

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

EDERLAN DE SOUZA FERREIRA

**Vicilinas de leguminosas e seus efeitos no
metabolismo lipídico de ratos dislipidêmicos**

**ARARAQUARA, SP
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

EDERLAN DE SOUZA FERREIRA

Vicilinas de leguminosas e seus efeitos no metabolismo lipídico de ratos dislipidêmicos

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de
Doutor em Alimentos e Nutrição, área de Ciência
dos Alimentos.*

Prof. Dr. VALDIR AUGUSTO NEVES
ORIENTADOR

**ARARAQUARA, SP
2013**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Ferreira, Ederlan de Souza

F383v Vicilinas de leguminosas e seus efeitos no metabolismo lipídico de ratos
dislipidêmicos / Ederlan de Souza Ferreira. – Araraquara, 2013
205 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Alimentos e Nutrição

Orientador: Valdir Augusto Neves

1. Leguminosas. 2. Vicilinas. 3. Colesterol. 4. Triacilglicerideo. 5.
Expressão gênica. I. Neves, Valdir Augusto, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

**“VICILINAS DE LEGUMINOSAS E SEUS EFEITOS NO METABOLISMO LIPÍDICO
DE RATOS DISLIPIDÊMICOS”**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado do candidato ***Ederlan de Souza Ferreira***, em sessão pública realizada em 04/06/2013.

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves (Orientador)

Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli (Membro titular)

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Membro titular)

Profa. Dra. Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre (Membro titular)

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior (Membro titular)

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas (Membro suplente)

Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini (Membro suplente)

Araraquara, 04 de junho de 2013.

Dedico este estudo,

AOS MEUS AVÓS,

Mariana Costa de Souza e Donaciano Ferreira de Souza,

que sempre me ampararam, mesmo nos momentos contrários às suas opiniões.

AOS MEUS PAIS,

Antônia de Souza Ferreira e Ademar Ferreira da Silva,

pelo apoio pleno, em todos os meus desafios escolhidos, e o mais importante, pela

lição de vida.

Meus agradecimentos,

Ao professor e grande amigo, Valdir Augusto Neves, por toda contribuição científica, profissional e pessoal proporcionada durante todos esses anos;

À Prof^a. Dr^a. Aureluce Demonte, pelos incentivos durante este período especial da minha vida;

Aos docentes do programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, pela diversidade de experiências vivenciadas durante o período de Mestrado e Doutorado;

À todos os técnicos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo carinho, experiências, auxílios e momentos de confraternização;

Ao Dr. Rogério Vieira, pesquisador da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pela doação dos feijões utilizados na pesquisa;

Ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli e colegas, do laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos da FCF, pela contribuição nas análises expressão gênica;

Ao Prof. Dr. Marcello Duranti e colegas, da Facoltà Agraria da Università degli Studi di Milano, pela singular experiência concedida no período do doutorado-sanduíche;

Aos meus familiares e amigos distantes, mas sempre tão presentes durante este período da minha vida,

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), pelo apoio acadêmico e financeiro;

À CNPq, CAPES, FUNDUNESP e FAPESP, pelo auxílio financeiro;

E por fim, aos amigos presentes... Não há necessidade de palavras!

Meu agradecimento muito especial,

*Novamente, àqueles que me confiaram à guarda, e que foram fundamentais para a
realização desse estudo. Registro aqui meu sincero agradecimento.*

"Um pensamento me vem à mente uma vez que o ritmo frenético de ensino e pesquisa se torna uma lembrança. Quaisquer que sejam os motivos, se a curiosidade ou a ambição, geralmente uma combinação de ambos, só perto do final é que uma pessoa aprecia totalmente as recompensas e privilégios que vem com uma carreira na ciência. Assim, tanto melhor se os resultados provarem ter algum grau de permanência. A ciência é de fato um empreendimento glorioso, e tem sido para mim, eu admito, um glorioso entretenimento"

*Konrad Bloch (1912-2000)
(versão traduzida)*

"One thought comes to mind once the hectic pace of teaching and research becomes a memory. Whatever the motives, whether curiosity or ambition usually a combination of both only near the end does one fully appreciate the rewards and privileges that go with a career in science. So much the better if the results should prove to have some degree of permanence. Science is indeed a glorious enterprise, and has been for me, I admit, glorious entertainment"

*Konrad Bloch (1912-2000)
Nobel de Fisiologia/Medicina de 1964*

RESUMO

Estudos em animais e humanos têm demonstrado que as proteínas de leguminosas exercem um efeito redutor do colesterol e triacilglicerídeos. Neste cenário, a ação da proteína β -conglícinina de soja tem sido notadamente confirmada. Recentemente, proteínas de outras espécies também têm recebido atenção, em parte pela homologia à da soja. No presente estudo foram avaliados os efeitos da administração das proteínas do tipo vicilina (7S) isoladas da soja (*Glycine max* L. Merrill), feijões caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) e adzuki (*Vigna angularis* Willd), em ratos dislipidêmicos induzidos pela dieta. A mais relevante constatação observada neste estudo foi que as proteínas exerceram uma importante atividade hipocolesterolêmica. Os animais tratados com a β -conglícinina apresentaram menores concentrações séricas de colesterol total, não-HDL-c e triacilglicerídeos em 22, 39 e 21%, respectivamente, e os tratados com a β -vicilina do caupí e adzuki apresentaram redução dos níveis de colesterol (entre 32-33%) e não-HDL-c (entre 53-54%) superiores aos efeitos observados pela sinvastatina (colesterol -21% e não-HDL -31%). Embora o mecanismo de ação dessas proteínas ainda não seja totalmente conhecido, uma hipótese observada no estudo foi à alteração na expressão de genes da ácido graxo sintase (FAS, menores entre 10-28%), HMG-CoA redutase (menores entre 12-48%), HMG-CoA sintase (menores entre 74-83%), fatores regulatórios da síntese do colesterol e triacilglicerídeos, SREBP-2 (menores entre 33-57%) e receptor de LDL (aumentado entre 12-93%). Estes resultados fornecem evidências para o reconhecimento da ação hipocolesterolêmica exercida por essas proteínas, e contribuem aos achados da literatura que atribuem esse efeito, em parte, a regulação de mRNA de enzimas e fatores regulatórios relacionados ao metabolismo dos lípides.

Palavras-chave: Leguminosas. Vicilinas. Colesterol. Triacilglicerídeo. mRNA. Ratos.

ABSTRACT

Studies in animals and humans have shown that proteins of legumes exert a lowering effect on cholesterol and triacylglycerides. In this scenario, the action of the protein β -conglycinin from soybean has been remarkably confirmed. Recently, proteins from other species have also received attention in part by homology to the soybean. In the present study, we evaluated the effects of administration of type-vicilin proteins (7S) isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill), cowpea beans (*Vigna unguiculata* L. Walp) and adzuki (*Vigna angularis* Willd) in dyslipidemic rats induced by diet. The most significant finding in this study was that the proteins exerted an important hypocholesterolemic activity. The animals treated with β -conglycinin had lower serum concentrations of total cholesterol, non-HDL-C and triacylglycerides in 22, 39 and 21%, respectively, and those treated with cowpea and adzuki β -vignin showed minors levels of cholesterol (between 32-33%) and non-HDL-C (between 53-54%) greater than the effects observed for simvastatin (-21% cholesterol, non-HDL -31%). Although the mechanism of action of these proteins is not yet fully understood, a hypothesis observed in the study was the change in gene expression of fatty acid synthase (FAS, minor between 10-28%), HMG-CoA reductase (minor between 12-48 %), HMG-CoA synthase (between 74-83% lower) regulatory factors synthesis of cholesterol and triacylglycerides, SREBP-2 (minor between 33-57%) and LDL receptor (increased between 12-93%). These results give evidence for the recognition of hypocholesterolemic action exerted by these proteins, and contribute to findings that attribute the effect to the regulation of mRNA of enzymes and regulatory factors related to lipid metabolism.

Keywords: Legumes. Vicilins. Cholesterol. Triacylglycerides. mRNA. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Fluxograma das etapas de isolamento da β -conglícinina (7S) de soja	53
Figura 2	- Fluxograma das etapas de isolamento da β -vignina do feijão caupí	54
Figura 3	- Fluxograma das etapas de isolamento da β -vignina do feijão adzuki	55
Figura 4	- Alinhamento sequencial das vicilinas (7S) de soja, caupí e adzuki	73
Figura 5	- Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras, e representação gráfica da análise de densitometria das proteínas de soja	76
Figura 6	- Cromatograma obtido em coluna Sepharose CL-6B a partir do fracionamento da β -conglícinina (7S) isolada	77
Figura 7	- Cromatografia do pico obtido em coluna de Sepharose CL-6B, e eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras do pico da β -conglícinina de soja	78
Figura 8	- Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras, e representação gráfica da análise de densitometria das proteínas do feijão caupí	81
Figura 9	- Cromatograma em coluna de Sepharose CL-6B da β -vignina (7S) do feijão caupí, e eletroforese em gel poliacrilamida em condições redutoras	82
Figura 10	- Eletroforese em gel de SDS-PAGE em condições redutoras, e representação gráfica da análise de densitometria das proteínas do feijão adzuki	85
Figura 11	- Cromatograma obtido em coluna de Sepharose CL-6B, e SDS-PAGE em condições redutoras da β -vignina (7S) do feijão adzuki	87
Figura 12	- Mapa eletroforético bidimensional do extrato protéico total, e da β -vignina obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B do feijão caupí	89
Figura 13	- Mapa eletroforético bidimensional do extrato protéico total, e da β -vignina obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B do feijão adzuki	90
Figura 14	- Gráfico de estimativa da massa molecular por filtração em gel em coluna Sephadex G200, da proteína β -vignina dos feijões caupí e adzuki obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B	92
Figura 15	- Análise de detecção de polipetídeos glicosilados por meio da reação com concanavalina A/peroxidase	94
Figura 16	- Cruzamento entre o soro anti- β -conglícinina com a proteína	

	β -vignina dos feijões caupí e adzuki obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B	97
Figura 17	– Cruzamento entre o soro anti- β -vignina do feijão caupí com as proteínas β -conglucina e β -vignina do feijão adzuki obtidas por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B	98
Figura 18	– Cruzamento entre o soro anti- β -vignina do feijão adzuki com as proteínas β -conglucina e β -vignina do feijão caupí obtidas por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B	99
Figura 19	– Cruzamento entre o soro anti- α' da β -conglucina com a proteína β -vignina dos feijões caupí e adzuki	100
Figura 20	– Cruzamento entre o soro anti- α' da β -conglucina com as proteínas dos feijões caupí e adzuki.	100
Figura 21	– Efeito da dieta HC e dos diferentes tratamentos sobre o crescimento ponderal, e ingestão diária durante o período experimental	102
Figura 22	– Concentração plasmática de colesterol total, e triacilglicerídeos, em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	106
Figura 23	– Concentração plasmática da lipoproteína não-HDL, e lipoproteína HDL, em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	107
Figura 24	– Índice aterogênico de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos	108
Figura 25	– Concentração plasmática de glicose, e insulina, em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	110
Figura 26	– Concentração plasmática da lipoproteína lípase, e transaminase pirúvica, em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	111
Figura 27	– Concentração hepática de colesterol, e triacilglicerídeos, em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	115
Figura 28	– Quantidade hepática de lipídeos totais em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	116
Figura 29	– Quantidade de colesterol, e lipídeos totais presente nas fezes de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	117
Figura 30	– Análise histológica de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos	119
Figura 31	– Concentração relativa de expressão hepática do mRNA das enzimas ácido graxo sintase e málica de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	124

Figura 32	–	Concentração relativa de expressão hepática do mRNA das enzimas 7- α -hidroxilase e HMG-CoA redutase de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	125
Figura 33	–	Concentração relativa de expressão hepática do mRNA da enzima HMG-CoA sintase e do receptor de LDL de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	126
Figura 34	–	Concentração relativa de expressão hepática do mRNA para os fatores transcrpcionais SREBP-1c, e SREBP-2 de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	128
Figura 35	–	Concentração relativa de expressão hepática do mRNA para o fato transcrpcional PPAR- α de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Composição química da dieta e tratamento dos diferentes grupos experimentais	64
Tabela 2	– Sequências dos iniciadores utilizados na análise de real-time qRT-PCR	71
Tabela 3	– Massa molecular (MM), percentual relativo (%) e mobilidade relativa (Rf) das subunidades presente no extrato protéico total e da proteína β -conglucina (7S) isolada de soja	76
Tabela 4	– Massa molecular (MM), percentual relativo (%) e mobilidade relativa (Rf) das subunidades presente no extrato protéico total e da proteína β -vigna (7S) isolada do feijão caupí	80
Tabela 5	– Massa molecular (MM), percentual relativo (%) e mobilidade relativa (Rf) das subunidades presente no extrato protéico total e da proteína β -vigna (7S) isolada do feijão adzuki	84
Tabela 6	– Ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente alimentar e excreção fecal dos grupos experimentais	104
Tabela 7	– Biometria de tecidos e índices dos grupos experimentais	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN	American Institute of Nutrition (Instituto Americano de Nutrição)
Apo	Apolipoproteína
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CYP7A	Enzima 7-alfa hidroxilase
DCVs	Doenças cardiovasculares
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
FDA	Food and Drug Administration (Órgão Americano responsável pelo controle de alimentos, medicamentos e derivados)
HepG2	Hepatocellular cells (<i>Cultura de célula hepática humana</i>)
HMG-CoA	3-hidroxil-3-metilglutaril coenzima A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
NCDs	Non-communicable diseases (Doenças crônicas não-transmissíveis)
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
S	Svedberg
SREBP	Proteínas ligante do elemento regulatório de esterol

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
Vicilinas de leguminosas e seus efeitos no metabolismo lipídico em ratos dislipidêmicos	
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	22
3 FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Material	50
4.2 Métodos	50
4.2.1 Preparo do material	50
4.2.2 Extração, isolamento e caracterização das proteínas	50
4.2.3 Determinação da proteína	56
4.2.4 Cromatografia de filtração em gel	56
4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	56
4.2.6 Eletroforese bidimensional	57
4.2.7 Estimativa do peso molecular	58
4.2.8 Detecção de glicopolipeptídeos	58
4.2.9 Anticorpos policlonais	58
4.2.10 Análise por “ELISA”	59
4.2.11 Análise por “immunoblotting”	60
4.2.12 Animais, dieta e protocolo experimental	61
4.2.13 Parâmetros experimentais	62
4.2.14 Análises bioquímicas séricas e índices	63
4.2.15 Análises hepáticas e da excreção fecal	65
4.2.16 Análise histológica	66
4.2.17 Extração do RNA total	66
4.2.18 Quantificação do RNA total e cDNA	67
4.2.19 Análise do RNA total por eletroforese em gel de agarose	67
4.2.20 Transcrição reversa	68
4.2.21 Análise do cDNA por eletroforese em gel de agarose	68
4.2.22 Oligonucleotídeos iniciadores	69
4.2.23 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e	

quantificação absoluta	69
4.2.24 Análise estatística	70
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	72
5.1 Caracterização das vicilinas	72
5.1.1 β -conglícinina da soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill)	75
5.1.2 β -vignina do feijão caupí (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp)	78
5.1.3 β -vignina do feijão adzuki (<i>Vigna angularis</i> Willd)	83
5.1.4 Caracterização eletroforética bidimensional	87
5.1.5 Estimativa da massa molecular	91
5.1.6 N-glicosilação e outras análises	93
5.2. Reconhecimento imunoenzimático	95
5.3 Efeitos sobre o metabolismo lipídico <i>in vivo</i>	101
5.3.1 Parâmetros biométricos	101
5.3.2 Indicadores bioquímicos	105
5.3.3 Indicadores hepáticos e fecais	113
5.3.4 Indicadores histológicos	118
5.3.5 Indicadores de expressão gênica	120
6 CONCLUSÃO	134
REFERENCIAS	135
APÊNDICES	146
ANEXO	167

CAPÍTULO II 168

**β -conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct
hypocholesterolemic effects in rats**

(Artigo publicado: Ferreira et al. *Lipids in Health and Disease* 2012, 11:11)

CAPÍTULO III 177

**Hypocholesterolemic effect of oral doses of vicilins from cowpea and adzuki
beans in rats**

(Artigo submetido: Ferreira et al. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2013)

Capítulo I

**Vicilinas de leguminosas e seus efeitos no metabolismo lipídico em ratos
dislipidêmicos**

1 INTRODUÇÃO

As plantas da família das leguminosas representam a terceira maior entre as angiospermas, compreendendo aproximadamente 730 gêneros com mais de 19,400 espécies, sendo considerada a primeira em importância agrícola e econômica dentre as Dicotiledôneas, muito embora apenas 20 espécies pertencentes à subfamília *Papilionoideae* seja cultivada como fonte de alimentos, como mostrado por Lewis e seus colaboradores (2005). Por outro lado, ainda que os grãos provenientes a partir das leguminosas representem a segunda posição na produção mundial de alimentos, estes, segundo Duranti et al. (2006) fornecem proteína em quantidade e qualidade considerada superiores quando comparado aos grãos de cereais. Lourenço (2000) reportou que as sementes frequentemente mais utilizadas na alimentação humana pertencem aos gêneros *Phaseolus*, *Pisum*, *Vicia*, *Lens*, *Dolichos* e *Vigna*. Além disso, os estudos a partir desses e outros gêneros das leguminosas, tais como, *Glycine*, *Lupinus*, *Cicer*, *Canavalia* e *Cajanus*, em diferentes áreas do conhecimento como na genética, agronomia, bioquímica, economia e ciência dos alimentos, têm sido incitados devido à sua importância nutricional e também econômica reconhecida, em parte, por apresentarem característica de acumularem, no cotilédone, grandes quantidades de proteínas durante o desenvolvimento, em virtude da necessidade de realização de suas funções catalíticas, estruturais e de reserva nutricional (CARBONARO, 2000). Desta maneira, Scarafoni et al. (2007) legitimaram o reconhecimento às sementes de leguminosas como uma importante e valiosa fonte de proteína da alimentação humana.

As sementes empregadas na dieta contêm de 18 a 30% de proteína, exceto a soja e tremço com quantidades variáveis de 35 a 45% (SCARAFONI et al. 2007).

Segundo a mais recente classificação proposta por Fukushima (1991), este conteúdo proteico na sua totalidade constitui-se de uma heterogeneidade de proteínas que são classificadas em proteína de reserva, estrutural e com atividade biológica, nesta última incluem as lectinas, enzimas e os inibidores enzimáticos. Por outro lado, as proteínas de reserva são não enzimáticas e têm o propósito de fornecerem nitrogênio e enxofre durante o desenvolvimento da planta, sendo que nas sementes de leguminosas elas representam cerca de 90% do total protéico.

As proteínas de reserva ou de armazenamento como também são denominadas foram empiricamente classificadas por Osborne (1924), de acordo com as suas características de solubilidade em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções hidroalcoólicas) e glutelinas (solúveis em soluções ácidas, alcalinas ou na presença de SDS). No entanto, as albuminas e globulinas são concebidas como proteínas de armazenamento das dicotiledôneas, enquanto que as prolaminas e glutelinas são majoritárias nas monocotiledôneas. Desta maneira, as proteínas dos grãos são constituídas por essas duas classes principais, as albuminas e globulinas que compreendem proteínas com coeficiente de sedimentação entre 1,6S-2S e 7-13S (S, *Svedberg*), e que compõem aproximadamente entre 8-20% e 40-70%, respectivamente, da proteína total das sementes de leguminosas. Utsumi (1992) demonstrou que as globulinas representam entre 50-90% de toda a proteína encontrada nos grãos de leguminosas. Isto legitima as globulinas como a proteína de reserva majoritária entre as estas sementes.

Derbyshire et al. (1976) reportaram que esta fração proteica constitui-se geralmente de duas proteínas principais, denominadas de globulina do tipo vicilinas e leguminas, sendo usualmente classificadas em proteínas 7S e 11S,

respectivamente, e uma minoritária, as globulinas 2S. Em termos gerais, esta última é considerada uma família de proteínas de reserva adicional de menor importância nas leguminosas, geralmente monoméricas e de baixo peso molecular. Por outro lado, as globulinas 7S (vicilinas) são proteínas formadas por um trímero de cadeias polipeptídicas de massa molecular entre 150-190 kDa, e que apresentam subunidades glicosiladas entre 50-75 kDa, porém, sua conformação nativa não apresenta interações intra e intermoleculares por ligações covalente de dissulfeto, devido a ausência na sequência primária do aminoácido cisteína, enquanto que as globulinas 11S (leguminas) são complexos oligoméricos com massa molecular entre 270-350 kDa formados por 6 pares de subunidades, sendo que cada subunidade é composta por uma cadeia polipeptídica maior ácida e uma segunda menor básica, ligada por uma única ligação dissulfeto. Geralmente não são glicosiladas, embora alguns estudos tenham descrito a presença de pequenas quantidades de carboidrato entre 0,5-1%.

Mandal e Mandal (2000) salientaram que embora as proteínas de reservas de diferentes sementes de leguminosas, ou mesmo numa mesma espécie pareçam demonstrar significativas diferenças em suas propriedades físico-químicas, estruturais e também no aproveitamento biológico, o advindo das novas ferramentas e tecnologias, consequentemente à ampliação do conhecimento e detalhamento sobre a sequência primária das proteínas, tem sido identificado uma elevada homologia e reconhecimento interespecies. Vários estudos têm sugerido que vicilinas (7S) encontradas em distintas sementes de leguminosas apresentam genes ancestrais comuns, e que suas propriedades similares tais como, sequência de aminoácidos e N-terminal, digestibilidade, reconhecimento imunológico e atividade biológica são decorrentes de uma evolução genética convergente (GEPTS et al.

2005; DOYLE e LUCKOW, 2003; BORROTO e DURE, 1987; ARGOS et al. 1985). Esta constatação torna-se de fundamental importância, haja vista que determinadas proteínas têm sido consideradas precursoras de peptídeos biologicamente ativos. Desta maneira, proteínas de outras espécies que apresentassem uma semelhança sequencial de aminoácidos, a esta com ação já estabelecida, por exemplo, teriam maiores probabilidades eventualmente de exercerem a mesma atividade.

Recentemente, vários estudos com distintas abordagens têm relacionado à ação de peptídeos originados da digestão de proteínas dos grãos de leguminosas, em diversos eventos fisiológicos. Entre estas, estão: atividade antihipertensiva, hipocolesterolêmica, antiobesidade, antioxidante, capacidade de ligação com minerais, anticâncer, imunomoduladora, antimicrobiana e opióide (PAK et al. 2012; CONSONNI et al. 2011, 2010; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010, 2008; CHO et al. 2008; ALUKO, 2008; SHAHIDI e ZHONG, 2008; DZIUBA e DAREWICZ, 2007; YOSHIKAWA et al. 2000; YAMAMOTO, 1997; WEBB et al. 1992). De fato, há tempos as proteínas dos alimentos não são consideradas apenas fontes de aminoácidos, mas também como um elemento capaz de desempenhar outras atividades específicas no organismo, em especial a partir das sementes de leguminosas onde os estudos têm sido bem mais evidentes.

Para tanto, a capacidade de uma proteína em gerar peptídeo durante a sua digestão gastrointestinal com características favoráveis para alcançar a corrente sanguínea, tem sido considerada ainda uma condição fundamental. Embora os mecanismos envolvidos permaneçam ainda pouco esclarecidos, de alguma maneira direta ou indiretamente alguns peptídeos parecem modificar determinados fatores relacionados ao metabolismo. Exemplo disso, os estudos realizados por Lovati et al. (2008, 2000) observaram *in vitro* que a proteína β -conglícinina da soja promovia

aumento da captação de LDL-c, devido ao acréscimo na expressão de receptores de LDL em células Hep-G2 (células hepáticas humanas). Outros pesquisadores com destaque para os grupos de Japoneses, Aoyama et al. (2001), Fukui et al. (2004) e Moriyama et al. (2004) mostraram em estudos *in vivo* que a β -conglícinina administrada como única fonte proteica na dieta promovia significativa redução sérica e hepática de colesterol, associado com aumento da atividade da enzima carnitina palmitoiltransferase, acil-CoA oxidase, 7- α hidroxilase e redução da ácido graxo sintase.

A partir dessas hipóteses, um corpo de evidências tem relacionado às proteínas encontradas nas leguminosas a melhora das desordens lipídicas. Assim, fundamentado nesses e em outros resultados já observados quanto à ação exercida pela proteína de soja, bem como por proteínas de outras espécies, alguns autores têm sugerido que outras proteínas poderiam também exercer efeito semelhante à soja sobre as desordens lipídicas (BETTZIECHE et al. 2008; LOVATI et al. 2008; SCARAFONI et al. 2007; DURANTI et al. 2006; DABAI et al. 1996). Evidentemente, que os determinantes, assim como os mecanismos envolvidos na ação de tais proteínas encontram-se distantes de uma compreensão definitiva que relacione a ingestão dessas com a regulação do metabolismo lipídico, com exceção talvez, da soja, que recentemente tem acumulado um corpo de evidências. Nesse sentido, este estudo se propôs a investigar o efeito da administração das vicilinas isoladas da soja (*Glycine max* L. Merrill), feijão caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) e feijão adzuki (*Vigna angularis* Willd) no metabolismo lipídico de ratos alimentados com uma dieta indutora da dislipidemia, assim como compará-las aos efeitos observados com a sinvastatina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito exercido pela proteína vicilina isolada da soja, feijão caupí e feijão adzuki, administradas oralmente durante 28 dias, sobre parâmetros relacionados ao metabolismo lipídico de ratos dislipidêmicos induzidos pela dieta.

2.2 Objetivos específicos

Separar, isolar e caracterizar a proteína vicilina da soja, feijões caupí e adzuki;

Verificar os efeitos da administração das proteínas sobre as concentrações de lipídios dos indicadores plasmático, hepático e fecal;

Observar por meio de análise histológica alterações sobre o tecido celular hepático;

Verificar alterações na concentração relativa do mRNA das enzimas ácido graxo sintase, málica, HMG-CoA redutase, HMG-CoA sintase, 7- α -hidroxilase, receptor de LDL, fatores transcricionais SREBP-1c, SREBP-2 e PPAR- α , no tecido hepático;

Comparar os efeitos ocasionados pela administração das vicilinas, aos observados pelo tratamento com sinvastatina.

3 FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

3.1 Doenças cardiovasculares – Saúde pública

Estudos epidemiológicos têm apresentado dados contundentes que estabelecem as doenças crônicas não-transmissíveis (NCDs - *non-communicable diseases*) como um notório desafio neste século não apenas para as questões de saúde pública, mas também ao crescimento econômico global. Nesta questão, um primeiro ponto de destaque é o aumento na prevalência das NCDs que tem sido considerado o resultado da convergência entre saúde, crescimento econômico e desenvolvimento, fortemente atrelados às tendências universais como o envelhecimento da população mundial, avanço da urbanização e de um estilo de vida menos saudável, todos como revérbero da globalização (BLOOM et al. 2012; WHO 2011). Além disso, as NCDs têm representado a principal causa de morte nas últimas duas décadas no mundo. Os dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde mostram que as NCDs foram responsáveis por 36 das 57 milhões de mortes no mundo em 2008. Contrário ao que se pensa, os países de baixa e média renda são os mais afetados, juntos eles compreendem 80% das mortes provocadas por esses agravos (YUSUF et al. 2002). Este número representou 63% de todas as mortes ocorridas no período, sendo que as doenças cardiovasculares (DCV), a principal causa representou 48%, seguido dos casos de cânceres (21%), doenças respiratórias crônicas (12%) e diabetes (3%).

As projeções indicam que o número de mortes devido as DCV passará de 17 milhões (2008) para 25 milhões até 2030. Nos Estados Unidos, por exemplo, estes agravos corresponderam por 38,5% das mortes em 2001, sendo observada uma redução para 35% no ano 2008. Os dados da prevalência Americana foram

próximos aos observados em outros países, como Argentina (33%), França (30%) e Inglaterra (34%). Países como Alemanha (45%), Croácia (50%), Finlândia (41%) e República Checa (50%) têm apresentado os maiores índices de prevalência deste tipo de morte no mundo. No Brasil, houve um menor crescimento da prevalência nos últimos anos, porém, não menos preocupante. Em 2008, o percentual de mortes relacionadas às DCVs foi de 35%. No ano de 2005, a prevalência era de 32%, e em 1998 representou 27%. De acordo com as conclusões da entidade, fatores como dieta, inatividade física e uso do tabaco, juntos, são responsáveis por 80% dos episódios coronarianos e cerebrovasculares decorrente da aterosclerose (OMS 2011).

Swirski e Nahrendorf (2013) em uma recente revisão sobre a aterosclerose descreveram que a ideia da doença simplesmente como um lento e passivo processo de deposição de gordura na parede dos vasos sanguíneos, hoje está sendo vista como uma inflamação crônica complexa que se inicia de uma desordem no metabolismo lipídico, especificamente da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c). No entanto, também envolve fatores como idade, estilo de vida, genético, imunológico, endócrino, circulatório e do sistema nervoso.

A hipótese alegada, na qual a LDL oxidada seja a responsável pelos eventos iniciais do desenvolvimento da aterosclerose tem sido demonstrada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. Isto resulta da LDL apresentar maior suscetibilidade à oxidação, e do tempo de permanência na corrente sanguínea em relação às demais lipoproteínas, o que explicaria pelo menos em parte sua característica pró-aterogênica (KOBAYASHI e HIRANO, 2011; CHEN et al. 2007). Deste modo, muitos estudos são unânimes perante a alegação na qual a dislipidemia, especialmente hipercolesterolemia deva ser considerada a principal causadora do desenvolvimento

da aterosclerose, e obviamente das DCVs (BAIK et al. 2013; OHSAWA e TANNO, 2013; BLOOM et al. 2012; TAVRIDOU e MANOLOPOULOS, 2008; LEHRKE et al. 2005; MAXFIELD e TABAS, 2005). O National Cholesterol Education Program (NCEP), fundamentado nessas e em outras evidências reconheceu a hipercolesterolemia como o pré-requisito para a aterosclerose (NCEP, 2011), e estabeleceu desde o seu primeiro relatório (NCEP I, 1988) e consolidado no segundo (NCEP II, 1993), a prevenção primária tendo a redução da LDL como objetivo principal para a diminuição do risco de eventos cardiovasculares.

Evidentemente que esta compreensão da dislipidemia como elemento desencadeador das DCVs só foi possível devido às quatro últimas décadas de estudos e observações clínicas, como foi descrito por Grundy (2000). Não obstante, as concentrações plasmáticas das lipoproteínas tornaram-se alvo principal dos estudos em relação ao tratamento que tem sido intensificado nos últimos anos. O controle dietético, embora seja limitado, é considerado ainda essencial independente do grau da dislipidemia e tratamento farmacológico selecionado (NCEP, 2011).

3.2 Considerações sobre o metabolismo dos lípidos

A relação negativa entre os distúrbios lipídicos, obesidade, diabetes e aterosclerose tem sido definitivamente comprovada nos últimos 20 anos, devido ao grande acúmulo de evidências científicas observadas tanto em ensaios experimentais quanto em clínicos que atribuem às principais manifestações das doenças ligadas à desregulação do metabolismo das lipoproteínas (EATON, 2005). No entanto, sabe-se que os lipídeos exercem importantes funções biológicas. Estes são considerados essenciais na constituição das membranas celulares, representam a melhor forma de reserva energética biológica, e atuam como sinalizadores de

diversos eventos intra e intercelulares. Em condições normais, a regulação do metabolismo lipídico dá-se por uma interação complexa com outros sistemas metabólicos, especialmente o dos carboidratos.

Os lipídeos consistem de ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídios, esfingolipídios, colesterol e derivados. Os primeiros, considerados importantes componentes da membrana celular, são ácidos carboxílicos constituídos de longas cadeias laterais de hidrocarbonetos, sendo que os mais comuns no sistema biológico compreendem entre 12-24 números de carbonos, podendo ou não apresentar duplas ligações. Já os triacilglicerídeos representam aproximadamente 90% de todo o componente lipídico biológico, e embora não sejam componentes de membrana são considerados a forma mais eficiente de armazenamento e a maior fonte energética nos mamíferos, inclusive dos humanos. Geralmente, são formados de uma molécula de glicerol esterificada com três ácidos graxos podendo ser semelhantes ou não entre as diferentes posições. Já os componentes de esteroides são derivados ciclopentanoperidrofenantreno que consistes de quatro anéis aromáticos conjugados. O colesterol é o principal representante deste grupo, e também o componente lipídico mais abundante na membrana plasmática. Além disso, nos mamíferos em especial, este, é precursor metabólico de hormônios esteroides que regulam diversas funções fisiológicas essenciais ao organismo (COLEMAN e BELL, 1976).

A desregulação do metabolismo lipídico em qualquer que seja o momento, tem demonstrado desencadear importantes consequências biológicas. Nesse contexto, a obesidade tem sido destacada pela sua crescente prevalência em todo o mundo. A obesidade é considerada um grave problema de saúde pública que até alguns anos anteriores era tido como uma preocupação quase que exclusiva de

países mais desenvolvidos, porém, atualmente tem sido observado um rápido aumento na incidência nos países de média e baixa renda (LOW et al. 2009). Este estado tem como principal característica o aumento do peso corpóreo. Geralmente, provocado pela maior oferta de caloria a partir dos alimentos, e que, conseqüentemente, tem demonstrado desencadear o aumento do tamanho e número de células adipócitas responsáveis pelo armazenamento dos lipídeos. No entanto, a deposição de gordura corporal tem sido demonstrada como resultado do balanço entre a disponibilidade e mobilização de lipídeos no tecido adiposo para produção de energia, sendo dependente da velocidade de síntese dos triacilglicerídeos nos tecidos, especialmente no adiposo e hepático (GAAL et al. 2006).

3.2.1 Via exógena do metabolismo de lípidos

Já está bem estabelecido na literatura o conhecimento sobre a via metabólica endógena e exógena para produção e obtenção de lipídeos, respectivamente. A ingestão de alimentos fornece uma mistura de nutrientes ao organismo. Neste meio se encontram os lipídeos (via exógena) na forma de triacilglicerídeos, fosfolipídios e colesterol. Estes são digeridos, absorvidos no intestino em meio à interface lipídeo-água, na qual ocorre pela participação dos sais biliares como agente emulsificantes, e que combinado com os movimentos peristálticos do intestino delgado proporcionam o aumento da ativação interfacial, possibilitando assim, a ação da enzima lipase pancreática. A enzima hidrolisa as moléculas de triacilglicerídeos nas posições 1 e 3, gerando ao final do processo ácidos graxos livres, monoacilglicerídeo, fosfolipídios e colesterol livre que são absorvidos nos enterócitos. No interior da célula, os ácidos graxos livres são

complexados à proteína intestinal ligadora de ácidos graxos (*FABP - fatty acid-binding protein*). Desta forma evitando dano à célula devido ao seu efeito detergente, e os tornando mais solúveis no meio citoplasmático. Ainda no interior dos enterócitos, os ácidos graxos são convertidos novamente a triacilglicerídeos que associado ao colesterol e a apolipoproteína (apo) B-48 são organizados em partículas lipoprotéicas conhecidas como quilomícrons, que na sua superfície apresentam as apolipoproteínas A-I, A-II e A-IV com a função de receptores de membrana. Os quilomícrons (recém formados) são secretados na linfa intestinal e transportados pelos vasos linfáticos até alcançarem a corrente sanguínea, vasos e capilares.

Na circulação, por um mecanismo ainda não bem compreendido, os quilomícrons recebem da lipoproteína de alta densidade (HDL) as apolipoproteínas C-II e E, assim, tornam-se capazes de ativar a lipoproteína lípase que por sua vez irá hidrolisar os triacilgliceróis, após aderirem a sítios na superfície do endotélio no músculo esquelético e tecido adiposo. Outro evento ainda pouco esclarecido ocorre pela presença da HDL que recebe uma parte dos fosfolipídios superficiais, colesterol livre e apo-C dos quilomícrons. Desta maneira, as partículas de quilomícrons vão sendo reduzidas até atingirem a condição de quilomícrons remanescentes com a característica de serem partículas ricas em colesterol. Tomado essa condição, esses se dissociam do endotélio e retornam à circulação. Os quilomícrons remanescentes são captados pelo fígado por endocitose através dos receptores de LDL-c, apo C-III, apo-E e receptor LRP que serão posteriormente hidrolisados nos lisossomos. O resultado é um “pool” de colesterol, glicerol e ácidos graxos a serem utilizados para produção de energia ou armazenado para posteriormente serem utilizados de acordo às necessidades biológicas. Portanto, em resumo os quilomícrons

transportam os triacilgliceróis e o colesterol exógenos, sendo estes primeiros transferidos aos tecidos musculares e adiposos, enquanto que o segundo é levado ao fígado (DEBOSE-BOYD, 2008).

3.2.2 Via endógena do metabolismo de lípidos

O caminho endógeno dos lipídeos é considerado particularmente importante, sobretudo, porque este mecanismo leva em conta a “contribuição” exógena na regulação da síntese, secreção e utilização do colesterol e triacilgliceróis. Mazein et al. (2013) reportaram a biossíntese do colesterol e ácidos graxos como uma central de numerosos processos biológicos inerentes à saúde e doença. Desta maneira, durante evolução celular foram criados mecanismos complexos que regulam a produção e distribuição a fim de evitar danos a própria célula. Isto pode ser observado no caso de uma depleção de esteróis ou triacilgliceróis, onde os mecanismos celulares são levados a aumentar a absorção e a lipogênese “*de novo*” que, conseqüentemente, reduz o efluxo celular. Por outro lado, numa condição contrária, ocasionada pelo excesso de colesterol e ácidos graxos livres, os mecanismos são reprogramados por “*feedback*”, a fim de diminuir a absorção e a síntese. Assim, o efluxo de colesterol via tecido periférico torna-se ativo novamente. No entanto, uma falha neste processo compensatório provoca o acúmulo de colesterol e ácidos graxos que são esterificados em ésteres de colesterol e triacilglicerídeos, respectivamente, e então, incorporados ao citoplasma da célula (MAXFIELD e MEER, 2010).

Os triacilglicerídeos são sintetizados mais ativamente no fígado, intestino e no tecido adiposo, a partir de ésteres de acil-CoA graxa e glicerol-3-fosfato. Este primeiro representa os ácidos graxos que são todos formados do alongamento e

adição de duplas ligações, a partir do ácido graxo palmitato sintetizado (COLEMAN e LEE, 2004; COLEMAN e BELL, 1976). A síntese dos ácidos graxos acontece preferencialmente quando existe um excedente energético a partir dos carboidratos. O processo de lipogênese “*de novo*” que ocorre no citoplasma celular, se inicia pela carboxilação da acetil-coenzima A (CoA), precursora dos ácidos graxos, pela enzima acetil-CoA-carboxilase convertendo à malonil-CoA. As demais reações de síntese do palmitato a partir do malonil-CoA são dependentes da enzima ácido graxo síntase (FAS). Inicialmente o malonil-CoA preferencialmente, ou mesmo acetil-CoA diretamente, é condensado à proteína carreadora de acila (PCA), e posteriormente por uma série de condensações e reduções catalisadas pela FAS, ocorrem à adição sequencial de outras moléculas de malonil-CoA (JOSEPH et al. 2002; BOUCHARD 2000). O outro componente necessário para a síntese dos triacilgliceróis, o glicerol-3-fosfato é obtido do glicerol a partir da via exógena pela fosforilação catalisada pela glicose quinase, ou a partir do diidroxiacetona-fosfato um intermediário do metabolismo da glicose, catalisado pela enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase. A estrutura principal recebe então dois resíduos de ácidos graxos na posição 1, e depois na posição 2 pela ação catalítica das enzimas glicerol-3-fosfato-aciltransferase e 1-acilglicerol-3-fosfato-aciltransferase, respectivamente. Em seguida, a enzima ácido fosfatídico-fosfatase catalisa a formação do 1,2-diacilglicerol, e então, pela ação da diacilglicerol-aciltransferase catalisa a formação do triacilglicerol (SAGGERSON, 2008).

A síntese do colesterol é realizada por todas as células do organismo, porém, a maior produção endógena ocorre no fígado, onde se produz cerca de 10-20% de todo o colesterol sintetizado. Embora a síntese extra-hepática seja consideravelmente importante, toda a produção é transportada até o tecido hepático

(QUIMET, 2013). Konrad Block (1965), bioquímico Alemão dedicou sua vida acadêmica ao estudo do metabolismo lipídico, em especial ao do colesterol. Foi ele quem sugeriu que todos os carbonos da estrutura do colesterol são derivados do acetato, na qual este por sua vez, por uma série de reações a partir da acetil-CoA é convertido à unidade de isopreno e finalmente até ao colesterol. Olivier et al. (2000) reportaram que a síntese de colesterol perpassa ao menos por três diferentes compartimentos celulares, entre estes a mitocôndria, retículo endoplasmático, peroxissomas e citosol. A primeira reação é catalisada pela enzima acetoacetil-CoA tiolase que condensa duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. Em seguida, a acetoacetil-CoA é convertida a 3-hidroxil-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA), pela adição de uma terceira molécula de acetil-CoA catalisada pela 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintase. Estudos mais recentes têm demonstrado que estas reações podem ocorrer tanto no citossol, quanto na mitocôndria e nos peroxissomos celulares. As quatro próximas reações têm a finalidade de converter a HMG-CoA ao intermediário isoprenóide. Dessas, a primeira tem sido mostrado ocorrer no retículo endoplasmático e peroxissoma, sendo considerada a via limitante da biossíntese do colesterol, onde a enzima HMG-CoA redutase converte a molécula de HMG-CoA em mevalonato.

Posteriormente, pela ação da mevalonato-5-fosfotransferase forma-se o fosfomevalonato, em seguida, convertido a 5-pirofosfatomevalonato pela fosfomevalonato-cinase, e então, até isopentenil-pirofosfato catalisado pela pirofosfo-mevalonato-decarboxilase. Na sequência, outras três reações ocorrem a partir da molécula de isopentenil-pirofosfato para a conversão até farnesil-pirofosfato. Olivier et al. (2000) demonstraram que todas as reações entre o mevalonato até farnesil-pirofosfato ocorrem predominantemente nos peroxissomos

celulares. Outras duas reações ocorrem para a ciclização do esqualeno desempenhada pela enzima esqualeno sintase que catalisa a formação do lanosterol. Esta reação tem sido mostrada ocorrer exclusivamente no retículo endoplasmático. Finalmente, a conversão do lanosterol a colesterol, em um processo de 19 reações, cujas enzimas estão localizadas na própria membrana nos peroxissomos quanto no retículo endoplasmático.

3.2.3 Transporte e distribuição para os tecidos

O transporte do colesterol e triacilglicerídeo endógeno no plasma ocorre através de sua inserção no núcleo de partículas com revestimento anfifílico formado de proteínas e fosfolipídeos denominadas de lipoproteínas.

A primeira, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL - *Very low density lipoprotein*) é sintetizada nas células hepáticas, e assim como os quilomícrons sofre a ação da lipoproteína lípase e lecitina colesterol acil-transferase (LCAT) nos capilares dos tecidos musculares e adiposo, sendo progressivamente convertida em lipoproteína de densidade intermediária (IDL - *Intermediate density lipoprotein*), e que rapidamente alcança a condição de lipoproteína de baixa densidade (LDL - *Low density lipoprotein*), à medida que a quantidade de triacilglicerídeos e algumas de suas apolipoproteínas vai sendo reduzido. A LDL é considerada a principal transportadora de colesterol na corrente sanguínea, assim, exerce a função de fornecer colesterol aos tecidos periféricos. O processo de captação ocorre por endocitose, mediada por receptores de LDL (LDLr) localizada na membrana da célula e pela apolipoproteína B-100 da LDL. A função antagônica é realizada pela lipoproteína de alta densidade (HDL - *High density lipoprotein*), responsável pelo maior transporte reverso de colesterol endógeno. A HDL é sintetizada no fígado e

trato gastrointestinal, porém, torna-se ativa somente na circulação pela ação da enzima LCAT, na qual converte o colesterol a ésteres de colesteril e transfere algumas apolipoproteínas. Desta maneira, a lipoproteína torna-se eficiente na remoção de colesterol dos tecidos, mediada pelas proteínas transportadora ABC (*ATP - binding cassette*) A1, G1 e pela proteína SR-B1 (*Scavenger receptor class B member 1*). Além de ser captada diretamente pelo fígado por meio do receptor específico SR-B1, a HDL também transfere parte dos ésteres de colesterol novamente para as VLDLs e LDLs, mediada pela proteína de transferência éster de colesteril (CETP - *cholesteryl ester transfer protein*), no entanto, este mecanismo se encontra ainda pouco compreendido (MAZEIN et al. 2011; HEUVEL, 2009).

O colesterol transportado pelas lipoproteínas ao fígado poderá percorrer diferentes caminhos, podendo novamente ser incorporado às novas VLDLs, esterificado com ácidos graxos, levado a síntese de ácidos biliares ou mesmo diretamente excretado para a bile (suco biliar). O último é considerado a principal via de eliminação do colesterol. De fato, o conhecimento sobre o controle da biossíntese e transporte de colesterol encontra-se bem estabelecido na literatura. Sendo controlado a partir da regulação da atividade da enzima HMG-CoA redutase, turnover do receptor de LDL e da esterificação do colesterol pela ACAT (DEBOSE-BOYD, 2008; ZANNIS et al. 2006).

3.2.4 Alguns genes que participam da regulação metabólica dos lípidos

Pégorier et al. (2004) num estudo de revisão sobre a regulação da expressão de genes mediada por lipídeos demonstraram evidências suficientes nas quais os carboidratos, ácidos graxos e as proteínas poderiam modular através da

indução/supressão de genes que demonstram regular o metabolismo de forma independente da condição hormonal.

Além de desempenharem outras funções, como mostrado anteriormente, o colesterol e os ácidos graxos são os principais componentes das membranas celulares, portanto, esses são sintetizados de acordo com a necessidade celular. O tecido hepático tem sido mostrado como o principal local de síntese, sendo a produção regulada de acordo com os níveis intracelulares, por um sistema de “*feedback*”, modulado por diversos genes que codificam as enzimas lipogênicas, onde em ambos os processos iniciados a partir da acetil-CoA para acetoacetil-CoA ou malonil-CoA, até colesterol e palmitato, respectivamente, são controlados por uma família de fatores de transcrição chamadas de proteínas ligante do elemento regulatório de esterol (SREBPs - *Sterol regulatory element binding proteins*), e um segundo grupo, ligado aos aspectos do catabolismo dos lipídeos que incluem os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs - *Peroxisome proliferator activated receptors*) (RINGSEIS e EDER, 2011; HORTON et al. 2002; BROWN et al. 2000; BROWN e GOLDSTEIN, 1999). No entanto, tem sido demonstrado que as vias de biossíntese são reguladas de formas distintas. Ao passo que o controle da síntese do colesterol se apresenta fortemente dependente da quantidade intracelular, enquanto que a produção dos ácidos graxos é controlada em função da disponibilidade dos hidratos de carbono (carboidratos) (YE e DEBOSE-BOYD, 2011; LEE et al. 2008; AMEMIYA-KUDO et al. 2002; SHIMANO, 2001).

As SREBPs exibem três isoformas reconhecidas em mamíferos, são elas SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2, que são sintetizadas a partir de um precursor inativo ligado à membrana do retículo endoplasmático. Em uma situação que resulte

de privação do colesterol e/ou ácidos graxos, ocasionando consequentemente à diminuição intracelular, o mecanismo é ativado no qual o fragmento NH₂ terminal da SREBPs é proteoliticamente liberado. Assim, este migra até o núcleo, onde ativará o processo transcricional de genes envolvidos na síntese e o aumento da captação dessas moléculas. Quando alcançada à condição básica, o mecanismo proteolítico é interrompido, cessando assim os demais eventos de transcrição no núcleo, que culminará com a supressão da biossíntese e redução do influxo (YE e DEBOSE-BOYD, 2011; RINGSEIS e EDER, 2011). Já os PPARs são uma família de receptores nucleares que apresenta três isoformas o PPAR- α , PPAR- β e PPAR- δ que atuam na transcrição de genes envolvidos na regulação da β -oxidação e no metabolismo dos carboidratos. Im et al. (2010) reportaram que a isoforma α é expressa preferencialmente no tecido adiposo marrom e no fígado, enquanto que a β produzida predominante no tecido adiposo branco, onde desempenha uma importante função no processo de lipogênese e de diferenciação da célula adipócita.

Evidentemente que o conhecimento do número de genes envolvidos no metabolismo lipídico, bem como os próprios alvos das SREBPs e dos PPARs não se encontra ainda completamente elucidado (XIAO e SONG, 2013; LEE et al. 2008; HORTON, 2008; YOSHIKAWA et al. 2003). No entanto, os resultados dos estudos desta última década têm sugerido que a SREBP-2 está preferencialmente relacionado aos genes alvos da biossíntese de colesterol, tais como os ativadores/inibidores das enzimas HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase, farnesil difosfato sintase, esqualeno sintase, o receptor de LDL, e bem como da sua própria família. Enquanto que a SREBP-1c estaria preferencialmente associado ao metabolismo dos ácidos graxos e triacilglicerídeos, que incluiria as enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS), esteroil-CoA dessaturases,

glicerol-3-fosfato aciltransferase, proteína carreadora de acil-CoA. (HORTON et al. 2002; BROWN e GOLDSTEIN, 1997). Embora a SREBP-1a tenha mostrado ativar ambos os processos realizados preferencialmente pelas isoformas SREBP-1c e SREBP-2, a quantidade encontrada, pelo menos no tecido hepático, mostra-se pouco significativa comparada às outras duas (RINGSEIS e EDER, 2011).

Diversos estudos têm sugerido que determinados genes são os responsáveis diretos pelo controle do metabolismo lipídico, que contribuiria para a variação nos níveis plasmáticos de triacilglicerídeos, colesterol e frações. Gracia et al. (2001) especificaram dez genes importantes do metabolismo lipídico num estudo de levantamento da diversidade sequencial destes genes em indivíduos dislipidemicos. Onde foram incluídos: SREBP-1c, SREBP-2, SCAP (*Cleavage - activating protein*), HMG-CoA redutase, acil-CoA aciltransferase-2 (ACAT-2), colesterol 25-hidrolase, receptor de LDL, SR-BI (*Scavenger receptor, type B, class 1*), S1P (*site-1 protease*) e LXR (*liver X receptor*). Porém, além desses citados outros também têm mostrado desempenhar uma atuação relevante no metabolismo lipídico (HORTON et al. 2002; SHIMANO, 2001). O PPAR- α tem sido mostrado como a forma mais expressa nos tecidos com elevada taxa de β -oxidação, exercendo a função de controlar os genes envolvidos nos aspectos do catabolismo celular que inclui a absorção, transporte intracelular, mitocondrial e peroxissomal, a cetogênese e gliconeogênese. Sua participação na β -oxidação ocorre através da ativação das enzimas acil-CoA dehidrogenase, carnitina palmitoil transferase-I, acil-CoA oxidase (ACO) e da ácido graxo hidrolase que participam diretamente desse processo na mitocôndria, peroxissomos e microsomos. Além disso, a síntese de ácido graxo “*de novo*” é controlada pelo PPAR- α , por meio da redução de atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase que desempenham uma importante

função no controle do processo. Outro efeito dos PPAR- α envolve o controle da regulação de síntese dos ácidos biliares, através da indução de expressão hepática LXR- α que conseqüentemente estimula a expressão da 7 α -hidroxilase, principal enzima responsável pela conversão de colesterol até os sais biliares (RINGSEIS e EDER, 2011; RAALTER et al. 2004).

Os efeitos dos derivados do ácido fíbrico (fibratos) e das estatinas, por meio do tratamento farmacológico em relação aos distúrbios dislipidêmicos têm sido bem reconhecidos, e seus mecanismos de ação se encontram bem documentados na literatura. Entre os fibratos, o clofibrato foi o primeiro a ser introduzido a pouco mais de 35 anos no controle de dislipidemias. Em seguida, foi criado o gemfibrozil que foi amplamente utilizado na clínica, e mais recentemente, são utilizados o benzafibrato, fenofibrato, etofibrato e ciprofibrato. Essas drogas exercem uma importante redução dos níveis plasmáticos de triacilglicerídeos (30-50%), e aumento da lipoproteína HDL (5-15%), quando existe a hipertriacilgliceridemia. Estes são considerados um potente agonista de fatores de transcrição da família dos PPARs, em especial do PPAR α , que é o responsável pelo controle de expressão de vários genes envolvidos no metabolismo dos triacilglicerídeos e da HDL-c. Além disso, estas drogas induzem a atividade de enzimas relacionadas à β -oxidação dos ácidos graxos. Exemplo disso tem sido observado o aumento da atividade da lipoproteína lipase que atua na remoção dos triacilglicerídeos das lipoproteínas circulante, acréscimo da β -oxidação nos tecidos e redução da esterificação de ácidos graxos no fígado.

As estatinas são fármacos com estrutura similar ao precursor do colesterol à HMG-CoA, e que apresentam capacidade de diminuir a síntese endógena de colesterol entre 25-60%, por inibição competitiva da enzima HMG-CoA redutase. Embora possa ser observado um avanço importante na prevenção e tratamento das

dislipidemias, ainda é evidente que a intervenção farmacológica se faça necessária com o aporte dietético, e ora vice-versa em vista de resultados mais eficientes no controle das dislipidemias. No entanto, possibilidades alternativas têm sido buscadas, tais como o uso de resinas com capacidade de ligação com sais biliares, derivados do ácido nicotínico, o uso de fibras dietéticas, suplementação de esterois de plantas e de ácidos graxos ômega-3, entre outros.

3.3 Proteínas de leguminosas na dislipidemia

Desde a década de 40, estudos vêm demonstrando a relação desfavorável entre o consumo de proteínas de origem animal e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Por outro lado, a ingestão de proteínas de origem vegetal tem apresentado um efeito antagônico (SCARAFONI et al. 2007; SAWASHITA et al. 2006). Muito embora a grande maioria dos estudos tenha sido realizado com as proteínas da soja (FERREIRA et al. 2011, 2010; ZHONG et al. 2007; PAK et al. 2005b; DURANTI et al. 2004; FUKUI et al. 2004; AOYAMA et al. 2001), têm se observado uma ação semelhante em diferentes espécies de leguminosas (FROTA et al. 2008; MAGNI et al. 2004; MACARULLA et al. 2001; DABAI et al. 1996). Estes dados indicam a vantagem da substituição da fonte proteica de origem animal pela vegetal, a fim de promover diversos benefícios à saúde, principalmente àqueles envolvidos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Na década de 90, Lovati e seus colaboradores (1987) mostraram o efeito do isolado proteico de soja comparada ao animal, sobre a atividade dos receptores de LDL de indivíduos entre 26-64 anos e que apresentavam hiperlipoproteínemia. Dois grupos independentes receberam uma dieta com baixo teor lipídico (26%) e com diferentes fontes de proteína (20% da caloria total diária). Após o período de quatro

semanas foi observado uma redução 16% na concentração de colesterol total e da fração LDL dos indivíduos alimentados com o isolado proteico de soja. Este efeito foi acompanhado do aumento da captação da LDL pelas células mononucleares hepáticas em 8 e 16 vezes, respectivamente, comparado aos indivíduos alimentados com proteína de origem animal (baixo lipídio), e no grupo controle. Embora a relação entre a redução do colesterol total e LDL-c, com o aumento da captação e degradação da LDL ainda não estivesse clara, esses resultados confirmavam alguns achados anteriores em animais, e sugeriam a hipótese de que a proteína e/ou peptídeos poderiam ser os responsáveis diretos pelos efeitos observados.

Mais tarde, Lovati et al. (1992) demonstraram em células HepG2, que os receptores de LDL eram aumentados quando incubados na presença da proteína 7S da soja. Posteriormente, os autores observaram que esta proteína (80 mg/L) marcada com iodo (I^{125}), incubada por 6 e 12 horas, respectivamente, em cultura de células do tecido epitelial e HepG2, demonstrava habilidade de interagir positivamente com diferentes sítios de ligações da membrana das células (LOVATI et al. 1996). Eles mostraram ainda que as proteínas de membrana que interagiam com a 7S apresentavam massa molecular entre 14-21 kDa. Finalmente, este mesmo grupo de pesquisadores (LOVATI et al. 2000) demonstrou em células HepG2, expostas pela primeira vez a subunidades α , α' e com a própria proteína isolada o aumento da ativação dos receptores de LDL. As células expostas ao isolado proteico (0,5 g/L) apresentaram um aumento de 35 e 42%, respectivamente, na captação e degradação da LDL-c, mas quando expostas ao isolado hidrolisado por enzimas digestivas este efeito passou para 104 e 122%, comparados ao grupo controle. Estes resultados sustentam a hipótese de que um ou mais peptídeos podem exercer o efeito redutor do colesterol plasmático, assim, confirma a alegação que a proteína

de soja é a maior responsável pela ação hipocolesterolêmica, devido à ingestão do grão.

As proteínas de leguminosas, em particular, vêm recebendo certa atenção quanto ao seu papel no metabolismo e na prevenção de desordens lipídicas, em especial da hipercolesterolemia, hipertriacilgliceridemia e hiperglicemia. Muitos estudos com a proteína da soja em animais (FERREIRA et al. 2011, 2010; DURANTI et al. 2006; SAWASHITA, 2006; PAK et al. 2005b; DURANTI et al. 2004; MORIYAMA et al. 2004; MANZONI et al. 2003; LOVATI et al. 2000) e humanos (SIRTORI et al. 2009; KOHRO et al. 2006; HOIE et al. 2005) têm sugerido que esta apresenta uma capacidade de reduzir a concentração plasmática de colesterol total e LDL-c. Levantamentos bibliográficos elaborados a partir dos efeitos observados com a proteína de soja em animais (SIRTORI et al. 2009) e humanos (REYNOLDS et al. 2006) têm sugerido que esta apresenta uma capacidade de reduzir a concentração plasmática de colesterol total e LDL-c. A proteína de soja ganhou reconhecimento na melhora de fatores de risco para doenças cardiovasculares, em 1999, quando a US Food and Drug Administration (FDA) postulou a recomendação de ingestão dessa proteína na prevenção de doenças do coração. O FDA, baseado em estudos clínicos, indicou que o consumo de 25 g de proteína de soja por dia poderia reduzir o colesterol total e LDL-c. Embora o mecanismo de ação dessas proteínas ainda permaneça pouco esclarecido, uma hipótese plausível, é que peptídeos derivados da sua digestão gastrointestinal e após absorção poderiam modular o metabolismo lipídico, por alterações na absorção, síntese, excreção, indução e/ou supressão de transcrição de receptores e enzimas envolvidas.

Recentemente, Consonni et al. (2011, 2010) apresentaram um polipeptídeo recombinante clonado e expresso em *Pichia pastoris*, com 216 resíduos de

aminoácidos, encontrado naturalmente na sequência da subunidade α' da β -conglícinina da soja (7S) que apresenta a capacidade de modular o metabolismo do colesterol e dos triacilglicerídeos, reportado em experimentos *in vitro* e *in vivo*. O polipeptídeo na concentração de 8 $\mu\text{mol/L}$ mostrou ser um potente modulador da atividade de receptores de LDL em células hepáticas humanas. A captação e degradação da LDL-c foram aumentadas, respectivamente, em 192 e 143%, semelhante ao observado nas células tratadas com 1 $\mu\text{mol/L}$ de sinvastatina. Estes resultados sustentam os achados anteriores, tornando evidente a ação de peptídeos originados da proteína 7S de soja sob a hipercolesterolemia e, sobretudo, abrem novas perspectivas para estudos que visam identificar “novos” peptídeos e seus mecanismos envolvidos na resposta biológica tanto nessa proteína quanto nas de outras espécies.

Outros estudos com animais já haviam atribuído à proteína de soja a propriedade hipocolesterolêmica. Fukui et al. (2002) estudaram os efeitos da β -conglícinina em ratos jovens (6 semanas) e adultos (21 semanas) alimentados com uma dieta rica em colesterol durante 10 dias. A proteína provocou uma redução na concentração de colesterol total em 66 e 30%, respectivamente, nos animais jovens e adultos. Posteriormente, pesquisadores japoneses, com destaque para Aoyama et al. (2001) e Moriyama et al. (2004), mostraram em ratos que a proteína β -conglícinina administrada como única fonte proteica na dieta promovia significativa redução sérica e hepática de colesterol, associado a isso, houve o aumento da atividade enzimática da carnitina palmitoil transferase, acil-CoA oxidase, 7- α hidroxilase e redução da ácido graxo sintase. Duranti et al. (2004) mostraram pela primeira vez até então, a ação β -conglícinina administradas em doses diárias (200 mg/Kg) em animais submetidos à dieta hipercolesterolemica, em reduzir o

colesterol total e triacilglicerídeos sérico, respectivamente em 49 e 50%. Uma das subunidades da proteína, a fração α' -conglucina administrada na concentração de 20 mg/Kg/dia, levou a redução de 36 e 34%, respectivamente, para colesterol total e triacilglicerídeo sérico.

Evidentemente, assim como a proteína da soja outras espécies de leguminosas, tais como: feijões, ervilhas e tremoço poderiam também exercer alguma ação sobre o metabolismo do colesterol e lipídico (SCARAFONI et al. 2007; SAWASHITA, 2006; DURANTI et al. 2006; DABAI et al. 1996), porém, estas têm recebido menor atenção embora possam exercer efeito semelhante na prevenção das desordens lipídicas (LOVATI et al. 2008; SCARAFONI et al. 2007). Uma redução do colesterol e triacilglicerídeos pela ingestão como fonte proteica de determinadas espécies de feijões (MACARULLA et al. 2001; ANDERSON et al. 1999; DABAI et al. 1996) tem sido observadas. Dabai et al. (1996) verificaram uma redução acentuada em nível plasmático do colesterol total (18-31%), LDL-c (32-53%), e triacilglicerídeos (27-46%) em ratos alimentados durante 8 semanas com uma dieta hipercolesterolêmica e que consumiram como única fonte proteica a farinha de feijões das espécies *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus* e *Vigna subterrânea* comparado ao grupo que recebeu caseína. Macarulla et al. (2001) observaram o efeito hipocolesterolêmico da farinha e isolado proteico de *Vicia faba* em ratos. Estes grupos tiveram uma redução da concentração plasmática de colesterol total de 37 e 30%, e a partícula não-HDL-c foi menor 56 e 37%, respectivamente. Houve ainda uma redução dos triacilglicerídeos de 39 e 11%, respectivamente, comparados ao grupo alimentado com caseína como fonte proteica. Anderson et al. (1999) apontaram uma redução no colesterol e triacilglicerídeos em relação ao grupo controle, respectivamente, de 10 e 11%, em

homens adultos hipercolesterolêmicos alimentados com 120 g de feijão (*Phaseolus vulgaris*) durante 21 dias. Mahadevappa et al. (1983) mostraram em ratos alimentados com o isolado proteico do feijão caupí (*Vigna unguiculata*) durante 8 semanas, uma redução de 40 e 24%, respectivamente, para concentração sérica de colesterol total e hepático. Recentemente, Frota e Arêas (2008) verificaram em *hamsters* alimentados com uma dieta tendo como fonte de proteína o isolado proteico do caupí um efeito hipocolesterolemizante com redução de 20 e 22%, respectivamente, para colesterol total e colesterol não-HDL-c. Observaram ainda que o grupo alimentado com o isolado apresentava menor deposição de gordura nas células hepáticas.

3.4 Proteínas da soja, feijão caupí e feijão adzuki

A origem do termo leguminosa foi atribuída segundo Uebersax e Occeña (2003), como derivado da palavra latina “*legumen*” que significa “sementes colhidas em vagens”. Os grãos de leguminosas são considerados um importante componente da dieta há milênios, sendo nos dias atuais consumidos em todo o mundo. Segundo Duranti (2006) representam ainda a principal fonte de proteína da alimentação em muitos países. O elevado conteúdo proteico tem sido sem dúvida, o principal aspecto nutricional das sementes de leguminosas. Grusak (2005) demonstrou nas diferentes regiões em termos percentuais que o consumo dos grãos de leguminosas se configura em 46,6% na América Latina, 24,3% na África, 13,3% na Europa (ocidental/oriental), 7,5% na América do Norte, 4,5% na Ásia e 4,0% no Oriente Médio. Rubatzky e Yamaguchi (1997) descreveram as 20 principais espécies de leguminosas em termo de produção no mundo. Entre essas, encontraram-se cinco espécies do gênero *Vigna* e uma *Glycine*.

A representante do gênero *Glycine* considerada a mais importante oleaginosa, a espécie *Glycine max* (L.) Merr., comumente conhecida como soja. Acredita-se que sua origem e o cultivo se iniciaram na China em meados do primeiro milênio, de onde se espalhou para a Ásia e passou a ser utilizada como alimento. Historicamente, foi introduzida nas colônias americanas por volta de 1765, por Samuel Bowen (HYMOWITZ e HARLAN, 1983). No Brasil, o grão chegou com os primeiros imigrantes japoneses, em 1908, mas foi inserido oficialmente no Rio Grande do Sul apenas em 1914. Porém, a real expansão da soja no Brasil ocorreu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e demanda do mercado internacional. A composição do grão de soja poder variar de acordo com condições de plantio e solo. No entanto, em média, apresentam de 35-45% de proteína, 18 a 25% de lipídios, aproximadamente 30 a 34% de carboidrato e 5% de minerais (SGARBIERI, 1996).

As proteínas de reserva da soja apresentam os seguintes coeficientes de sedimentação 2S, 7,5S, 11,8S e 15S (HILL e BREIDENBACH, 1974). De acordo com uma classificação sugerida por Osborne (1924) as proteínas majoritárias da soja são representadas pelas globulinas (11S e 7S) que constituem mais de 70% da proteína total. As globulinas 11S e 7S, na soja são denominadas de glicinina e β -conglucininina, respectivamente. A glicinina corresponde a 37-45% do conteúdo proteico total da soja, portanto, a proteína majoritária. No entanto, a β -conglucininina tem demonstrado um maior interesse nos estudos com peptídeos bioativos do que a glicinina, em parte devido a sua característica de sofrer um processo proteolítico menos intenso que resulta em uma grande variedade de fragmentos de polipeptídios. A β -conglucininina (7S) representa 25-30% da proteína total da soja. Esta proteína tem massa molecular de aproximadamente 150 kDa, constituída,

geralmente de um trímero de polipeptídios de 71, 67 e 50 kDa, representados pelas subunidades polipeptídicas alfa-prime (α'), alfa (α) e beta (β), respectivamente, onde todas essas apresentam sítios de N-glicosilação (THANH e SHIBASAKI, 1977).

Já as duas espécies de leguminosas do gênero *Vigna*, a *unguiculata* e *angularis*, conhecidas vulgarmente como feijão caupí e feijão adzuki, respectivamente, são cultivadas em clima tropical e subtropical. As evidências têm sugerido que a origem da espécie *unguiculata* tenha ocorrido no continente Africano, e mais tarde se dispersou para outros locais. Atualmente, tem assumido uma importante posição na produção de grãos no Brasil, Índia, Estados Unidos e Sudeste Asiático (ODEIGAH e OSANYINPEJU, 1996). O feijão adzuki por outro lado, tem apresentado muitas contestações quanto a sua origem. Acredita-se que sua origem tenha ocorrido entre os países da Oceania, porém, alguns estudos genéticos mais recentes têm sugerido a sua origem no Japão, enquanto outros do noroeste da China (FUKUDA et al. 2007). Independentemente da origem, o grão de adzuki representa uma importante cultura agrícola nos países do leste asiático como Japão, China e Coreia (Norte e Sul).

A semente de ambas as espécies do gênero *Vigna* apresentam quantidades de proteínas que variam entre 18-30% da composição química. Ao contrário, como observado na soja, a vicilina 7S é considerada a proteína majoritária e constitui cerca de 70-80% da proteína total nos feijões (GUPTA et al. 2010; ALUKO et al. 2008; MENG et al. 2001; SAKAKIBARA et al. 1979; DERBYSHIRE et al. 1976). Estudos anteriores de caracterização das proteínas de sementes caupí e adzuki têm designado uma nomenclatura específica a 7S das *Vignas*, sendo denominadas de proteína β -vignina. Há exemplo de outras espécies como a soja (β -conglícinina), tremço (γ -conglutina), ervilha (vicilina) e feijão comum (faseolina).

Murray et. (1983) demonstraram que β -vignina (7S) do caupí é constituída por duas cadeias polipeptídica majoritárias de 56 e 52 kDa. Já a globulina 11S era representada por duas estruturas de 80 e 43 kDa, que em condições redutoras originaram cadeias de 61, 26 e 19 kDa, enquanto que a fração albumina, nas mesmas condições anteriores apresentou cadeias de 100, 70, 43, 35, 32 e 25 kDa. Recentemente, Freitas e colaboradores (2004), isolaram e caracterizaram três globulinas da espécie *V. unguiculata*, e sugeriram a seguinte denominação para essas frações: γ (gama), β (beta) e α (alfa), respectivamente. A fração α apresentou uma cadeia majoritária de 80 kDa, e duas subunidades menores de 58 e 44 kDa. Na presença do agente redutor, a fração principal originava duas cadeias de 60 e 20 kDa, sendo que esta proteína não apresentava sítios de N-glicosilação, caracterizando-se essencialmente como uma proteína do tipo 11S. A fração γ , minoritária, apresentou uma única cadeia de 22 kDa, e devido ao baixo peso molecular foi caracterizada como uma proteína 2S. A fração majoritária β , apresentava duas subunidades polipeptídica principais de 60 e 55 kDa glicosiladas, e quatro menores de 66, 30, 24 e 22 kDa não glicosiladas. O resultado deste e outros estudos (ALUKO et al. 1997; KHAN et al. 1980) sugeriam que a fração β , no feijão caupí representava a proteína 7S.

A β -vignina (7S) do feijão adzuki foi bem caracterizada por Sakakibara e colaboradores (1979). Nesse estudo os autores demonstraram que vicilina 2S e 7S, representavam os grupos proteicos majoritários no adzuki, constituindo 45 e 55%, respectivamente. Além disso, a β -vignina dissociada consistiu de três subunidades polipeptídicas, denominadas de α , β_1 e β_2 , com peso molecular estimado em 55, 28 e 25 kDa, respectivamente. Posteriormente, Chen et al. (1984) observaram num estudo de caracterização que a β -vignina apresentava apenas duas subunidades, α

e $\beta 1$, ambas glicosiladas com peso molecular de 55 e 35 kDa, respectivamente. Os resultados de um estudo recentemente realizado por Meng e Ma (2001), sugeriram que a β -vignina (7S) do feijão adzuki seja constituída de três subunidades, sendo uma majoritária de 55 kDa, e duas menores com aproximadamente 33 e 29 kDa, enquanto que a 11S, em condições redutoras, apresentaria uma subunidade ácida e outra básica, de 40 e 20 kDa, respectivamente.

3.6 Homologia entre vicilinas

A proteína das leguminosas é geralmente constituída por duas classes principais, as albuminas e globulinas que representam entre 8-20% e 40-60%, respectivamente, do total. A fração globulina é constituída de duas frações majoritárias denominadas legumina e vicilina, sendo usualmente classificadas em proteínas do tipo 11S e 7S, respectivamente, como demonstrado anteriormente (DURANTI, 2006; LORENÇO, 2000). As vicilinas (7S) são proteínas oligoméricas heterogêneas geralmente glicosiladas cuja massa molecular situa-se na faixa de 140 a 200 kDa. Algumas dessas proteínas possuem diversas subunidades, porém, geralmente são constituídas de três a quatro subunidades de massa molecular de aproximadamente de 40 a 60 kDa, mas ausente de ligação dissulfeto (MENG e MA, 2001; LOURENÇO, 2000; PERNOLLET e MOSSE, 1983). Algumas 7S presentes em diferentes espécies de leguminosas têm demonstrado características físicas e químicas análogas, tais como, sequência de aminoácidos e N-terminal, digestibilidade, reconhecimento imunológico e atividade biológica.

Os primeiros estudos de caracterização genética postularam que 7S de diferentes espécies apresentam genes ancestrais comuns para a codificação da proteína (BORROTO e DURE, 1987; ARGOS et al. 1985; LACKEY, 1981), e isto tem

sido confirmado pela acentuada homologia sequencial observada entre as vicilinas. A faseolina, vicilina e β -conglícinina, respectivamente, globulinas 7S das espécies *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Glycine max* apresentam estruturas primárias fortemente homólogas (DOYLE et al. 1986, 1985; ARGOS et al. 1985). Estudos distintos têm mostrado que algumas 7S apresentam elevada semelhança em suas composições e sequência de aminoácidos, sugerindo que suas similaridades são decorrentes de uma evolução convergente (GEPTS et al. 2005; DOYLE e LUCKOW, 2003). Outro fato relevante foi reportado por Doyle et al. (1985) que analisaram a relação antigênica da proteína 7S da soja com proteínas de diversas subfamílias e tribos de leguminosas. Os resultados mostraram que um grande número de vicilinas da subfamília Papilionoideae apresentava homologia antigênica à da soja, no entanto, esta similaridade se mostrou mais intensa na tribo Phaseoleae, sobretudo, nos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*. Foi verificado ainda que a sequência de aminoácidos da parte N-terminal das vicilinas era correspondente ao sequenciamento da β -conglícinina. Alguns anos antes, um estudo de classificação filogenética de Lackey (1981) já indicava que a elevada atividade imunológica apresentada entre as subtribos Phaseolinae (gênero: *Vigna*) e Glicininae (Gênero: *Glycine*) ocorria devido à origem ancestral comum entre estes gêneros.

Os resultados encontrados por Argos et al. (1985) e Doyle et al. (1986) sugeriam que a proteína 7S de determinadas leguminosas (phaseolinas e vicilinas) eram similares à β -conglícinina, uma vez que suas subunidades apresentavam uma sequência de aminoácidos e regiões de rompimento fortemente homólogas. Kagawa et al. (1987) mostraram esta relação através do reconhecimento imunoquímico, com o anti-soro da vicilina da soja, em relação as vicilinas dos feijões adzuki e mungo. Além disso, os autores observaram que o sequenciamento N-terminal de

polipeptídeos destas espécies apresentava estrutura idêntica, com da vicilina da soja, todos derivados de hidrólise trípica e quimotríptica. Mais tarde, Hirano et al. (1992) confirmaram estes primeiros achados para as sequências N-terminal das espécies caupí, adzuki e mungo, apresentam entre 80-90% de similaridade, com a vicilina da soja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As sementes dos feijões caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) e adzuki (*Vigna angularis* Willd) foram gentilmente concedidas pelo Sr. Rogério Faria Vieira, pesquisador do Centro Tecnológico da Zona da Mata da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG, Viçosa, MG). A farinha de soja (*Glycine max* L. Merrill) foi obtida de fornecedor comercial (Araraquara – SP).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo do material

Inicialmente, as sementes de caupí e adzuki foram selecionados (grãos íntegros e que não apresentavam grau de maturação avançado) e imersos em água destilada a 8 °C/12 h, para intumescimento dos grãos. Em seguida, o cotilédone foi separado do epicarpo manualmente, e depois seco em estufa com circulação de ar forçada a 50 °C/10 h. O grão seco foi pulverizado em liquidificador doméstico com filtro (Arno magiclean, In501311) e tamisado a 60 mesh de granulação (Granutest, Ind. Bras. Ltda). Na farinha comercial de soja foi realizada extração de lipídeos a frio com solvente n-hexano na proporção 1:8 m/v. Logo após a separação realizada por filtração, a farinha permaneceu por 24 h em estufa com circulação de ar forçada a 50 °C. Posteriormente, as farinhas obtidas foram conservadas em frascos de polipropileno e acondicionado em câmara fria sob refrigeração de 8 °C.

4.2.2 Extração, isolamento e caracterização das proteínas

A vicilina da soja (7S ou β -conglucina) foi obtida de acordo com procedimentos descritos e adaptados a partir de Nagano et al. (1992), como

mostrado na figura 1. Inicialmente, a extração da proteína foi realizada utilizando-se água destilada (1:15 m/v) em pH 7,5 ajustado com NaOH 2 mol/L, sob agitação durante 60 minutos. O material em seguida foi centrifugado (7000 rpm/60 min), ao sobrenadante obtido adicionou-se metabisulfito de sódio (0,98 g/L), pH ajustado para 6,4 e deixado em repouso “*overnight*” a 4 °C. Na sequência, o material foi centrifugado novamente (6500 rpm/20 min./4 °C). No sobrenadante foi adicionado NaCl até a concentração de 0,25 mol/L, pH à 5,0 com adição de HCl 2 mol/L e deixado por 60 minutos em repouso a 4 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado (7000 rpm/60 min./4 °C), e o sobrenadante obtido diluído (2X) com água destilada, homogeneizado, pH ajustado a 4,8 e mantido “*overnight*” a 4 °C. Finalmente, centrifugado (6500 rpm/30 min./4 °C), e o precipitado (β -conglucina) foi recolhido por solubilização em NaCl 0,2 mol/L e pH ajustado a 7,0.

A vicilina dos feijões caupí e adzuki (7S ou β -vignina) foram obtidas a partir de procedimentos previamente desenvolvidos e padronizados em nosso laboratório, respectivamente, apresentados nas figuras 2 e 3.

No isolamento da β -vignina do caupí, amostras da farinha foram inicialmente dispersas (1:20 m/v) em solução de NaCl 0,1 mol/L, pH ajustado para 7,5 e deixado sob agitação por 60 minutos. Em seguida, centrifugado (12000 rpm/40 min./4 °C), o sobrenadante obtido foi diluído com água (1X) a concentração de 0,05 mol/L, homogeneizado, pH ajustado para 5,0 e mantido em repouso “*overnight*” a 4 °C. Posteriormente, centrifugado (12000 rpm/20 min./4 °C). O precipitado obtido foi re-solubilizado em água destilada (1:20 m/v inicial), homogeneizado, pH ajustado em 7,0 e deixado sob agitação por 10 minutos. Em seguida, o pH foi levado a 5,0 e o material foi centrifugado (12000 rpm/10min./4 °C). O precipitado obtido foi novamente solubilizado em NaCl 0,1 mol/L (1:20 m/v inicial), homogeneizado, pH

ajustado em 7,5 e deixado sob agitação por 15 minutos. O material foi então novamente centrifugado (12000 rpm/10 min./4 °C). O sobrenadante obtido foi diluído (1X) com água, homogeneizado, pH ajustado para 5,0 e deixado em repouso “*overnight*” a 4 °C. Finalmente, o material foi centrifugado (12000 rpm/10 min./4 °C) e o precipitado (β -vignina) obtido foi solubilizado em NaCl 0,2 mol/L e pH ajustado para 7,0.

Para a obtenção da β -vignina do adzuki, inicialmente foi realizada extração com água (1:20 m/v) em pH 7,5 e mantida sob agitação por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado (12000 rpm/40 min). O sobrenadante (S1) foi reservado e o precipitado foi novamente solubilizado em NaCl 0,5mol/L (1:10 m/v), pH ajustado em 7,5 e deixado por 30 minutos sob agitação. O material foi novamente centrifugado (12000 rpm/30 min./4 °C), e o sobrenadante (S2) recolhido e reunido ao S1. A solução (S1 + S2) foi diluída com água (5X) a 0,05 mol/L, homogeneizada, pH ajustado a 4,8 e mantida em repouso “*overnight*” a 4 °C. Posteriormente, centrifugada (12000 rpm/10 min./4 °C). O precipitado obtido foi solubilizado em água destilada (1:20 m/v inicial), centrifugado (12000 rpm/10 min./4 °C) e o precipitado obtido foi novamente solubilizado em solução de NaCl 0,25 mol/L (1:20 m/v inicial) e deixado por 10 minutos sob agitação. Em seguida, centrifugado novamente (12000 rpm/10 min./4 °C) e o sobrenadante diluído com água (4X) a 0,05 mol/L, pH ajustado para 4,8 e deixado em repouso “*overnight*” a 4 °C. Finalmente, o material foi centrifugado (12000 rpm/10 min./4 °C). O precipitado (β -vignina) obtido foi solubilizado em NaCl 0,2 mol/L e pH levado a 7,0.

Figura 1 – Fluxograma das etapas de isolamento da proteína β -conglucina (7S) de soja.

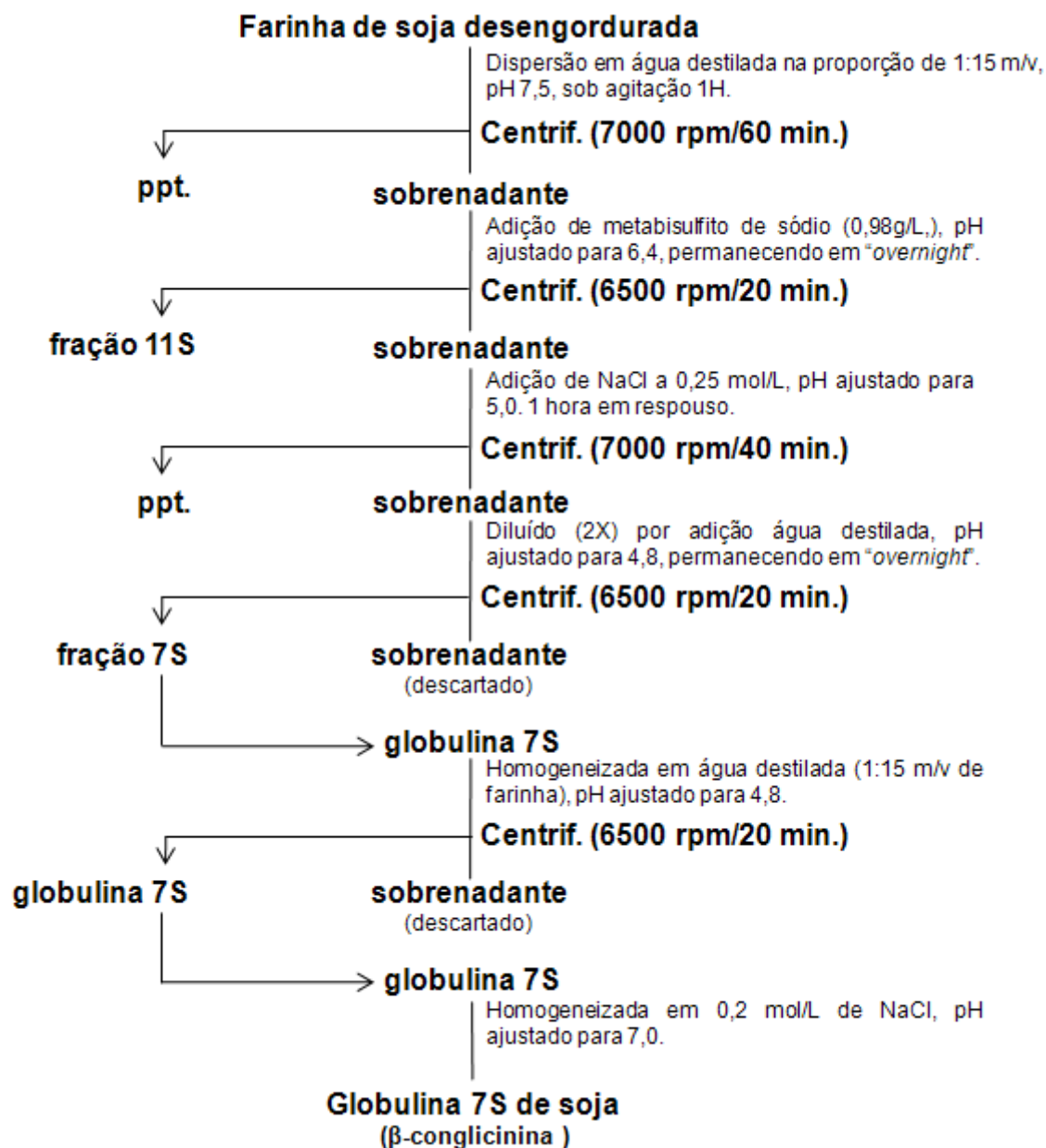


Figura 2 – Fluxograma das etapas de isolamento da proteína β -vignina (7S) do feijão caupí.

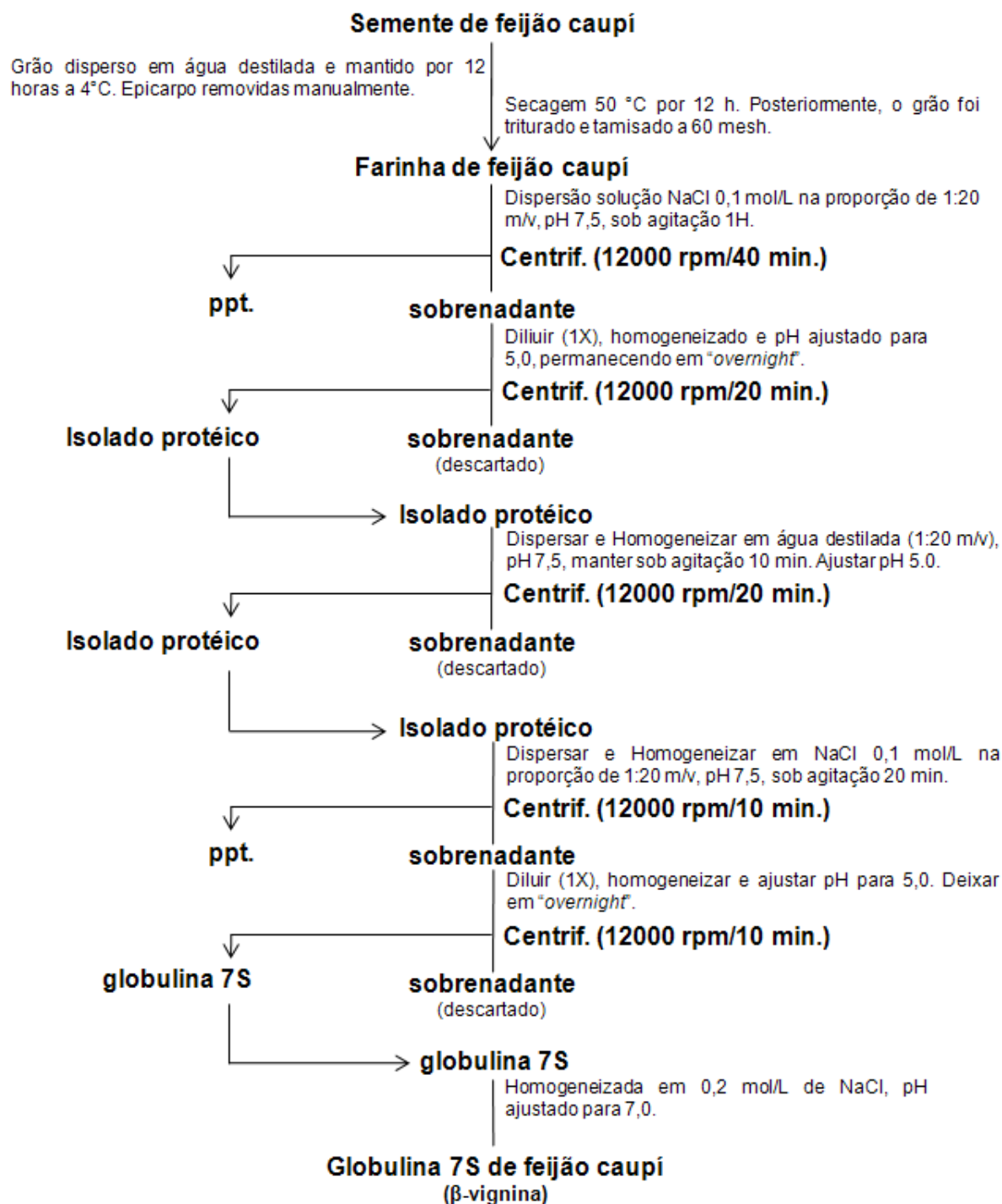
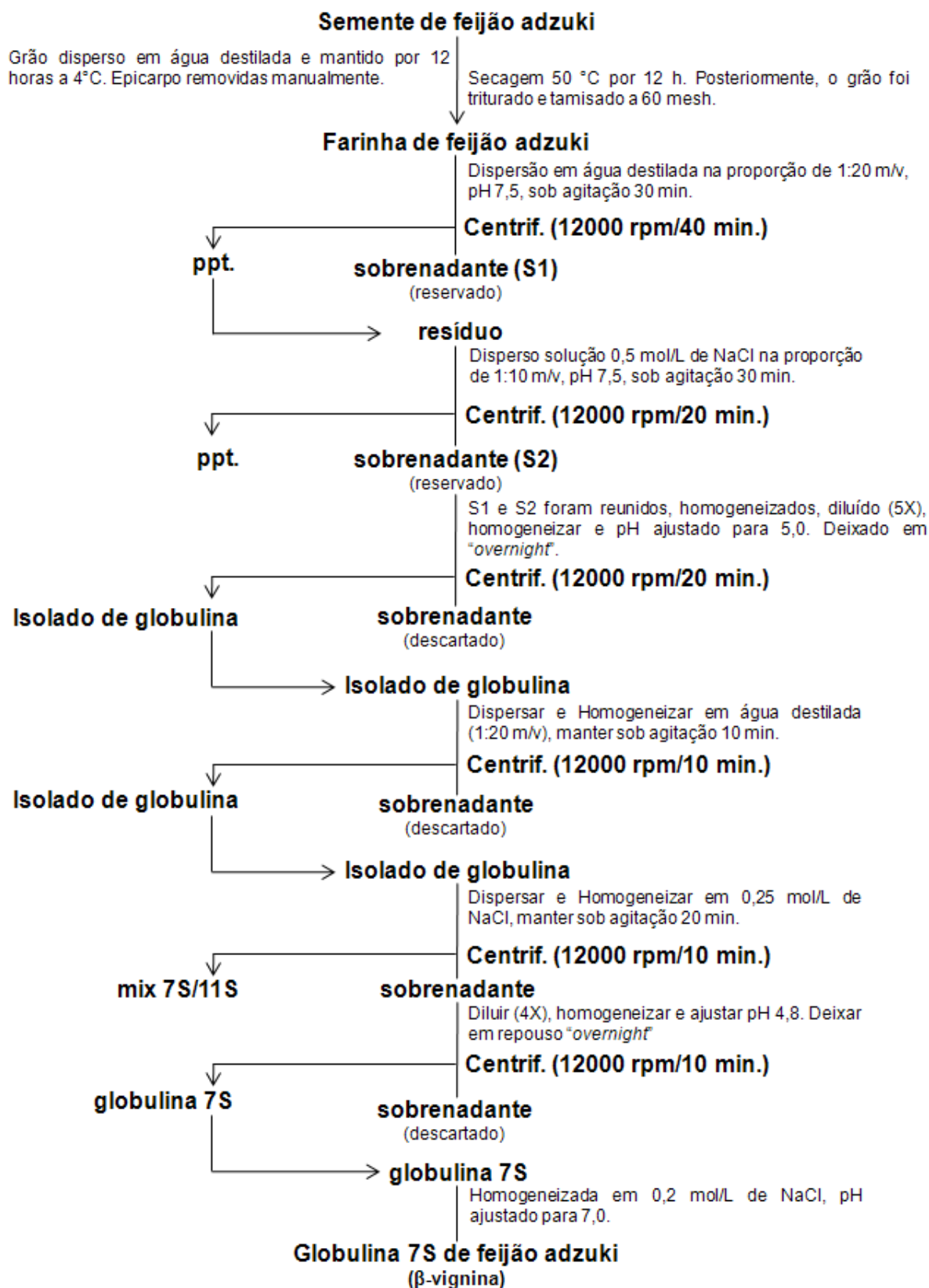


Figura 3 – Fluxograma das etapas de isolamento da proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki.



4.2.3 Determinação da proteína

A determinação de proteína total nas farinhas foi estimada pelo método de Kjeldahl descrito pela AOAC (1984), através da quantificação do nitrogênio total, utilizando destilador de nitrogênio MA 036 (Marconi[®] Ltda, Piracicaba, SP), sendo calculado pelo fator de conversão de 6,25. Todos os demais procedimentos foram baseados a partir da quantificação estimada de proteína determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma Aldrich[®] St. Louis, MO, USA) como padrão, através da medida de absorbância 750 nm realizada em *UV/visible spectrophotometer ultrospec 2000* (Pharmacia Biotech[®]).

4.2.4 Cromatografia de filtração em gel

Amostras das proteínas isoladas (100-150 mg de proteína) foram aplicadas em coluna Sepharose CL-6B, nas seguintes condições cromatográficas: tampão fosfato de potássio 5 mmol/L com 0,5 mol/L de cloreto de sódio, 1 g/100 g de azida sódica, pH 7,5 e fluxo de 5,8 mL por 7 minutos (0,83 mL/min). O fracionamento foi acompanhado por medida de absorbância a 280 nm. A fração correspondente às vicilinas de interesse foi recolhida, armazenada e conservada sob congelamento a -20 °C.

4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas isoladas foram analisadas por SDS-PAGE na presença do agente redutor β -mercaptoetanol, conforme método descrito por Laemmli (1970), em gel de poliacrilamida (12 g/100 g) com dodecilsulfato de sódio (0,1 g/100 g), utilizando equipamento *Hoefer MiniVE electrophoresis system* (Amersham Biosciences[®]). O marcador de massa molecular (LMW 97-14,4 kDa) utilizado

apresentava os seguintes padrões: fosforilase b (97 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbonica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare, Amersham Biosciences®). Os géis foram corados em uma solução de Coomassie brilliant blue (R-250) (Sigma Aldrich®), descorados com metanol/ácido acético/água (1:1:8 v/v/v). As imagens foram digitalizadas no *Alpha Imager Scanner* e analisadas através do software *AlphaEase* (Alpha Innotech®, San Leandro, USA).

4.2.6 Eletroforese bidimensional

A análise eletroforética bidimensional foi realizada de acordo com os procedimentos proposto por Gorg et al. (1985). Amostra do extrato proteico total e da proteína β -vignina cromatografada dos feijões caupí e adzuki foram preparadas em tampão uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L, CHAPS (2 g/100 g) e DTT 65 mmol/L (1,4 dithiothreitol). Na focalização isoeétrica (*IEF - Isoelectric focusing*), amostras proteicas (80 μ g) foram usadas para adsorção em tiras com gradiente de pH linear imobilizado (*IPG strips immobilized pH gel*). As tiras (7 cm, pH 3-10) foram reidratadas por um período “overnight”, através do *DryStrip Reswelling Tray*. Posteriormente, a análise foi realizada em *Multiphor II electrophoresis unit* utilizando-se o *Immobiline DryStrip kit* (Amersham Biosciences®), nos seguintes parâmetros a 20 °C: 40 v/120 min., 200 v/30 min., 600 v/45 min., 1200 v/45 min., 2500 v/30 min. e 3000 v/ 100 min. Em seguida, as tiras foram incubadas em tampão “equilibration” de uréia (6 mol/L), Tris-HCl (1,87 mol/L), glicerol (20 g/100 g), SDS (2 g/100 g), pH 8,8 contendo DTT (65 mmol/L) durante 15 minutos, e depois em tampão contendo iodoacetamida (135 mmol/L) e *bromophenol blue*, por 10 minutos. Logo após as tiras

foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE, como descrito anteriormente.

4.2.7 Estimativa do peso molecular

A massa molecular da vicilina dos feijões caupí e adzuki foram estimadas de acordo como proposto por Whitaker et al. (1963), por cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephadex G-200 (50 x 2,5 cm/cm), equilibrada com tampão fosfato de potássio (0,01 mol/L), contendo NaCl (0,5 mol/L), azida sódica (1 g/L) e pH 7,5. Os marcadores conhecidos utilizados na estimativa da massa molecular foram: ferritina (440 kDa), miosina (240 kDa), galactosidade (116 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e citrocomo C de coração de cavalo (12,4 kDa). O volume de exclusão da coluna (V_o) foi determinado a partir dos valores obtidos para o azul de dextrana (2000 kDa). A eluição das proteínas (V_e) foi acompanhada pela medida de absorbância a 280 nm.

4.2.8 Detecção de glicopolipeptídeos

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em condições redutoras, transferidas para membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno), e a análise de detecção de subunidades protéicas glicosilada foi realizada a partir das reações com concanavalina A/peroxidase, como proposto por Fayer e Chrispeels (1985).

4.2.9 Anticorpos policlonais

As vicilinas obtidas por cromatografia de filtração em gel como descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.4, foram dialisadas contra água por 24 horas, precipitadas por centrifugação (12000 rpm/10 min./4 °C), solubilizadas em solução fisiológica (0,9

g/NaCl/100 g/H₂O) e utilizadas para produção de soro policlonal anti-vicilinas em coelhos macho adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* Botucatu. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Previamente à inoculação dos imunógenos (proteínas), os animais foram submetidos a uma sangria de prova pelo método de Ouchterlony, para avaliar reatividade com alguma proteína em estudo. Posteriormente, o imunógeno (700 µg da proteína nativa) foi diluído até 500 µL em solução fisiológica e misturado, homogeneizado em parte igual ao adjuvante completo de Freund (Difco®) e inoculado por via subcutânea em pontos do dorso. Após o intervalo de duas semanas, uma nova inoculação foi realizada com adjuvante incompleto de Freund (Difco®). Na terceira semana, após a primeira inoculação foram coletadas amostras de soro dos animais para teste de prova de anticorpos, e se realizou uma terceira inoculação com 100 µg do imunógeno por via parenteral. Após quatro semanas foi coletada amostra de sangue e centrifugada (1500 rpm/15 min./10 °C). O soro obtido foi fracionado em tubo de polipropileno (eppendorf 2 mL) e armazenado a -20 °C.

4.2.10 Análise por “ELISA”

A reação imunoenzimática foi realizada através de testes de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), onde microplacas com 96 cavidades que foram sensibilizadas com a vicilina da soja, caupí e adzuki, em concentrações padronizadas de 1,25 µg/mL, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 mol/L), pH 9,6 e incubadas por 18 horas à 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas (3X/10 min.) com PBS-Tween (0,05%, v/v), e em seguida, adicionado o soro

anti-vicilina previamente diluído em PBS/T na presença de soro albumina bovina (1 g/100 mL, m/v) em diluições seriadas (1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800), seguido de incubação (37 °C/60 min). Depois, as placas foram lavadas novamente com PBS/T, e então, adicionado uma solução com peroxidase anti-IgG de coelho (Pierce® Chemical Co., Rockford Illinois, USA), diluída em PBS/T/BSA e incubada novamente (37 °C/60 min). As placas foram novamente lavadas com PBS/T, e em seguida incubadas em tampão citrato (0,1 mol/L, pH 5,0), contendo orto-fenilenodiamina (1 mg/mL, m/v) e peróxido de hidrogênio (0,03%, v/v), durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, a reação era interrompida pela adição de HCl (3 mol/L). A leitura das placas foi realizada pela medida de absorbância a 492 nm, em *Microplate reader* 550 (Bio-Rad®). Todos os ensaios foram acompanhados por controles do antígeno e conjugado simultaneamente a partir de soro de coelho, como negativos.

4.2.11 Análise por “immunoblotting”

As proteínas cromatografadas foram analisadas em SDS-PAGE de acordo como descrito no item 4.2.5, e transferidas para membrana de PVDF (Bio-Rad®) por eletrotransferência. Após a transferência, a membrana foi imersa em solução TBS contendo BSA (3 g/100 mL, m/v), sob leve agitação por 120 minutos e em seguida, lavada (3X/5 min.) com PBS/T (1%, v/v), e na sequência, incubada com soro anti-vicilina sob agitação por 18 horas a 4 °C. Posteriormente, realizou-se nova lavagem (3X/5min.) com PBS/T e então, a membrana foi incubada em solução de avidina na presença do anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase por 90 minutos. Finalmente, a membrana era lavada, nas mesmas condições descritas

anteriormente, e a imunoreatividade detectada através da imersão em PBS/T na presença de 3',3-diaminobenzidina (DAB, SigmaAldrich®).

4.2.12 Animais, dieta e protocolo experimental

O efeito da administração por via oral da vicilina isolada de soja, caupí e adzuki foram avaliados em ratos submetidos à dieta hiperlipidêmica durante 28 dias. Ratos machos adulto-jovens da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*), com 4 semanas de idade e peso aproximado de 70 g $\pm$ 8 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* Botucatu foram utilizados no experimento. Inicialmente, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas por uma semana à temperatura controlada de 22 $\pm$ 2 °C, com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração comercial (Purina®) e água *ad libitum*. Após atingirem o peso corporal médio de 150 g, os animais foram transferidos para gaiolas individuais para nova adaptação até dar-se início ao experimento quando o peso corporal encontrava-se entre 180 e 200 g/animal. Todos os procedimentos realizados com os animais foram executados após apreciação e aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob protocolo CEP/FCF/CAR de nº 25/2009 (Anexo A).

Para o experimento foram elaboradas duas dietas experimentais. A primeira, dieta caseína padrão (STD) foi elaborada conforme as recomendações de necessidade para ratos e roedores em crescimento, reportado pelo “*American Institute of Nutrition*” (AIN-93G) e descrito por Reeves et al. (1993). A segunda dieta, hipercolesterolêmica (HC) foi preparada de acordo com as modificações propostas por Nath et al. (1959), pelo acréscimo de gordura de côco (20 g/100 g), colesterol (1 g/100 g) e ácido cólico (0,5 g/100 g) para induzir ao estado de dislipidemia em ratos.

As dietas foram produzidas pela empresa PragSoluções® Ltda, como apresentado na tabela 1.

Os animais foram divididos de acordo com peso corporal em seis grupos de $n = 9$, como descrito a seguir: [1] grupo standard (controle negativo) recebeu a dieta STD. Todos os demais grupos, [2] hipercolesterolêmico (HC, controle positivo), [3] β -conglucina de soja (S), [4] β -vignina de caupí (C), [5] β -vignina de adzuki (A) e [6] sinvastatina (SV) foram alimentados com a dieta HC. As proteínas e o fármaco foram administrados diariamente por técnica de gavagem, respectivamente, nas concentrações de 300 e 50 mg/Kg de peso corpóreo dos animais, durante 28 dias. Os grupos controle negativo e positivo, respectivamente, STD e HC receberam uma solução salina (NaCl 0,2 mol/L), nas mesmas condições supracitada, como apresentado na tabela 1.

4.2.13 Parâmetros experimentais

Ao longo de todo o período experimental, o ganho de massa corporal, consumo alimentar e excreção fecal dos grupos foram quantificados de dois em dois dias, respeitando sempre os mesmos horários, através de aferição em balança semi-analítica Q520 (Quimis®). A ingestão foi determinada pela diferença entre a ração ofertada no dia em relação ao resto de ingesta do dia posterior. A eficácia alimentar foi calculada a partir da relação entre o ganho de massa e consumo alimentar no mesmo período. As fezes foram coletadas, secas em estufa à temperatura de 60 °C “overnight”. Posteriormente, pesadas, armazenadas e conservadas sob congelamento a -24 °C para posteriores análises.

Ao final do período experimental, os animais foram deixados entre 10-12 horas em jejum. Posteriormente, foram eutanasiados por decapitação. O sangue foi

coletado em tubos contendo gel separador SST II (Vacutainer BD[®]), e em seguida centrifugado (1500 rpm/15 min./4 °C). O soro obtido foi fracionado em *ependorfs*, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado sob congelamento à -70 °C, para posteriores análises. A gordura retroperitoneal, o tecido hepático e o cardíaco foram removidos, lavados em solução fisiológica (NaCl 9 g/100 mL, m/v), pesados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -70 °C, para as análises.

4.2.14 Análises bioquímicas séricas e índices

A concentração de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis foram mensurados por método colorimétrico utilizando *kits* comerciais (Laborlab[®] Co., Ribeirão Preto, Brasil). O colesterol total foi quantificado pela reação de CHOD-PAP, como descrito por Stockbridge et al. (1989). A HDL-c foi quantificada após separação por meio de agente precipitante como proposto por Assmann (1979). Os triacilglicerídeos foram quantificados a partir da reação de GPO-PAP, como sugerido por Annoni et al. (1982), e a concentração plasmática de glicose foi determinada através da reação GOD-PAP, como descrito por Trinder (1969).

A fração não-HDL-colesterol foi determinada pela diferença entre as quantificações plasmáticas de colesterol total e HDL-c. O índice aterogênico foi calculado de acordo como proposto previamente por Liu et al. (2006), e os índices hepatossomático e viscerossomático foram calculados pelas seguintes relações, respectivamente: massa do tecido hepático/massa corporal (%) e massa da gordura retroperitoneal/massa corporal, proposto por Chen et al. (2003).

Tabela 1 – Composição química da dieta e tratamento dos diferentes grupos experimentais

	STD	HC	S	C	A	SV
Ingrediente (g/100 g)						
Caseína	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Amido	39,75	25,25	25,25	25,25	25,25	25,25
Dextrina	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	7,00	--	--	--	--	--
Óleo de coco	--	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Mistura mineral	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Birtatarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Colesterol	--	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ácido cólico	--	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Composição (energia %)						
Proteína	20,3	17,8	17,8	17,8	17,8	17,8
Lipídio	15,9	39,6	39,6	39,6	39,6	39,6
Carboidratos	63,8	42,6	42,6	42,6	42,6	42,6
Tratamento (mg/Kg/dia)						
<i>Glycine max</i>	--	--	300	--	--	--
<i>Vigna unguiculata</i>	--	--	--	300	--	--
<i>Vigna angularis</i>	--	--	--	--	300	--
<i>Sinvastatina</i>	--	--	--	--	--	50

STD = controle negativo (dieta normal, tratado com placebo), HC = grupo hipercolesterolêmico (dieta HC, tratado com placebo), S = grupo vicilina de soja (dieta HC, tratado com 300 mg/Kg/ β -conglucina), C = grupo vicilina de feijão caupí (dieta HC, tratado com 300 mg/Kg/ β -vignina), A = grupo vicilina de feijão adzuki (dieta HC, tratado com 300 mg/Kg/ β -vignina) e SV = grupo sinvastatina (dieta HC, tratado com 50 mg/Kg/estatina).

A concentração plasmática de insulina foi analisada por método de ELISA, utilizando *kit* imunoenzimático ultrasensível para ratos (DGR Instruments® GmbH, Frauenbergstr, Germany), como descrito por Korner et al. (2001).

A atividade plasmática da lipoproteína lipase foi determinada de acordo com procedimentos descritos por Roe e Byler (1963), e da transaminase pirúvica (TGP) foi quantificada como sugerido previamente por Tonks (1983). Para determinar a atividade destas enzimas foram utilizados *kits* comerciais (Bioclin® Co., Belo Horizonte, Brasil).

4.2.15 Análises hepáticas e da excreção fecal

Amostras do tecido hepático e de excreção fecal foram utilizadas para extração dos lipídeos totais, utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) conforme propostos por Folch et al. (1957), com algumas adaptações. Após a homogeneização completa com auxílio “*Potter-elvehjem*”, o material foi transferido para tubos, agitado vigorosamente por 5 minutos, e deixados em repouso por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, a fase clorofórmica obtida foi imediatamente filtrada em sulfato de sódio anidro, e alíquotas foram levadas para evaporação do solvente em estufa com circulação a forçada a 70 °C por 2 horas. A quantificação foi feita por análise gravimétrica.

O colesterol foi extraído de acordo com metodologia descrita por Haug e Hostmark (1987). Amostras dos fígados foram homogeneizadas com isopropanol (10% m/v), em “*Potter-elvehjem*” por 5 minutos e mantidos em repouso por 48 horas a 4 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1500 rpm/10 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado na determinação do colesterol por *kits* enzimáticos, de acordo como descrito para as análises plasmáticas.

4.2.16 Análise histológica

Amostras do tecido hepático (lóbulo maior) obtidas imediatamente após a eutanásia foram fixadas com solução de formol-sacarose (10% paraformaldeído, 5% de sacarose, 20 $\mu\text{mol/L}$ de BHT e 2 μmol EDTA, pH 7,4) por 48 horas. Em seguida, o material foi lavado em água corrente por 24 horas, e conservado em solução de hidroálcoolica (7:3 v/v). Posteriormente, as peças foram desidratadas por imersão em diferentes concentrações de xilol, depois em soluções alcoólicas, inclusão em parafina e coloração por hematoxilina-eosina (HE). A microtomia foi efetuada com espessura de 5 μm . Uma amostragem de cinco animais ($n = 5$) de cada grupo foram avaliados, sendo que para cada animal foram confeccionadas três lâminas com quatro cortes semi-seriados, desprezando-se 10 “secções” entre cada lâmina. As imagens foram observadas e capturadas por scanner.

4.2.17 Extração do RNA total

O isolamento do RNA total foi baseado em procedimentos previamente descritos por Chomezynski e Sacchi (1987), com algumas adaptações. Fragmento do tecido hepático (50-100 mg) foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL (eppendorf), onde imediatamente foi adicionado (1 mL) o TriReagent (Sigma Aldrich®) e homogeneizado manualmente com auxílio de pistilo. Em seguida, o material foi deixado em repouso durante 2 minutos a temperatura ambiente. Depois, foi adicionado clorofórmio (200 μL), seguido de homogeneização por agitação vigorosa por 15 segundos e deixado em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado (12000 $\times g$ /15 min./4 °C) e a fase aquosa (superior aproximadamente 400 μL) foi transferida para um novo tubo, seguido da adição de isopropanol (500 μL), uma leve homogeneização com as mãos por

inversão e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, centrifugado (12000 $\times g$ /10 min./4 °C), e o precipitado “*pellet*” foi lavado com etanol 75% (1 mL), e novamente centrifugado (7500 $\times g$ /5 min./4 °C). Finalmente, o “*pellet*” foi seco a temperatura ambiente por 8 minutos, solubilizado em água DEPC, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -70 °C em ultrafreezer. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar utilizando-se material previamente esterilizado.

4.2.18 Quantificação do RNA total e cDNA

A concentração de RNA total e cDNA foram quantificadas por leitura direta de alíquota (4 μ L), utilizando-se o espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare®) no comprimento de onda em 260, e 280 nm para a presença de contaminantes proteicos. A razão 260/280 entre 1,75–2,00 foi estabelecida como exigência mínima de qualidade para a transcrição reversa. Estes dados são apresentados no apêndice A.

4.2.19 Análise do RNA total por eletroforese em gel de agarose

Após a extração e quantificação, as amostras de RNAs foram analisadas em gel de agarose (1,2 g/100 mL, m/v) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,5), no qual foi utilizado também como tampão de corrida de acordo com procedimentos descritos por Masek et al. (2005). As amostras foram preparadas em tampão (1:10 v/v, *loading dry*) contendo Tris-HCl (50 mmol/L), glicerol (60%, v/v), azul de bromofenol (0,25%, m/v), brometo de etídeo (1 μ L da solução estoque 1 mg/mL) em pH 7,6, e formamida deionizada com 60% (v/v) de concentração final. A desnaturação foi realizada a 65 °C/5 min. e imediatamente

mantida em gelo. O gel foi submetido a um gradiente de voltagem de 5 V/cm, e posteriormente, a presença das frações ribossomais (28S, 18S e 5S) foram visualizadas em transiluminador UV, a imagem foi documentada, e são mostradas no apêndice B.

4.2.20 Transcrição reversa

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNA foi realizada segundo protocolo estabelecido por Tzanetakis et al. (2005), onde foram utilizados 2 µg de RNA total, transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen) e Oligo dT (12-18) *primer* (Invitrogen®) em presença de inibidores de Rnase (Rnase OUT, Invitrogen) e H₂O mili-Q (q.s.p) em um volume final de 20 µL, utilizando-se o *kit High-Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems®). A ordem e as etapas de incubação da transcrição reversa no termociclador *MyCler* (BioRad®) foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante, e o cDNA posteriormente quantificado, analisado e conservado à -20 °C (Apêndice C).

4.2.21 Análise do cDNA por eletroforese em gel de agarose

O cDNA obtido foi analisado em gel de agarose (0,8 g/100 mL, m/v) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,5), de acordo com procedimentos previamente estabelecidos por Porter e Sanborn (1992). As amostras de cDNA foram preparadas em tampão concentrado (5X), contendo Tris-HCl (10 mmol/L, pH 8,0), EDTA (1 mmol/L, pH 8,0), azul de bromofenol (0,125%, m/v) xilenocianol (0,125%, m/v), glicerol (30%, v/v), e aplicadas no gel na presença de brometo de etídeo (0,5 mg/mL), em tampão TAE a um gradiente de voltagem de 5 V/cm. Posteriormente, foram visualizadas em transiluminador UV, e as imagens documentada são mostradas no apêndice D.

4.2.22 Oligonucleotídeos iniciadores

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes alvos para a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) foram selecionadas através de análise das sequências de mRNAs a partir de outros estudos realizados anteriormente, e confirmadas no genebank através do programa BLASTn do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), mostrado no apêndice 5. Foram selecionados os iniciadores referentes à: enzima ácido graxo sintase (FAS), 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoAr), 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A sintase (HMG-CoAs), enzima málica (MA), receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-r), proteína-1c ligante do elemento regulatório de esterol (SRBP-1c), proteína-2 ligante do elemento regulatório de esterol (SREBP-2), 7-alfa hidroxilase (CYP7A), proteína receptora alfa do proliferador ativado de peroxissoma (PPAR α) e beta-actina (bAct) que foram produzidos pela empresa Invitrogen® Brasil Ltda. As sequências dos *primes* são apresentadas na tabela 2.

4.2.23 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) e quantificação relativa

Individualmente, cada par de *primer* foi otimizado e validado para se determinar a concentração ideal dos mesmos para as posteriores amplificações, sendo realizados ensaios em diferentes concentrações (0,25 – 0,7 $\mu\text{mol/L}$), e diferentes quantidades de cDNA, através de diluições seriadas (200, 100, 50, 25 e 12,5 ng), ambas submetidas às mesmas condições. As amplificações de validação e as curvas de dissociação dos genes-alvos, bem como os dados obtidos e empregados para o cálculo da equação de regressão/correlação entre as variáveis podem ser observados no apêndice F. As amplificações foram realizadas em PCR

em tempo real tomando 200 ng de cDNA por reação, delineado da seguinte configuração: gene-alvo (triplicata + controle negativo) e gene-endógeno (triplicata + controle negativo), utilizando o sistema baseado no fluorocromo *SYBR*, do *kit SYBR Master Mix* (Applied Biosystems®) de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante. As condições de amplificação foram às seguintes: 1 ciclo de 50 °C/2 min. [estágio 1], 1 ciclo de 95 °C/10 min. [estágio 2], 40 ciclos de 95 °C/0,15 min. [estágio 3] e 60 °C/1 min. [estágio 4]. As leituras da fluorescência foram realizadas em equipamento 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems®) a cada ciclo de amplificação, e posteriormente, analisadas em *Sequence Detection Software* v 1.3 (Applied Biosystems®).

A quantificação relativa a partir da análise de expressão dos genes-alvos foi realizada baseada no método $\Delta\Delta CT$, segundo modelo descrito por Ptáffl et al. (2001). Os dados obtidos em CT (*threshold cycle*) que representa o número de ciclos de PCR necessário para detecção acima do ruído de fundo (*background*) foi utilizado para se obter o resultado expresso em unidades arbitrárias, e posteriormente, para realização da análise estatística.

4.2.24 Análise estatística

Os dados dos tratamentos com nove repetições foram avaliados utilizando o software SigmaStat® 3.5 (Dundas software, Germany, 1999). Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de *Student-Newman-Keuls* (SNK), para comparação múltipla entre os tratamentos. Foi estabelecido $P < 0,05$ como nível de significância. Todos os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão (SE).

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados na análise de *real-time* qRT-PCR¹

Gene	Número acesso	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	bp	Temperatura °C
FAS	NM017332.1	5`CCTCTTCCCTGGCACTGGCTACCT3`	5`ACTCGGCGGGGATCGGGACTT3`	281	60
MA	NM012600.2	5`TCCGACCAGCAAAGCTGAGT3`	5`CACGGCCCTTGGTCACTT3`	162	60
CYP7A1	J05430.1	5`CAAGACGCACCTCGCTATCC3`	5`CCGGCAGGTCATTCACTTG3`	206	60
HMG-CoA redutase	NM013134.2	5`AAGGGGCGTGCAAAGACAATC3`	5`ATACGGCACGGAAAGAACCATAGT3`	406	60
HMG-CoA sintase	NM173094.1	5`GAACTTCTCTCCCCCTGGTGA3`	5`CAGCGGCTCCCCTTTCTT3`	357	55
LDLr	NM175762.2	5`AAGAAAGGGGGTTTGAATGG3`	5`GGAGGACACTGTCACCGACT3`	490	65
SREBP-1c	NM001276707.1	5`GCAACACTGGCAGAGATCTACGT3`	5`TGGCGGGCACTACTCAGGAA3`	191	60
SREBP-2	NM001033694.1	5`CCGGTAATGATGGGCCAAGAGAAAG3`	5`AGGCCGGGGGAGACATCAGAAG3`	400	65
PPAR-α	NM013196.1	5`TACCACTATGGAGTCCACGCATGT3`	5`TTGCAGCTTCGATCACACTTGTCTG3`	98	60
β-actina	NM031144.3	5`CATGAAGATCAAGATCATTGCTCCT3`	5`CTGCTTGCTGATCCACATCTG3`	109	55

¹FAS - enzima ácido graxo sintase (EC 2.3.1.85); MA - enzima málica (EC 1.1.1.40); CYP7A1 - enzima colesterol 7α-hidroxilase (EC 1.14.13.17); HMG-CoAr - 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (EC 1.1.1.34); HMG-CoAs - 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintase (EC 4.1.3.5); LDLr - receptor de lipoproteína de baixa densidade; SREBP - Proteína ligadora do elemento regulado por esteroide; PPAR-α - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das proteínas

A hipótese inicial deste estudo foi fundamentada em observações anteriores que demonstraram características próximas e algumas vezes semelhantes entre as vicilinas (β -vignina) dos feijões caupí e adzuki a β -conglícinina da soja que tem sua propriedade hipocolesterolêmica relatada na literatura, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado. Inicialmente, foram realizadas análises virtuais a partir das estruturas primárias destas proteínas, através de softwares de bioinformática disponíveis, tais como: *GeneBank Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado para obter registros de sequência dos aminoácidos das proteínas (subunidade α' da β -conglícinina: AY221105.1, subunidade α da β -conglícinina: AB234095.1, subunidade β da β -conglícinina: AB213029.1; β -vignina do feijão caupí: AM905848; β -vignina do feijão adzuki: AB292246.1). A partir do software *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org/>) foi obtido informações FASTA (subunidade α' da β -conglícinina: Q84UB3_SOYBN, subunidade α da β -conglícinina: Q94LX2_SOYBN, subunidade β da β -conglícinina: Q93VL9_SOYBN; β -vignina do feijão caupí: A8YQH5_VIGUN; β -vignina do feijão adzuki: A4PI98_PHAAN) e o *CLUSTAL W multiple sequence alignment* 1.83 (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) para comparações múltiplas entre as sequência, ambos da European Bioinformatics Institute – EMBnet (<http://www.ebi.ac.uk/>) (Figura 4).

Figura 4 – Alinhamento sequencial das vicilinas (7S) de soja, caupí e adzuki.

α' -subunidade/soja	VEEEEECEEGQIPRPRP--QHPERERQQHGEKEEDEGEQPRPFFPRPRQ
α -subunidade/soja	-VEKEECEEGEIPRPRPRPQHPEREPQQPGEKEEDEDEQPRPIPFPRP-Q
β -subunidade/soja	-----
β -vignina/caupí	-----
β -vignina/adzuki	-----
α' -subunidade/soja	PHQEEHEQKEEHEWHRKEEKHGKGSEEEQDEREHPRPHQPHQKEEEKH
α -subunidade/soja	PRQEEHEQREEQEWPRKEEKRGEKGSEEEDED-----EDEEQ
β -subunidade/soja	-----
β -vignina/caupí	-----
β -vignina/adzuki	-----
α' -subunidade/soja	EWQHKQEKHQGKESEEEEEEDQDEDEEQDKESQSESESGESQREPRRHKNKN
α -subunidade/soja	DERQFPFPRPPHQKEERNEEEDEDEEQQRESESESDS----ELRRHKNKN
β -subunidade/soja	-----VREDENNP
β -vignina/caupí	-----VPLLLGLVLFASLSVSFGIVHRGHQESQEESEPR-QQNNP
β -vignina/adzuki	-----IVHREHHESREEVSVS SGKNNP
α' -subunidade/soja	PFHFNSKRFQTLFKNQYGHVRVLQRFNKRSSQQLQNLRDYRILEFNSKPNP
α -subunidade/soja	PFLFGSNRFTLFLKNQYGRIRVLQRFNQRSPQLQNLRDYRILEFNSKPNP
β -subunidade/soja	FYFRSSNSFQTLFENQNVRIQLLQRFNKRSPQLENLDRYRIVQFQSKPNP
β -vignina/caupí	FYFDSDRWFHTLFRNQYGHVLRVLQRFQDQSKQIQNLNRYRVVEFQSKPNP
β -vignina/adzuki	FYFNSDRWFHTLYRNEWGHIRVLQRFQDQSKQMQLNLENYRVVEFKSKPNP
α' -subunidade/soja	LLLPHHADADYLIVILNGTAILTLVNNDDRDSYNLQSGDALRVPAGTTFFY
α -subunidade/soja	LLLPNHADADYLIVILNGTAILSLVNNDDRDSYRLQSGDALRVPS-----
β -subunidade/soja	ILLPHHADADFLFVLSGRAILTLVNNDDRDSYNLHPGDAQRIIPAG----
β -vignina/caupí	LLLPHHADADFLVVLNGRAILTLVNPDGRDSYILEQGHAKTPAG----
β -vignina/adzuki	LLLPHHADADFLVVLNGTAVLTLVNPDSRDSYILEQGHAKTPAG----
α' -subunidade/soja	VVNPNDNENLRMIAGTTFFYVVNPNDNENLRMITLAIIPVKNKPGRFESFFLS
α -subunidade/soja	-----GTTYVYVNPNDNENLRITLAIIPVKNKPGRFESFFLS
β -subunidade/soja	-----TTYLVNPHDHQNLKIIKLAIPVKNKPGRYDDFFLS
β -vignina/caupí	-----TTFFLVNHDDNENLRIVKLAVPVNNPHRFQDFFLS
β -vignina/adzuki	-----TTFFLVNPDNDNENLRITLAIIPVNNPHRFQDFFLS
α' -subunidade/soja	STQAQQSYLQGFSGKNILEASYDTKFEEINKVLFGREEGQQQGEERLQESV
α -subunidade/soja	STEAQQSYLQGFSRNILEASYDTKFEEINKVLFSGREEGQQQGEQRLQESV
β -subunidade/soja	STQAQQSYLQGFSGHNILETSHSEFEEINRVLFGEES-----EQRQQEGV
β -vignina/caupí	STEAQQSYLQGFSGKNILEASFDSDFKENRVLFGEESQKQDEESQQEGV
β -vignina/adzuki	STEAQQSYLRGFSKNILEASFDSDFKENRVLFGEERQQQQGEESREEGV
α' -subunidade/soja	IVEISKQIRELSKHAKSSSRKTISSEDKPFLNLSRDPISYNSKLGKLFEEI
α -subunidade/soja	IVEISKEQIRALSKRAKSSSRKTISSEDKPFLNLSRDPISYNSKLGKFFEEI
β -subunidade/soja	IVELSKQIRQLSRRAKSSSRKTISSEDEPFNLRSRNPISYNNFGKFFEEI
β -vignina/caupí	IVQLKREQIRELMKHAKSTSKKSLSTQNEPFNLRSQKPIYSNKFGRLEHEI
β -vignina/adzuki	IVELKREQIQELMKHAKSSSRKELSSQDEPFNLRSKPIYSNKFGRWYEM
α' -subunidade/soja	TQ-RNPQLRDLDFVLSVDMNEGALFLPHFNSKAIVVLVINEGEANIELV
α -subunidade/soja	TPEKNPQLRDLDFLSIVDMNEGALLLPHFNSKAIVILVINEGDANIELV
β -subunidade/soja	TPEKNPQLRDLDFLSSVDINEGALLLPHFNSKAIVILVINEGDANIELV
β -vignina/caupí	TPEKNPQLRDLDFVLTSDVIKEGGLMPNYNSKAIVILVNVNKGANIELV
β -vignina/adzuki	TPEKNPQLKDLDFVFISSVDMKEGALLLPHYSSKAIVIMVINEGEAKIELV
α' -subunidade/soja	GIKEQQQRQQQEEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYPVMVNATSDLNFF
α -subunidade/soja	GLKEQQQEQQEEQPLEVRKYRAELSEQDIFVIPAGYPVVVNATSNLNFF
β -subunidade/soja	GIKEQQQKQKQEEEPLEVQRYRAELSEDDVFVIPAAYPVVVNATSNLNFL
β -vignina/caupí	GQREQQQQ-QQEEES-WEVQRYRAEVSDDDVFVIPASYPVAITATSNLNFI
β -vignina/adzuki	GLSDQQQKQQEEES-LEVQRYRAELSEDDVFVIPAAYPVAINATSNLNFF
α' -subunidade/soja	AFGINAENNRNFLAGSKDNVISQIPSQVQELAFPRSAKDIENTLIKSQSE
α -subunidade/soja	AIGINAENNRNFLAGSQDNVISQIPSQVQELAFPGSAQAVEKLLKNQRE
β -subunidade/soja	AFGINAENNRNFLAGKDNVVRQIERQVQELAFPGSAQDVERLLKKQRE
β -vignina/caupí	AFGINAENNRNFLAGEDNMSEIPTVLDVTFPASGEKVEKLINKQSD
β -vignina/adzuki	AFGINAENNRNFLAGGKDNVMSEIPTVLEVSFPASGKKVEKLICKQSE
α' -subunidade/soja	SYFVDAQPQQKEEGNKGRKGPLSSILRAFY--
α -subunidade/soja	SYFVDAQPKKKEEGNKGRKGPLSSILRAFY--
β -subunidade/soja	SYFVDAQPQQKEEGSKGRKGPFPSILGALY--
β -vignina/caupí	SHFTDHSSKREERV-----
β -vignina/adzuki	SHFVDAQPEQQQREEGHKGRKGSLSSILGSLY

C-terminal

A partir das simulações *in silico* (Tools on the ExPASy Server, NCBI Blast/UniProtKB), observou-se que a β -vignina dos feijões caupí e adzuki apresentam estrutura primária semelhante em 65 e 70%, respectivamente, à subunidade α' da β -conglícinina (Figura 4). Obviamente, a análise virtual de hidrólise enzimática a partir dessas proteínas, realizada em diferentes simulações com pepsina, tripsina, quimotripsina, isoladamente, (*PeptideCutter*, Server: Bioinformatics Resource Portal) ou pela simulação gastrointestinal (Biopep: www.uwm.edu.pl/biochemia) mostraram um grande número de peptídeos idênticos para as proteínas 7S dessas espécies (dados não apresentados).

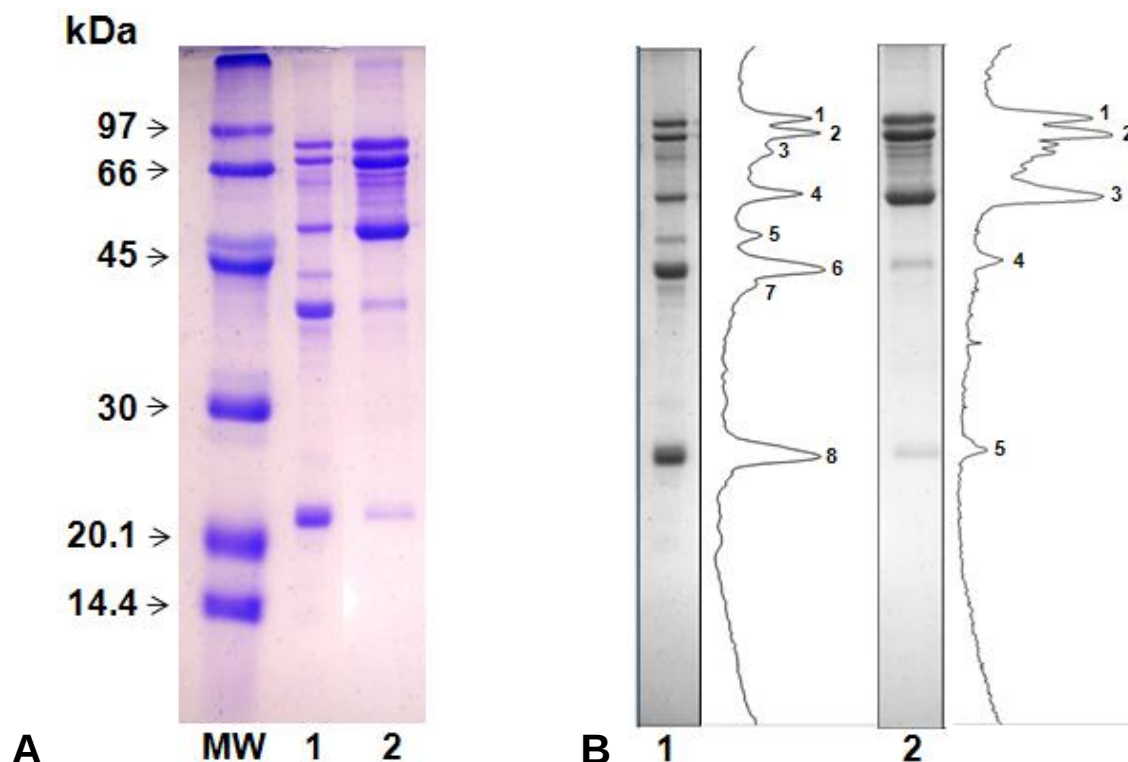
Embora as proteínas sejam codificadas por uma família multigênica e, além disso, exista uma significativa variação entre gêneros e a própria espécie, estudos anteriores apresentados por Borroto e Dure (1987), Argos et al. (1985) e Lackey (1981) sugeriram a partir de estudos moleculares, a hipótese de que a codificação de diferentes globulinas em leguminosas apresentariam genes ancestrais comuns. Isso tem sido reportado como o determinante da homologia observada entre algumas espécies, tal como foi mostrado no alinhamento sequencial para a β -vignina dos feijões caupí e adzuki com a β -conglícinina da soja (Figura 4). Gepts et al. (2005) a partir de diversos modelos de investigação e dos resultados apresentados numa conferência sobre os avanços em leguminosas, realizada em 2004 na cidade de Santa Fé, Novo México (USA), sugeriram que as relações filogenéticas entre gêneros da família das leguminosas são basicamente refletidas na similaridade a nível genômico entre as espécies, algumas vezes mostrando-se elevada e outras não.

5.1.1 β -conglícinina da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

Estudos de composição química mostram que a fração protéica representa entre 35-45% da constituição do grão de soja. No entanto, foi observado que o processo de remoção parcial de lipídeos, que no grão integral representam de 18-25%, provocou um aumento da concentração protéica para 50%, observada na farinha desengordurada. O método utilizado para extração e isolamento da proteína 7S de soja teve um rendimento de 48% do total da fração presente na farinha. A análise de densitometria do extrato protéico total da soja mostrou que as globulinas constituem 90% do isolado protéico de soja (Figura 5), sendo que a glicínina, proteína majoritária, representa 55%, e a β -conglícinina 38% da proteína total do isolado. Os resultados de caracterização da 7S isolada da soja, apresentados na tabela 3 demonstram que a subfração- β da β -conglícinina representa a principal subunidade na proteína, enquanto que subfração- α' a minoritária.

A relação 11S/7S encontrada foi de 1,44, semelhante às espécies cultivadas no Japão que apresentam relação de 1,28 a 1,70, porém, maior do que as taxas descritas em cultivares nos EUA que se mostram entre 0,97 a 1,07. Estudos anteriores têm reportado que esta diferença entre os cultivares inicia-se já na fase de síntese, e se estende durante o acúmulo de proteína no cotilédono. Estudos mais recentes de análise filogenética de cultivar de soja têm confirmado esta diversidade de composição (EL-SHEIMY et al. 2001), sendo sugerido também para outras espécies de leguminosas.

Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (A), e representação gráfica da análise de densitometria das proteínas de soja (B).



Coluna 1, representa o extrato protéico total; coluna 2, representa a proteína β -conglycinina (7S), e a coluna MW corresponde ao padrão de massa molecular (97-14,4 kDa).

Tabela 3 – Massa molecular (MM), percentual relativo (%) e mobilidade relativa (Rf) das subunidades presente no extrato protéico total e da proteína β -conglycinina (7S) isolada de soja¹

subunidade	Extrato protéico total	β -conglycinina isolada	Rf.
	MM (% relativo)	MM (% relativo)	
1	70,9 (10,5)	70,9 (24,5)	0,109
2	67,5 (11,7)	67,0 (28,2)	0,131
3	62,5 (8,9)	-	0,159
4	53,2 (9,8)	53,0 (37,7)	0,220
5	45,2 (4,4)	-	0,281
6	39,8 (20,9)	-	0,332
7	37,0 (6,8)	-	0,371
8	19,5 (27,0)	-	0,606

¹Géis de eletroforeses digitalizados e analisados por densitometria utilizando scanner Alpha Imager e software AlfaEase FC (Alpha Innotech, San Leandro, Ca, USA).

O cromatograma obtido no fracionamento da proteína isolada apresentou dois picos majoritários com absorção em 280 nm, localizados entre as frações 40-48 (pico 1) e 78-88 (pico 2), porém, a determinação de proteína mostrou apenas traços protéicos no pico 1, enquanto que o pico 2 representava a vicilina de soja (Figura 6). A análise do pico 1, por SDS-PAGE mostrou a presença da fração legumina (11S) como contaminante, no entanto, não houve relação entre os valores de absorbância observados e a quantidade proteica. Estudos anteriores de isolamento de proteínas em outras espécies de leguminosas têm reportado a presença de compostos não protéicos com absorção em 280 nm. O resultado obtido da recromatografia do pico da vicilina de soja está apresentado nas figuras 7A e 7B. O resultado apresentado na análise eletroforética mostra que a proteína 7S da soja é composta de 3 subunidades, duas delas (α -conglícinina e α' -conglícinina) com massa entre 94-66 e uma entre 66-24 kDa (β -conglícinina), como reportado anteriormente por Nagano et al. (1992), El-Sheimy et al. (2001) e Duranti et al. (2004).

Figura 6 – Cromatograma obtido em coluna Sepharose CL-6B a partir do fracionamento da β -conglícinina (7S) isolada.

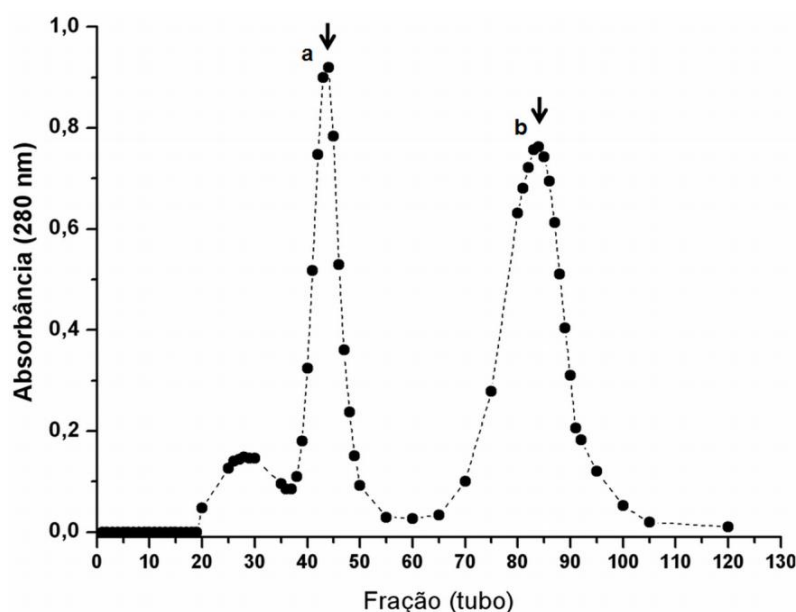
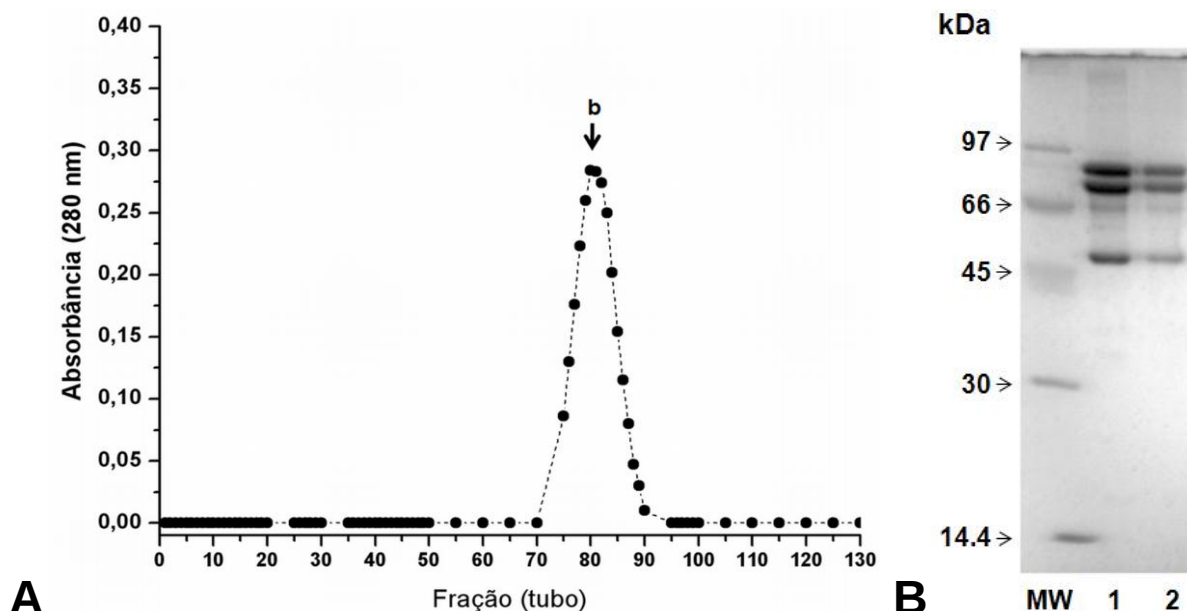


Figura 7 – Cromatografia do pico obtido em coluna de Sepharose CL-6B (A), e eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras do pico da β -conglucina de soja (B).



Coluna 1 e 2 representam 10 e 5 μ g/proteína, respectivamente, e a coluna MW corresponde ao padrão de massa molecular (97-14,4 kDa).

5.1.2 β -vignina do feijão caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

A separação da vicilina (7S) do feijão caupí foi padronizada a partir de repetitivos ensaios de solubilidade e precipitação isoelétrica, a princípio considerando resultados reportados por alguns estudos anteriores (FREITAS et al. 2004; ALUKO et al. 1997). Embora os estudos de separação e caracterização de proteínas de muitas espécies de leguminosas tenham sido por décadas objetivo de estudos, verificou-se na literatura que algumas espécies, entre estas as do gênero *Vigna*, apresentam ainda deficiência de informações específicas quanto à caracterização das propriedades de suas proteínas e subunidades proteicas.

As globulinas são proteínas majoritárias das leguminosas, inclusive quando se reporta a proteína de feijões do gênero *Vigna* que geralmente apresentam característica insolúvel em água, porém, dissolvem em soluções salinas diluídas em

valores de pH acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico (DURANTI e GIUS, 1997). Em algumas espécies como, por exemplo, na soja as globulinas chegam a representar 90% do conteúdo proteico total do grão. Neves et al. (2003) e Aluko et al. (1997) estudaram algumas propriedades da globulina principal parcialmente purificada do feijão caupí. Estes estudos mostraram que as globulinas apresentam-se como fração protéica majoritária no caupí. O fracionamento da proteína mostrou que a globulina e albumina representam 42 e 10% da proteína total, respectivamente (SHOSHIMA et al. 2005; NEVES et al. 2003). Murray et al. (1983) mostraram que esta fração representa 72% do conteúdo protéico total, enquanto que as albuminas (solúveis em água) representaram 12-17% do grão. No entanto, Freitas et al. (2004) mostraram que as albuminas representavam cerca de 45%, em contrastes com os resultados reportados em outros estudos (SHOSHIMA et al. 2005; NEVES et al. 2003; ALUKO et al. 1997; MURRAY et al. 1983). Nosso estudo mostrou que as globulinas representam a proteínas majoritárias do feijão caupí, sendo que as albuminas representam entre 10-20%, como pode ser observado em um ensaio de caracterização destas frações (Tabela 4).

Resultados de estudos anteriores demonstraram que a banda na faixa de 94 kDa representa as albuminas, as demais subunidades entre 94-66 kDa (legumina, 11S), 66-29 kDa representam as globulinas, como mostrado na figura 8. Nossos resultados foram próximos aos sugeridos anteriormente por Freitas et al. (2004). Os autores postularam ainda que a globulina total do feijão caupí era representava por três proteínas majoritárias, denominadas genericamente gama, beta e alfa vigninas. A fração alfa-vignina em condição desnaturante, mas não redutora mostrou uma subunidade majoritária com massa molecular de aproximadamente 80 kDa e duas menores com massas próximas a 44 e 58 kDa. Os resultados mostraram ainda que

esta fração não glicosilada apresentava um coeficiente de sedimentação de 16,5S, característico de proteínas do tipo legumina (11S), e que a proteína gama (2S), a menor fração mostrada, apresentava um única subunidade com massa de 22 kDa, que por ausência de carga negativa não era separada por troca iônica.

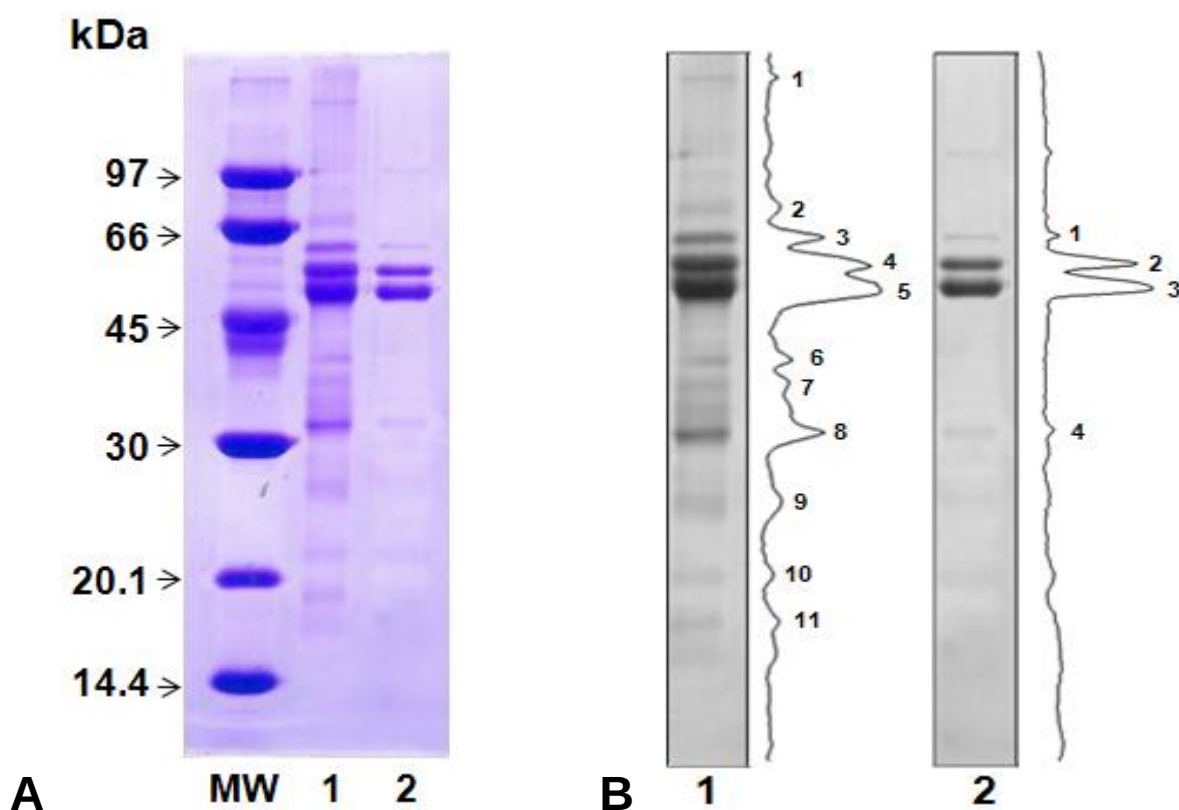
Tabela 4 – Massa molecular (MM), percentual relativo (%) e mobilidade relativa (Rf) das subunidades presente no extrato protéico total e da proteína β -vignina (7S) isolada do feijão caupí¹

subunidade	Extrato protéico total	β -vignina isolada	Rf.
	MM (% relativo)	MM (% relativo)	
1	111,2 (3,2)	-	0,073
2	72,8 (5,5)	-	0,239
3	65,8 (9,6)	65,9 (8,4)	0,278
4	60,4 (15,7)	60,5 (33,3)	0,312
5	55,8 (23,9)	55,9 (46,8)	0,343
6	44,7 (5,8)	-	0,435
7	40,7 (4,9)	-	0,466
8	34,5 (18,2)	35,0 (11,5)	0,531
9	27,6 (7,7)	-	0,618
10	21,5 (5,5)	-	0,716
11	18,8 (5,7)	-	0,770

¹Géis de eletroforeses digitalizados e analisados por densitometria utilizando scanner Alpha Imager e software AlfaEase FC (Alpha Innotech, San Leandro, Ca, USA).

Por outro lado, Freitas et al. (2004) descreveram a β -vignina como a proteína majoritária do caupí constituída de dois polipetídeos majoritários glicosilados (55 e 60 kDa) e outros menores (66, 22, 24 e 30), característico de proteínas do tipo vicilina (7S). No entanto, outros autores têm sugerido a presença de um número maior de subunidades. Nossos resultados mostrados na figura 8A, a partir do isolamento da β -vignina do feijão caupí constituía-se de dois polipeptídios majoritários (55 e 50 kDa) e três menores (61, 25 e 35 kDa) que foram confirmados pela análise densitométrica (Figura 8B), semelhantes aos resultados sugeridos anteriormente por Aluko et al. (1997).

Figura 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (A), e representação gráfica da análise de densitometria das proteínas do feijão caupí (B).



Coluna 1, representa o extrato protéico total; coluna 2, representa a proteína β -vignina (7S) isolada, e a coluna MW corresponde ao padrão de massa molecular (97-14,4 kDa).

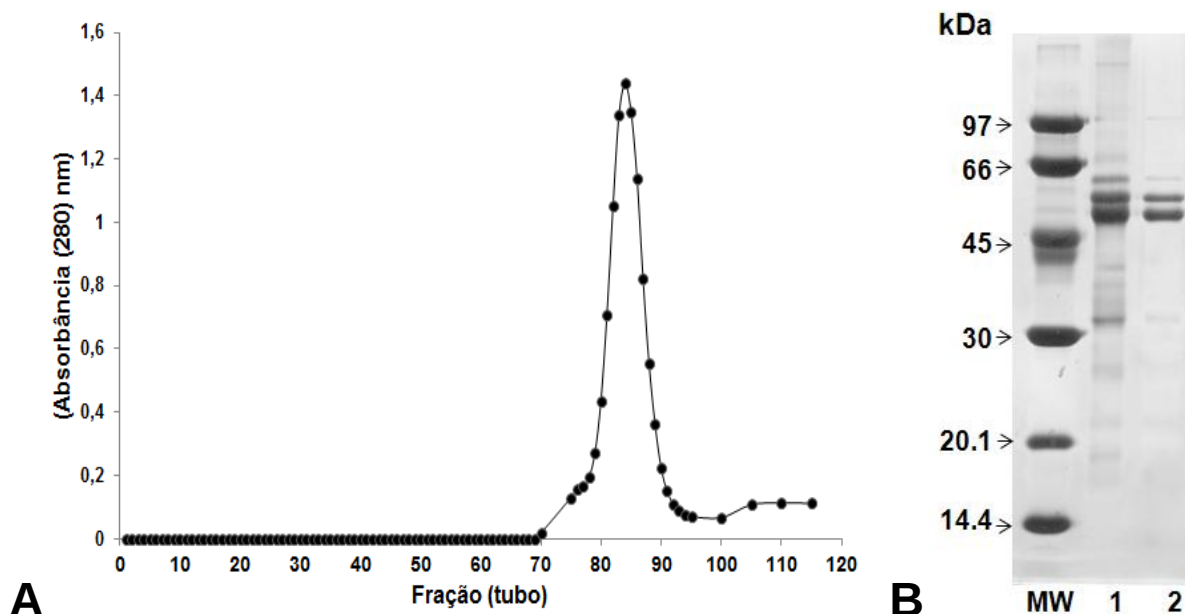
A extração do isolado protéico da farinha do feijão caupí, em diferentes concentrações de cloreto de sódio mostrou alterar a obtenção da globulina total. A fração 11S mostrou-se ausente no isolado quando a extração foi realizada com 0,1 mol/L NaCl, de acordo com os procedimentos de isolamento apresentado na figura 2. O efeito observado sugere que esta proteína torna-se insolúvel em concentração igual ou abaixo desta citada anteriormente, mas é prontamente revertida quando levada a concentração entre 0,15-0,30. Além disso, o processo subsequente de diálise/diluição mostrou viável para a remoção da fração albumina com massa molecular próxima a 97 kDa, posteriormente confirmada após testes de fracionamento por extração em solução aquosa, seguido de

precipitação/solubilização por diálise.

Embora o rendimento de extração obtido de 8,6% da β -vignina (7S) em relação à farinha integral tenha sido considerado baixo, devido às várias etapas do procedimento de separação, quando relacionado ao conteúdo protéico total na farinha, este percentual passou a representar 39%, e em relação ao conteúdo estimado da fração 7S este percentual apresentou média de 49%. Além disso, apresentou um grau de pureza superior a 93%.

A β -vignina isolada, que posteriormente foi cromatografada em coluna de gel filtração, apresentou um único pico de proteína, como pode ser observado no cromatograma (Figura 9A), e confirmada por análise de SDS-PAGE (Figura 9B), comparado aos resultados previamente estabelecidos na literatura por Aluko et al., (1997).

Figura 9 – Cromatograma em coluna de Sepharose CL-6B da β -vignina (7S) do feijão caupí (A), e eletroforese em gel poliacrilamida em condições redutoras (B).



Coluna 1, extrato protéico total de feijão caupí; coluna 2, proteína β -vignina cromatografada, e a coluna MW corresponde ao padrão de massa molecular (97-14,4 kDa).

5.1.3 β -vignina do feijão adzuki (*Vigna angularis* Willd)

A extração e isolamento da proteína do tipo vicilina do feijão adzuki foi padronizada a partir de alguns conhecimentos prévios já estabelecidos na literatura de caracterização físico-química. Sakakibara (1979) e colaboradores estudaram algumas propriedades da proteína isolada obtida do fracionamento cromatográfico em coluna Sephadex G-200. No estudo foi determinado o coeficiente de sedimentação, ponto isoelétrico, estimativa do peso molecular e caracterização eletroforética que nos forneceu subsídios importantes para delinear um procedimento viável para o isolamento da β -vignina do feijão adzuki. Outros estudos têm mostrado que as globulinas, assim como na maioria das espécies de leguminosas, representam a fração majoritária da proteína total do adzuki, que consiste de mistura de dois grupos principais com coeficiente de sedimentação de 7 e 2, respectivamente, 7S vicilina (majoritário) e 2S (FUKUDA et al. 2007; CHEN et al. 1984). Sakakibara et al. (1979) demonstraram que estes dois grupos representam 55 e 45% da fração protéica total, respectivamente. Chen et al. (1984) confirmaram os primeiros achados de Sakakibara et al. (1979) demonstrando que a globulina 7S constitui a principal fração protéica do feijão adzuki.

Nossos resultados, obtidos a partir da extração com NaCl 0,5 mol/L mostraram que o isolado proteico obtido do feijão adzuki à predominância de proteínas das classes albumina e globulina (Tabela 5), corroborando como os resultados reportado por outros autores. Chen et al. (1984) verificaram que cerca de 11% da proteína do feijão adzuki era solúvel em água, enquanto que na presença de 0,5 mol/L de NaCl este percentual era representado por aproximadamente 70% da proteína total. Este estudo mostrou ainda que a globulina 7S era constituída de três subunidades denominadas de alfa, beta 1 e beta 2, com massa molecular estimada

de 55, 28 e 25 kDa, respectivamente. No entanto, os autores mencionam que a subunidade beta 1 não tem sido frequentemente encontrada em diferentes cultivares do feijão adzuki (Tabela 5). Este fato foi observado em nossos resultados, onde a β -vignina isolada apresentou apenas duas subunidades α e $\beta 1$, como pode ser observada na figura 10.

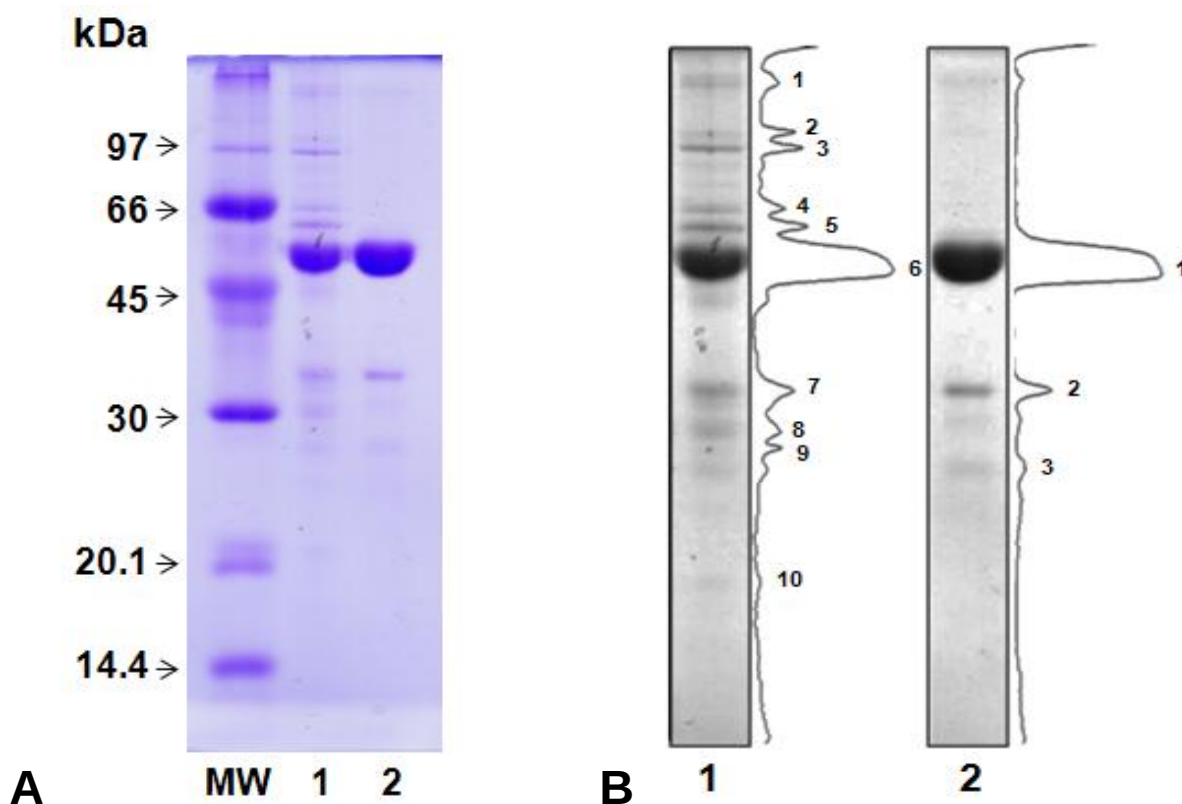
Tabela 5 – Massa molecular (MM), percentual relativo (%) e mobilidade relativa (Rf) das subunidades presente no extrato protéico total e da proteína β -vignina (7S) isolada do feijão adzuki¹

subunidade	Extrato protéico total	β -vignina isolada	Rf.
	MM (% relativo)	MM (% relativo)	
1	102,4 (4,7)	-	0,056
2	87,0 (3,7)	-	0,123
3	83,0 (5,3)	-	0,142
4	68,3 (3,6)	-	0,221
5	64,5 (7,0)	-	0,245
6	57,2 (59,4)	56,5 (88,0)	0,294
7	38,0 (6,9)	37,9 (9,4)	0,460
8	33,5 (5,6)	-	0,512
9	29,6 (1,8)	29,6 (2,6)	0,563
10	20,7 (2,0)	-	0,709

¹Géis de eletroforeses digitalizados e analisados por densitometria utilizando scanner Alpha Imager e software AlfaEase FC (Alpha Innotech, San Leandro, Ca, USA).

O isolamento da β -vignina (7S) se iniciou da separação do isolado protéico total obtido por extração com água, seguida de reextração com solução salina 0,5 mol/L de NaCl. A partir do conhecimento na qual a proteína albumina apresenta uma elevada solubilidade em solução aquosa, distinto das globulinas, o procedimento subsequente consistiu na diluição do isolado protéico (IP) a uma concentração salina $a < 0,05$ mol/L, para separação destas duas classes e obtenção da globulina total, como descrito no procedimento de isolamento apresentado na figura 3.

Figura 10 – Eletroforese em gel de SDS-PAGE em condições redutoras (A), e representação gráfica da análise de densitometria das proteínas do feijão adzuki (B).



Coluna 1, representa o extrato protéico total; coluna 2, representa a β -vignina (7S) isolada, e a coluna MW corresponde ao padrão de massa molecular (97-14,4 kDa).

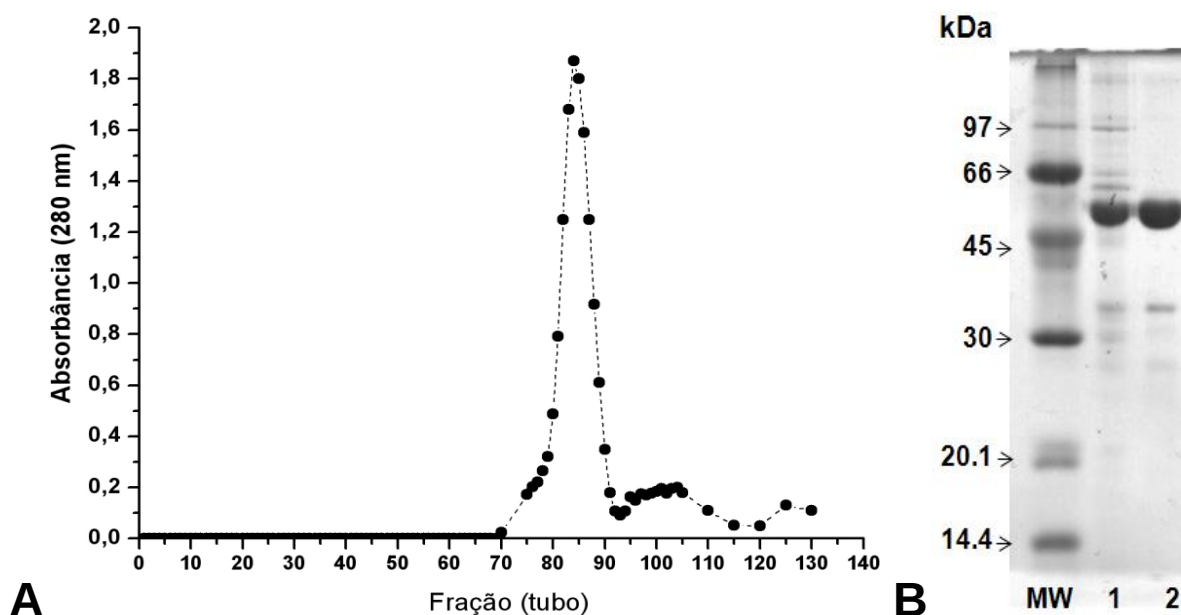
Durante os testes de padronização do isolamento, foi observado que a fração 11S tornava-se insolúvel em concentração salina de NaCl abaixo de 0,25 mol/L. Desta forma, foi possível realizar a separação das frações 7S e 11S pela resolubilização e precipitação do material nessas condições. No entanto, foi observado que este procedimento provocava uma perda significativa da 7S que migrava para o precipitado junto com a fração 11S. Por outro lado, os procedimentos adotados mostraram ser eficientes para isolamento da fração 7S, visto que no sobrenadante não foi observado presença da fração 11S, porém, observou-se que a parte da fração 2S ainda permanecia presente. O isolado de globulina 7S foi então diluído novamente a uma concentração de NaCl $\leq 0,05$ mol/L o que a tornava

insolúvel, e ao mesmo tempo a fração 2S permanecia em solução favorecendo a exclusão desta fração por uma simples centrifugação. Este efeito era acelerado quando a solução era mantida em temperatura próxima a 4 °C.

A β -vignina (7S) isolada foi cromatografada em coluna de filtração em gel Sepharose CL-6B, e apresentou apenas um pico majoritário no perfil cromatográfico, conforme mostrado na figura 11A. Os tubos do pico foram reunidos, o teor protéico quantificado e realizado SDS-PAGE para verificar o perfil eletroforético da β -vignina do feijão adzuki. A análise densitométrica da proteína β -vignina purificada mostrou que esta fração consisti de duas subunidades majoritárias com massa molecular de 55 e 30 kDa, genericamente denominadas de alfa e beta vigninas, respectivamente, conforme evidenciado por Fukuda et al. (2007) e Chen et al. (1984). Assim, foi possível determinar por meio da análise comparativa entre IP, β -vignina isolada e purificada que o processo de fracionamento a partir da farinha mostrou ser eficiente em relação às condições qualitativas.

Chen et al. (1984), e recentemente Fukuda et al. (2007) demonstraram que a proteína β -vignina constitui a fração protéica majoritária do feijão adzuki, no entanto, devido às inúmeras etapas do protocolo de isolamento e pela necessidade de se obter um material adequado qualitativamente o rendimento de extração mostrou ser consideravelmente baixo. O rendimento médio de obtenção da β -vignina em relação à farinha integral, proteína e vicilina total foi de 4, 18 e 43%, respectivamente. Isto significa que para cada 1 Kg⁻¹ de farinha utilizada na extração se obteria em média de 33,4 g de β -vignina.

Figura 11 – Cromatograma obtido em coluna de Sepharose CL-6B (A), e SDS-PAGE em condições redutoras da β -vignina (7S) do feijão adzuki (B).



Coluna 1, isolado protéico total; coluna 2, β -vignina cromatografada, e a coluna MW corresponde ao padrão de massa molecular (97-14,4 kDa).

5.1.4 Caracterização eletroforética bidimensional

As figuras 12 e 13 apresentam os resultados da análise eletroforética bidimensionais obtidos a partir do extrato protéico total e da proteína β -vignina (7S) cromatografada dos feijões caupí e adzuki, respectivamente.

As proteínas solubilizadas em 0,5 de NaCl e pH 7 presentes no extrato protéico total do caupí quando foram separadas por IEF apresentaram uma grande diversidade de “spots”, porém, é possível identificar duas proteínas principais, como pode ser observado na figura 12A. Além disso, podem ser notados os “spots” correspondentes a globulina 11S e albumina (100, 70, 43, 35, 32 e 25 kDa) como sugerido por Murray et al. (1983), e a proteína 2S de 22 kDa, reportada por Freitas et al. (2004). Embora não tenha sido realizada uma análise quantitativa dos “spots” é possível comprovar a partir dos dados apresentados que as duas subunidades majoritárias da β -vignina do caupí de 61 e 56 kDa apresentam o ponto isoelétrico

(PI) muito próximos, entre o pH 5,3-5,5, enquanto que a subunidade de 35 kDa mostrou PI próximo ao pH 7. Estes resultados foram confirmados a partir dos resultados com a proteína cromatografada, mostrados na figura 12B.

O extrato proteico total do feijão adzuki, obtido nas mesmas condições mencionadas anteriormente demonstrou uma menor diversidade de proteínas comparada ao feijão caupí, como mostrado na figura 13. Chen et al. (1984) relataram a presença de aproximadamente 50 “spots” em um extrato de adzuki obtido com água. Os autores demonstraram ainda uma grande frequência de proteínas entre o pH 4-5,2. Nosso resultado foi distinto aos reportados nesse estudo, todavia, seja possível observar algumas proteínas na faixa de pH indicado pelos autores do estudo (CHEN et al. 1984). A subunidade principal da β -vignina do feijão adzuki que apresenta massa molecular de 57 kDa apresentou PI entre o pH 5,8 e 6,0, como pode ser observado na figura 13A. Esse resultado foi confirmado pela análise *IEF* realizada com a proteína β -vignina cromatografada, apresentada na figura 15B, e foram semelhantes aos dados sugeridos por estudos anteriores (CHEN et al. 1984).

Sakakibara e colaboradores (1979) sugeriram num estudo anterior que a β -vignina do adzuki era formada de três subunidades de 55, 28 e 25 kDa, respectivamente, enquanto que Chen et al. (1984), mais tarde reportariam a duas subunidades de 55 e 35 kDa. Meng e Ma (2001) sustentaram a presença de uma subunidade majoritária de 55 kDa, e duas menores com aproximadamente 33 e 29 kDa. Porém, nossos resultados confirmam a presença de uma proteína majoritária e pelo menos outra menor de aproximadamente 38 kDa, como pode ser observado na figura 13B.

Figura 12 – Mapa eletroforético bidimensional do extrato protéico total (A), e da β -vignina (B) obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B do feijão caupí.

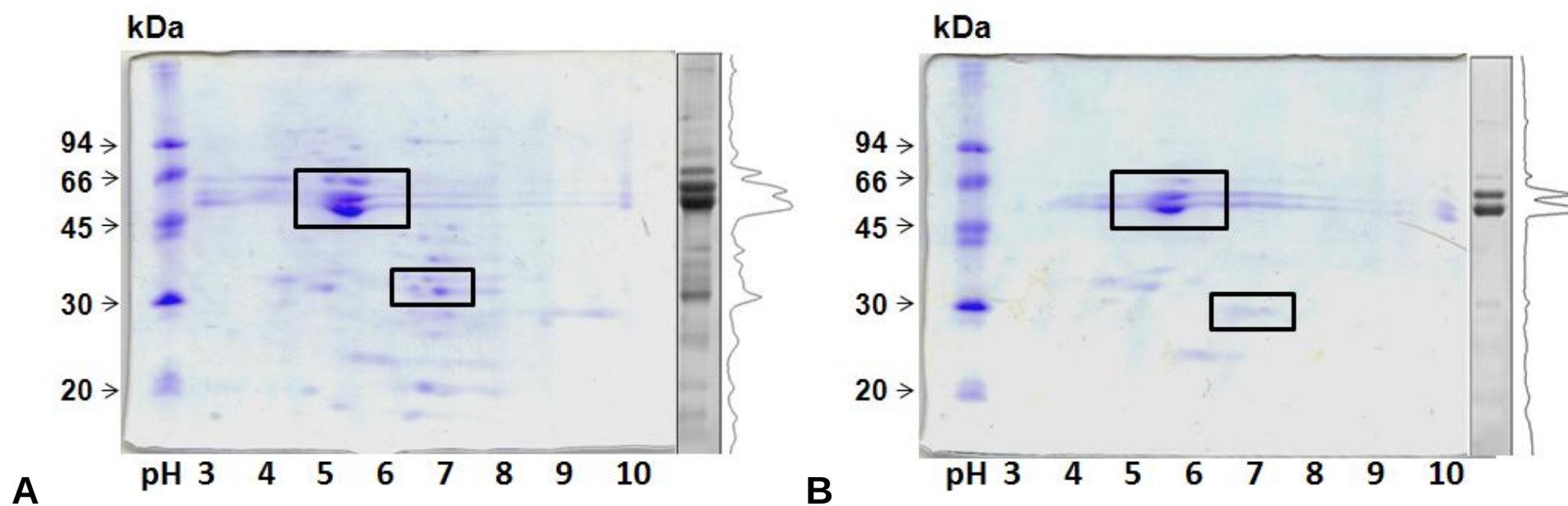
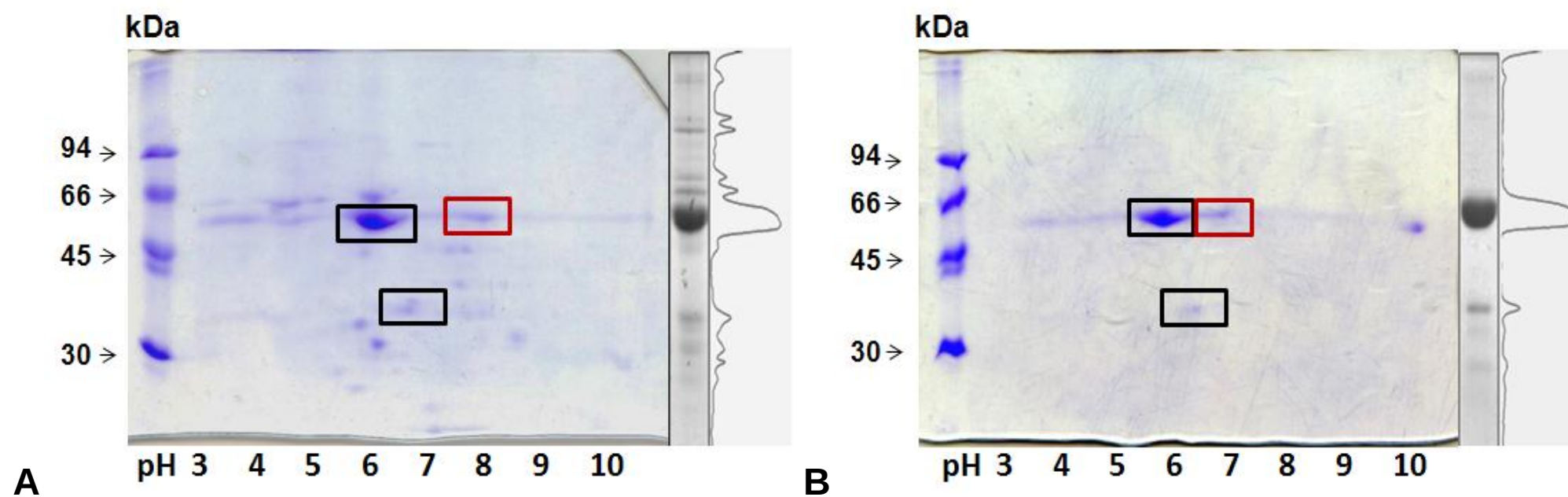


Figura 13 – Mapa eletroforético bidimensional do (A) extrato protéico total, e da (B) β -vignina obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B do feijão adzuki.



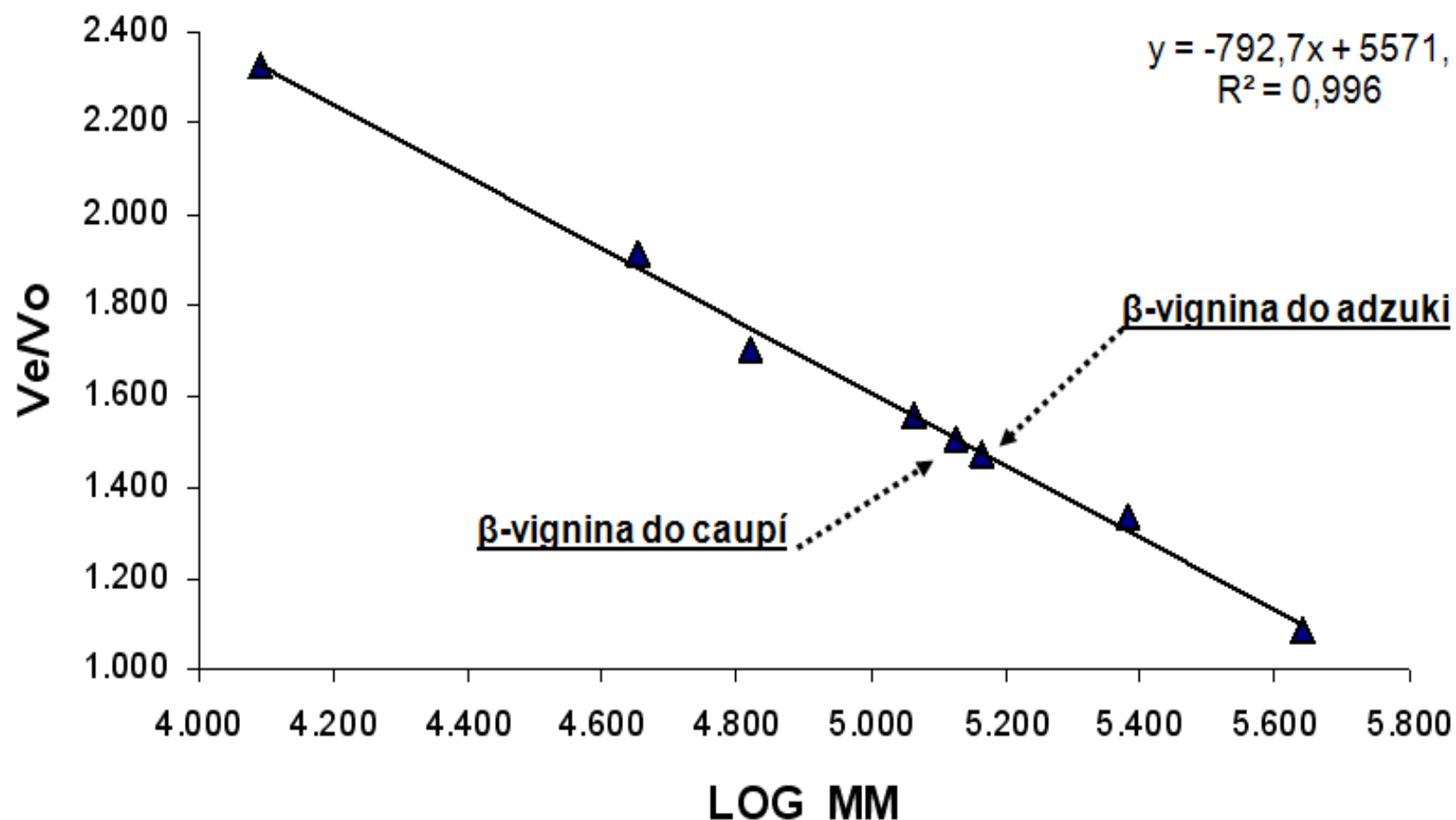
5.1.5 Estimativa da massa molecular

A estimativa da massa molecular das proteínas β -vignina dos feijões caupí e adzuki são apresentadas na figura 14. Estas foram analisadas a partir da relação V_e/V_o contra o logaritmo das proteínas conhecidas, através de gel filtração em coluna Sephadex G200.

As vicilinas (7S) apresentaram massa molecular de 133,8 e 146,4 kDa, respectivamente, para os feijões caupí e adzuki. De fato, quando comparados os resultados observados através da análise densitométrica para a β -vignina do caupí, demonstrados na tabela 4, verificou-se que a estimativa obtida a partir da somatória das três subunidades de aproximadamente 61, 56 e 35 kDa, respectivamente, confirma o resultado encontrado para o peso molecular da proteína (~152 kDa), pela técnica cromatográfica supracitada.

Por outro lado, partindo desse mesmo princípio, na análise da β -vignina do adzuki foi possível observar uma inesperada divergência. A somatória das subunidades de aproximadamente 57 e 38 kDa, resulta numa massa molecular de 95 kDa, bem menor do que a estimativa obtida (~154 kDa), por gel filtração em coluna Sephadex G-200. Fukuda et al. (2007), pela primeira vez citado na literatura, alegaram num estudo de caracterização molecular e clonagem das isoformas da β -vignina que a subunidade majoritária de aproximadamente 57 kDa, observada no nosso estudo, é composta na verdade de duas subunidades de massa molecular praticamente semelhante, embora tem sido demonstrado em condições ainda controversas. No entanto, quando esta informação foi levada em consideração na estimativa, a partir do trímero, obtivemos uma massa molecular de exatamente 152,9 kDa, que posteriormente foi confirmada a partir de análises subsequentes (dado não mostrado).

Figura 14 – Gráfico de estimativa da massa molecular por filtração em gel em coluna Sephadex G-200, da proteína β -vignina dos feijões caupí e adzuki obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B.



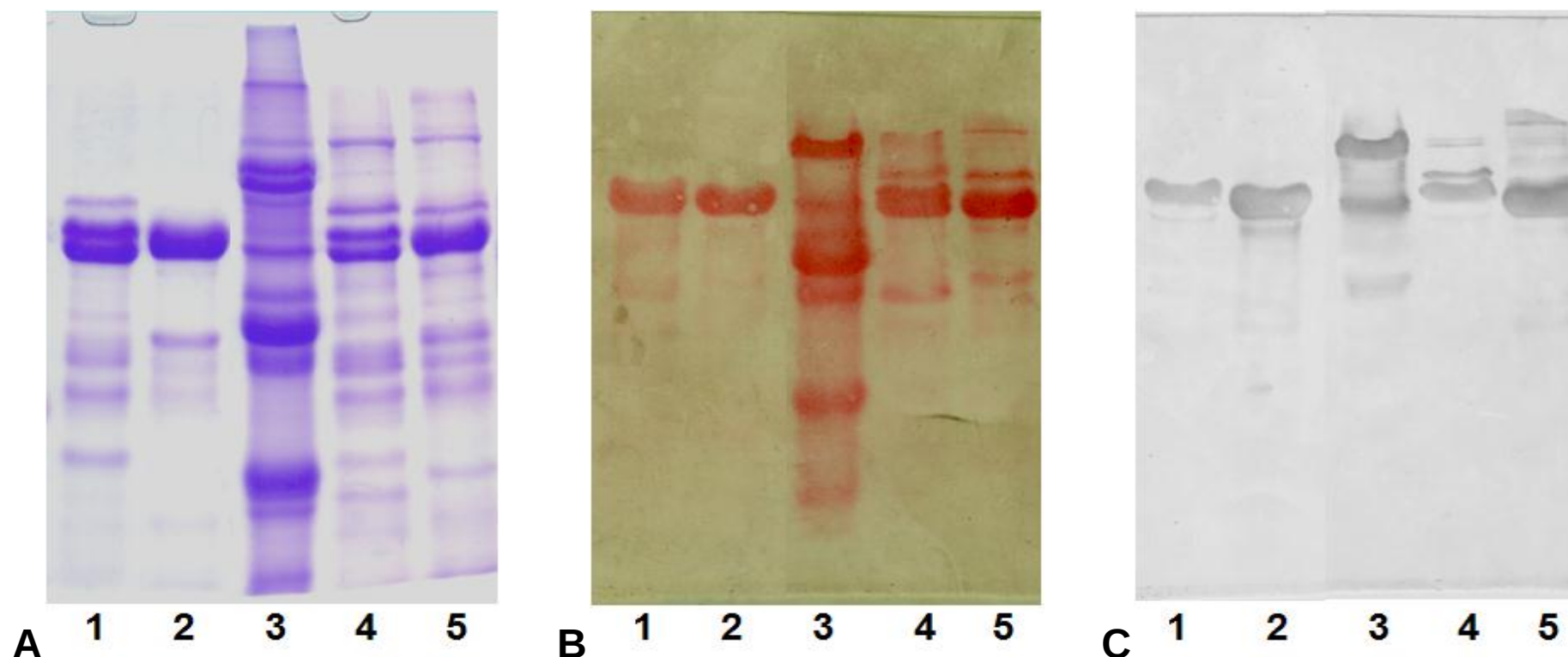
Padrões moleculares utilizados foram: ferritina (440 kDa), miosina (240 kDa), galactosidase (116 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e citocromo C (12,4 kDa).

5.1.6 N-glicosilação e outras análises

No presente estudo, foi realizada a análise qualitativa da presença de cadeias polipeptídicas no extrato proteico total e na β -vignina obtidos dos feijões caupí e adzuki. Inicialmente, através de simulações computacionais (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) realizadas com base nas sequências disponíveis da β -vignina destas espécies. Assim, verificamos que a proteína do caupí não demonstrava sítios de predisposição para glicosilação, mas foi observado para a proteína do adzuki (dados não mostrados). Em virtude disso, foi realizada análise de detecção, através da reação imunoenzimática com concanavalina A/peroxidase.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 15, onde se observa que ambas as β -vigninas do feijão caupí e adzuki mostram ser glicosiladas. No entanto, dentre as três subunidades reportadas no presente estudo que constitui a β -vignina do caupí, apenas a subunidade de massa correspondente a 61 kDa apresentou uma reatividade significativa. Embora nossos resultados tenham demonstrado que as duas subunidades majoritárias do caupí apresentem a mesma sequência N-terminal (IVHRXHQESQEE...). A subunidade majoritária da β -vignina do feijão adzuki com massa molecular de 57 kDa mostrou ser glicosilada, sendo que a subunidade minoritária de aproximadamente 38 kDa, apresentou uma reação em menor intensidade. A presença de carboidratos na estrutura de vicilinas tem sido frequentemente reportada na literatura. Segundo Derbyshire et al. (1976) os açúcares podem representar entre 2-5% nas globulinas de leguminosas. Além disso, a proteína β -vignina isolada do feijão caupí e adzuki apresentaram significativa quantidade de zinco ($9-12 \times 10^{-3}\%$), níquel ($8-9 \times 10^{-3}\%$), cálcio ($32-47 \times 10^{-3}\%$) e magnésio ($7-11 \times 10^{-3}\%$) (dados não mostrados).

Figura 15 – Análise de detecção de polipetídeos glicosilados por meio da reação com concanavalina A/peroxidase.



(A) eletroforese em gel de poliacrilamida, (B) confirmação de transferência da proteína para membrana PVDF através da coloração com o corante “ponceau”, (C) imunoreatividade com concanavalina A. Coluna 1, representam a proteína β -vignina do feijão caupí obtida por cromatografia em gel filtração; coluna 2, representam a proteína β -vignina do feijão adzuki obtida por cromatografia em gel filtração; coluna 3, representam o extrato protéico total de soja; coluna 4, representam o extrato protéico total do feijão caupí; coluna 5, representam o extrato protéico total obtido do feijão adzuki.

5.2 Reconhecimento imunoenzimático

Os resultados apresentados nos testes de ELISA entre os cruzamentos das proteínas nativas e os anticorpos produzidos a partir vicilina da soja, feijão caupí e feijão adzuki, apresentaram diferentes respostas e grau de antigenicidade. Posteriormente foi analisado por immunoblotting para a identificação das subunidades proteicas que determinavam a reatividade cruzada interespécie.

O soro anti- β -conglícinina (anticorpos) mostrou uma reatividade cruzada intensa com as vicilinas (antígeno) do feijão caupí e adzuki (Figura 16A). A reação imunoenzimática com caupí teve um reconhecimento de 93,5% na diluição inicial de 1/400, permanecendo em 70% em 1/12000. Valores próximos foram observados também no cruzamento com a vicilina do adzuki, sendo a reatividade de 95 e 56%, respectivamente, nas mesmas diluições supracitadas. Isto pode indicar a presença de homologia sequencial e/ou estrutural entre as proteínas devido o reconhecimento antigênico que foi observado e confirmado pela reatividade cruzada pelo método de immunoblotting com a proteína em condições desnaturantes que demonstrou que presença de bandas antigênicas frente o soro anti- β -conglícinina (Figura 16B). O resultado observado mostrou que as subunidades das vicilinas analisadas foram reconhecidas pelo soro anti- β -conglícinina policlonal, no entanto, a subunidade com massa entre 66-45 kDa da β -vignina do feijão adzuki mostrou uma reatividade maior do que as subunidades do feijão caupí (Figura 16B).

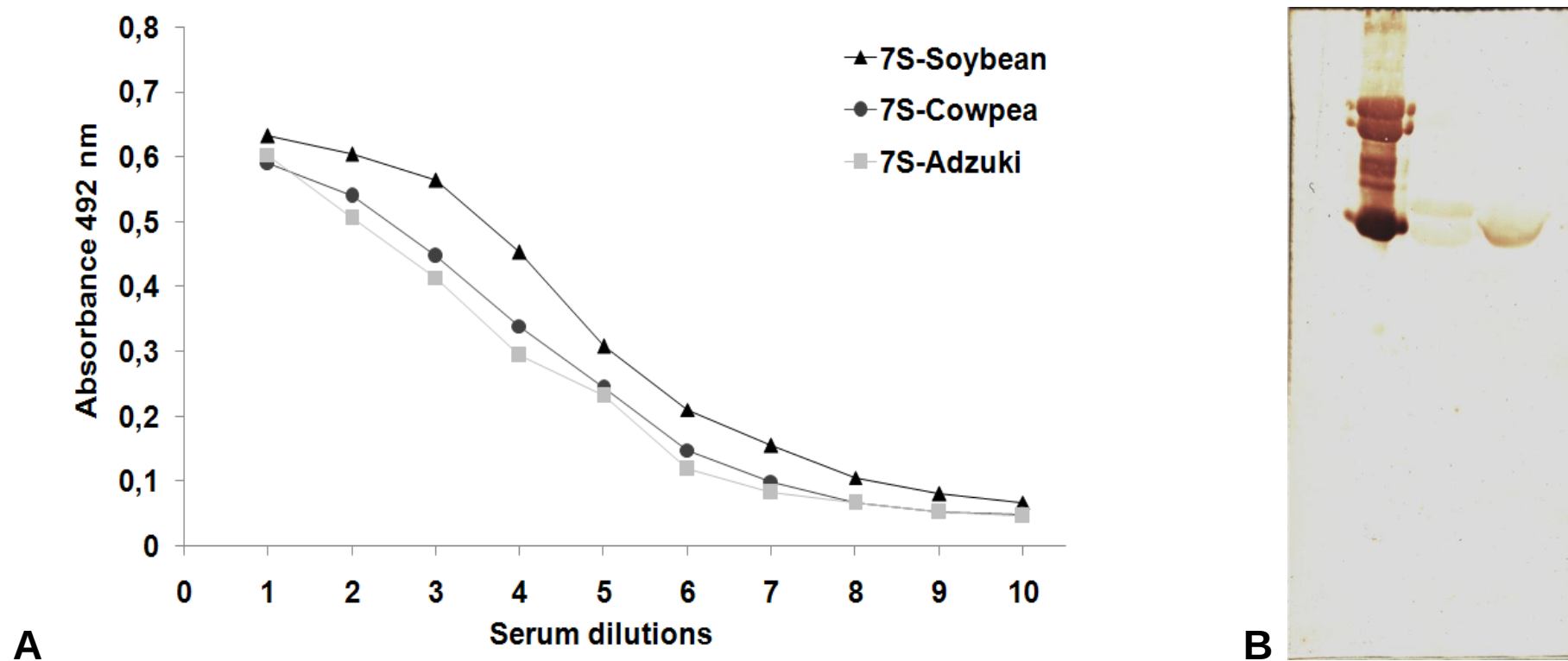
A proteína vignina nativa do adzuki apresentou um elevado nível de reconhecimento pelo cruzamento com o soro anti-vignina do feijão caupí. Os resultados observados na reação imunoenzimática mostraram uma identificação de 100% na diluição 1/400, permanecendo em 62% em 1/12000. A β -conglícinina apresentou uma baixa reatividade com o soro anti-vignina do caupí. O

reconhecimento foi 20 e 12%, nas mesmas diluições (Figura 17A). Estas observações foram confirmadas pelo resultado mostrado no immunoblotting. A subunidade proteica referente à vicilina no feijão adzuki em condições redutoras e desnaturantes foi fortemente reconhecida pela anti-vignina do caupí, enquanto que na soja as subunidades α e α' foram fracamente identificadas, apenas a subunidade β da vicilina da soja apresentou uma reatividade considerável (Figura 17B).

Os resultados da reação de ELISA apresentados pelo soro anti-vignina do feijão adzuki foram semelhantes aos observados para a anti-vignina do caupí. A proteína do caupí mostrou um alto reconhecimento pelo soro do adzuki. Na diluição inicial (1/400) foi observado um percentual de 99% de identificação, permanecendo em 65% na diluição de 1/12000, enquanto que a β -conglucina apresentou 22 e 15%, respectivamente, para as mesmas diluições (Figura 18A). Observou-se ainda que o soro obtido a partir do adzuki foi capaz de reconhecer fortemente a vicilina do caupí e à da soja em menor intensidade (Figura 18B).

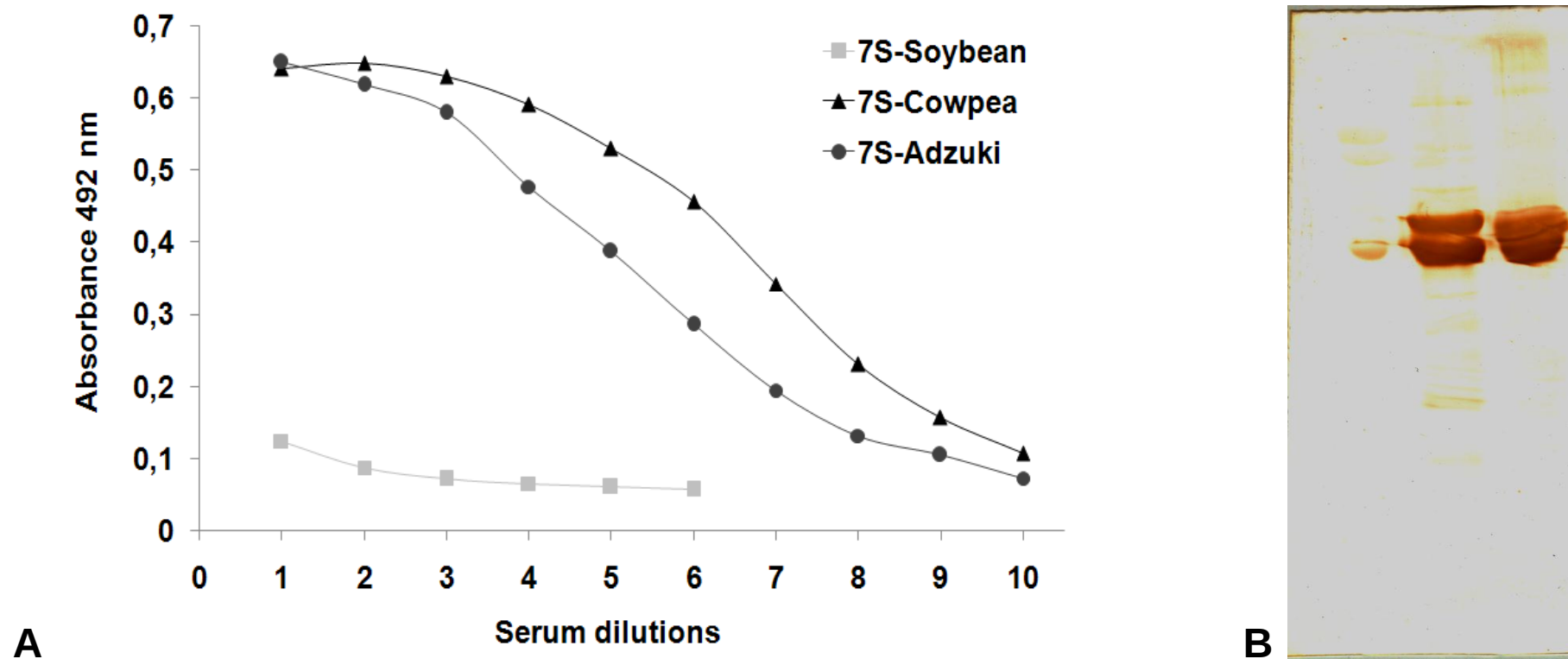
Recentemente, um grupo de pesquisadores italianos que desde a década de 90 investigam os efeitos hipocolesterolêmicos observados a partir das proteínas de soja identificaram que a sequência polipeptídica formada de 216 resíduos de aminoácido, correspondente a subunidade α' da β -conglucina, exercia ação reguladora da expressão de receptores de LDL *in vitro* e *in vivo* (CONSONNI et al. 2011, 2010). Em virtude deste fato, associado aos estudos que indicam uma forte homologia entre a vicilina da soja, feijão caupí e adzuki, e também devido ao reconhecimento antigênico observado em nossos resultados, cruzamos as proteínas β -vignina dos feijões com o anti-corpo da subunidade α' da β -conglucina.

Figura 16 – Cruzamento entre o soro anti- β -conglucina com a proteína β -vignina dos feijões caupí e adzuki obtida por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B.



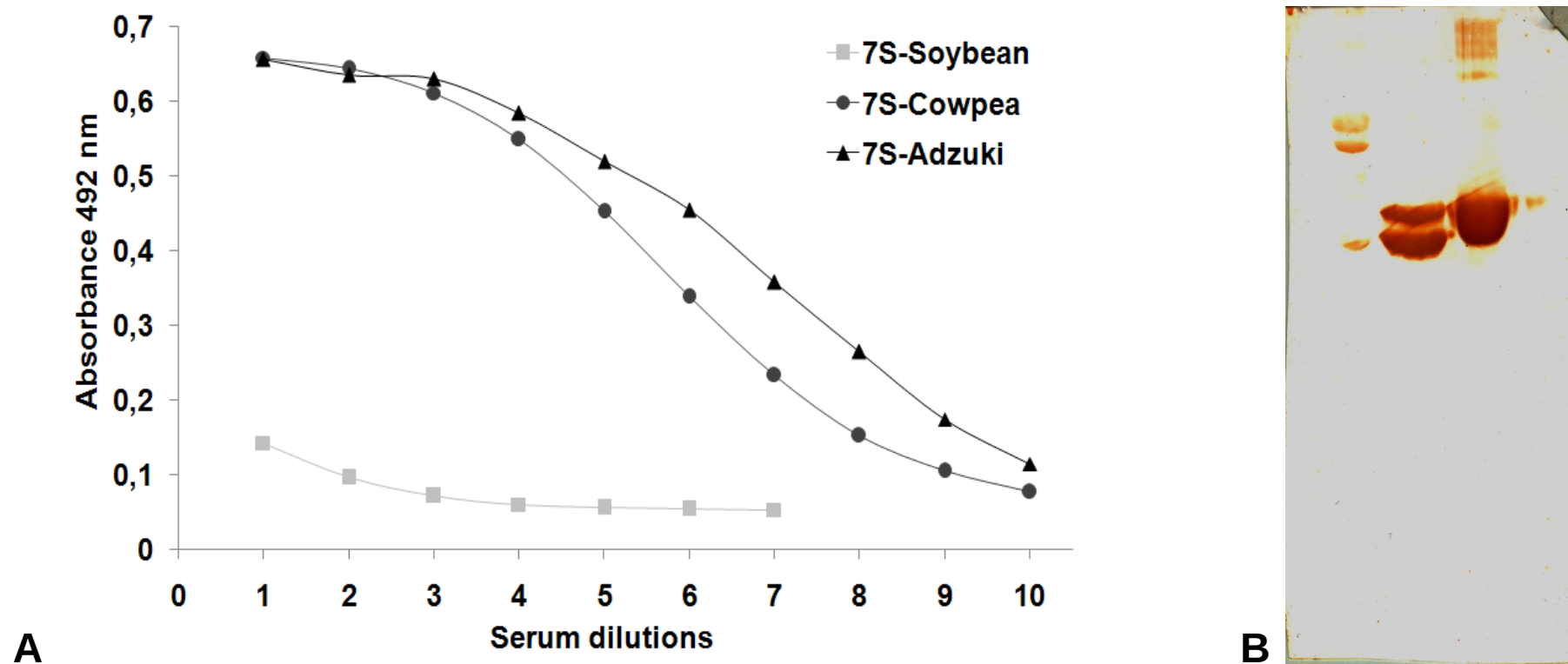
(A) perfil antigênico pelo teste de ELISA; (B) imunoreatividade das cadeias polipeptídicas por “immunoblotting”.

Figura 17 – Cruzamento entre o soro anti- β -vignina do feijão caupí com as proteínas β -conglucina e β -vignina do feijão adzuki obtidas por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B.



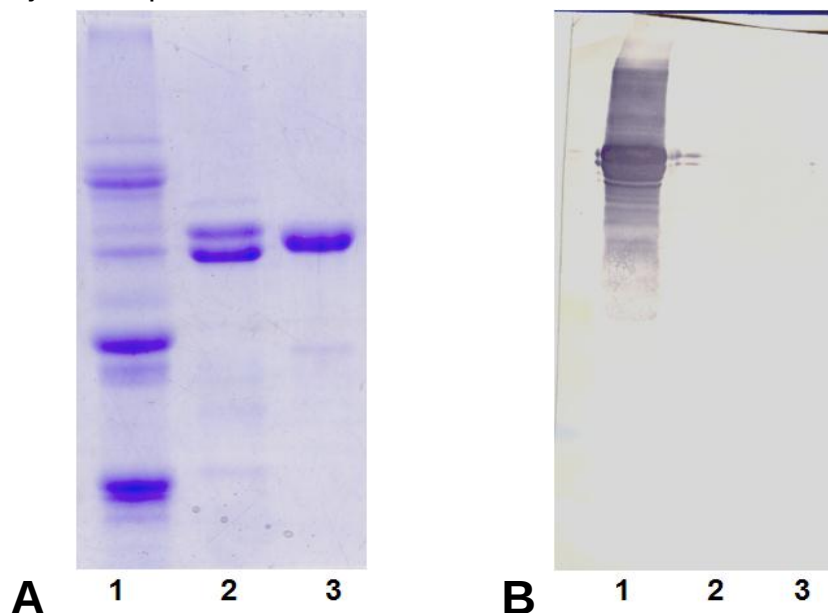
(A) perfil antigênico pelo teste de ELISA; (B) imunoreatividade das cadeias polipeptídicas por “immunoblotting”.

Figura 18 – Cruzamento entre o soro anti- β -vignina do feijão adzuki com as proteínas β -conglucina e β -vignina do feijão caupí obtidas por cromatografia de gel filtração em coluna Sepharose CL-6B.



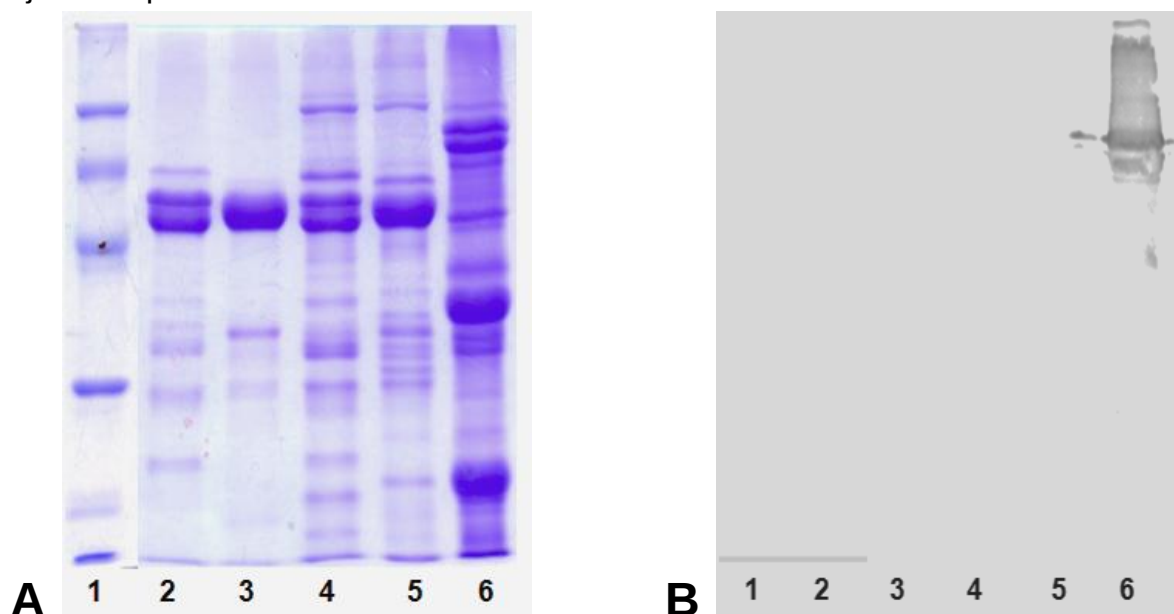
(A) perfil antigênico pelo teste de ELISA; (B) imunoreatividade das cadeias polipeptídicas por “immunoblotting”.

Figura 19 – Cruzamento entre o soro anti- α' da β -conglucina com a proteína β -vignina dos feijões caupí e adzuki.



(A) eletroforese em gel de poliacrilamida, e (B) imunoreatividade das cadeias polipeptídicas por “immunoblotting”. Coluna 1, extrato protéico total de soja; coluna 2, proteína β -vignina do caupí; coluna 3, proteína β -vignina do adzuki.

Figura 20 – Cruzamento entre o soro anti- α' da β -conglucina com as proteínas dos feijões caupí e adzuki.



(A) eletroforese em gel de poliacrilamida, e (B) imunoreatividade das cadeias polipeptídicas por “immunoblotting”. Coluna 1, padrão molecular; coluna 2, β -vignina do caupí isolada; coluna 3, proteína β -vignina do adzuki isolada; coluna 4, extrato protéico total do feijão caupí; coluna 5, extrato protéico total do feijão adzuki; coluna 6, extrato protéico total de soja.

Os resultados obtidos do cruzamento entre o anti-corpo da subunidade α' da β -conglícinina e as proteínas β -vignina dos feijão caupí e adzuki são apresentados na figura 19. Observou-se que não houve o reconhecimento imunológico para nenhuma das subunidades das espécies de analisadas. Resultados semelhantes foram observados também quando cruzados com o extrato protéico total dos feijões, reportados na figura 20.

5.3 Efeitos sobre o metabolismo lipídico *in vivo*

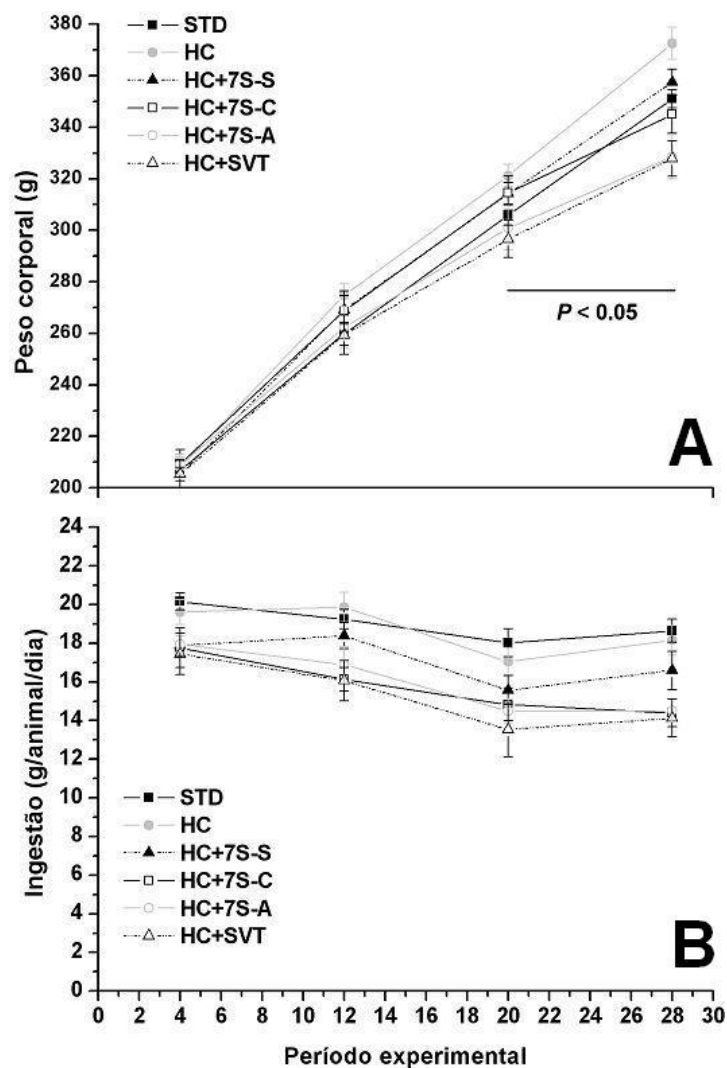
5.3.1 Parâmetros biométricos

Os resultados encontrados para os parâmetros de ganho de peso, consumo alimentar, excreção fecal e coeficiente de eficácia alimentar são mostrados na tabela 6. Após os 28 dias experimentais, os animais alimentados com a dieta (**HC**) enriquecida com 20% de gordura de palma, 1% de colesterol e 0,5% ácido cólico tiveram um ganho de peso de 7% ($P < 0,05$) maior comparado aos alimentados com a dieta padrão (**STD**). No entanto, foram observados diferentes efeitos nos grupos tratados com as proteínas e o fármaco. Os animais que receberam a proteína β -conglícinina da soja (**S**), β -vignina do feijão caupí (**C**) e β -vignina do feijão adzuki (**A**) apresentaram um peso corporal menor em 4,1% ($P < 0,05$), 7,4% ($P < 0,01$) e 11,8% ($P < 0,001$), respectivamente, e os que foram tratados com sinvastatina (**SV**) mostraram uma redução média de 12% ($P < 0,001$), todos comparados ao HC. Este efeito foi significativo a partir do 20º dia experimental (Figura 21A).

Estudos anteriores têm reportado uma significativa redução no ganho de peso quando animais foram alimentados com diferentes fontes de proteínas de leguminosas (WILSON et al. 2007; RHO et al. 2007; FUKUI et al. 2004, 2002; MACARULLA et al. 2001; DABAI et al. 1996) em especial às da soja. Em parte, este

efeito ocorre devido a uma maior excreção fecal de lipídeos (MACARULLA et al. 2001; DABAI et al. 1996) e uma menor deposição de tecido adiposo nos animais (WILSON et al. 2007; FUKUI et al. 2004, 2002).

Figura 21 – Efeito da dieta HC e dos diferentes tratamentos sobre o crescimento ponderal (A), e ingestão diária (B) durante o período experimental[‡].



[‡]Valores representados em média $\pm$ SEM (n = 9).

Não houve diferença significativa no consumo alimentar entre os grupos STD, HC e S, mas foi observada uma alteração no ganho de peso e na ingestão diária dos grupos tratados com as proteínas do caupí, adzuki e pela droga sinvastatina (Figura 21B). Estes parâmetros foram menores, respectivamente, nos

grupos caupí em 14 e 10%, adzuki em 23 e 12% e sinvastatina 23 e 14%. Ainda na figura 21B, podemos observar que a partir do 12º dia os grupos já apresentavam comportamentos distintos em relação à ingestão. Porém, não foi observado diferença no coeficiente alimentar, sugerindo que a diminuição do ganho de peso observado nos grupos C, A e SV possivelmente ocorreu como consequência da redução da ingestão. Todos os grupos alimentados com a dieta a HC tiveram uma excreção fecal maior comparado ao STD. Porém, apenas o grupo tratado com proteína do caupí apresentou um aumento significativo na excreção fecal de 8,8% ($P < 0,05$), em relação ao HC (Tabela 6).

O peso absoluto e os índices relativos dos órgãos analisados são apresentados na tabela 7. Os resultados mostraram que os grupos alimentados com a dieta HC tiveram um aumento significativo no peso do tecido hepático e índice hepatossomático. O grupo HC teve um acréscimo de 73 e 72% ($P < 0,001$), respectivamente, comparado ao STD. Não foram observadas alterações nos grupos que receberam a proteína da soja, feijão caupí e sinvastatina quando confrontados ao HC ($P > 0,05$), já o grupo A teve uma diminuição de 19 e 10% ($P < 0,05$), respectivamente, em relação ao HC. A dieta HC provocou um aumento de 100% e 96%, respectivamente, na deposição de gordura epididimal e do índice viscerossomático. Os grupos tratados com a proteína do feijão caupí (**C**) e feijão adzuki (**A**) tiveram redução de 19 e 17% ($P < 0,05$), e 16% ($P < 0,05$) e 5% ($P > 0,05$), respectivamente, em relação aos valores obtidos para HC. O tecido cardíaco e a relação órgão/peso corpóreo não sofreram alterações devido à dieta, ou mesmo pelo tratamento com as proteínas. No entanto, os animais tratados com sinvastatina mostraram um peso menor de 14% ($P < 0,05$), porém, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na relação órgão/peso do animal.

Tabela 6 – Ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente alimentar e excreção fecal dos grupos experimentais.

	Grupos experimentais [‡]					
	STD	HC	S	C	A	SV
Peso corporal inicial (g/animal)	184,3 ± 3,7	183,8 ± 3,9	183,0 ± 2,5	182,1 ± 3,9	182,0 ± 3,2	182,1 ± 3,6
Peso final (g/animal)	351,0 ± 3,5*	372,5 ± 6,3	357,5 ± 5,0	345,0 ± 7,3*	328,5 ± 8,5*	327,9 ± 6,9*
Ganho de peso (g/animal/dia)	5,9 ± 0,1*	6,8 ± 0,2	6,3 ± 0,2	5,9 ± 0,2*	5,2 ± 0,2*	5,3 ± 0,2*
Consumo (g/animal/dia)	18,9 ± 0,3	18,2 ± 0,5	17,3 ± 0,3	16,4 ± 0,5	16,5 ± 0,5	15,7 ± 0,5*
Excreção fecal (g/animal/dia)	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1*	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Coeficiente alimentar (%)	30,2 ± 0,7*	36,0 ± 0,7	36,2 ± 1,2	36,9 ± 0,8	34,7 ± 0,9	34,9 ± 0,9

‡Valores representados em média ± SEM. Diferentes marcadores indicam diferenças estatísticas * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, pelo teste de Bonferroni-test de comparação múltipla entre os tratamentos com grupo HC. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Tabela 7 – Biometria de tecidos e índices dos grupos experimentais.

	Grupos experimentais [‡]					
	STD	HC	S	C	A	SV
Tecido hepático (g/animal)	11,4 ± 0,3	19,7 ± 0,7	19,1 ± 0,6	19,3 ± 0,7	16,1 ± 0,7	18,5 ± 0,7
Tecido adiposo epididimal (g/animal)	2,6 ± 0,2	5,2 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,3	4,7 ± 0,3
Tecido cardíaco (g/animal)	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0
Índice hepatossomático (IHS, g/100g)	3,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,4 ± 0,2
Índice viscerossomático (IVS, g/100g)	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Tecido cardíaco/peso corpóreo (g/100 g)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0

IHS = (peso tecido hepático/peso corpóreo) x 100; IVS = (peso tecido adiposo/peso corpóreo) x 100.

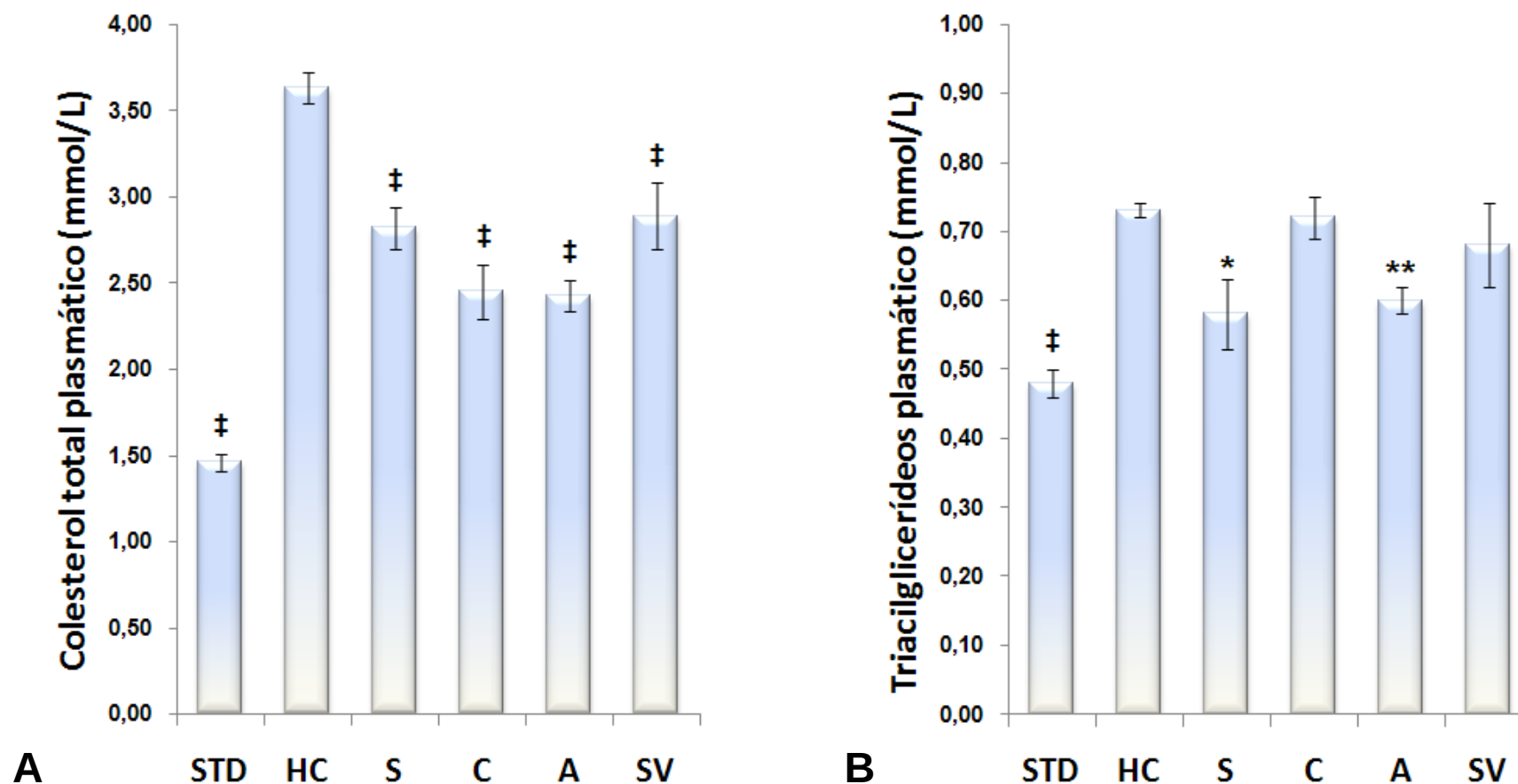
‡Valores representados em média ± SEM. Diferentes marcadores indicam diferenças estatísticas * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, pelo teste de Bonferroni-test de comparação múltipla entre os tratamentos com grupo HC. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

5.3.2 Indicadores bioquímicos

A figura 22 mostra o resultado da concentração plasmática do colesterol total e triacilglicerídeos de animais alimentados com a dieta padrão e hipercolesterolêmica, sob diferentes tratamentos. O grupo HC ($3,63 \pm 0,09$ mmol/L) teve um aumento de 149% ($P < 0,05$) do colesterol quando comparado ao que recebeu uma dieta padrão caseína (STD, $1,46 \pm 0,05$ mmol/L). No entanto, foi observado que administração de diferentes proteínas das leguminosas estudadas minimizou este efeito deletério. Houve uma redução significativa ($P < 0,001$) de 22, 34 e 33%, respectivamente, nos grupos tratados com dose diária de β -conglícinina da soja ($2,82 \pm 0,12$ mmol/L), β -vignina do caupí ($2,45 \pm 0,16$ mmol/L) e β -vignina do adzuki ($2,43 \pm 0,09$ mmol/L). Estes resultados foram semelhantes ao obtido para o grupo tratado com a droga sinvastatina ($2,89 \pm 0,19$ mmol/L) que reduziu 21% da concentração sérica ($P < 0,001$). A proteína da soja e do feijão adzuki mostrou ainda reduzir o nível de triacilglicerídeo em 21% ($0,58 \pm 0,05$ mmol/L; $P < 0,05$) e 18% ($0,60 \pm 0,02$ mmol/L; $P < 0,01$), respectivamente, comparados ao HC ($0,73 \pm 0,01$ mmol/L). Não foi observada uma redução significativa ($P > 0,05$) nos animais tratados com feijão caupí ($0,72 \pm 0,03$ mmol/L) e sinvastatina ($0,68 \pm 0,06$ mmol/L).

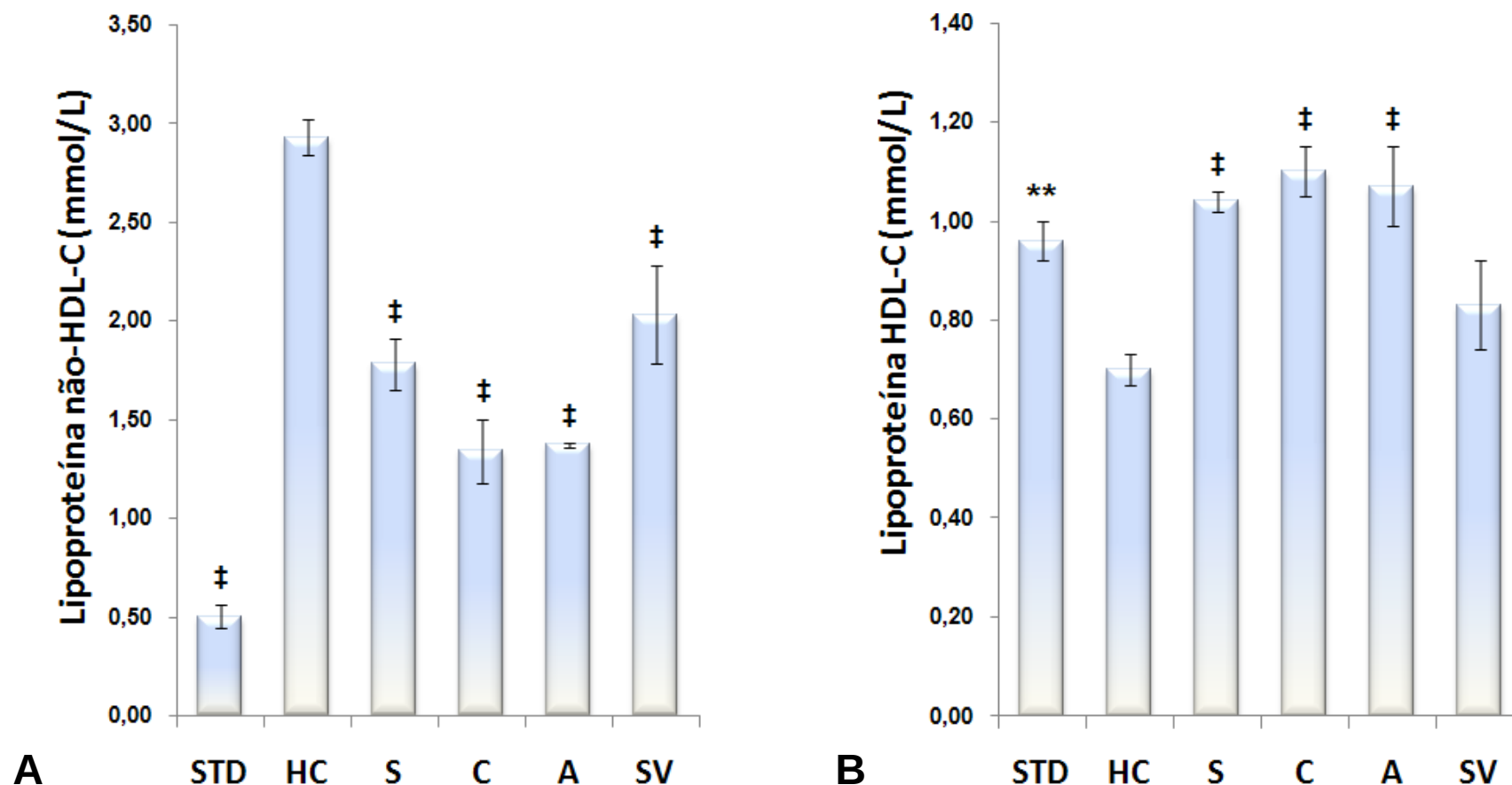
Pode ser observado na figura 23 que a dieta hipercolesterolêmica aumentou a fração não-HDL-c (VLDL-c+LDL+c) em quase 3 vezes, ou seja, o grupo HC teve um acréscimo de 486% ($2,93 \pm 0,09$ mmol/L; $P < 0,001$) em relação ao grupo STD ($0,50 \pm 0,06$ mmol/L). Os grupos S, C e A tiveram uma redução ($P < 0,001$), respectivamente, de 39% ($1,78 \pm 0,13$ mmol/L), 54% ($1,34 \pm 0,16$ mmol/L) e 53% ($1,37 \pm 0,01$ mmol/L), comparado à concentração mostrada pelo HC. Estes resultados foram superiores ao efeito (-31%) encontrado no grupo tratado com sinvastatina ($2,03 \pm 0,25$ mmol/L).

Figura 22 – Concentração plasmática de colesterol total (A), e triacilglicerídeos (B), em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

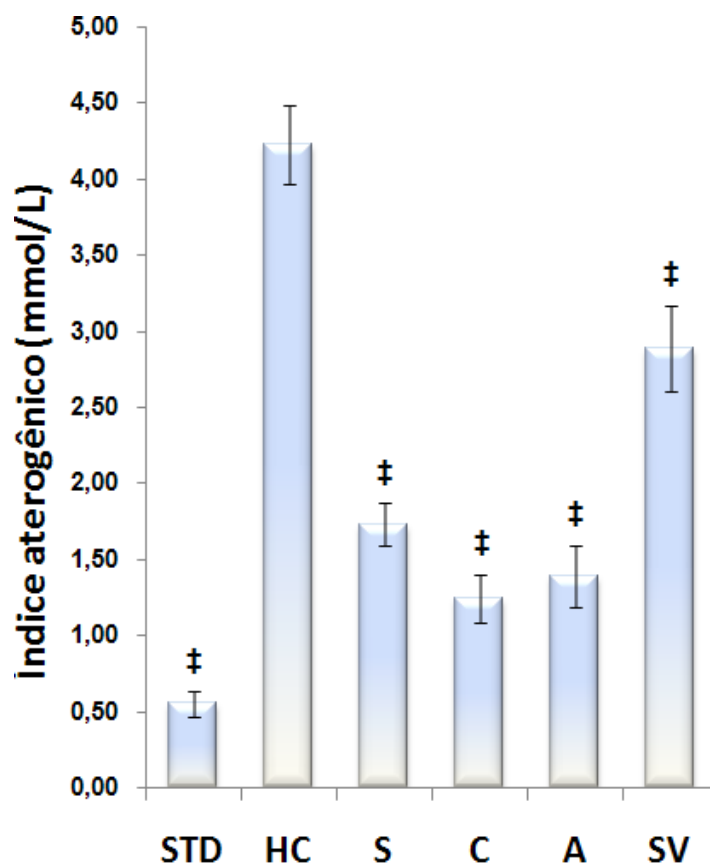
Figura 23 – Concentração plasmática da lipoproteína não-HDL (A), e lipoproteína HDL (B), em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

O grupo HC alimentado com a dieta suplementada com 20% de gordura de palma, 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico teve uma redução de 27% no nível da HDL-c ($0,70 \pm 0,03$ mmol/L; $P < 0,05$) em relação ao STD ($0,96 \pm 0,04$ mmol/L), como mostrado na figura 23. No entanto, nos grupos que receberam as proteínas foi observado um expressivo acréscimo desta fração. Nos grupos tratados com a β -conglícinina da soja, β -vignina do caupí e β -vignina do adzuki houve um aumento de 49% ($1,04 \pm 0,02$ mmol/L), 57% ($1,10 \pm 0,05$ mmol/L) e 53% ($1,07 \pm 0,08$ mmol/L), respectivamente. Não houve alteração significativa no grupo **SV**. O índice aterogênico (Figura 24) foi menor em 59, 70, 67 e 32%, respectivamente, nos grupos tratados com as proteínas (**S**, **C** e **A**) e droga (**SV**).

Figura 24 – Índice aterogênico de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos[‡].

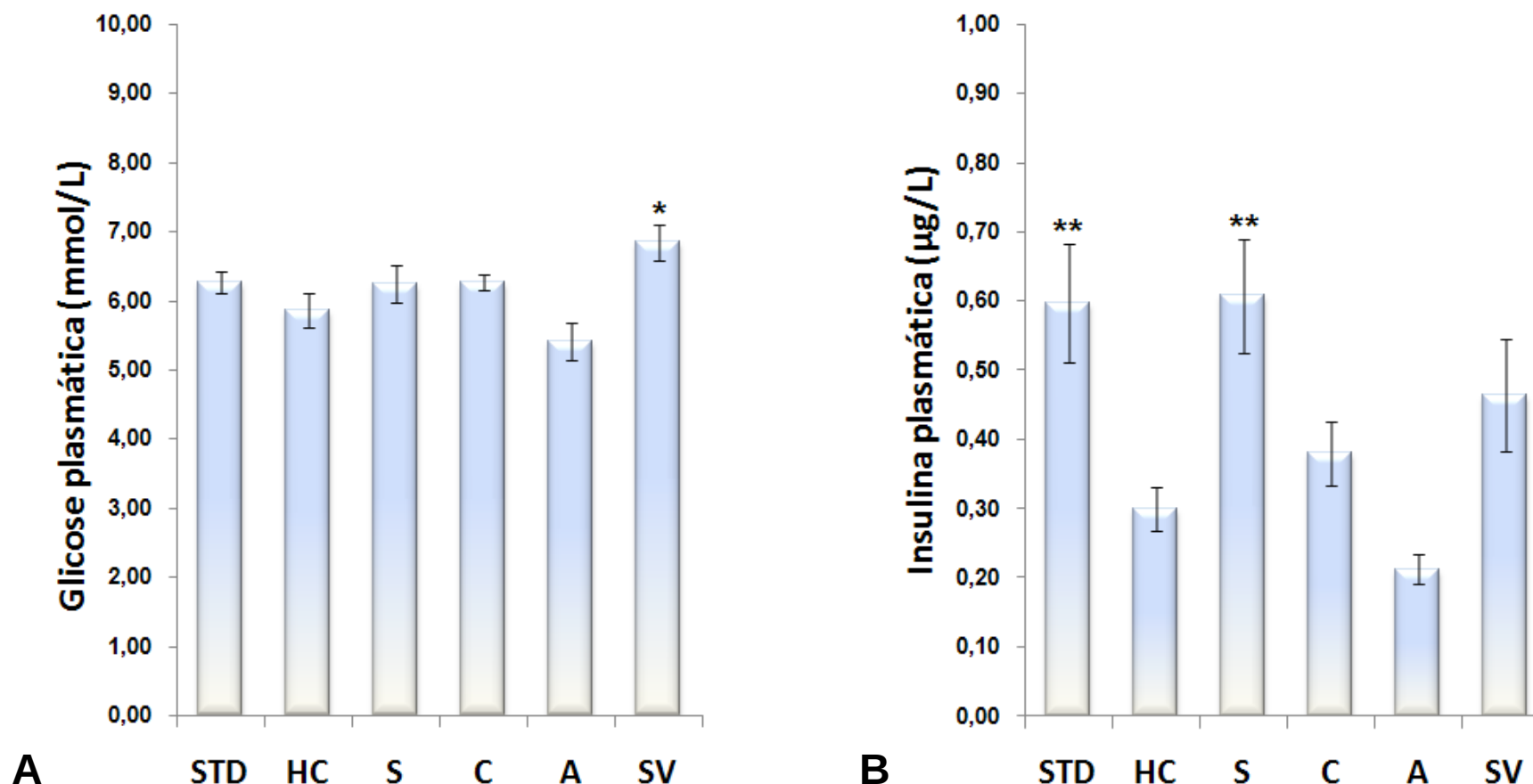


‡Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e ‡ $P < 0,001$.

A concentração sérica de glicose não teve alteração devido à composição da dieta ou pelos tratamentos com as proteínas estudadas, porém, houve um aumento de 17% ($P < 0,05$) no grupo tratado com sinvastatina ($6,85 \pm 0,26$ mmol/L) comparado ao HC ($5,86 \pm 0,25$ mmol/L), como pode ser observado na figura 25A. O grupo HC ($0,30 \pm 0,09$ µg/L) apresentou uma redução de 50% ($P < 0,01$) de insulina plasmática em relação ao STD ($0,60 \pm 0,26$ µg/L). Os grupos que receberam a vicilina dos feijões caupí ($0,38 \pm 0,14$ µg/L), adzuki ($0,21 \pm 0,06$ µg/L) e a sinvastatina ($0,46 \pm 0,24$ µg/L) não apresentaram alterações significativas comparados ao HC. Porém, a redução sérica de insulina não foi observada nos animais que receberam a proteína 7S da soja ($0,61 \pm 0,25$ µg/L), como reportado na figura 25B.

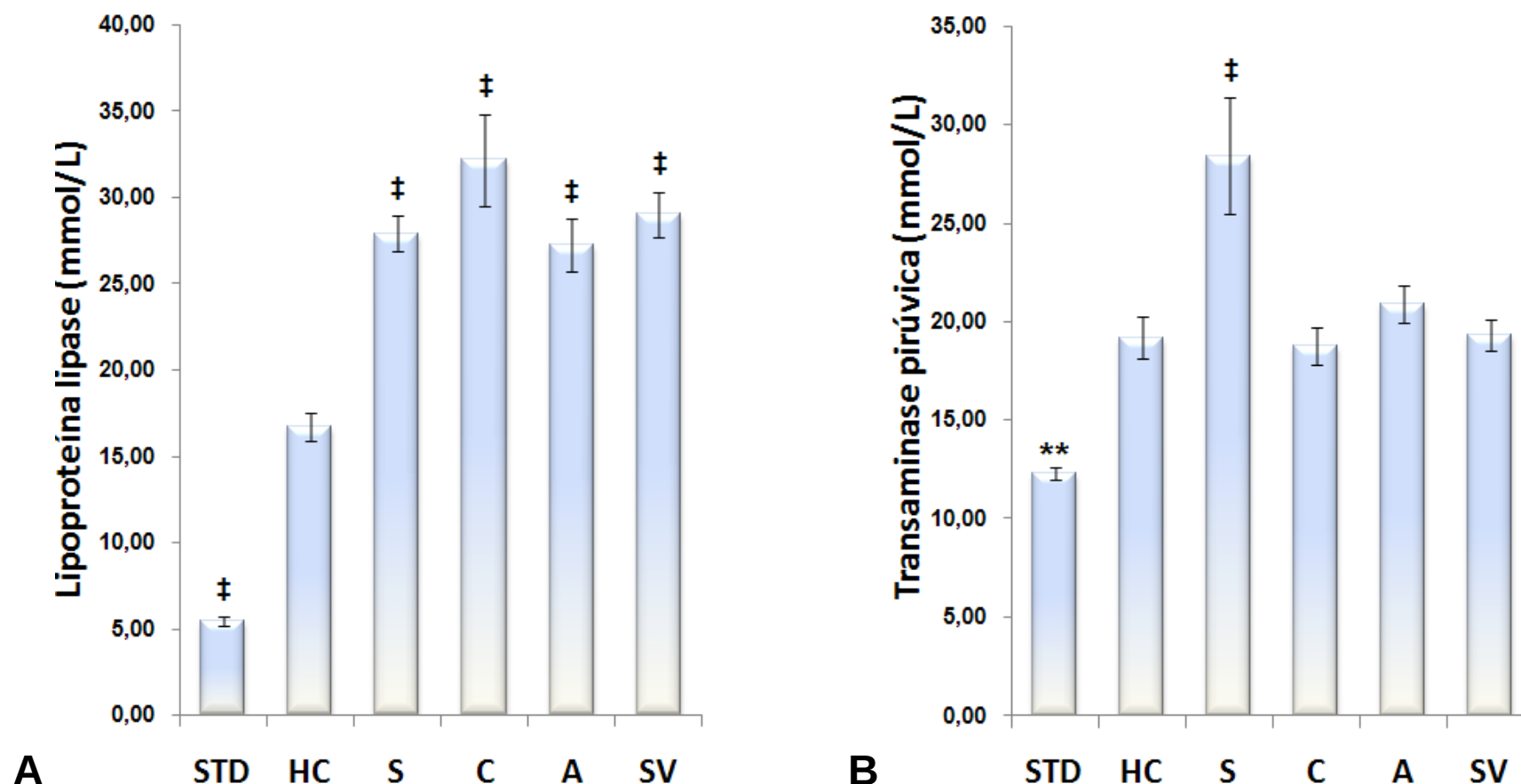
A atividade sérica da lipoproteína lipase se mostrou duas vezes maior no grupo HC ($16,73 \pm 0,81$ mmol/L; ($P < 0,001$) comparado ao STD ($5,42 \pm 0,27$ mmol/L) (Figura 26A). Os grupos que receberam doses diárias da proteína de soja, caupí e adzuki mostraram um aumento de 67% ($27,89 \pm 1,05$ mmol/L), 92% ($32,16 \pm 2,68$ mmol/L) e 63% ($27,22 \pm 1,56$ mmol/L), respectivamente, e o grupo tratado com sinvastatina teve um acréscimo de 73% ($29,01 \pm 1,31$ mmol/L) na atividade enzimática, comparados ao HC ($P < 0,001$). A figura 30B mostra que os grupos alimentados com a dieta hipercolesterolêmica apresentaram aumento ($P < 0,001$) na atividade da enzima transaminase pirúvica comparados ao grupo STD ($12,28 \pm 0,31$ mmol/L). Não houve diferença significativa entre o HC ($19,18 \pm 1,06$ mmol/L) e os grupos C ($18,75 \pm 0,93$ mmol/L), A ($20,89 \pm 0,92$ mmol/L) e SV ($19,32 \pm 0,77$ mmol/L). Os animais que receberam a β -conglícinina da soja ($28,41 \pm 2,94$ mmol/L) mostraram um acréscimo significativo de 48% ($P < 0,001$), na atividade desta enzima, em relação ao HC.

Figura 25 – Concentração plasmática de glicose (A), e insulina (B), em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



‡Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e † $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Figura 26 – Concentração plasmática da lipoproteína lipase (A), e transaminase pirúvica (B), em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e $^{\dagger}P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Os efeitos observados sobre a concentração plasmática de lipídeos em animais tratados com a β -conglícinina tinha sido reportado anteriormente por outros estudos. Aoyama et al. (2000) observaram em ratos uma redução do colesterol plasmático de 29%, enquanto que Fukui et al. (2002) verificaram uma diminuição de 21%. Duranti et al. (2004) reportaram uma redução de 49 e 36%, respectivamente, em ratos *Sprague-Dawley* tratados com β -conglícinina e com a subunidade α' da β -conglícinina.

Embora os resultados apresentados nesse estudo sejam os primeiros a demonstrar a ação da proteína β -vignina dos feijões caupí e adzuki isoladamente das demais proteínas e componentes do grão, outros estudos anteriores já indicavam a proteína como o elemento responsável por estes efeitos relacionados ao metabolismo dos lipídeos. Dabai et al. (1996) haviam reportado uma redução acentuada em nível plasmático do colesterol total (18-31%), LDL-c (32-53%), e triacilglicerídeos (27-46%) em ratos alimentados durante 8 semanas com uma dieta hipercolesterolêmica, e que consumiram como única fonte protéica a farinha de feijões das espécies *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus* e *Vigna subterrânea* comparado ao grupo que recebeu caseína. Macarulla et al. (2001) observaram o efeito hipocolesterolêmico da farinha e isolado protéico de *Vicia faba* em ratos. Estes grupos tiveram uma redução da concentração plasmática de colesterol total de 37 e 30%, e a partícula não-HDL-c foi menor 56 e 37%, respectivamente. Houve ainda uma redução dos triacilglicerídeos de 39 e 11%, respectivamente, comparados ao grupo alimentado com caseína como fonte proteica. Anderson et al. (1999) apontaram uma redução no colesterol e triacilglicerídeos em relação ao grupo controle, respectivamente, de 10 e 11%, em homens adultos hipercolesterolêmicos alimentados com 120 g de feijão (*Phaseolus vulgaris*) durante 21 dias.

Mahadevappa et al. (1983) mostraram em ratos alimentados com o isolado protéico do feijão caupí (*Vigna unguiculata*) durante 8 semanas, uma redução de 40 e 24%, respectivamente, para concentração sérica de colesterol total e hepático. Recentemente, Frota e Arêas (2008) verificaram em *hamsters* alimentados com uma dieta tendo como fonte de proteína o isolado proteico do caupí um efeito hipocolesterolemizante com redução de 20 e 22%, respectivamente, para colesterol total e colesterol não-HDL.

Rho et al. (2007), em ratos *Sprague–Dawley* tratados com BSP (*black soy peptide*), mostraram aumento do HDL-c em 29, 41 e 123%, e redução da fração não-HDL-c em 14, 24 e 54%, respectivamente, para BSP em 2, 6 e 10 do valor calórico da dieta. Kern et al. (2002) observaram acréscimo não significativo da HDL-c, porém, houve redução de 38% na fração não-HDL-c em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com isolado proteico de soja. Choi et al. (2005) reportaram aumento na HDL-c de 105 e 67%, respectivamente, em camundongos diabéticos geneticamente modificados (KK-A^y), com dieta normal e hiperlipídica, ambos alimentados com proteína isolada de um grão de milho (*Panicum miliaceum* L).

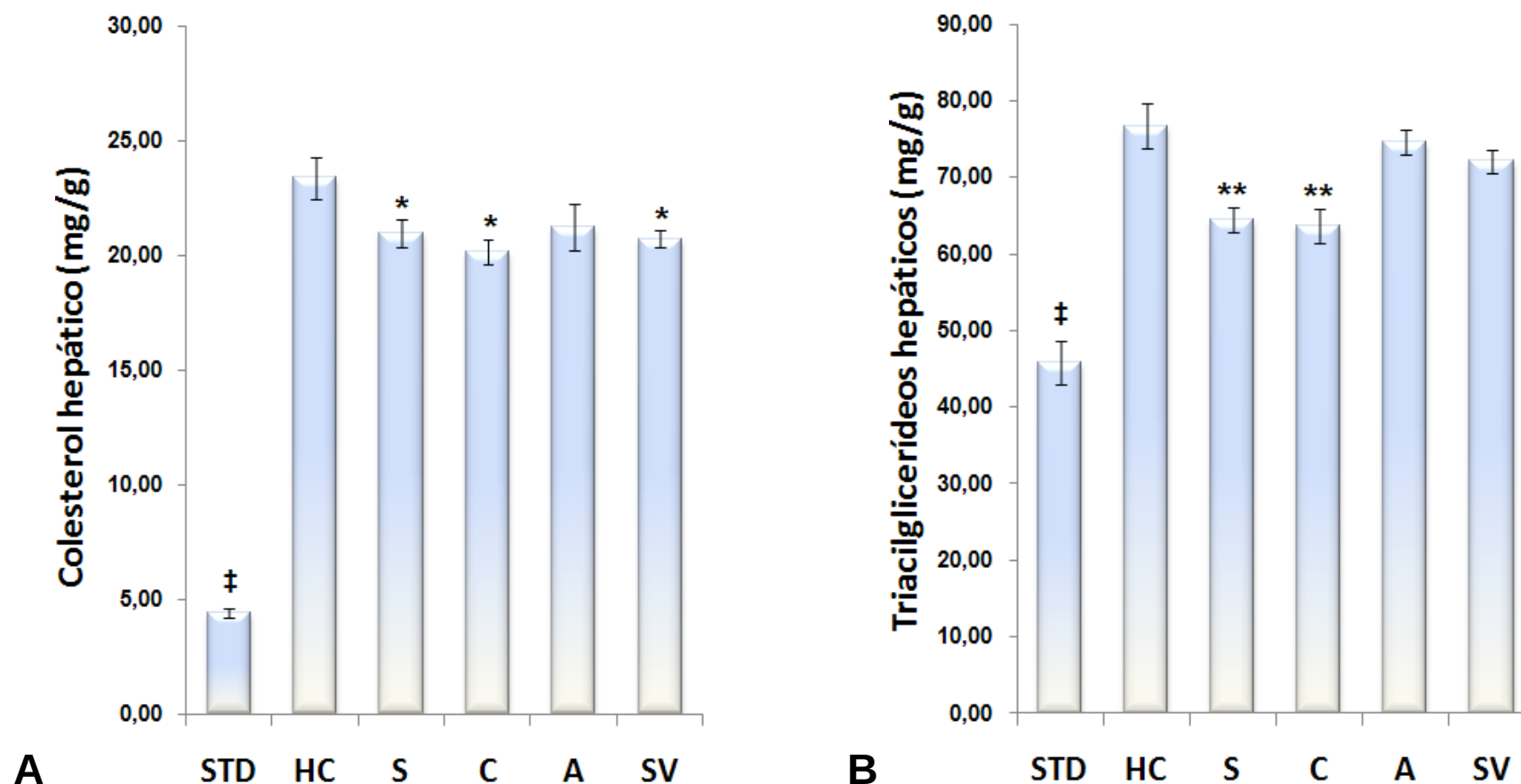
5.3.3 Indicadores hepáticos e fecais

A figura 27 mostra os resultados da quantificação de colesterol total e triacilglicerídeos hepáticos nos grupos alimentados com dieta STD e HC, que receberam ou não a vicilina da soja, feijão caupí, feijão adzuki ou sinvastatina. O colesterol total hepático foi aproximadamente cinco vezes maior ($P < 0,001$) no grupo HC ($23,37 \pm 0,91$ mg/g), comparado ao grupo STD ($4,39 \pm 0,20$ mg/g). Por outro lado, a administração das diferentes proteínas minimizou o efeito observado no grupo HC. Os resultados mostram que a proteína β -conglícinina da soja, β -vignina do

caupí e β -vignina do adzuki reduziram o colesterol total hepático em 11% ($P < 0,05$), 14% ($P < 0,01$) e 9% ($P < 0,05$), respectivamente, enquanto que os animais tratados com sinvastatina apresentaram uma redução de 11%, quando comparados ao HC. O grupo HC ($261,01 \pm 6,73$ mg/g tecido) teve um acréscimo na quantidade de lipídeos totais de 144%, comparado ao STD ($107,07 \pm 7,72$ mg/g tecido). Os animais que receberam a proteína do feijão caupí ($229,69 \pm 3,95$ mg/g) mostraram uma redução de 12% ($P < 0,05$), em relação aos valores obtidos para o HC. Não houve alteração significativa nos grupos tratados com a proteína da soja, adzuki e sinvastatina.

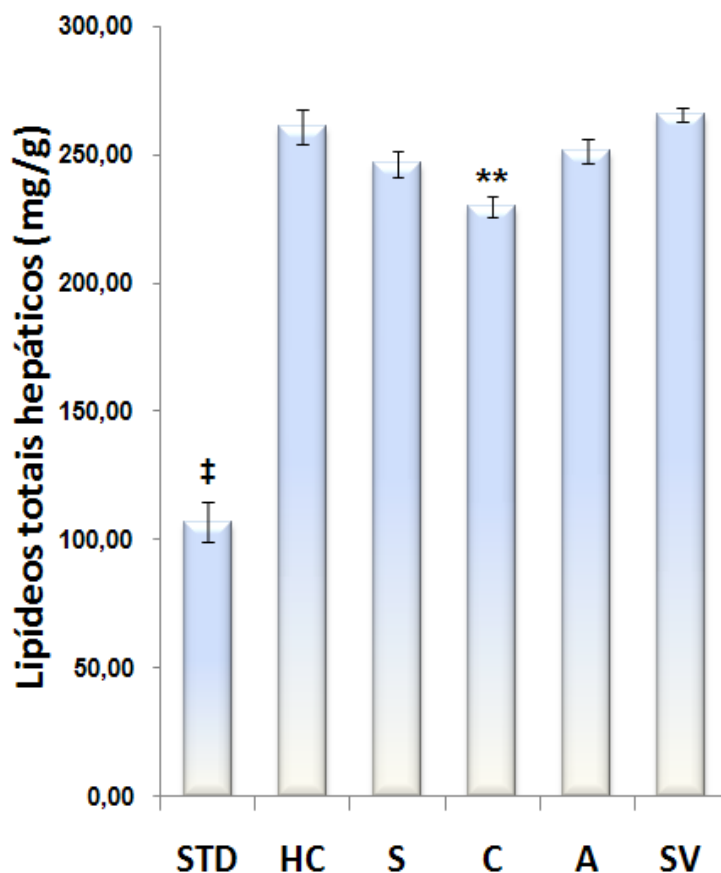
A figura 28 mostra os resultados da quantificação de lipídeos totais e colesterol encontrado nas fezes dos grupos alimentados com dieta STD e HC, que receberam ou não a vicilina da soja, feijão caupí, feijão adzuki ou sinvastatina. Todos os grupos que receberam a dieta HC tiveram um acréscimo da excreção fecal, comparado ao grupo STD alimentado com dieta não enriquecida. Porém, entre os grupos tratados com as diferentes proteínas e droga, somente os animais que receberam a vicilina do feijão caupí tiveram um aumento significativo na excreção fecal, comparado ao HC como já reportado anteriormente (Tabela 6).

Figura 27 – Concentração hepática de colesterol (A), e triacilglicerídeos (B), em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



‡Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e ‡ $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglícinina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

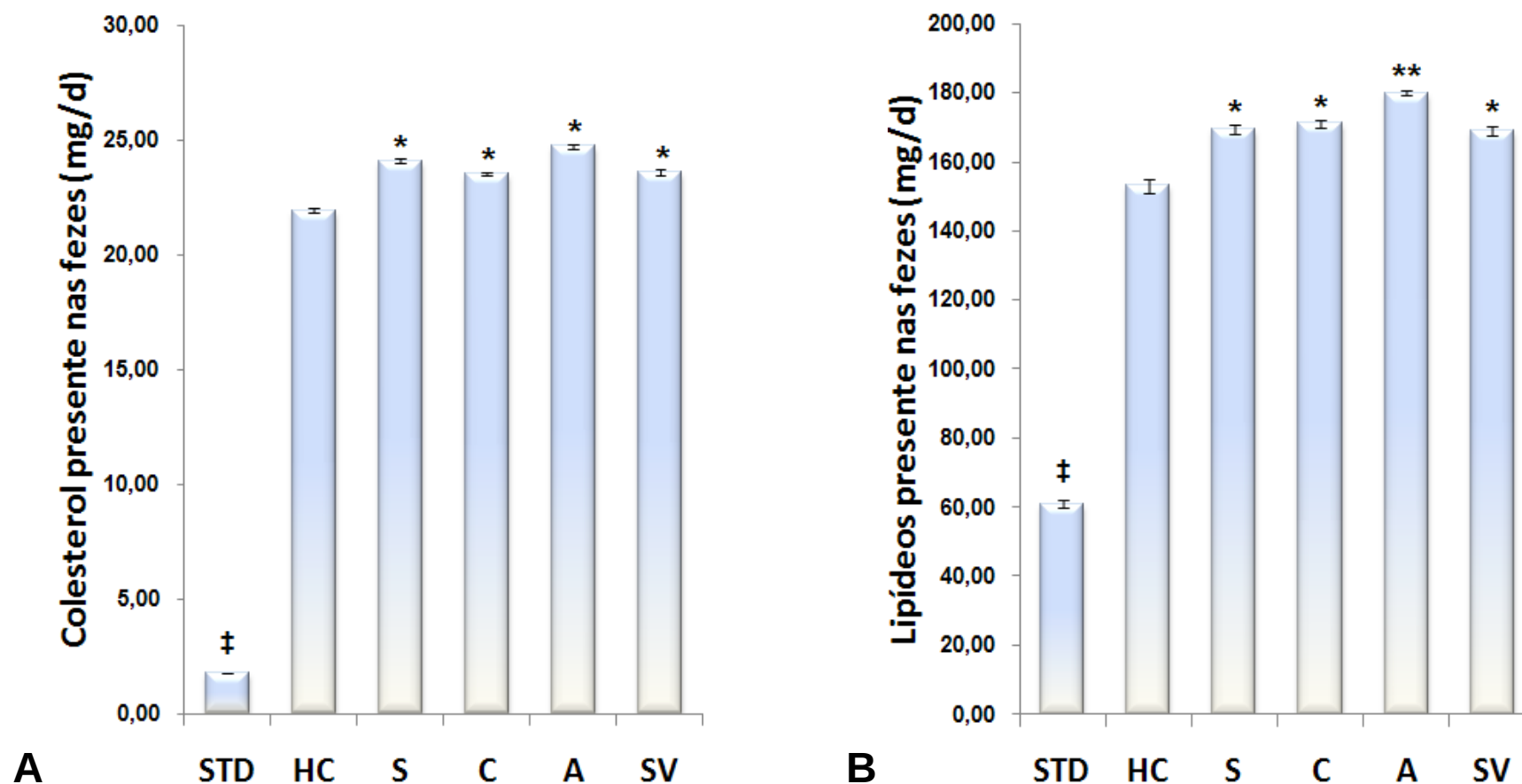
Figura 28 – Quantidade hepática de lipídeos totais em ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



‡Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e ‡ $P < 0,001$.

Por outro lado, a quantificação de lipídeos totais e colesterol total (Figura 29) presente nas fezes mostraram que os grupos tratados com as diferentes proteínas tiveram uma excreção maior ao do HC. Os grupos S ($169,3 \pm 1,3$ mg/d), C ($171,0 \pm 1,1$ mg/d), A ($179,9 \pm 0,8$ mg/d) e SV ($169,0 \pm 1,5$ mg/d), tiveram um acréscimo ($P < 0,05$) na excreção de lipídeos em 11, 12, 18 e 11%, respectivamente, comparados ao HC ($153,0 \pm 1,3$ mg/d). Outros resultados apontam ainda que as proteínas apresentam capacidade de aumentar a excreção de colesterol pelas fezes. Os animais que receberam a vicilina da soja, caupí e adzuki mostraram um acréscimo significativo ($P < 0,05$) de 10% ($24,1 \pm 0,1$ mg/d), 7% ($23,6 \pm 0,1$ mg/d) e 13% ($24,7 \pm 0,1$ mg/d), respectivamente, comparados ao HC ($21,9 \pm 0,1$ mg/d).

Figura 29 – Quantidade de colesterol (A), e lipídeos totais (B) presente nas fezes de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



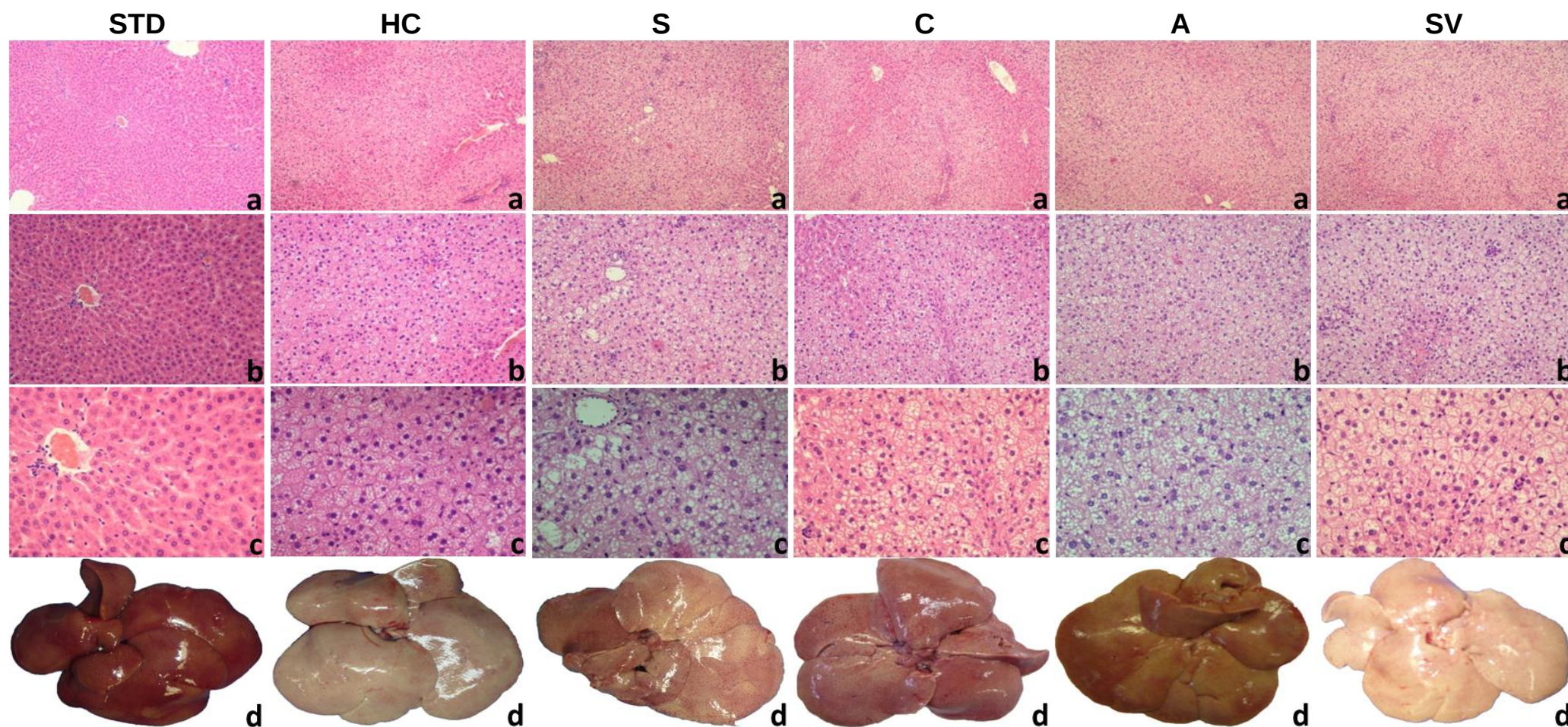
‡Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e ‡ $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglícinina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

5.3.4 Indicadores histológicos

Os resultados da análise histológica a partir de fígados dos ratos com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos durante 28 dias são mostrados na figura 30. A análise macroscópica do tecido hepático demonstrou diferentes colorações possivelmente devido à deposição de gordura, no entanto, os resultados microscópicos não identificaram diferenças significativas entre os grupos com a dieta HC que receberam doses diárias de proteína ou droga (HC, S, C, A e SV), somente quando comparado ao efeito das dietas.

A avaliação permitiu observar que microscopicamente os cortes de fígado dos ratos do grupo STD apresentavam placas de hepatócitos entremeados por sinusóides, apresentando muitas vezes pequenas “gotículas” de gordura, e os núcleos centralizados na célula. Desta maneira, o tecido hepático dos animais deste grupo foi definido com aspectos de normalidade. Enquanto que as lamina analisadas a partir do fígado dos animais alimentados com dieta suplementada com 20% de gordura de palma, 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico apresentavam acúmulo de gordura nas células do tipo microvesículas e macrovesículas, os núcleos estavam rechassados para periferia e apresentavam certa desestruturação celular. Assim, caracterizando-se o estado de esteatose hepática (Figura 30).

Figura 30 – Análise histológica de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos.



Imagens mostradas em aumento histológico de 100X (a), 200X (b), 400X (c), e pela representação macroscópica do tecido (d). STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

5.3.5 Indicadores de expressão gênica

Estudos anteriores têm apresentado resultados que legitima a hipótese na qual a ingestão de proteínas, particularmente às de leguminosas, exerceria um efeito redutor da concentração plasmática de colesterol e de outros lipídeos devido uma habilidade moduladora, alcançada por meio da indução/supressão de genes de enzimas e/ou receptores envolvidos no metabolismo (CONSONNI et al. 2011, 2010; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010, 2009, 2008; RIGAMONTI et al. 2010; BETTZIECHE et al. 2009, 2008; LOVATI et al. 2008, 2000; CHO et al. 2008; SHUKLA et al. 2007; TORRES et al. 2006; BRANDSCH et al. 2006; MORIYAMA et al. 2004). Os resultados observados no presente estudo, em ratos dislipidêmicos tratados com doses diárias da proteína β -conglícinina da soja, β -vignina dos feijões caupí e adzuki sustentam estes achados. Isto porque, esses animais apresentaram menores concentrações plasmáticas de lipídios, e tiveram ainda alterações na expressão de alguns genes no fígado envolvidos no metabolismo lipídico.

As concentrações hepáticas do mRNA das enzimas ácido graxo sintase (EC 2.3.1.85) e málica (EC 1.1.1.40) nos animais alimentados com dieta normal ou HC, com diferentes tratamentos são apresentadas na figura 31. Ambas são consideradas enzimas lipogênicas que estão relacionadas à biossíntese de ácidos graxos e triacilglicerídeos, a primeira desempenha uma função fundamental na conversão do malonil-CoA até o palmitato, catalisando todas as reações, enquanto que a segunda tem mostrado exercer uma importante atividade no estímulo da secreção de insulina, junto com outras enzimas do metabolismo da glicose.

O grupo STD alimentado com a dieta controle apresentou uma expressão da enzima ácido graxo sintase ($3,77 \pm 0,02$) 3,7 vezes maior, comparado ao grupo HC ($1,00 \pm 0,01$). Os animais tratados com a proteína β -conglícinina da soja e β -vignina

do feijão adzuki tiveram uma menor expressão em 22 e 28%, respectivamente ($P < 0,001$). Não houve alterações significativas na expressão da enzima málica nos grupos C e A, porém, os animais tratados com a proteína da soja apresentaram um aumento expressivo de 87% ($P < 0,001$), enquanto àqueles que foram tratados com sinvastatina mostraram uma redução de 10%. Pesquisadores japoneses com destaque para Aoyama et al. (2001), Fukui et al. (2004) e Moriyama et al. (2004), já haviam reportado em estudos *in vivo* que a proteína β -conglícinina administrada como única fonte proteica na dieta promovia significativa redução sérica e hepática de colesterol, associado com aumento da atividade da enzima carnitina palmitoiltransferase, acil-CoA oxidase, 7- α hidroxilase e redução da ácido graxo sintase.

As expressões hepáticas das enzimas 7- α -hidroxilase (CYP7A1, EC 1.14.13.17) e HMG-CoA redutase (EC 1.1.1.34) são apresentadas na figura 32. A CYP7A1 tem sido considerada como a principal enzima envolvida no processo de eliminação do colesterol hepático pela via biliar. Esta é responsável pela primeira reação que converte o colesterol a 7 α -hidroxicolesterol, que adiante será convertido em ácido cólico. Além disso, os estudos em animais e humanos têm demonstrado que a deficiência da enzima provoca hipercolesterolemia e o acúmulo de colesterol no tecido hepático, e sua atividade tem sido descrita como a etapa limitante para a síntese de ácidos biliares a partir do colesterol no fígado. A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos observar que a dieta HC ($1,00 \pm 0,02$) promoveu o aumento da expressão da enzima CYP7A1 em 39% ($P < 0,001$), quando comparado ao grupo STD ($0,61 \pm 0,02$). Nos grupos tratados com a proteína do feijão adzuki e com a sinvastatina houve um acréscimo na expressão de 208 e 230%, enquanto que

os grupos soja e caupí tiveram uma redução de 53 e 30%, respectivamente ($P < 0,001$).

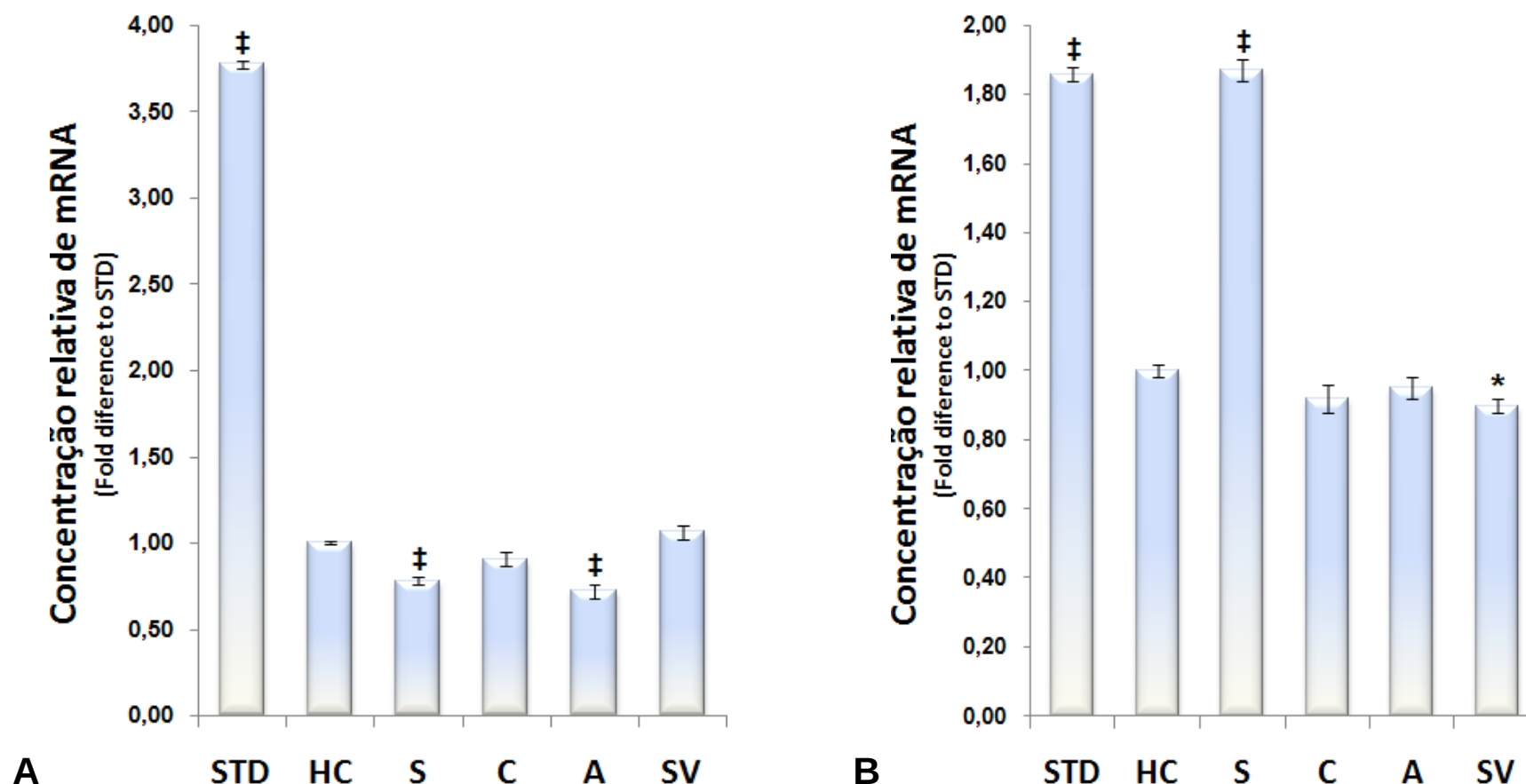
A dieta HC, enriquecida com gordura de coco (20%), colesterol (1%), ácido cólico (0,5%) provocou uma intensa diminuição na expressão da enzima HMG-CoA redutase ($P < 0,001$), como pode ser observado na figura 32B. O grupo HC apresentou a expressão dessa enzima ($1,00 \pm 0,02$) aproximadamente 3 vezes menor do que os animais do grupo STD ($2,80 \pm 0,04$). Os grupos tratados com a β -conglícinina da soja, β -vignina do caupí e β -vignina do adzuki tiveram uma menor expressão em 12% ($P < 0,05$), 48% ($P < 0,001$) e 36% ($P < 0,001$), respectivamente, comparado ao grupo HC. Não foi observada alteração significativa no grupo tratado com a droga sinvastatina. Além disso, a expressão de outra enzima envolvida na biossíntese de colesterol, a HMG-CoA sintase, apresentou uma redução significativamente importante observada nos animais tratados com as proteínas (Figura 33A). Os grupos soja (S), caupí (C) e adzuki (A) apresentam uma menor expressão dessa enzima em 79% ($0,21 \pm 0,02$), 74% ($0,26 \pm 0,02$) e 83% ($0,17 \pm 0,01$), respectivamente ($P < 0,001$), enquanto que o grupo tratado com a sinvastatina mostrou-se menor em 11% ($P < 0,05$), todos comparado ao grupo HC.

Os estudos têm sugerido que aumento do catabolismo hepático das lipoproteínas é induzido pelo acréscimo de receptores de LDL. Lovati et al. (2008, 2000), observaram *in vitro* que a β -conglícinina da soja promoveu aumento da captação de LDL em 192% e do *turnover* em 143%, devido o acréscimo do número de receptores de LDL em células Hep-G2, que foi confirmado expressão positiva de mRNA para os receptores. A partir dos resultados encontrados para a concentração relativa hepática de mRNA do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr), apresentados na figura 33B, podemos observar que dieta HC ($1,00 \pm 0,03$) causou

uma expressão de aproximadamente 4,5 vezes menor comparada à STD ($4,49 \pm 0,03$). No entanto, este efeito mostrou-se atenuado significativamente nos grupos tratados com a proteína de soja ($1,23 \pm 0,03$), caupí ($1,93 \pm 0,04$) e com a sinvastatina ($2,31 \pm 0,04$) que apresentaram um aumento de 23% ($P < 0,001$), 93% ($P < 0,001$) e 131% ($P < 0,001$), respectivamente.

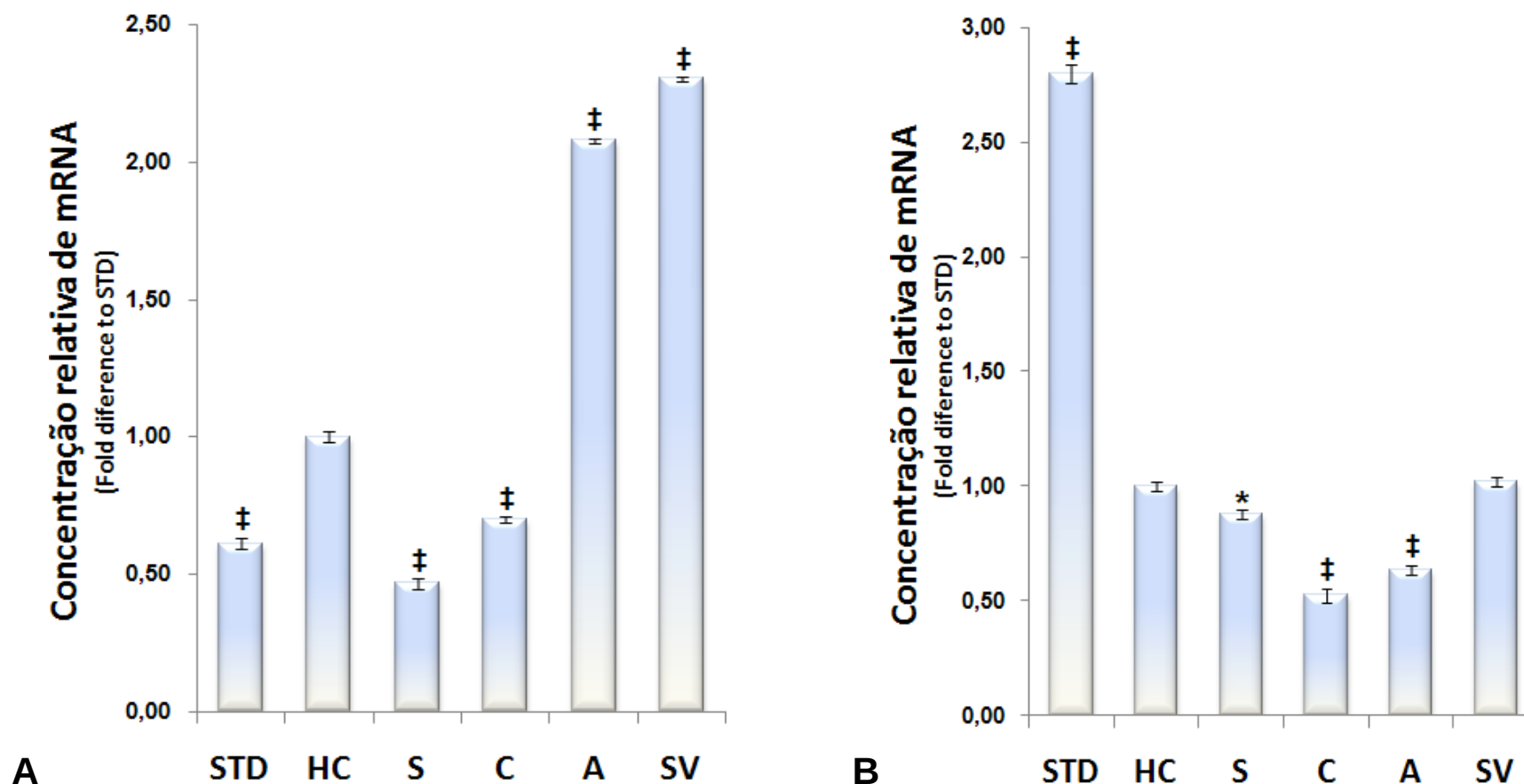
O receptor de LDL exerce uma função fundamental na regulação na concentração plasmática da LDL-c. Desta maneira, o aumento da expressão desses receptores levaria ao acréscimo da captação da LDL-c circulante. Em resposta a elevação da concentração intracelular, outros dois mecanismos de regulação parecem ser ativados. O acúmulo de colesterol e dos seus metabólitos passa a suprimir a transcrição de genes envolvidos na biossíntese e na captação de colesterol, tais como mRNAs para a enzimas HMG-CoA redutase e para o próprio receptor de LDL, respectivamente. Este evento tem sido aceito como um dos mecanismos de ação das estatinas. Além disso, muitos estudos têm sugerido que peptídeos das proteínas de leguminosas poderiam também exercer ação semelhante (CONSONNI et al. 2011, 2010; DURANTI et al. 2004; MANZONI et al. 2003; LOVATI et al. 2000, 1996).

Figura 31 – Concentração relativa de expressão hepática do mRNA das enzimas ácido graxo sintase (A), e málica (B) de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



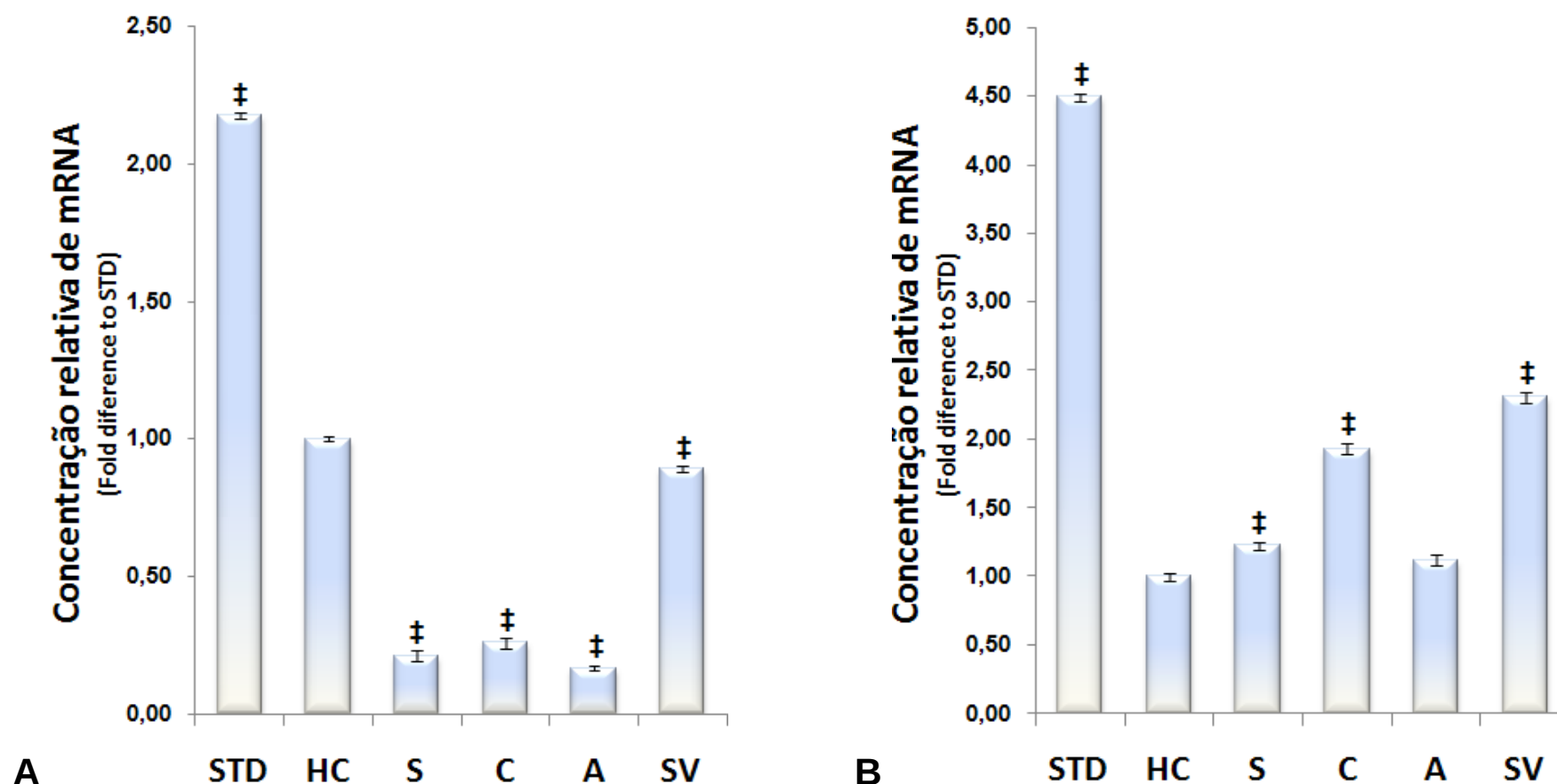
[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Figura 32 – Concentração relativa de expressão hepática do mRNA das enzimas 7- α -hidroxilase (A), e HMG-CoA redutase (B) de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglícinina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Figura 33 – Concentração relativa de expressão hepática do mRNA da enzima HMG-CoA sintase (A), e do receptor de LDL (B) de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



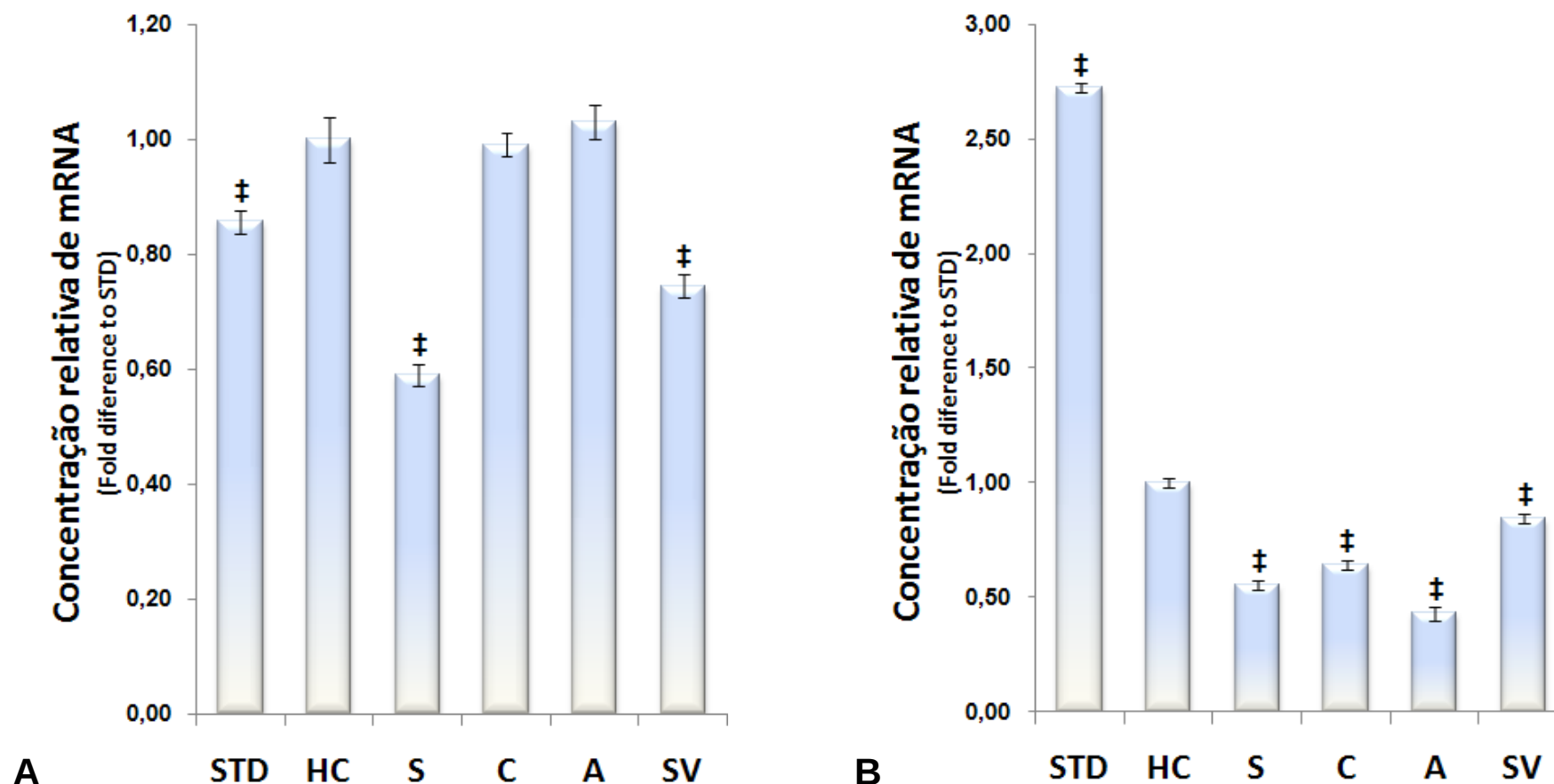
[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Estudos recentes demonstrando que as proteínas de leguminosas exercem uma ação moduladora na expressão de genes envolvidos do metabolismo dos lipídeos têm sido unânimes na alegação da qual o mecanismo implicaria na participação das SREBPs e dos PPARs (PAROLINI et al. 2012; RIGAMONTI et al. 2010; BETTZIECHE et al. 2008).

Bettzieche et al. (2008) observaram uma expressiva diminuição da síntese de ácidos graxos e triacilglicerídeos devido a regulação dos fatores transcricionais ligados a SREBP-1c, enzimas ácido graxo sintase e acil-CoA glicerol-3-fosfato aciltransferase, em ratos alimentados com a proteína isolada do tremoço. Ascencio et al. (2004) sugeriram que os efeitos exercidos pela proteína da soja na diminuição plasmática de colesterol e triacilglicerídeos poderiam ser uma consequência da regulação na família de fatores transcricionais da proteína ligante do elemento regulatório de esteróis (SREBP) que afetariam os níveis de insulina no plasma e mRNA da SREBP-1c hepático. Moriyama et al. (2004) também verificaram que os níveis de insulina do plasma e mRNA de SREBPs eram afetados pela ação da β -conglucina quando usada como única fonte de proteínas na dieta de animais.

Os resultados encontrados neste estudo com a proteína β -conglucina de soja, β -vigninas dos feijões caupí e adzuki, para as concentrações hepática de mRNA dos fatores transcricionais das SREBPs e do PPAR- α são apresentados nas figuras 34 e 35, respectivamente. Os grupos tratados com a proteína da soja e com a sinvastatina mostraram uma menor expressão da SREBP-1c em 41% ($P < 0,001$) e 26% ($P < 0,001$), comparados ao grupo HC. Os animais que receberam doses diárias das proteínas de soja ($0,56 \pm 0,02$), caupí ($0,64 \pm 0,02$), adzuki ($0,43 \pm 0,03$) e droga ($0,85 \pm 0,02$) tiveram redução de expressão da SREBP-2 em 44% ($P < 0,001$), 36% ($P < 0,001$), 57% ($P < 0,001$) e 15% ($P < 0,001$).

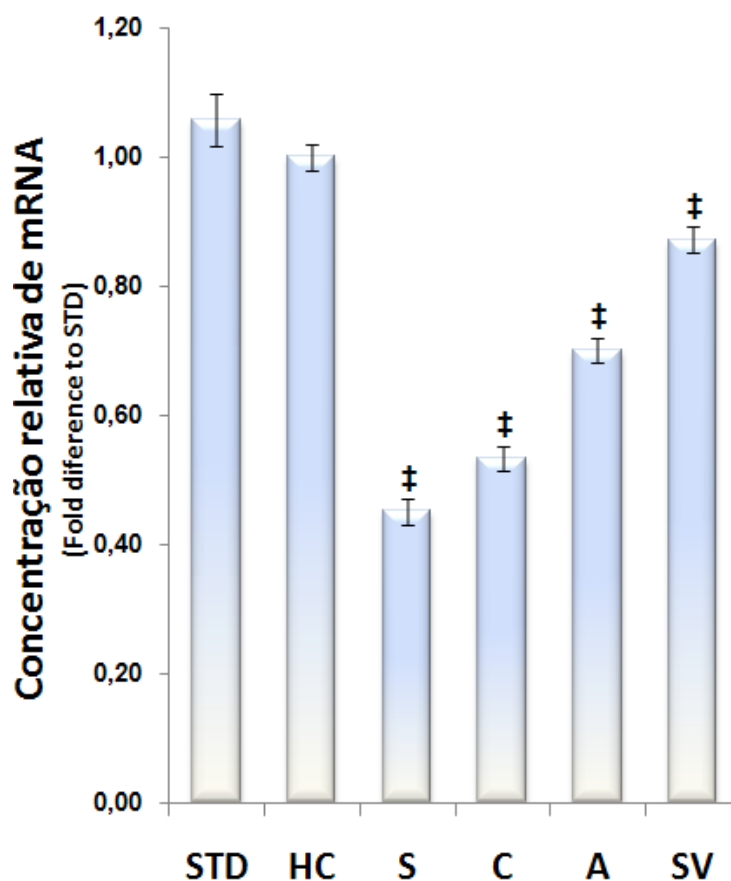
Figura 34 – Concentração relativa de expressão hepática do mRNA para os fatores transcripcionais SREBP-1c (A), e SREBP-2 (B) de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Não foi observada variação no comportamento de expressão do PPAR- α entre os animais alimentados com dieta STD e HC. Por outro lado, os grupos tratados com as proteínas do caupí, adzuki e a droga apresentaram valores de 55% ($P < 0,001$), 47% ($P < 0,001$), 30% ($P < 0,001$) e 13% ($P < 0,05$) menores, comparados ao grupo HC, respectivamente.

Figura 35 – Concentração relativa de expressão hepática do mRNA para o fator transcricional PPAR- α de ratos alimentados com ou sem dieta HC e com diferentes tratamentos[‡].



[‡]Valores representados pela média $\pm$ SEM. Marcadores indicam diferença estatística, por análise de comparação versus o grupo HC utilizando o teste de Bonferroni t-test, onde: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e [‡] $P < 0,001$. STD = dieta caseína (AIN-93G); HC = dieta hipercolesterolêmica (HC); S = dieta HC, tratado com a proteína β -conglucina (7S) (300 mg/Kg/dia); C = dieta HC, tratado com a proteína β -vignina (7S) do feijão caupí (300 mg/Kg/dia); A = dieta HC, tratado com proteína β -vignina (7S) do feijão adzuki (300 mg/Kg/dia) e SV = dieta HC, tratado com a droga sinvastatina (50 mg/Kg/dia).

Nossos primeiros estudos abordando a atividade hipocolesterolêmica de frações proteicas a partir de leguminosas usadas na alimentação se limitaram a confirmar alguns dos achados reportados com as proteínas da soja, e avançar nos estudos a partir da fração β -conglícina (7S) isolada dos demais componentes do grão (FERREIRA et al. 2011, 2010), assim como revelar também a importância da fração glicina (11S) nesse metabolismo (FASSINI et al. 2012, 2011), já que havia indícios que o elemento importante era de natureza proteica e não resultante da presença das isoflavonas como, equivocadamente, apontavam alguns experimentos (DURANTI et al. 2004; FUKUI et al. 2004; MORIYAMA et al. 2004; AOYAMA et al. 2001). Nossos primeiros estudos mostraram em ratos dislipidêmicos que a β -conglícina exercia uma ação mais significativa sobre os níveis séricos de colesterol total e triacilglicerídeo do que a glicina, porém, essa mostrava uma ação importante sobre a fração HDL-c (FASSINI et al. 2012). Assim, destacam-se os efeitos observados pela β -conglícina próximos àqueles observados em um grupo tratado com fenofibrato, uma droga hipolipidêmica comercial (FERREIRA et al. 2010). Na sequência, outro estudo mostrou que diferentes quantidades administradas da proteína β -conglícina causava um efeito importante e significativo com uma relação dose-resposta indicativa de sua ação (FERREIRA et al. 2011). Por outro lado, quando em combinação, a proteína associada ao tratamento farmacológico com rosuvastatina e/ou fenofibrato mostrou exercer efeitos distintos sobre as concentrações de colesterol e triacilglicerídeos plasmático e hepático, aparentemente uma interferência da proteína na ação da droga ou vice-versa foi notada (FERREIRA et al. 2012a; FASSINI et al. 2012).

Naquele momento, a propriedade hipocolesterolêmica exercida pela proteína da soja já havia sido reconhecida, em 1999, quando a US Food and Drug

Administration (FDA) postulou a recomendação de ingestão da proteína na prevenção de doenças do coração. Embora o mecanismo de ação ainda permaneça pouco esclarecido, uma hipótese plausível fazia referência à ação de peptídeos que modulariam o metabolismo lipídico, por alterações na absorção, síntese, excreção, indução e/ou supressão de transcrição de receptores e enzimas envolvidas (CONSONNI et al. 2011, 2010; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010, 2008; CHO et al. 2008).

Recentes estudos têm postulado inúmeras evidências sobre a ação de peptídeos originados da digestão de proteínas presente nos alimentos com diversas propriedades biológicas relacionadas às atividades antihipertensiva, hipocolesterolêmica, antiobesidade, antioxidante, capacidade de ligação com minerais, anticâncer, imunomoduladora, antimicrobiana e opióide (CAM e MEJIA, 2012; MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010; ALUKO, 2008; SHAHIDI e ZHONG, 2008; CHO et al. 2008; LOVATI et al. 2008; DZIUBA e DAREWICZ, 2007). Parece evidente que o elemento responsável pela propriedade hipocolesterolêmica exercida por essas proteínas, na verdade, é resultante da ação de peptídeos originados da hidrólise proteica. No entanto, os mecanismos de ação ainda são pouco claros. Tem sido postulado, que estes efeitos estão ligados a peptídeos de 3 a 20 resíduos de aminoácidos gerados da digestão gastrointestinal que poderiam modular o metabolismo do colesterol e triacilglicerídeos, por alterações na absorção, síntese, excreção, indução e/ou supressão do mRNAs de receptores e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico (LOVATI et al. 2008; SHAHIDI e ZHONG, 2008). Os resultados observados no presente estudo, também demonstraram o envolvimento de fatores transcricionais como mecanismo provável da ação de proteínas do tipo vicilina da soja, feijão caupí e feijão adzuki.

Peptídeos isolados da proteína de soja têm apresentado efeitos obre o metabolismo lipídico, através de inibição da síntese do colesterol pela regulação da HMG-CoA redutase (PAK et al. 2012, 2007, 2005b), pela capacidade de estimular a transcrição dos mRNAs para receptores de LDL (CHO et al. 2008) e enzimas β -oxidativas, ou por meio da supressão de enzimas lipogênicas (MARTINEZ-VILLALUENGA et al. 2010, 2008). Estes possíveis mecanismos têm sido propostos como alvos para novas alternativas no controle da hipercolesterolemia. Cho e seus colaboradores (2008) conseguiram pela primeira vez isolar, identificar e sequenciar peptídeos originados da proteína de soja que mostraram estimular a transcrição de receptores de LDL em células HepG2. Inicialmente, os autores obtiveram a partir da hidrólise da proteína isolada de soja com 15% de grau de hidrólise, cinco frações de diferentes massas moleculares separadas por cromatografia em gel filtração que foram testadas. As células expostas as fração 3 e 4, onde se encontravam os peptídeos de pesos moleculares entre 200 e 3000 daltons (Da), tiveram um aumento da transcrição dos receptores em 68 e 58%, respectivamente, comparados ao controle. Peptídeos a partir dessas frações foram posteriormente isolados e purificados por cromatografia de fase reversa. Entre os vários peptídeos purificados, sintetizados e testados, quatro deles com a seguinte sequência de aminoácidos, FVVNATSN (+249%), FKTNDRPSIGN (+125%), SSPDIYNPQAGS (+121%) e DTPMIGT (+155%), todos na concentração de 100 μ mol/L demonstraram estimular significativamente expressão de receptores de LDL nas células. Este estudo forneceu evidências diretas de que peptídeos derivados da proteína de soja podem influenciar na transcrição de mRNA de receptores de LDL de células hepáticas humanas.

Achados mais recentes atribuíram à propriedade hipocolesterolêmica da proteína de soja e a peptídeos gerados da hidrólise da subunidade α' - da β -conglícinina que foram testados “*in vitro*” em HepG2 (CONSONNI et al. 2011, 2010). Foi demonstrado que na presença do oligopeptídeos a captação e degradação da LDL-c aumentavam em 192 e 143%, respectivamente. Este efeito foi similar quando as células foram incubadas na presença de sinvastatina. Porém, alguns estudos anteriores, já sugeriam que a proteína isolada de soja, ausente de outros componentes, exerce ação redutora de colesterol e triacilglicerídeos devido à sua capacidade de atuar na regulação de genes no fígado (SHUKLA et al. 2007; TORRES et al. 2006; BRANDSCH et al. 2006). Entre estes, destacam-se as proteínas ligante do elemento regulatório de esterol (SREBPs) e receptores ativado por proliferadores de peroxissoma (PPARs).

Outro mecanismo possível tem sido apresentado em relação à diminuição da síntese de colesterol endógeno. Pak et al. (2005a), isolaram e identificaram peptídeos da glicínina de soja que apresentavam a habilidade de inibir a enzima HMG-CoA redutase. Os autores demonstraram que o hidrolisado proteico produzido por pepsina apresentava uma elevada capacidade de ligar-se com alguns ácidos biliares *in vitro*. Deste hidrolisado foram obtidos inicialmente quatro frações (A, B, C e D) separadas por HPLC utilizando coluna C18, que mostravam inibir a enzima, respectivamente, em 31, 45, 43 e 50%. A fração D foi recromatografada resultando em outras quatro frações (1, 2, 3 e 4) que inibiram a enzima, respectivamente, em 37, 75, 46 e 28%. O peptídeo que apresentou a sequência IAVPGEVA com 754.9 Da, mostrou maior atividade inibitória. Posteriormente, os autores (PAK et al. 2005b) sintetizaram o peptídeo IAVP o qual mostrou ser um potente inibidor da HMG-CoA redutase, com efeito semelhante ao observado com a droga lovastatina. No entanto,

a constatação mais importante encontrada foi que o mecanismo inibitório do peptídeo ocorria por competitividade em ambos os sítios ativos da enzima, substrato e co-fator NADPH. Mais tarde, a partir da compreensão deste mecanismo, os pesquisadores (PAK et al. 2012) propuseram aplicação de um método de análise espacial afim de propor novas sequências de peptídeos, baseado nas duas identificadas anteriormente, com atividade sobre a HMG-CoA redutase. Os peptídeos gerados foram sintetizados e testados. Os resultados obtidos confirmaram a hipótese, sendo que a melhor resposta mostrou um aumento de 14 vezes na atividade inibitória, comparada ao primeiro peptídeo (LPYP) isolado da soja.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo central investigar o efeito da administração de proteínas de leguminosas, isoladamente dos demais componentes químicos sobre o metabolismo de ratos dislipidêmicos. A partir dos resultados observados através do experimento *in vivo*, podemos concluir que as proteínas β -conglitinina da soja, β -vignina do feijão caupí e β -vignina do feijão adzuki exercem um importante efeito sobre o metabolismo de colesterol, sendo ainda observada uma ação sobre os triacilglicerídeos naqueles animais tratados com a proteína da soja e adzuki. Os resultados demonstrados neste estudo fornecem evidências para o reconhecimento da ação hipocolesterolêmica exercida por essas proteínas. Houve também um avanço na proposta de que outras espécies poderiam apresentar atividades semelhantes ou mesmo superiores às aquelas observadas com a β -conglitinina da soja. Além disso, contribuem aos achados da literatura que atribuem esse efeito à regulação da expressão de mRNA de enzimas e de fatores transcricionais relacionados ao metabolismo dos lipídeos.

REFERENCIAS

- ALUKO, R. E. Methods for the determination of nutritional and bioactive properties of peptides present in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates. **J AOAC Intern.** v. 9, p. 947-956, 2008.
- ALUKO, R. E.; YADA, R. Y.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Structural and functional properties of a partially purified cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin modified with protein kinase and glycopeptidase. **J Agric Food Chem.** v. 45, p. 2907-2913, 1997.
- AMEMIYA-KUDO, M.; SHIMANO, H.; YOSHIKAWA, T.; YAHAGI, N.; HASTY, A. H.; OKAZAKI, H.; TAMURA, Y.; SHIONOIRI, F.; IIZUKA, Y. Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. **J Biol Chem.** v. 275, p. 31078-31085, 2000.
- ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **Am J Clin Nutr.** v. 70S, 464-474, 1999.
- ANNONI, G.; BOTASSO, B. M.; CIACI, D.; DONATO, M. F.; TRIPODI, A. Liquid triglycerides (GPO-PAP). Medi Diagnostic Italy. **J Labor Clin Med.** v. 9, p. 115, 1982.
- AOYAMA, T.; FUKI, K. TAKAMATSU, K.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). **Nutrition.** v. 16, p. 349-354, 2000.
- AOYAMA, T.; KOHNO, M.; SAITO, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K. YAMAMOTO, T.; HASHIMOTO, Y. HIROTSUKA, M.; KITO, M. Reduction by phytat-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 65, p. 1071-1075, 2001.
- ARGOS, P.; NARAYANA, S. V.; NIELSEN, N. C. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. **EMBO J.** v. 4, p. 1111-1117, 1985.
- ASCENCIO, C.; TORRES, N.; ISOARD-ACOSTA, F. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. **J Nutr.** v. 134, p. 522-529, 2004.
- ASSMANN G. HDL-cholesterol precipitant. Randox Labs. Ltd. Crumlin Co. **Antrim Northern Ireland Internist.** v. 20, p. 559, 1979.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC.). **Official methods of analysis.** Arlington, 16th ed., v. 2. 1998. 99p.
- BAIK, I.; CHO, N. H.; KIM, S. H.; SHIN, C. Dietary information improves cardiovascular disease risk prediction models. **Eur J Clin Nutr.** v. 67, p. 25-30, 2013.
- BETTZIECHE, A.; BRANDSCH, C.; EDER, K.; STANGL, G. I. Lupin protein acts hypocholesterolemic and increases milk fat content in lactating rats by influencing the expression of genes involved in cholesterol homeostasis and triglyceride synthesis. **Mol Nutr Food Res.** v. 53, n. 9, p. 1134-1142, 2009.
- BETTZIECHE, A.; BRANDSCH, C.; WEISSE, K.; HIRCHE, F.; EDER, K.; STANGL, G. I. Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. **Br J Nutr.** v. 99, n. 5, p. 952-962, 2008.
- BLOCK, K. The biological synthesis of cholesterol. **Science.** v. 150, n. 3692, p. 19-28, 1965.

BLOOM, D. E.; CAFIERO, E. T.; JANÉ-LLOPIS, E.; ABRAHAMS-GESSEL, S.; BLOOM, L. R. **The global economic burden of noncommunicable diseases**. Geneva: World Economic Forum. 2011. 48p.

BORROTO, K.; DURE, L. The globulin seed storage proteins of flowering plants derived from two ancestral genes. **Plant Mol Biol**. v. 8, p. 113-131, 1987.

BOUCHARD, C. Inhibition of food intake by inhibitors of fatty acid synthase. **N Engl J Med**. v. 343, n. 25, p. 1888-1889, 2000.

BRANDSCH, C.; SHUKLA, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G.; EDER, K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. **Nutrition**. v. 22, p. 1162-1170, 2006.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 96, n. 20, p. 11041-11048, 1999.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**. v. 89, p. 331-340, 1997.

BROWN, M. S.; YE, J.; RAWSON, R. B.; GOLDSTEIN, J. L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. **Cell**. v. 100, p. 391-398, 2000.

CAM, A.; MEJIA, E. G. Role of dietary proteins and peptides in cardiovascular disease. **Mol Nutr Food Res**. v. 56, p. 53-66, 2012.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins. **J Agric Food Chem**. v. 48, p. 742-749, 2000.

CHEN, J. R.; CHIOU, S. F.; SUETSUNA, K.; YANG, H. Y.; YANG, S. C. Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. **Nutrition**. v.19, p. 676-680, 2003.

CHEN, T. H. H.; GUSTA, L. V.; TJAHHADI, C.; BREENE, W. M. Electrophoretic characterization of adzuki bean (*Vigna angularis*) seed proteins. **J Agric Food Chem**. v. 1084, n. 32, p. 396-399, 1984.

CHEN, Y.; ROLLINS, J.; PAIGEN, B.; WANG, X. Genetic and Genomic Insights into the Molecular Basis of Atherosclerosis. **Cell Metabolism**. v. 6, n. 3, p. 164-179, 2007.

CHO, S. J.; JUILLERAT, M. A.; LEE, C-H. Peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. **J Agric Food Chem**. v. 56, n. 12, p. 4372-4376, 2008.

CHOI, Y. Y.; OSADA, K.; ITO, Y.; NAGASAWA, T.; CHOI, M. R.; NISHIZAWA, N. Effects of dietary protein of korean foxtail millet on plasma adiponectin, HDL-Cholesterol, and insulin levels in genetically type 2 diabetic mice. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 69, n. 1, p. 31-37, 2005.

CHOMCZNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**. v. 162, p. 156-159, 1987.

COLEMAN, R. A.; BELL, R. M. Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells: Studies on the microsomal diacylglycerol acyltransferase activity using ethanol-dispersed diacylglycerol. **J Biol Chem**. v. 251, p. 4537-4543, 1976.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Prog Lipid Res.** v. 43, p. 134-176, 2004.

CONSONNI, A; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A.; MORAZZONI, P.; DURANTI, M. Cloning, yeast expression, purification and biological activity of a truncated form of the soybean 7S globulin α' subunit involved in Hep G2 cell cholesterol homeostasis. **J Nutr Biochem.** v. 21, n. 9, p. 887-891, 2010.

CONSONNI, A; LOVATI, M. R.; PAROLARI, A.; MANZONI, C.; MORAZZONI, P.; DURANTI, M. Heterologous expression and purification of the soybean 7S globulin subunit extension region: In vitro evidence of its involvement in cell cholesterol homeostasis. **Protein Express Purif.** v. 80, p. 125-129, 2011.

DABAI, F. D.; WALKER, A. F.; SAMBROOK, I. E. Comparative effects on blood lipids and faecal steroids of five legume species incorporated into a semi-purified, hypercholesterolaemic rat diet. **Br J Nutr.** v. 75, p. 557-511, 1996.

DEBOSE-BOYD, R. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. **Cell Res.** v. 18, n. 6, p. 609-621, 2008.

DEIGAH, P. G. C.; OSANYINPEJU, A. O. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm from IITA gene bank. **Genet Resour Crop Ev.** v. 43, p. 485-491, 1996.

DERBYSHIRE, E.; WRIGHT, D. J.; BOULTER, D. Legumin and vicilin storage proteins of legume seeds. **Phytochem.** v. 15, p. 3-24, 1976.

DOYLE, J. J.; LADIN, B. F.; BEACHY, R. N. Antigenic relationship of legume seed storage proteins to the 7S storage protein of soybean. **Bioc Syst Ecol.** v. 13, p. 123-132, 1985.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiol.** v. 131, p. 900-910, 2003.

DOYLE, J. J.; SCHULER, M. A.; GODETTE, W. D. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. **J Biol Chem.** v. 261, p. 9228-9238, 1986.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia.** v. 77, n. 2, p. 67-82, 2006.

DURANTI, M.; GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Cr Res.** v. 53, p. 31-45, 1997.

DURANTI, M.; LOVATI, M. R.; DANI, V. The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J Nutr.** v. 134, p. 1334-1339, 2004.

DZIUBA, M.; DAREWICZ, M. Food proteins as precursors of bioactive peptides — Classification into families. **Food Sci Tech Inter.** v. 13, p. 393-404, 2007.

EATON, C. B. Hyperlipidemia. **Prim Care Clin Office Pract.** v. 32, p. 1027-1055, 2005.

EL-SHEMY, H. A.; FUJITA, K.; AHMED, S. H. Differences in composition of glycinin and beta-conglycinin globulins in some legume cultivars. **Am Biotechnol Lab.** v. 19, p. 46-48, 2001.

- FASSINI, P. G.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. **Nutr Food Sci.** v. 42, n. 2, p. 102-110, 2012.
- FASSINI, P. G.; NODA, R. W.; FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; NEVES, V. A.; DEMONTE, A. Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. **Lipids Health Dis.** v. 10, n. 165, 2011.
- FAYE, L.; CHRISPEELS, M. J. Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. **Anal Biochem.** v. 145, N. 101, p. 218-224, 1985.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. **Lipids Health Dis.** v. 11, n. 11, 2012.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. **J Func Foods.** v. 2, p. 275-283, 2011.
- FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. Soy conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. **J Med Food.** v. 14, P. 94-100, 2010.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, S. G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem.** v. 226, p. 497-509, 1957.
- FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R.; FERREIRA, R. B. Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. **J Agric Food Chem.** v. 52, p. 1682-1687, 2004.
- FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, R. J. C.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **J Food Sci.** v. 73, n. 9, p. 235-240, 2008.
- FUKUDA, T.; PRAK, K.; FUJIOKA, M.; MARUYAMA, N.; UTSUMI, S. Physicochemical properties of native adzuki bean (*Vigna angularis*) 7S globulin and the molecular cloning of its cDNA isoforms. **J Agric Food Chem.** v. 55, p. 3667-3674, 2007.
- FUKUI, K.; KOJIMA, M.; TACHIBANA, N. Effects of soybean conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 68, n. 5, p. 1153-1155, 2004.
- FUKUI, K.; TACHIBANA, N.; WANEZAKI, S. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. **J Agric Food Chem.** v. 50, p. 5717-5721, 2002.
- FUKUSHIMA, D. Recent progress of soybean protein food chemistry: Technology and nutrition. **Food Rev Int.** v. 7, p. 323-351, 1991.
- GAAL, L. F. V.; MERTENS, I. L.; BLOCK, C. E. D. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature.** v. 444, n. 7121, p. 875-880, 2006.
- GARCIA, C. K.; MUES, G.; LIAO, Y.; HYATT, T.; PATIL, N.; COHEN, J. C.; HOBBS, H. H. Sequence Diversity in Genes of Lipid Metabolism. **Genome Res.** v. 11, p. 1043-1052, 2001.
- GEPTS, P.; BEAVIS, W. D.; BRUMMER, E. C. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed. **Plant Phys.** v. 137, p. 1228-1235, 2005.

GORG, A.; POSTEL, W.; GUNTHER, S. Two-dimensional electrophoresis: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**. v. 9, p. 531-546, 1988.

GRUNDY, S. M. Cholesterol-lowering trials: a historical perspective. In: Grundy SM, ed. **Cholesterol lowering therapy: evaluation of clinical trial evidence**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000. 329p.

GRUSAK, M. A. **Legumes**. In: Caballero, B., Allen, L., Prentice, A., editors. Encyclopedia of Human Nutrition. 2nd edition. New York, NY: Elsevier Academic Press. 2005. p. 120-126.

GUPTA, P.; SINGH, R.; MALHOTRA, S.; BOORA, K. S.; SINGAL, H. R. Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Physiol Mol Biol Plants**. v. 16, n. 1, p. 53-58, 2010.

HAUG, A.; HOSTMARK, A. T. Lipoprotein upases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish or coconut oil. **J Nutr**. v. 117, p. 1011-1017, 1987.

HEUVEL. Cardiovascular disease-related genes and regulation by diet. **Cur Atheroscler Rep**. v. 11, p. 448-455, 2009.

HILL, J. E.; BREIDENBACH, R. W. Proteins of soybean seeds: I. Isolation and characterization of the major components. **Plant Physiol**. v. 53, n. 5, p. 742-746, 1974.

HIRANO, H.; KAGAWA, H.; OKUBO, K. Characterization of proteins released from legume seeds in hot water. **Phytochemistry**. v. 31, p. 731-735, 1992.

HOIE, L. M.; GRAUBAUM, H. J.; HARDE, A.; GRUENWALD, J.; WERNECKE, K. D. Lipid-lowering effect protein soybean in human. **Adv Nat Ther**. v. 22, n. 2, p. 175-189, 2005.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin. Invest**. v. 109, p. 1125-1131, 2002.

HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; BROWN, M. S.; HAMMER, R. E.; GOLDSTEIN, J. L.; SHIMANO, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. **J Clin Invest**. v. 101, p. 2331-2339, 1998.

HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybeans to North America by Samuel Bowen in 1765. **Econ Bot**. v. 37, p. 371-379, 1983.

IM, S-S.; , KIM, M-Y.; KWON, S-K.; KIM, T-H.; BAE, J-S.; KIM, H.; KIM, K-S.; OH, G-T.; AHN, Y-H. Peroxisome Proliferator-activated receptor α -is responsible for the up-regulation of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression in fasting and db/db mice. **J Biol Chem**. v. 286, n. 2, p. 1157-1164, 2011.

JOSEPH, S. B.; LAFFITTE, B. A.; PATEL, P. H.; WATSON, M. A.; MATSUKUMA, K. E.; WALCZAK, R.; COLLINS, J. L.; OSBORNE, T. F.; TONTONOZ, P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. **J Biol Chem**. v. 277, n. 13, pp. 11019-11025, 2002.

KAGAWA, H; YAMAUCHI, F.; HIRANO, H. Soybean basic 7S globulin represents a protein widely distributed in legume species. **FEBS Lett**. v. 226, p. 145-149, 1987.

KERN, M.; ELLISON, D.; MARROQUIN, Y.; AMBROSE, M; MOSIER, K. Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. **Nutrition**. v. 18, p. 654-656, 2002.

- KHAN, R. I.; GATEHOUSE, J. A.; BOULTER, D. The seed proteins of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **J Exp Bot.** v. 31, p. 1599-1611, 1980.
- KOBA, S.; HIRANO, T. Dyslipidemia and atherosclerosis. **Nihon Rinsho.** v. 69, n. 1, p. 138-143, 2011.
- KOHONO, M., HIROTSUKA, M., KITO, M., MATSUZAWA, Y. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin. **J Atheroscl Thromb.** v. 13, p. 247-255, 2006.
- KORNER, J.; SAVONTAUS, E.; CHUA, S. C.; LEIBEL, R. L.; WARDLAW, S. L. Leptina regulation of agrp and Npy mRNA in the hypothalamus. **J Neuroendocrinol.** v. 13, p. 959-966, 2001.
- LACKEY, J. A. **Phaseoleae DC.** (1825). In. Advances in legume systematic. R.M. Polhill e P.H. Raven, eds. Royal Botanic Gardens, Kew, 1981, 327p.
- LAEMLLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680-684, 1970.
- LEE, A-H.; SCAPA, E. F.; COHEN, D.E.; GLIMCHER, L. H. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. **Science.** v. 320, n. 5882, p. 1492-1496, 2008.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World.** Royal Botanic Gardens, Kew. 2005. 577p
- LIU, J. R.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J.; CHEN, H. L.; YUERH, P. Y.; LIN, C. W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. **Brit J Nutr.** v. 95, p. 939-946, 2006.
- LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos.** Funep. Jaboticabal. 2000. 343p.
- LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CANADESI, A.; VACCARINO, V.; MARCHI, M. Soybean protein diet Increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. **J Clin Invest.** v. 80, p. 1498-1502, 1987.
- LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CORSINI, A. 7S Globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system. **J Nutr.** v. 126, p. 2831-2842, 1996.
- LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A. Polypeptide from 7S soy globulin alfa' subunit up-regulates LDL-receptors in Hep-G2 cells. **FASEB J.** v. 22, p. 303-307, 2008.
- LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **J Nutr.** v. 130, p. 2543-2549, 2000.
- LOVATI, M.R.; MANZONI, C.; CORSINI, A. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. **J Nutr.** v. 122, p. 197-1978, 1992.
- LOW, S.; CHIN, M. C.; DEURENBERG-YAP, M. Review on Epidemic of Obesity. **Ann Acad Med Singapore.** v. 38, p. 57-65, 2009.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACARULLA, M. T.; MEDINA, C.; DE-DIEGO, M. A. Effects of the whole seed and protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic rats. **Br J Nutr.** v. 85, p. 607-614, 2001.

- MAGNI, C.; SESSA, F.; ACCARDO, E. Conglutinoma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. **J Nutr Biochem**. v. 15, p. 646-650, 2004.
- MAHADEVAPPA, V. G.; RAINA, P. L. Hypocholesterolemic effect cowpea in rats on atherogenic diet. **Indian J Med Res**. v. 78, p. 819-823, 1983.
- MANDAL, S.; MANDAL, R. K. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. **Cur Science**. v. 79, n. 5, p. 576-589, 2000.
- MANZONI, C.; DURANTI, M.; EBERINI, I.; SCHARNAG, H.; MARZ, W. Subcellular localization of soybean 7S globulin in HepG2 cells and LDL receptor up-regulation by its constituent subunit. **J Nutr**. v. 133, p. 2149-2155, 2003.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; BRINGE, N. A.; BERHOW, M. A.; MEJIA, E. G. β -conglycinin embeds active peptides that inhibit lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes in vitro. **J Agric Food Chem**. v. 56, n. 22, p. 10533-10543, 2008.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; DIA, V. P.; BERHOW, M.; BRINGE, N. A.; MEJIA, E. G. Protein hydrolysates from β -conglycinin enriched soybean genotypes inhibit lipid accumulation and inflammation *in vitro*. **Mol Nutr Food Res**. v. 53, p. 1007-1018, 2009.
- MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; RUPASINGHE, S. G.; SCHULER, A. M.; MEJIA, E. G. Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. **FEBS J**. v. 277, p. 1481-1493, 2010.
- MASEK, T.; VOPALENSKY, V.; SUCHOMELOVA, P.; POSPISEK, M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Anal Biochem**. v. 336, p. 46-50, 2005.
- MAXFIELD, F. R.; MEER, G. V. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. **Curr Opin Cell Biol**. v. 22, p. 422-429, 2010.
- MAXFIELD, F. R.; TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. **Nature**. v. 438, p. 612-621, 2005.
- MAZEIN, A.; WATTERSON, S.; GIBBS, H.; HSIEH, W.; ABDULLAH, M. B.; BLANC, M.; GRIFFITHS, W. J.; FREEMAN, T. C.; GHAZAL, P. Regulation and feedback of cholesterol metabolism. Available from **Nature Precedings** <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2011.6315.1>> (2011).
- MAZEIN, A.; WATTERSON, S.; HSIEH, W-Y.; GRIFFITHS, W. J.; GHAZAL, P. A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. **Biochem Pharmacol**. In Press, Accepted Manuscript. Available online 10 April 2013.
- MENG, G-T.; MA, C-Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin. **Food Chem**. v. 73, p. 453-460, 2001.
- MORIYAMA, T.; KISHIMOTO, K.; NAGAI, K. Soybean conglycinin diet suppresses serum triglyceride level in normal and genetically obese mice by induction of oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. **Biosci Biotechnol Biochem**. v. 68, n. 2, p. 352-359, 2004.
- MURRAY, D. R.; MACKENZIE, K. F.; VAIRNHOS, F.; PEOPLES, M. B.; ATKINS, C. A.; PATE, J. S. Electrophoretic studies of the seed proteins of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Z. **Pflanzenphysiol**. v. 109, p. 363-370, 1983.
- NAGANO, T.; HIROTSUKA, M.; MORI, H. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. **J Agric Food Chem**. v. 40, p. 941-944, 1992.

NATH, N.; WIENER, R.; HARPER, A. E. Diet and cholesterolemia, I. Development of a diet for the study of nutritional factors affecting cholesterolemia in the rat. **J Nutr.** v. 67, p. 289-307, 1959.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. High Blood Cholesterol in Adults: Report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment. **NIH Pub.** No. 88-2925. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute. 1988. 87p.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Second report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. **NIH Pub.** No. 93-3095. Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute. 1993. 180p.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **NIH Pub.** Bethesda, MD: National Heart, Lung, and Blood Institute. 2002. 284p.

NEVES, V. A.; PEREIRA, D. D.; SHOSHIMA, A. H. R.; TAVANO, O. L. Características da solubilidade protéica e isolamento da globulina principal de caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar BR-14 Mulato. **Alim Nutr.** v. 14, p. 47-55, 2003.

OHSAWA, M.; TANNO, K. Conflicting effect of alcohol on cardiovascular risk: a clue to understand the different etiologies of coronary artery disease, stroke and peripheral artery disease. **Hypertension Res.** v. 36, p. 16-18, 2013.

OLIVIER, L. M.; KOVACS, W.; MASUDA, K.; KELLER, G-A.; KRISANS, S. K. Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes: AA-CoA thiolase, HMG-CoA synthase, MPPD, and FPP synthase. **J Lipid Res.** v. 41, p. 1921-1935, 2000.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins.** Longmans Green, London, 1924.

PAK, V. V.; KOO, M.; YUN, L.; KWON, D. Y. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. **Amino Acids.** v. 43, p. 2015-2025, 2012.

PAK, V. V.; KOO, M.; YUN, L.; KWON, D. Y. Recognized sequence and conformation in design of linear peptides as a competitive inhibitor for HMG-CoA reductase. **J Mol Recognit.** v. 20, p. 197-203, 2007.

PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chem Nat Comp.** v. 41, n. 6, p. 710-714, 2005.

PÉGORIER, J-P.; MAY, C. L.; GIRARD, J. Control of Gene Expression by Fatty Acids. **J Nutr.** v. 134, p. 2444S-2449S, 2004.

PERNOLLET, J. C.; MOSSÉ, J. Secondary structure prediction of seed storage proteins. **Int J Pept Protein Res.** v. 22, n. 4, p. 456-463, 1983.

PORTER, D.; SANBORN, B. M. Analysis of heat-denatured DNA using native agarose gel electrophoresis. **Biotechn.** 13(3); 406-410, 1992.

PTAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acid Res.** v. 29, p. 2002-2007, 2001.

QUIMET, M. Autophagy in obesity and atherosclerosis: interrelationships between cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism and autophagy in macrophages and other systems. **Biochim Biophys Acta.** v. 1831, n. 6, p. 1124-1133, 2013.

- RAALTE, D. H. V.; LI, M.; PRITCHARD, P. H.; WASAN, K. M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α : A Pharmacological Target with a Promising Future. **Pharmaceut Res.** v. 21, n. 9, p.1531-1539, 2004
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- REYNOLDS, K.; CHIN, A.; LEES, K. A Meta-Analysis of the Effect of Soy Protein Supplementation on Serum Lipids. **Am J Cardiol.** v. 98, p. 633-640, 2006.
- RHO, S. J.; PARK, S. P.; AHN, C. W.; SHIN, J. K.; LEE, H. G. Dietetic and hypocholesterolaemic action of black soy peptide in dietary obese rats. **J Sci Food Agric.** v. 87, p. 908-913, 2007.
- RIGAMONTI, E.; PAROLINI, C.; MARCHESI, M.; DIANI, E.; BRAMBILLA, S.; SIRTORI, C. R.; CHIESA, G. Hypolipidemic effect of dietary pea proteins: Impact on genes regulating hepatic lipid metabolism. **Mol Nutr Food Res.** v. 54, p. 24S-30S, 2010.
- RINGSEIS, R.; EDER, K. Regulation of genes involved in lipid metabolism by dietary oxidized fat. **Mol Nutr Food Res.** v. 55, p. 109-121, 2011.
- ROE, J. H.; BYLER, R. E. Serum lipase determination using a one-hour period of hydrolysis. **Anal Biochem.** v. 6, p. 451-460, 1963.
- RUBATZKY, V. E.; YAMAGUCHI M. World vegetables: principles, production, and nutritive values. Edition 2. New York: **Chapman & Hall.** 1997. 1554p.
- SAGGERSON, D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. **Annu Rev Nutr.** v. 28, p. 253-272, 2008.
- SAKAKIBARA, M.; AOKI, T.; NOGUCHI, H. Isolation and characterization of 7S protein-I of *Phaseolus angularis* (Adzuki bean). **Agric Biol Chem.** v. 43, n. 9, p. 1951-1957, 1979.
- SAWASHITA, N. Effect of dietary vegetable and animal proteins on atherothrombosis in mice. **Nutrition.** v. 22, p. 661-667, 2006.
- SCARAFONI, A.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. **Trends Food Sci Techn.** v. 18, p. 454-463, 2007.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos:** propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 517p.
- SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **J AOAC Inter.** v. 91, n. 4, p. 914-931, 2008.
- SHIMANO, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Prog Lipid Res.** v. 40, p. 439-452, 2001.
- SHOSHIMA, A. H. R.; TAVANO, O. L.; NEVES, V. A. Digestibilidade *in vitro* das proteínas do caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) var. BR-14 mulato: efeito dos fatores antinutricionais. **Braz J Food Technol.** v. 8, p. 299-304, 2005.
- SHUKLA, A.; BRANDSCH, A.; BETTZIECHE, F.; HIRCHE, G.; STANGL, K. EDER. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **J Nutr Biochem.** v. 18, p. 313-321, 2007.

- SIRTORI, C. R.; GALLI, G.; ANDERSON, J. W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**. V. 203, n. 1, p. 8-17, 2009.
- STOCKBRIDGE, H.; HARDY, R. I.; GLUECK, C. J. Photometric determination of cholesterol (CHOD-PAP method). **J Labor Clin Med**. v. 114, p. 142-151, 1989.
- SWIRSKI, F. K.; NAHRENDORF, M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. **Science**. v. 339, n. 6116, p. 161-166, 2013.
- TAVRIDOU, A.; MANOLOPOULOS, V. G. Novel molecules targeting dyslipidemia and atherosclerosis. **Curr Med Chem**. v. 15, p. 792-802, 2008.
- THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Heterogeneity of beta-conglycinin. **Biochim Biophys**. v. 439, n. 9, p. 326-338, 1976.
- TONKS, D. B. A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories. **Clin Chem**. v. 9, p. 217-233, 1963.
- TORRES, N.; TORRE-VILLALVAZO, I.; TOVAR, A. R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. **J Nutr Biochem**. v. 17, p. 365-373, 2006.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**. v. 6, p. 24-25, 1969.
- TZANETAKIS, I. E.; KELLER, K. E.; MARTIN, R. R. The use of reverse transcriptase for efficient first- and second-strand cDNA synthesis from single- and double-stranded RNA templates. **J Virol Methods**. v. 124, p. 73-77, 2005.
- UEBERSAX, M. A.; OCCEÑA, L. G. Legumes in the diet. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). **Elsevier Science Ltd**. 2003. 6289p.
- UTSUMI, S. Plant food protein engineering. In: **Advances in food and Nutrition Research**. Vol.36. ed: Kinsella, J.E., Academic Press, Inc. 1992.
- WEBB, K. E.; MATTHEWS, J. C.; DIRIENZO, D. B. Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives. **J ANIM SCI**. v. 70, p. 3248-3257, 1992.
- WHITAKER, J. R. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. **Anal Chem**. v. 35, p. 1950-1953, 1963.
- WILSON, T. A.; NICOLosi, R. J.; KOTYLA, T.; FLECKINGER, B. Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations. **Nutr. Res**. v. 27, p. 498-504, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global report: Noncommunicable diseases country profiles. Ed. **World Health Organization**, 2011, 209p.
- XIAO, X.; SONG, B-L. SREBP: a novel therapeutic target. **Acta Biochim Biophys Sin**. v. 45, p. 2-10, 2013.
- YAMAMOTO, N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. **Biopolymers**. v. 43, n. 2, p.129-134, 1997.
- YE, J.; DEBOSE-BOYD, R. A. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2011 Jul 1;3(7). On-line: pii: a004754. doi: 10.1101/cshperspect.a004754

YOSHIKAWA, M.; FUJITA, H.; MATOBA, N.; TAKENAKA, Y.; YAMAMOTO, T.; YAMAUCHI, R.; TSURUKI, H.; TAKAHATA, K. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. **BioFactors**. v. 12, p. 143-146, 2000.

YOSHIKAWA, T.; IDE, T.; SHIMANO, H.; YAHAGI, N.; AMEMIYA-KUDO, M.; MATSUZAKA T.; YATOH, S.; KITAMINE, T.; OKAZAKI, H.; TAMURA, Y.; SEKIYA, M.; TAKAHASHI, A.; HASTY, A. H.; SATO, R.; SONE, H.; OSUGA, J-I.; ISHIBASHI, S.; YAMADA, N. Cross-Talk between Peroxisome Proliferator- Activated Receptor (PPAR α) and Liver X Receptor (LXR) in Nutritional Regulation of Fatty Acid Metabolism. I. PPARs Suppress Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Promoter through Inhibition of LXR Signaling. **Mol Endocrinol**. v. 17, n. 7, p. 1240-1254, 2003

YUSUF, S.; OUNPUU, S.; ANAND, S. The global epidemic of atherosclerotic cardiovascular disease. **Med Principles Pract**. v. 11, n. 2, p. 3-8, 2002.

ZANNIS, V. I.; CHRONI, A.; KRIEGER, M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. **J Mol Med**. v. 84, p. 276–294, 2006.

ZHONG, F.; LIU, J.; MA, J. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. **Food Res. Inter**. v. 40, p. 661-667, 2007.

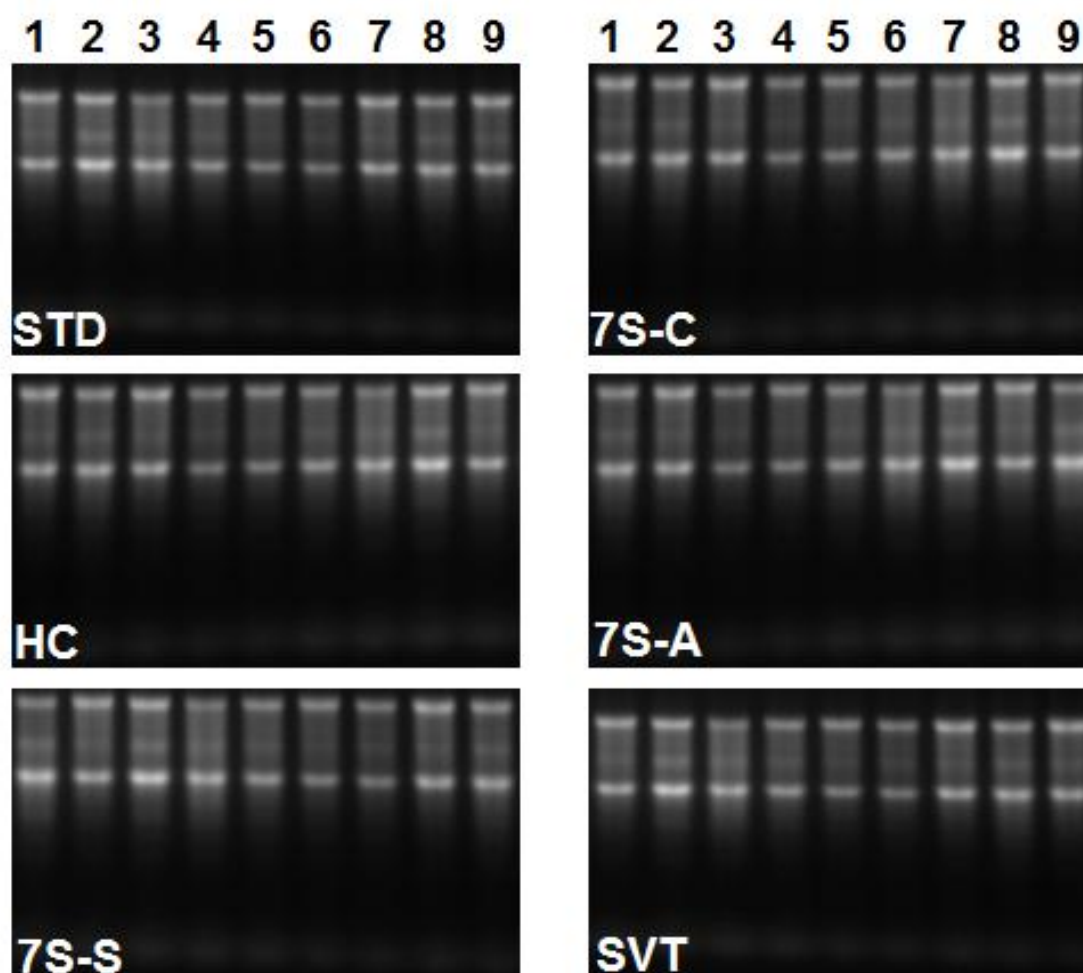
APÊNDICE A – Quantificação do RNA extraído do tecido hepático de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos.

		$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	260/280	[] $\mu\text{g/mL}$	[] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
STD	1	37,30	19,50	1,91	1483,0	1,48
	2	14,28	7,75	1,84	543,2	0,54
	3	23,29	12,41	1,88	924,8	0,92
	4	30,24	15,82	1,91	1199,0	1,20
	5	51,50	28,00	1,84	1986,0	1,99
	6	30,99	16,15	1,92	1227,0	1,23
	7	80,22	44,04	1,82	3027,0	3,03
	8	55,42	29,30	1,89	2112,0	2,11
	9	60,86	31,46	1,94	2394,0	2,39
HC	1	24,16	12,81	1,89	959,2	0,96
	2	42,47	22,09	1,92	1680,0	1,68
	3	44,30	23,06	1,92	1740,0	1,74
	4	36,69	19,03	1,93	1457,0	1,46
	5	46,43	24,07	1,93	1839,0	1,84
	6	59,79	30,89	1,94	2378,0	2,38
	7	27,19	14,19	1,92	1071,0	1,07
	8	52,00	26,82	1,94	2073,0	2,07
	9	56,68	29,40	1,93	2257,0	2,26
7S-Soja	1	30,28	15,98	1,90	1207,0	1,21
	2	50,21	26,55	1,89	1984,0	1,98
	3	58,57	30,81	1,90	2322,0	2,32
	4	58,76	30,68	1,92	2334,0	2,33
	5	31,44	17,08	1,84	1251,0	1,25
	6	56,00	29,54	1,90	2214,0	2,21
	7	75,66	39,90	1,89	2988,0	2,99
	8	38,36	20,28	1,89	1508,0	1,51
	9	22,94	12,16	1,89	912,0	0,91
7S-Caupí	1	62,24	32,36	1,92	2449,0	2,45
	2	54,10	28,14	1,92	2130,0	2,13
	3	61,52	33,88	1,82	2315,0	2,32
	4	54,54	28,76	1,90	2121,0	2,12
	5	86,15	45,19	1,91	3430,0	3,43
	6	63,40	32,88	1,93	2526,0	2,53
	7	86,19	45,19	1,91	3433,0	3,43
	8	78,78	41,68	1,89	3116,0	3,12
	9	54,04	27,52	1,96	2038,0	2,04

Continua...

7S-Adzuki	1	70,83	37,05	1,91	2824,0	2,82
	2	59,20	30,78	1,92	2347,0	2,35
	3	74,56	39,02	1,91	2927,0	2,93
	4	79,44	41,70	1,91	3161,0	3,16
	5	63,11	32,89	1,92	2508,0	2,51
	6	55,25	28,81	1,92	2196,0	2,20
	7	48,84	24,20	2,01	1953,6	1,95
	8	78,52	40,94	1,92	3122,0	3,12
	9	78,85	40,19	1,96	3133,0	3,13
Sinvastatina	1	39,40	20,52	1,92	1572,0	1,57
	2	50,30	26,62	1,89	1958,0	1,96
	3	58,02	30,22	1,92	2314,0	2,31
	4	37,56	20,36	1,85	1438,0	1,44
	5	29,76	15,87	1,88	1177,0	1,18
	6	37,74	20,24	1,87	1462,0	1,46
	7	55,50	29,18	1,90	2194,0	2,19
	8	45,48	24,20	1,88	1756,0	1,76
	9	47,26	24,96	1,89	1849,0	1,85

APÊNDICE B – Eletroforese em gel de agarose do RNA extraído do tecido hepático de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos.



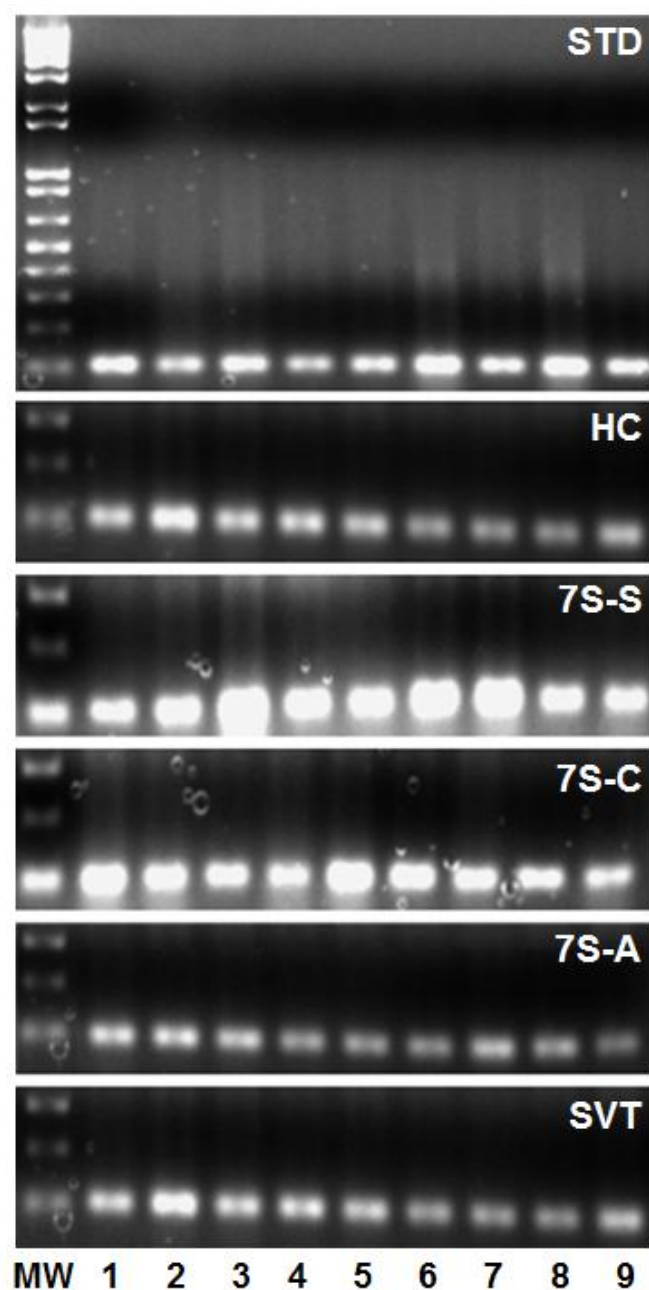
APÊNDICE C – Quantificação do cDNA produzido a partir do RNA de tecido hepático de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos.

		$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	260/280	[] $\mu\text{g/mL}$	[] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
STD	1	45,01	24,55	1,83	2245,00	2,25
	2	44,86	24,54	1,84	2223,00	2,22
	3	43,51	23,73	1,83	2162,00	2,16
	4	41,45	22,65	1,83	2063,00	2,06
	5	48,10	26,50	1,82	2367,00	2,37
	6	42,14	23,08	1,83	2081,00	2,08
	7	45,83	25,11	1,83	2274,00	2,27
	8	47,38	26,10	1,82	2333,00	2,33
	9	46,26	25,44	1,82	2287,00	2,29
HC	1	47,61	26,11	1,82	2349,00	2,35
	2	32,78	18,47	1,78	1633,00	1,63
	3	43,39	23,77	1,83	2148,00	2,15
	4	43,71	23,99	1,82	2169,00	2,17
	5	43,77	23,99	1,83	2160,00	2,16
	6	42,16	23,12	1,82	2095,00	2,10
	7	44,12	22,72	1,94	2112,00	2,11
	8	40,53	22,13	1,83	2010,00	2,01
	9	43,32	24,05	1,80	2116,00	2,12
7S-Soja	1	44,40	24,54	1,81	2175,00	2,18
	2	46,54	25,86	1,80	2280,00	2,28
	3	42,52	23,48	1,81	2099,00	2,10
	4	38,78	21,48	1,81	1901,00	1,90
	5	42,76	23,70	1,80	2087,00	2,09
	6	38,54	21,01	1,83	1873,00	1,87
	7	42,97	23,59	1,82	2125,00	2,13
	8	48,72	27,02	1,80	2393,00	2,39
	9	32,40	17,94	1,80	1591,00	1,59
7S-Caupí	1	46,88	26,01	1,80	2285,00	2,29
	2	40,34	22,74	1,77	1932,00	1,93
	3	53,64	29,72	1,80	2610,00	2,61
	4	46,79	26,00	1,80	2270,00	2,27
	5	53,24	29,58	1,80	2609,00	2,61
	6	47,77	26,49	1,80	2347,00	2,35
	7	48,94	27,10	1,81	2402,00	2,40
	8	44,62	24,68	1,81	2195,00	2,20
	9	43,22	23,82	1,81	2119,00	2,12

Continua...

7S-Adzuki	1	41,70	23,10	<i>1,81</i>	2041,00	2,04
	2	45,50	25,24	<i>1,80</i>	2219,00	2,22
	3	45,16	25,01	<i>1,81</i>	2184,00	2,18
	4	45,24	25,14	<i>1,80</i>	2215,00	2,22
	5	46,20	25,65	<i>1,80</i>	2242,00	2,24
	6	40,64	22,55	<i>1,80</i>	1974,00	1,97
	7	45,72	25,40	<i>1,80</i>	2208,00	2,21
	8	44,28	24,60	<i>1,80</i>	2141,00	2,14
	9	44,32	24,61	<i>1,80</i>	2135,00	2,14
Sinvastatina	1	40,76	22,64	<i>1,80</i>	1942,00	1,94
	2	47,48	26,34	<i>1,80</i>	2282,00	2,28
	3	48,46	26,89	<i>1,80</i>	2361,00	2,36
	4	43,80	24,20	<i>1,81</i>	2130,00	2,13
	5	47,16	25,90	<i>1,82</i>	2301,00	2,30
	6	46,06	25,84	<i>1,78</i>	2224,00	2,22
	7	46,48	25,80	<i>1,80</i>	2256,00	2,26
	8	56,60	31,40	<i>1,80</i>	2766,00	2,77
	9	42,82	23,78	<i>1,80</i>	2078,00	2,08

APÊNDICE D – Eletroforese em gel de agarose do cDNA produzido a partir do RNA de tecido hepático de ratos alimentados com ou sem dieta HC, e com diferentes tratamentos.



APÊNDICE E – Confirmação das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes alvos para a reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) genebank através do programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Análise do primer para a enzima ácido graxo sintase (FAS)

Primer-BLAST Primer-Blast results

▶ [NCBI/Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID_01_180321_130.14.22.10_9003 [more...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports: [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CCTCTTCCCTGGCACTGGCTACCT	24	67.66	62.50	3.00
Reverse primer	ACTCGGCGGGGATCGGGACTT	21	67.76	66.67	4.00

Products on target templates

>[NM_017332.1](#) Rattus norvegicus fatty acid synthase (Fasn), mRNA

product length = 287

Forward primer	1	CCTCTTCCCTGGCACTGGCTACCT	24
Template	2733		2756
Reverse primer	1	ACTCGGCGGGGATCGGGACTT	21
Template	3019		2999

Análise do primer para a enzima málica (MA)

Primer-BLAST Primer-Blast results

▶ [NCBI/Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID_01_148988_130.14.22.21_9003 [more...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports: [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	TCCGACCAGCAAAGCTGAGT	20	61.76	55.00	5.00
Reverse primer	CACGGCCCTTGGTCACTT	18	59.89	61.11	5.00

Products on target templates

>[NM_012600.2](#) Rattus norvegicus malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic (Me1), mRNA

product length = 59

Forward primer	1	TCCGACCAGCAAAGCTGAGT	20
Template	1224		1243
Reverse primer	1	CACGGCCCTTGGTCACTT	18
Template	1282		1265

Análise do primer para a enzima colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► NCBI/ **Primer-BLAST** : results: Job id=JSID_01_146955_130.14.22.21_9003 [more...](#)

Input PCR template none
 Specificity of primers Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Rattus)
 Other reports [► Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CAAGACGCACCTCGCTATCC	20	60.87	60.00	2.00
Reverse primer	CCGGCAGGTCATTCAAGTTG	19	58.83	57.89	4.00

Products on target templates

> [J05430.1](#) Rat cholesterol 7-alpha-hydroxylase (CYP7) mRNA, complete cds

product length = 206

Forward primer	1	CAAGACGCACCTCGCTATCC	20
Template	857	T.	876
Reverse primer	1	CCGGCAGGTCATTCAAGTTG	19
Template	1062		1044

Análise do primer para a enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoAr)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► NCBI/ **Primer-BLAST** : results: Job id=JSID_01_180500_130.14.22.10_9003 [more...](#)

Input PCR template none
 Specificity of primers Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports [► Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AAGGGGCGTGCAAAGACAATC	21	61.76	52.38	4.00
Reverse primer	ATACGGCACGGAAAGAACCATAGT	24	62.19	45.83	4.00

Products on target templates

> [NM_013134.2](#) Rattus norvegicus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (Hmgcr), mRNA

product length = 408

Forward primer	1	AAGGGGCGTGCAAAGACAATC	21
Template	2518		2538
Reverse primer	1	ATACGGCACGGAAAGAACCATAGT	24
Template	2925	.C.....	2902

Análise do primer para a enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintase (HMG-CoAs)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► [NCBI/Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID_01_180529_130.14.22.10_9003 [more...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports: [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GAACCTCTCTCCCCCTGGTGA	21	60.83	57.14	5.00
Reverse primer	CAGCGGCTCCCCCTTCTT	18	59.65	61.11	5.00

Products on target templates

>[NM_173094.2](#) Rattus norvegicus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial) (Hmgcs2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA

product length = 357

Forward primer	1	GAACCTCTCTCCCCCTGGTGA	21
Template	1453		1473
Reverse primer	1	CAGCGGCTCCCCCTTCTT	18
Template	1809		1792

Análise do primer para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► [NCBI/Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID_01_180587_130.14.22.10_9003 [more...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports: [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	AAGAAAGGGGGTTGAATGG	20	55.78	45.00	3.00
Reverse primer	GGAGGACACTGTCACCGACT	20	61.18	60.00	7.00

Products on target templates

>[NM_175762.2](#) Rattus norvegicus low density lipoprotein receptor (Ldlr), mRNA

product length = 738

Forward primer	1	AAGAAAGGGGGTTGAATGG	20
Template	1780		1799
Reverse primer	1	GGAGGACACTGTCACCGACT	20
Template	2517		2498

Análise do primer para a Proteína-1c ligadora do elemento regulado por esterol (SREBP-1c)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► [NCBI/Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID_01_147756_130.14.18.128_9003 [more...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports: [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GCAACACTGGCAGAGATCTACGT	23	62.77	52.17	6.00
Reverse primer	TGGCGGGCACTACTCAGGAA	20	63.37	60.00	3.00

Products on target templates

> [NM_001276707.1](#) Rattus norvegicus sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1), transcript variant 1, mRNA

product length = 104

Forward primer	1	GCAACACTGGCAGAGATCTACGT	23
Template	2184		2206
Reverse primer	1	TGGCGGGCACTACTCAGGAA	20
Template	2287		2268

Análise do primer para a Proteína-2 ligadora do elemento regulado por esterol (SREBP-2)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► [NCBI/Primer-BLAST](#) : results: Job id=JSID_01_147206_130.14.22.21_9003 [more...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
 Other reports: [Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CCGGTAATGATGGGCAAGAGAAAAG	25	63.67	52.00	5.00
Reverse primer	AGGCCGGGGGAGACATCAGAAG	22	65.79	63.64	4.00

Products on target templates

> [NM_001033694.1](#) Rattus norvegicus sterol regulatory element binding transcription factor 2 (Srebf2), mRNA

product length = 400

Forward primer	1	CCGGTAATGATGGGCAAGAGAAAAG	25
Template	1023		1047
Reverse primer	1	AGGCCGGGGGAGACATCAGAAG	22
Template	1422		1401

Análise do primer para o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- α)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► **NCBI/ Primer-BLAST** : results: Job id=JSID_01_147226_130.14.22.21_9003 [more...](#)

Input PCR template none
Specificity of primers Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
Other reports [► Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	TACCACTATGGAGTCCACGCATGT	24	63.48	50.00	7.00
Reverse primer	TTGCAGCTTCGATCACACTTGTCG	24	64.10	50.00	4.00

Products on target templates

> [NM_013196.1](#) Rattus norvegicus peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara), mRNA

product length = 98

Forward primer	1	TACCACTATGGAGTCCACGCATGT	24
Template	711		734
Reverse primer	1	TTGCAGCTTCGATCACACTTGTCG	24
Template	808		785

Análise do primer para a beta-actina (bAct)

Primer-BLAST *Primer-Blast results*

► **NCBI/ Primer-BLAST** : results: Job id=JSID_01_147259_130.14.22.21_9003 [more...](#)

Input PCR template none
Specificity of primers Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Rattus norvegicus)
Other reports [► Search Summary](#)

▼ **Detailed primer reports**

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CATGAAGATCAAGATCATTGCTCCT	25	59.23	40.00	8.00
Reverse primer	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	21	59.33	52.38	4.00

Products on target templates

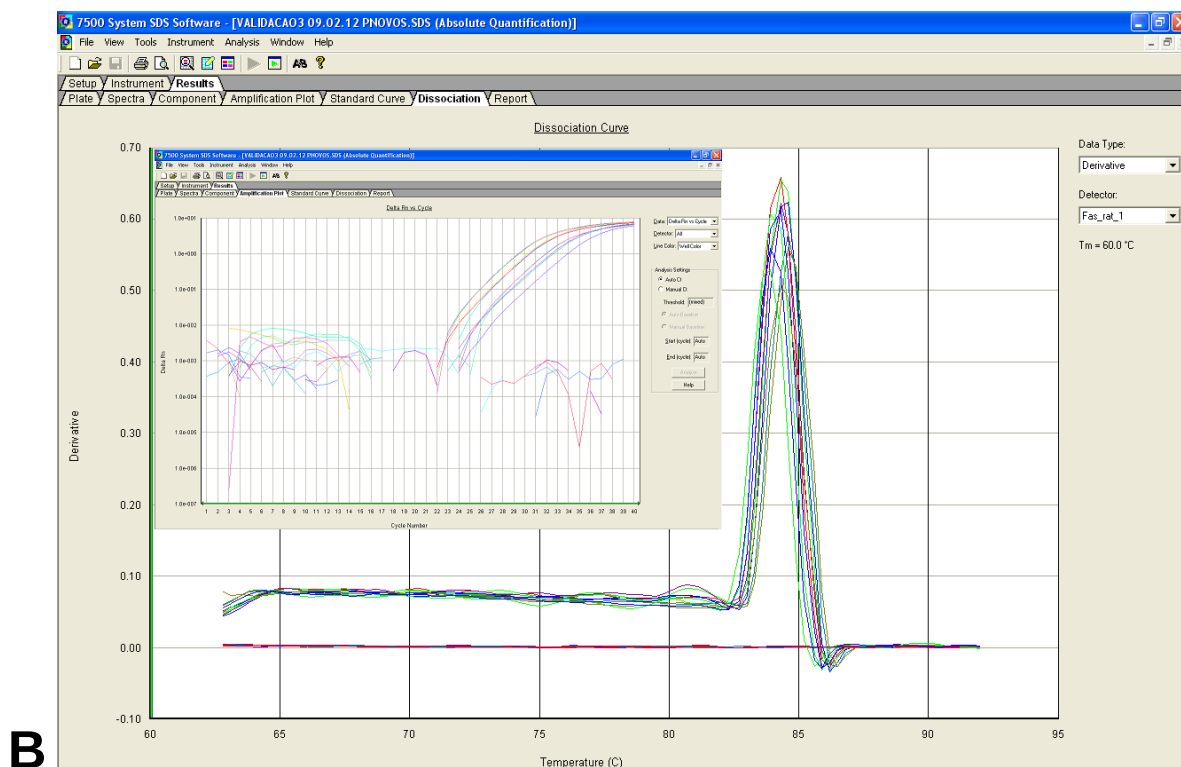
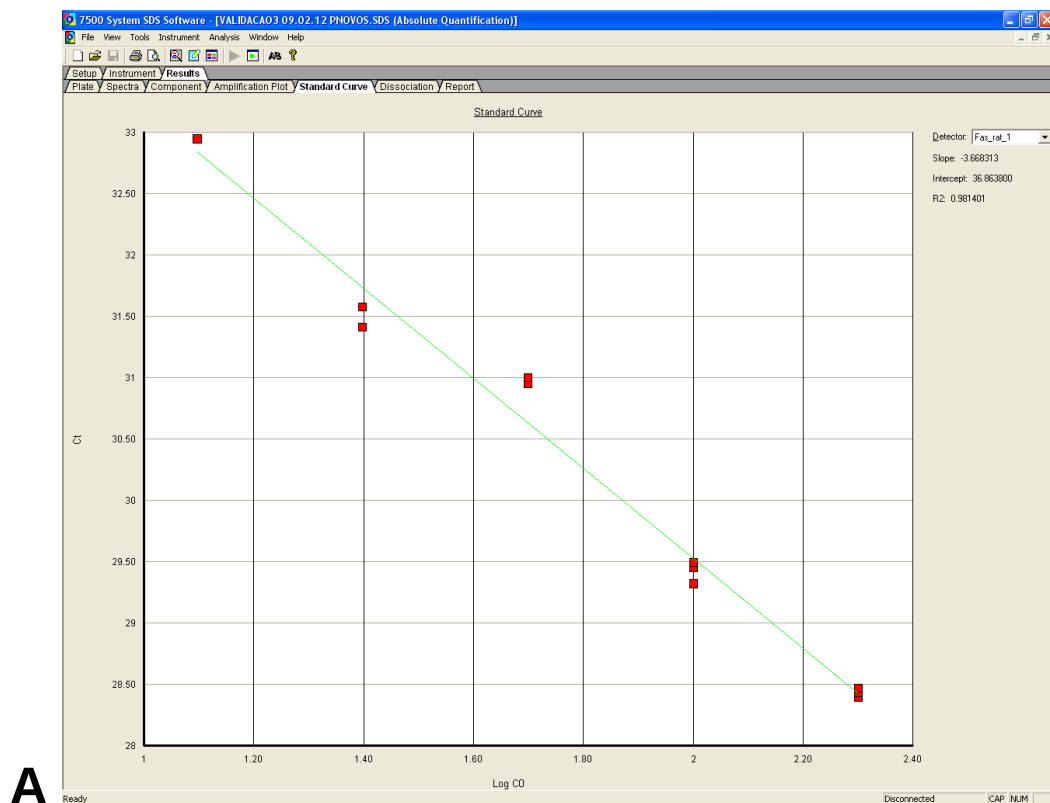
> [NM_031144.3](#) Rattus norvegicus actin, beta (Actb), mRNA

product length = 109

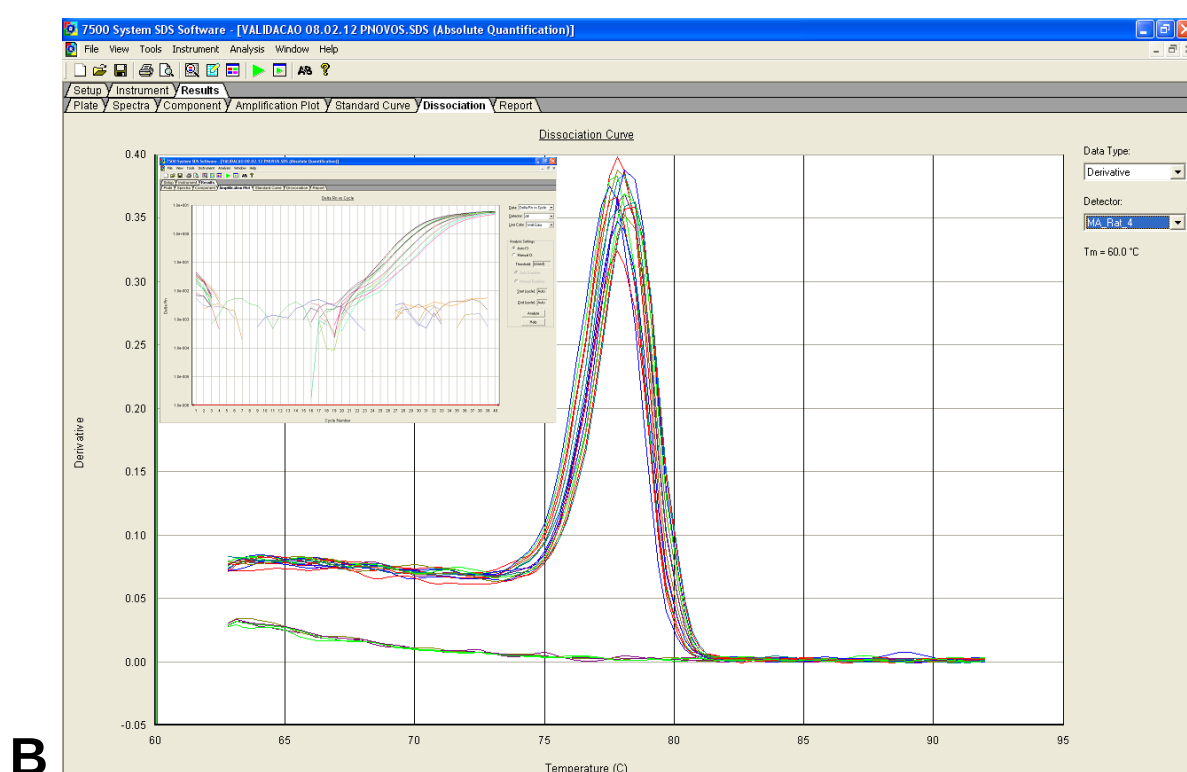
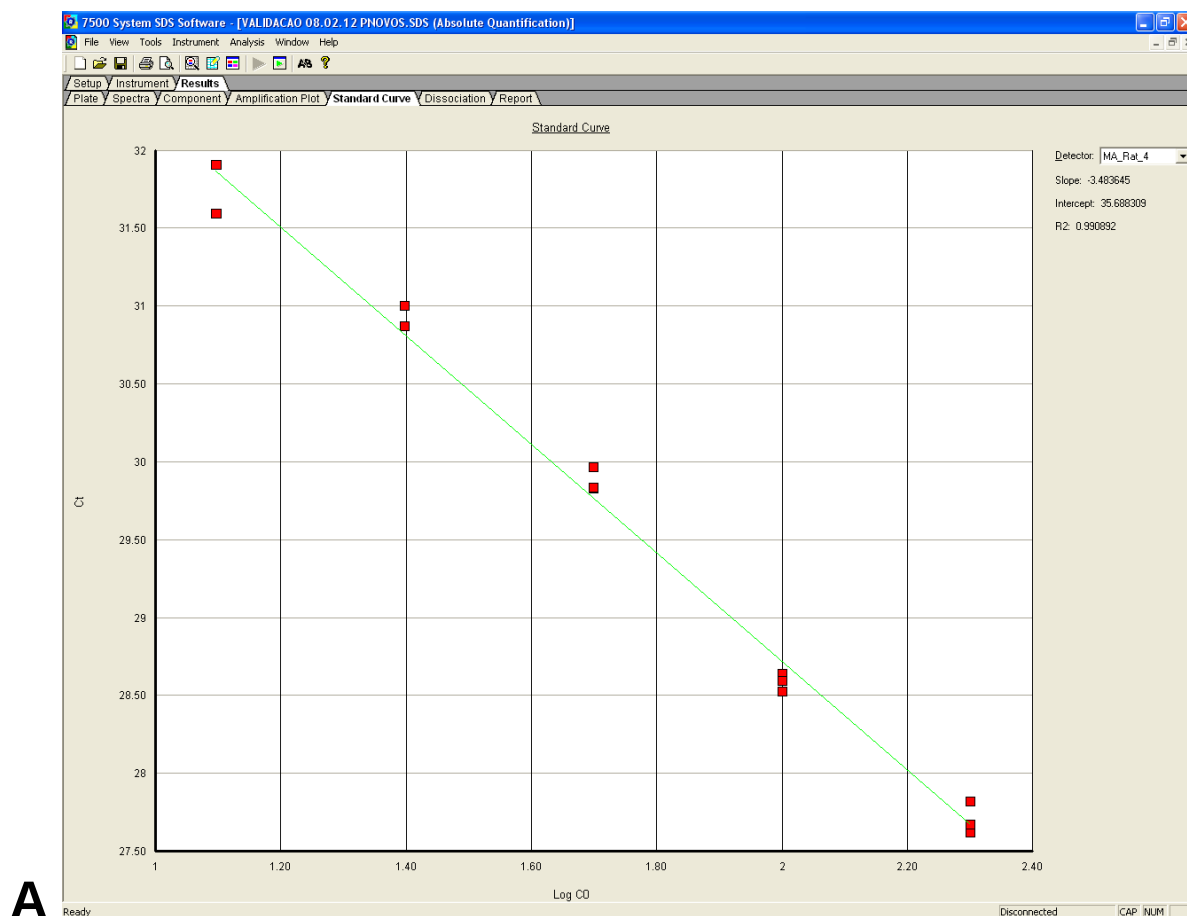
Forward primer	1	CATGAAGATCAAGATCATTGCTCCT	25
Template	1050		1074
Reverse primer	1	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	21
Template	1158		1138

APÊNDICE F – As ampliações de validação, curvas de dissociação dos genes-alvos e equação de regressão/correlação entre as variáveis.

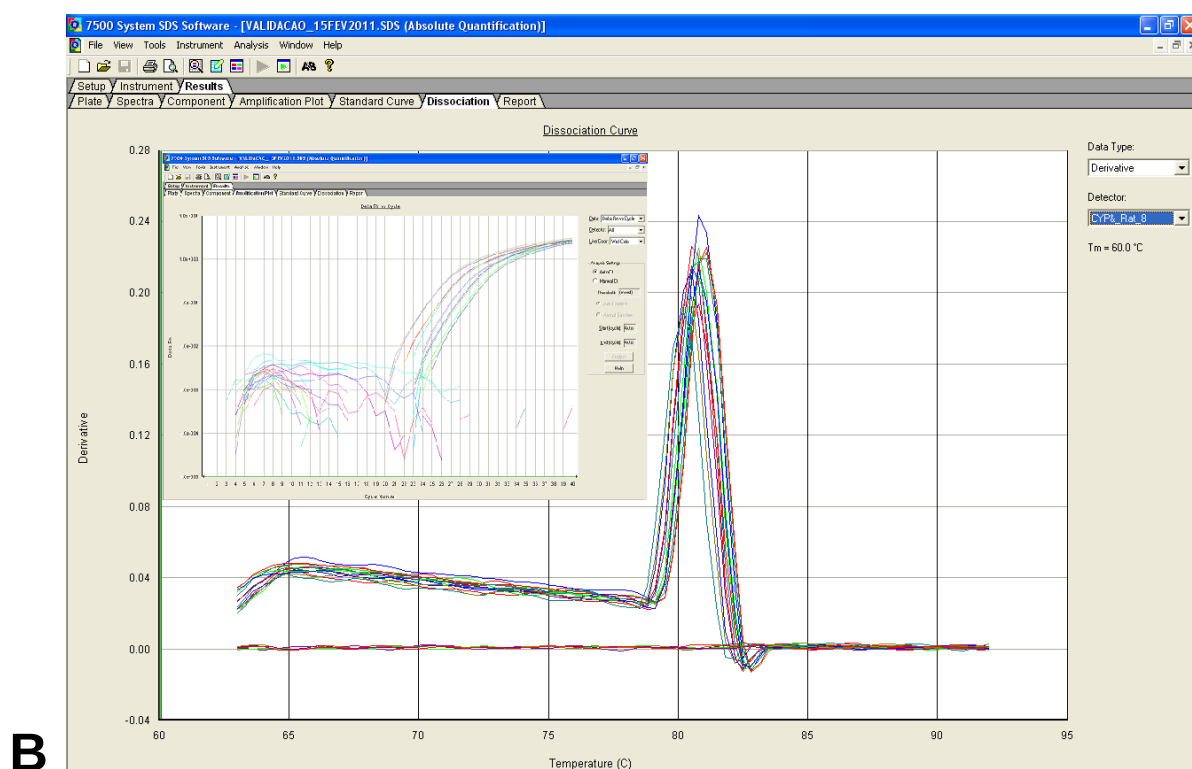
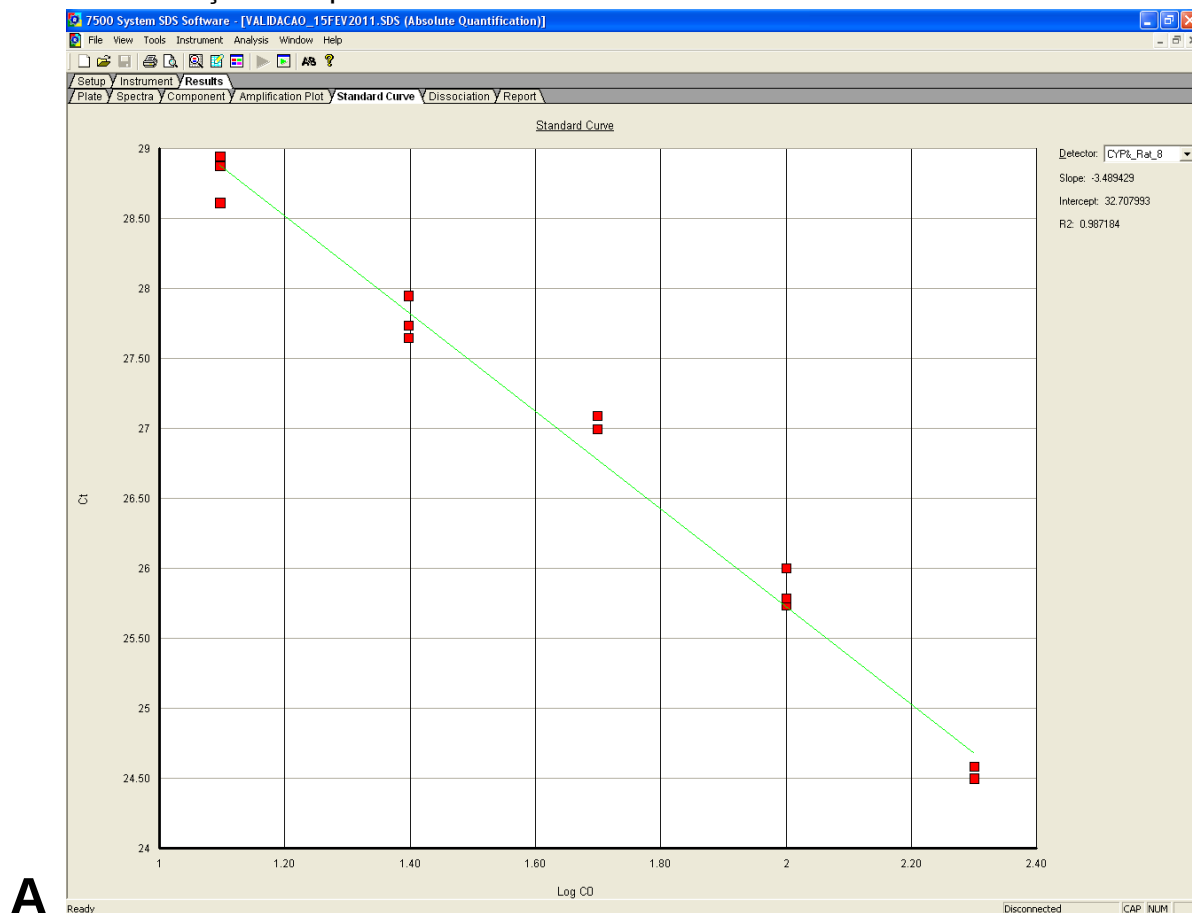
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo FAS, através da reação em qRT-PCR



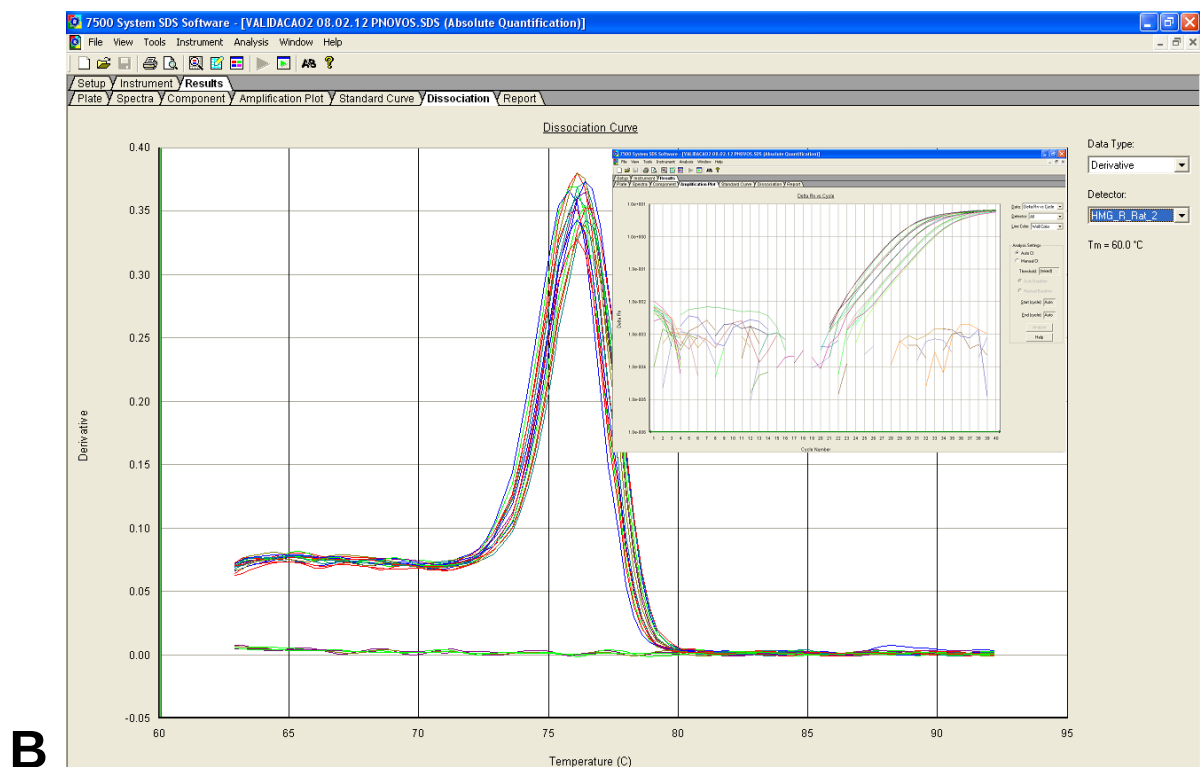
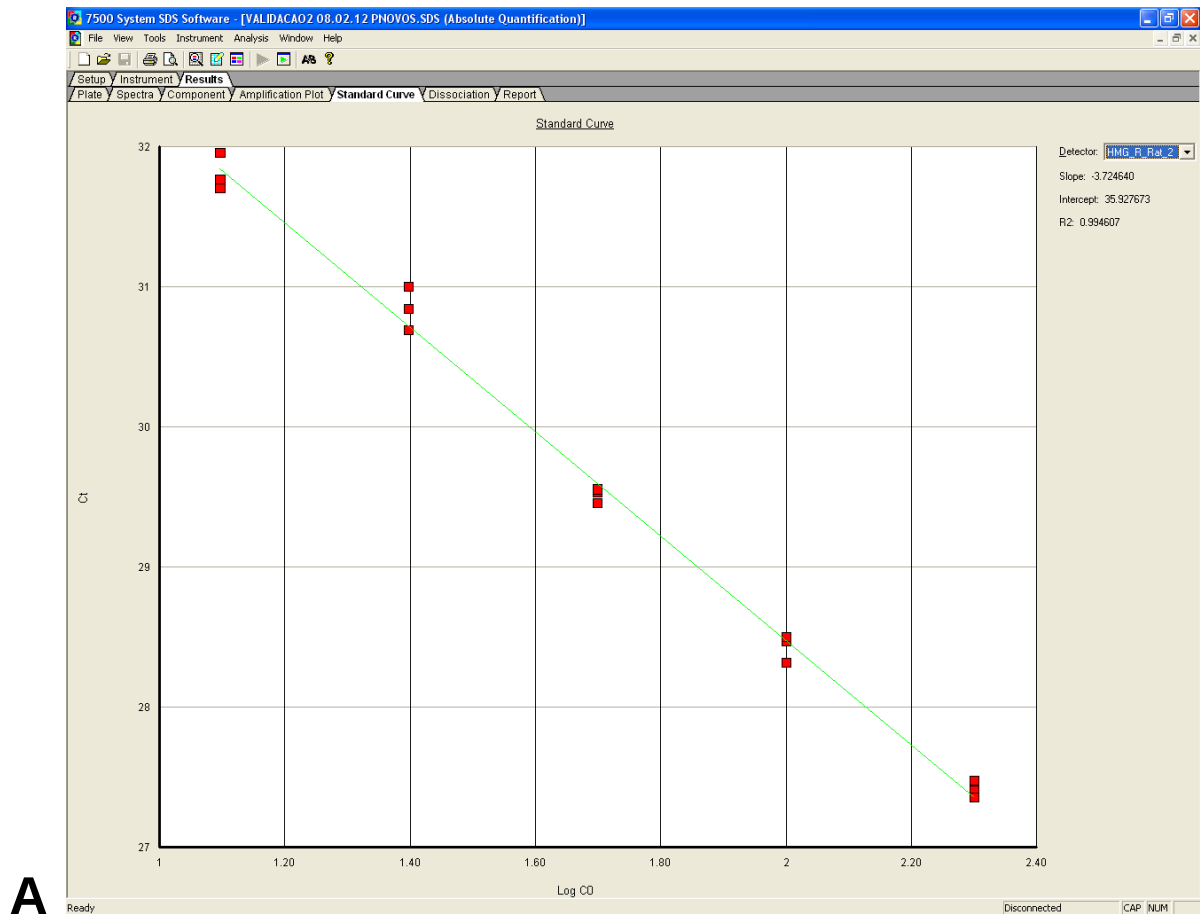
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo MA, através da reação em qRT-PCR



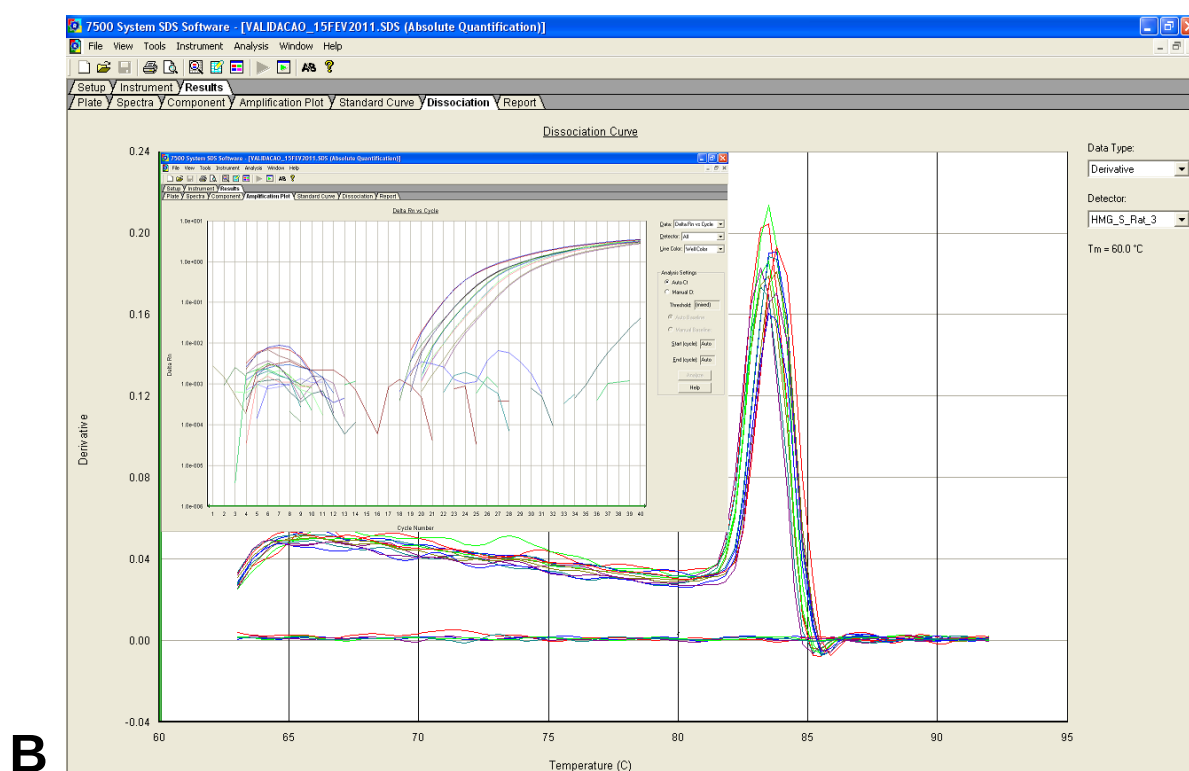
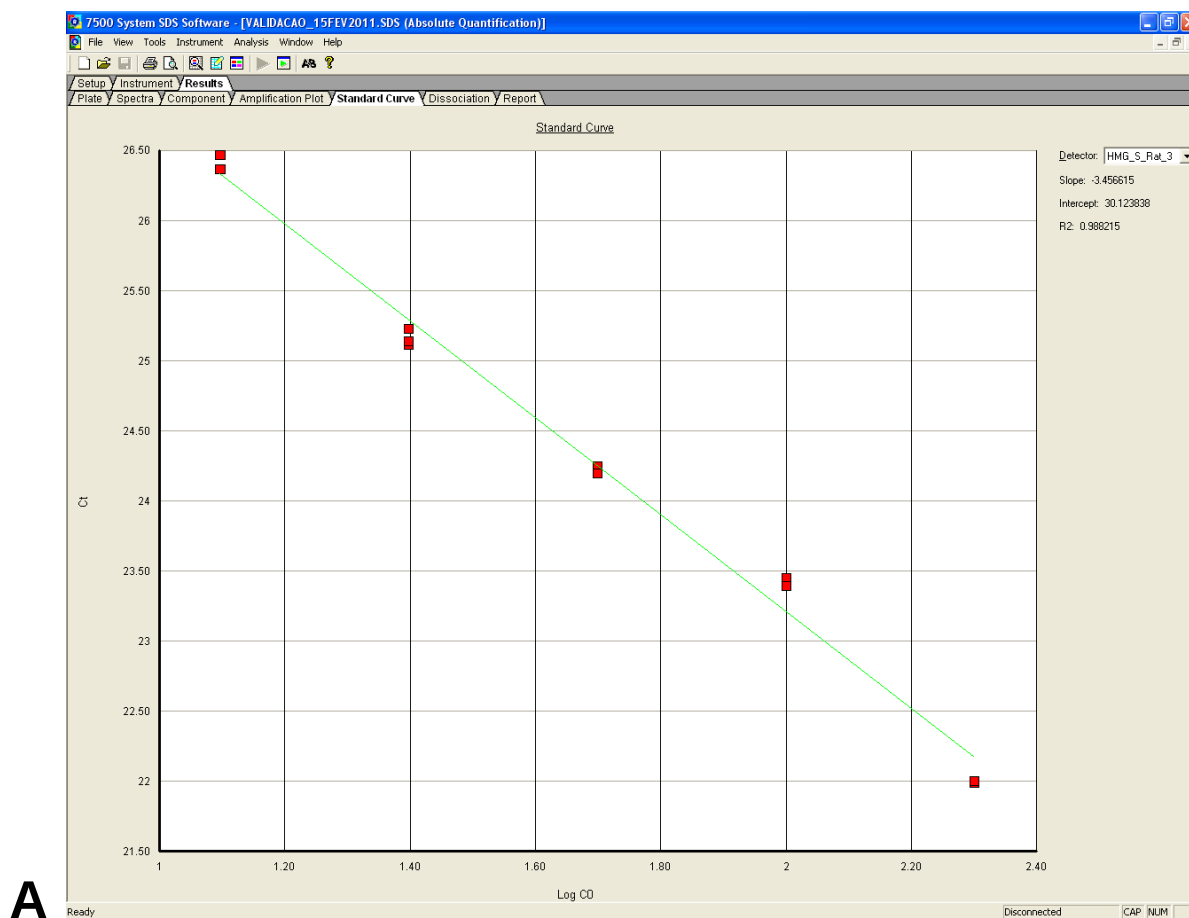
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo CYP7A1, através da reação em qRT-PCR



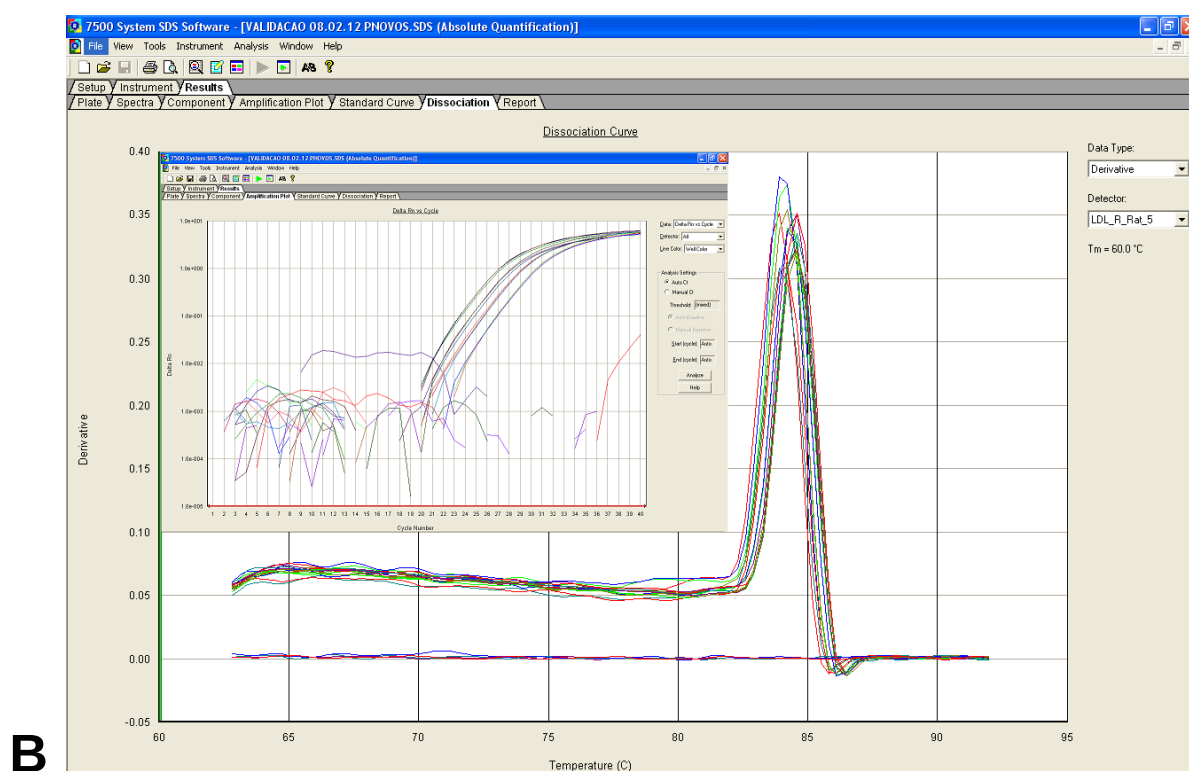
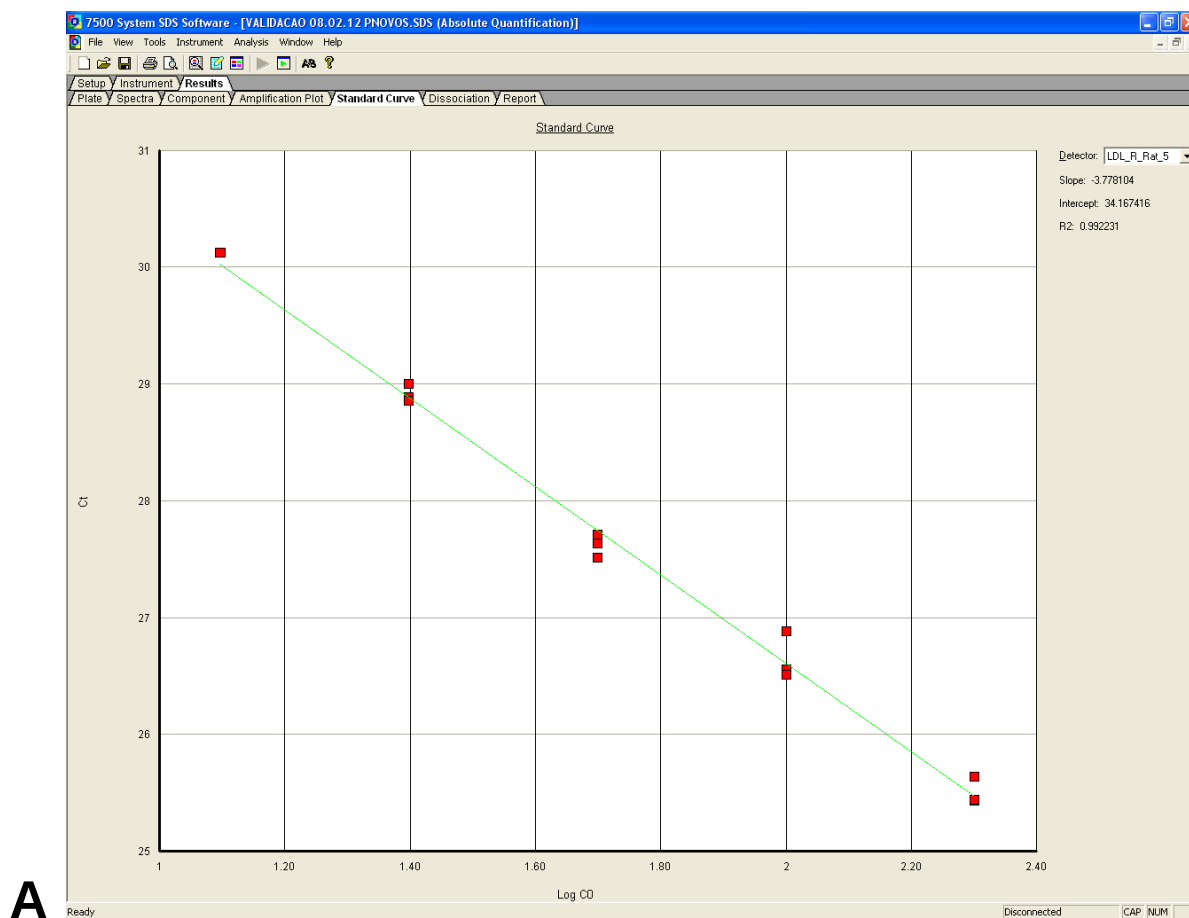
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo HMG-CoA redutase, através da reação em qRT-PCR



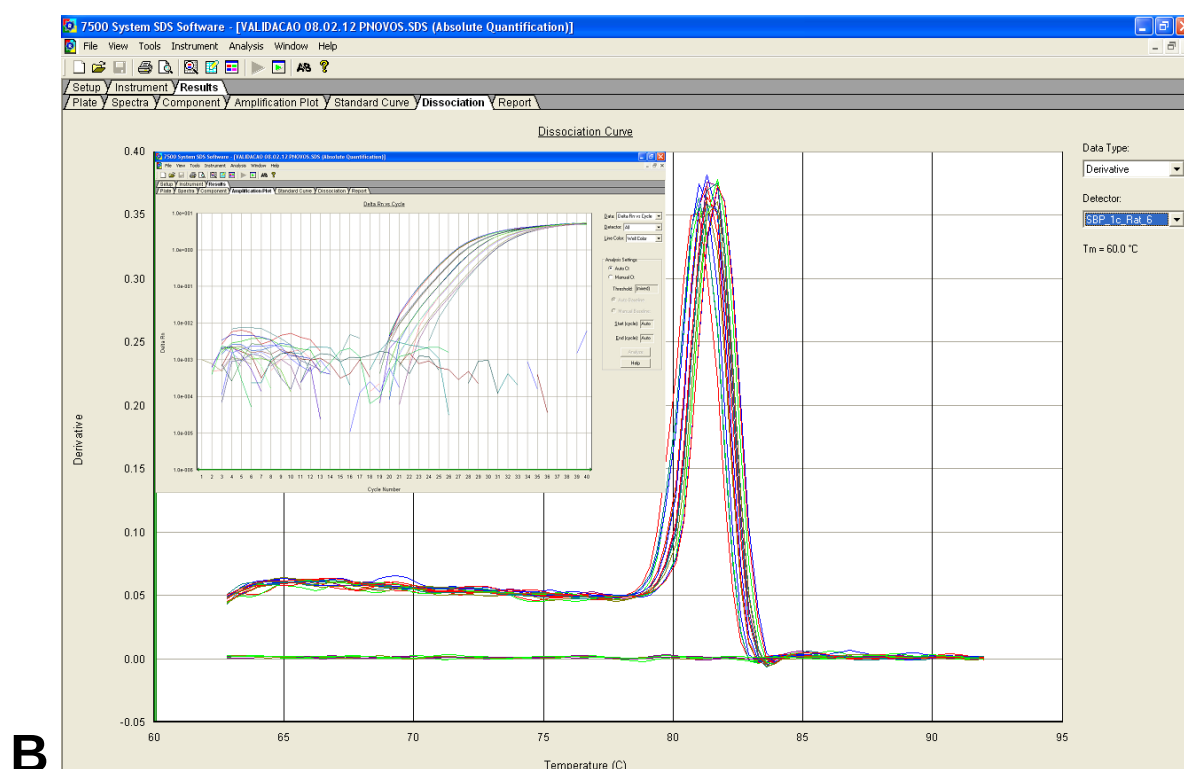
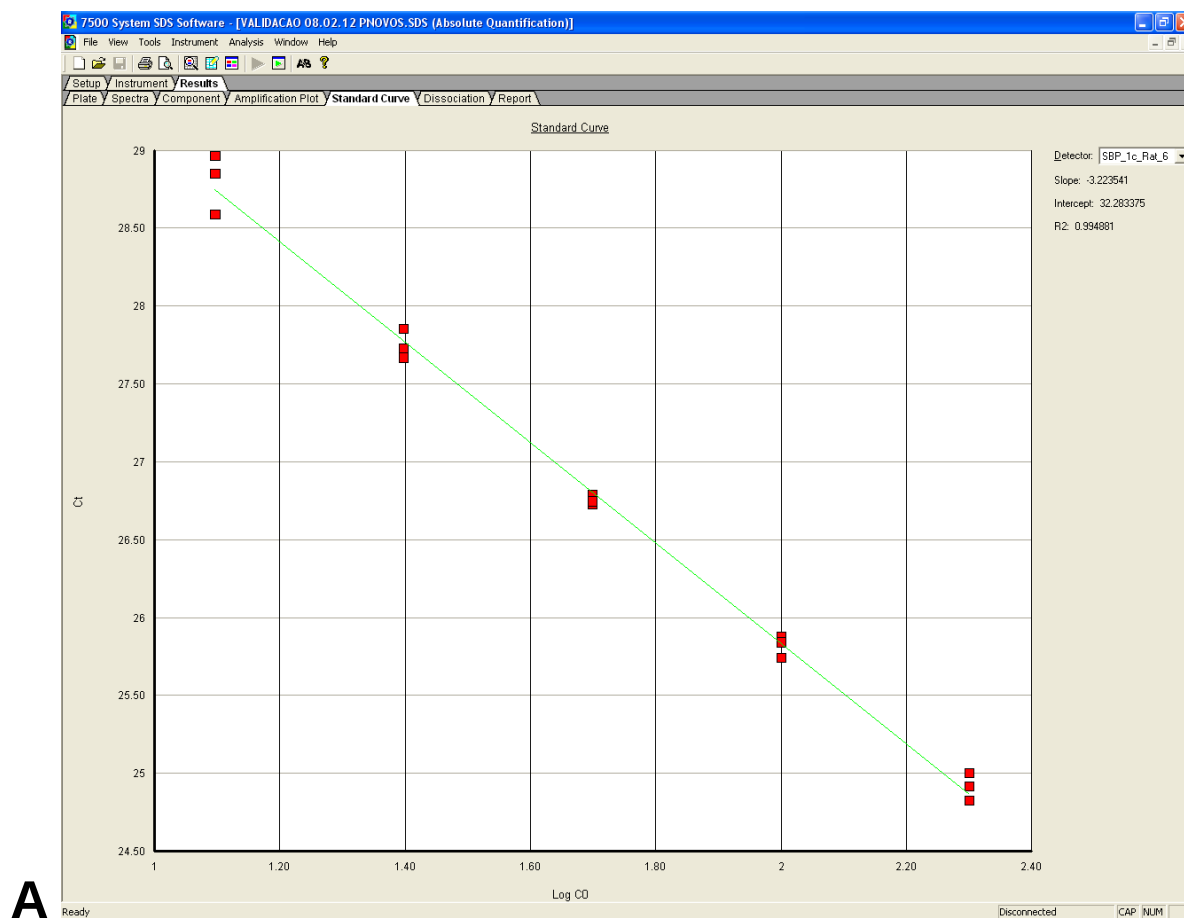
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo HMG-CoA sintase, através da reação em qRT-PCR



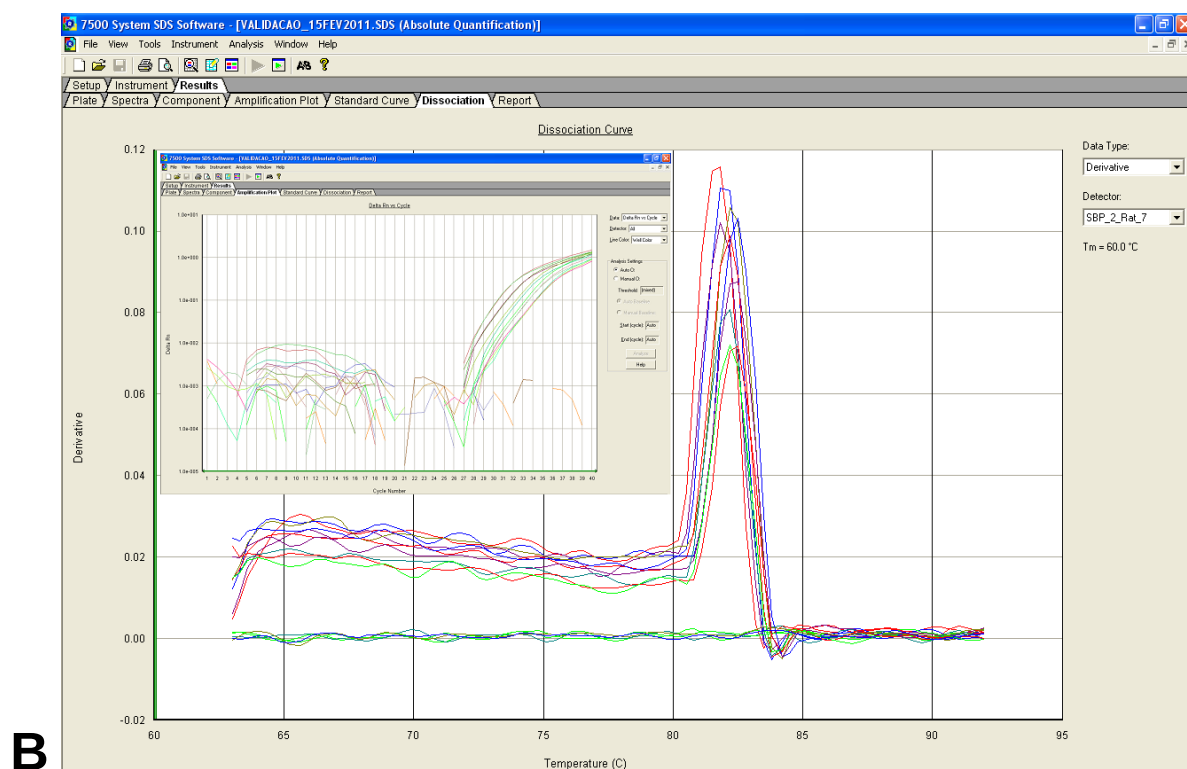
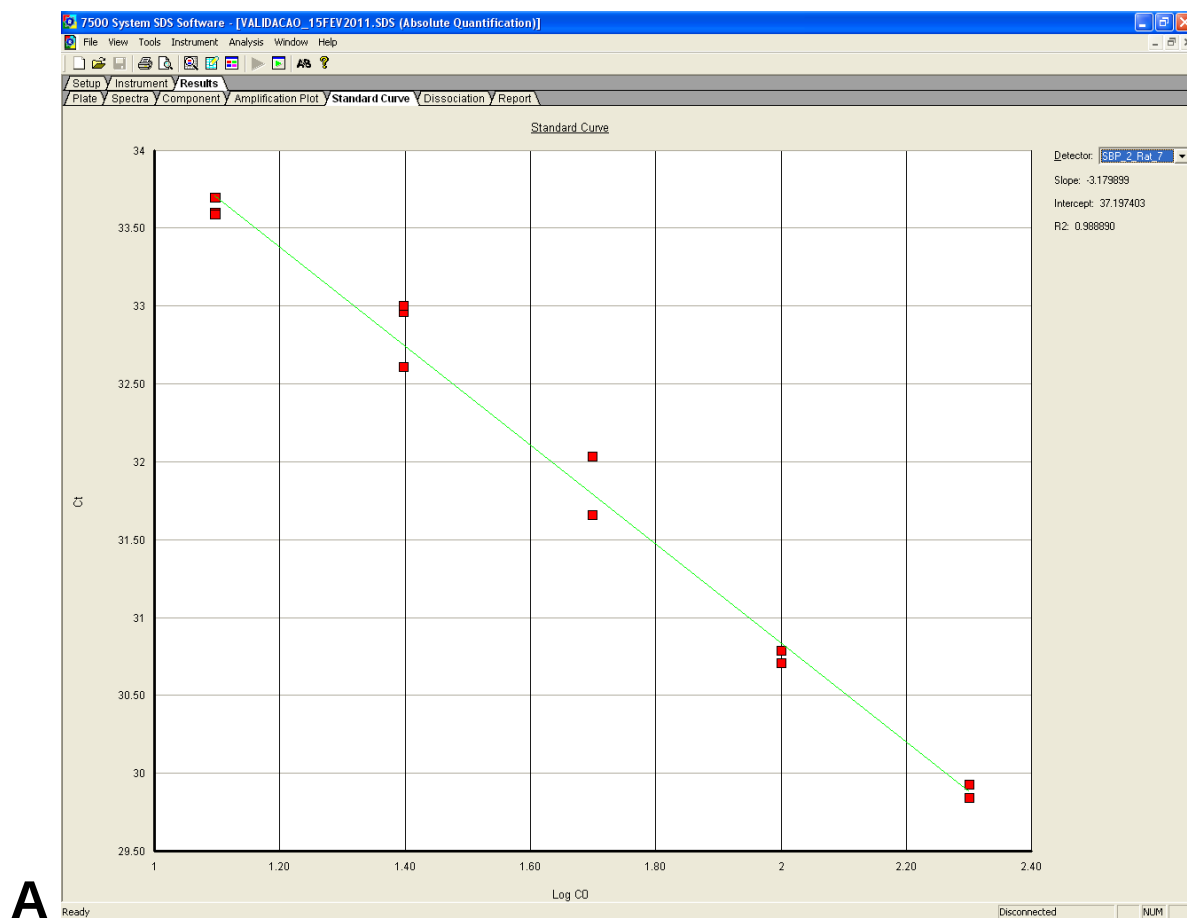
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo LDL receptor, através da reação em qRT-PCR



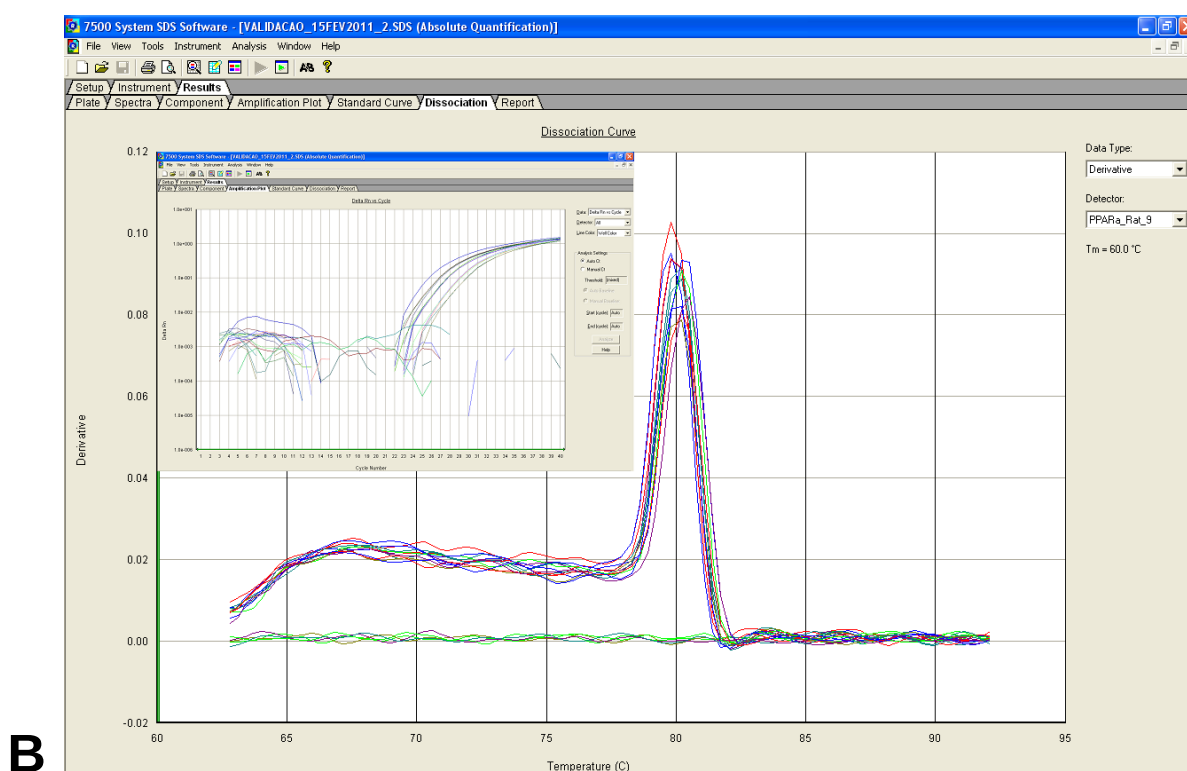
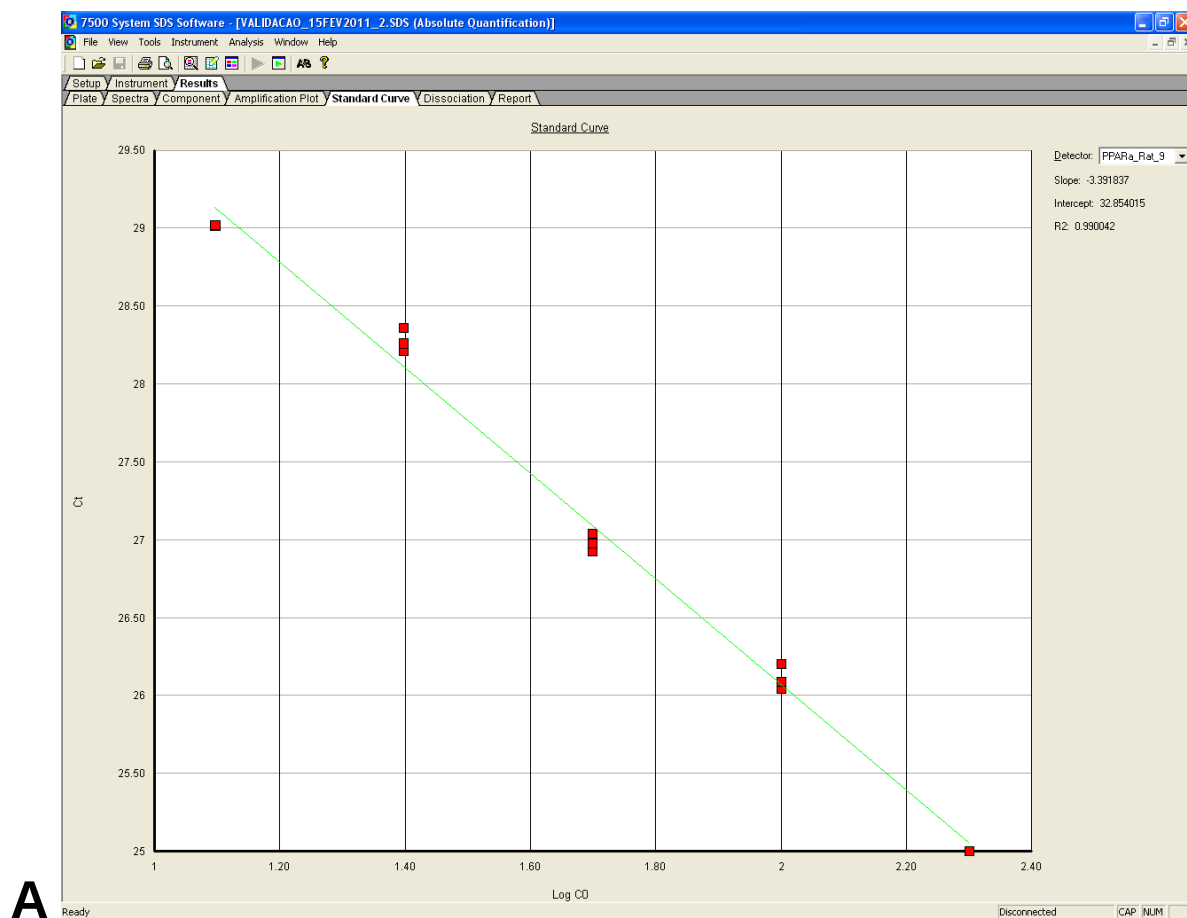
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo SREBP-1c, através da reação em qRT-PCR



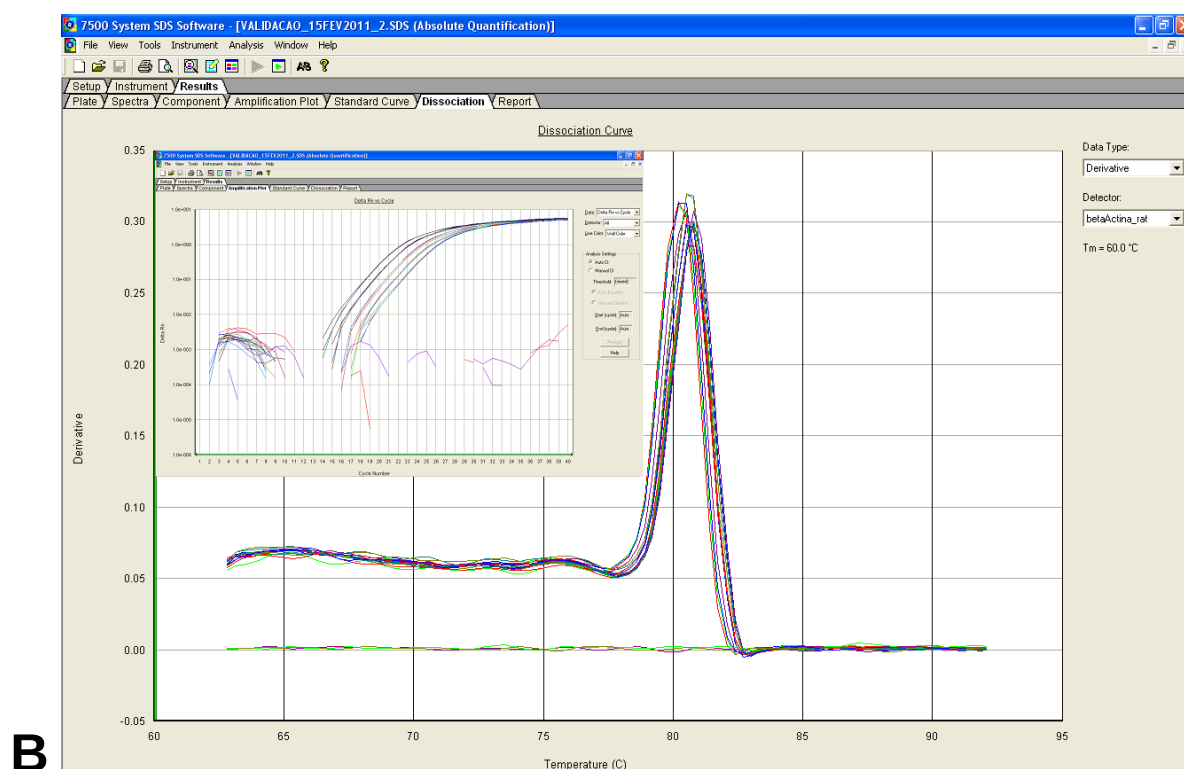
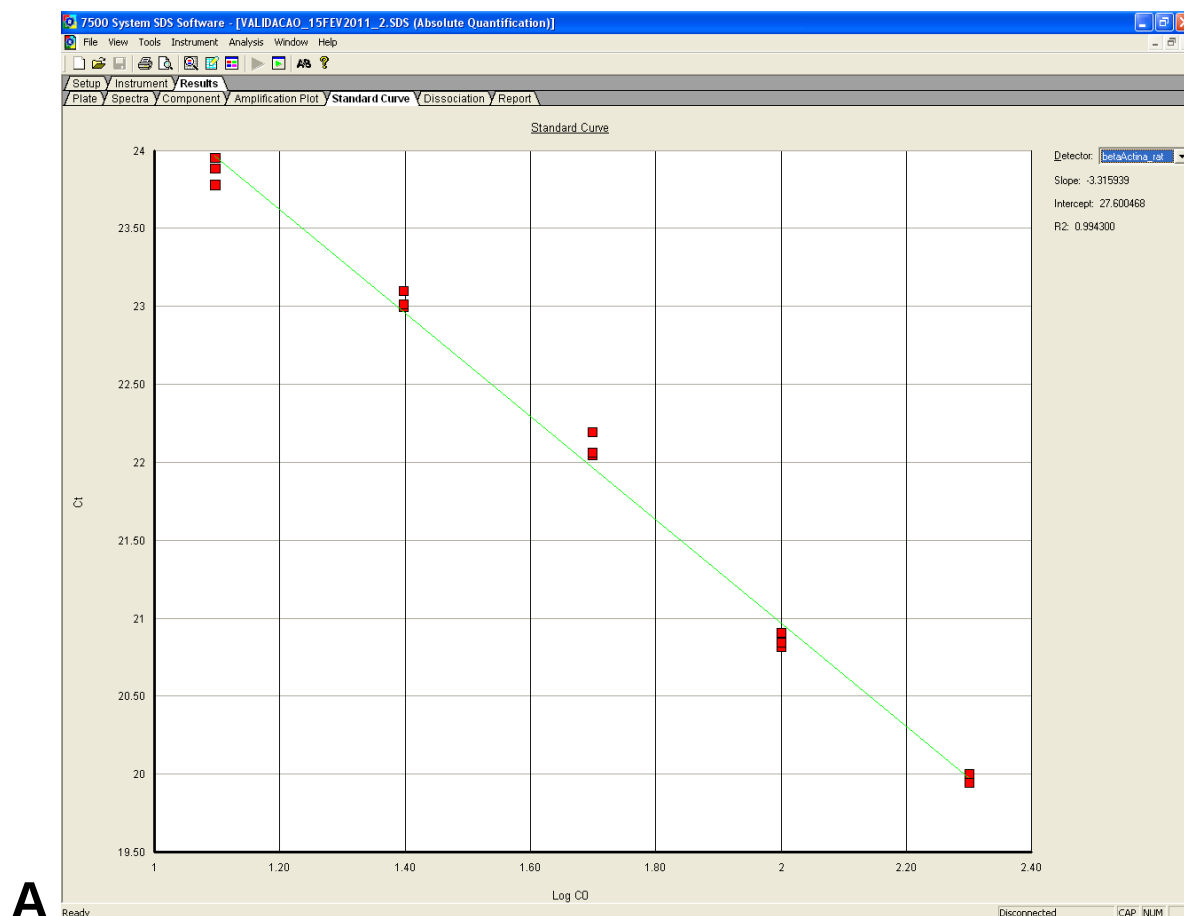
Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo SREBP-2, através da reação em qRT-PCR



Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo PPAR- α , através da reação em qRT-PCR



Curva de validação (A) e curva de dissociação (B) obtida para o gene alvo β -actina, através da reação em qRT-PCR



ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 25/2009

Interessado: EDERLAN DE SOUZA FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. Valdir Augusto Neves

Projeto: Efeito de vicilinas isoladas das espécies *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *V. angularis* no metabolismo lipídico de ratos

Parecer nº 53/2009 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Efeito de vicilinas isoladas das espécies *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *V. angularis* no metabolismo lipídico de ratos", apresentado pelo pós-graduando Ederlan de Souza Ferreira, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em maio de 2010.

Araraquara, 12 de novembro de 2009.


Prof.ª Dra. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

Capítulo II

**β -conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct
hypocholesterolemic effects in rats**

(publicado: Ferreira et al. Lipids in Health and Disease 2012, 11:11).

RESEARCH

Open Access

β -conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats

Ederlan S Ferreira, Maraiza A Silva, Aureluce Demonte and Valdir A Neves*

Abstract

Background: There is increasing interest in non-pharmacological control of cholesterol and triglyceride levels in the plasma and diet-drug association represent an important area of studies. The objective of this study was to observe the hypocholesterolemic effect of soybean β -conglycinin (7S protein) alone and combined with fenofibrate and rosuvastatin, two hypolipidemic drugs.

Methods: The protein and drugs were administered orally once a day to rats and the effects were evaluated after 28 days. Wistar rats were divided into six groups ($n = 9$): hypercholesterolemic diet (HC), HC+7S protein (300 mg.kg⁻¹ day⁻¹) (HC-7S), HC+fenofibrate (30 mg.kg⁻¹ day⁻¹) (HC-FF), HC+rosuvastatin (10 mg.kg⁻¹ day⁻¹) (HC-RO), HC+7S+fenofibrate (HC-7S-FF) and HC+7S+rosuvastatin (HC-7S-RO).

Results: Animals in HC-7S, HC-FF and HC-RO exhibited reductions of 22.9, 35.8 and 18.8% in total plasma cholesterol, respectively. In HC-7S-FF, animals did not show significant alteration of the level in HC+FF while the group HC-7S-RO showed a negative effect in comparison with groups taking only protein (HC-7S) or drug (HC-RO). The administration of the protein, fenofibrate and rosuvastatin alone caused increases in the plasma HDL-C of the animals, while the protein-drug combinations led to an increase compared to HC-FF and HC-RO. The plasma concentration of triacylglycerides was significantly reduced in the groups without association, while HC-7S-FF showed no alteration and HC-7S-RO a little reduction.

Conclusion: The results of our study indicate that conglycinin has effects comparable to fenofibrate and rosuvastatin on the control of plasma cholesterol, HDL-C and triacylglycerides, when given to hypercholesterolemic rats, and suggests that the association of this protein with rosuvastatin alters the action of drug in the homeostasis of cholesterol.

Keywords: β -conglycinin, cholesterol-lowering drugs, hypercholesterolemic diet, rats.

Background

Some proteins and peptides have been under study on account of their important biological function in relation to lipid metabolism [1-3]. Research has demonstrated the importance of leguminous seeds, as a component of the diet including their beneficial effect on the control of cholesterol and triacylglycerols in the blood, with an emphasis on their proteins and in particular soybean proteins [4,5]. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that ingestion of protein isolate and/or protein fractions of soybean, as the sole source of protein or even a daily

dose, improves the control of plasma cholesterol and triacylglycerides [6-15]. A recent analysis of various studies about the effects of soybean in the diet on the circulation levels of cholesterol indicates a variable reduction in LDL-C (from 7.9 to 10.3%) attributed to intrinsic and extrinsic effects of the soy protein foods [16]. Although these studies in various models have achieved progress in this area, the mechanism of the reduction of cholesterol and triacylglycerides in the serum by soybean proteins are still not clear. Nevertheless, the observed effects of soybean proteins was the basis on which the US Food and Drug Administration (FDA) made a recommendation that 25 g of soybean protein be ingested to decrease total cholesterol and the LDL-cholesterol fraction [17].

* Correspondence: nevesva@fcar.unesp.br
Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University -UNESP, Araraquara, SP, Brazil

A lot of studies have stressed the diet as an important form of intervention, alone or together with drugs, in the context of hyperlipidemia or hypercholesterolemia in their various forms [4,18]. The treatment of hyperlipidemia and hypercholesterolemia with a diet-drug combination is well recognized and has been growing in importance in recent times [19]; nevertheless, these combination therapies have received less attention than multi-drug therapy [18,20]. Fibrates and their derivatives are hypolipidemic agents widely used in the treatment of combined hyperlipidemias, however they are particularly effective at reducing serum triacylglycerols and improving serum high-density lipoprotein (HDL) [21,22].

Statins are used in the treatment of hypercholesterolemia, and the action of this class of drugs depends on their generation and dose. These drugs have an inhibitory action on cholesterol synthesis via the mevalonate pathway [18,23]. The positive effects of β -conglycinin soybean protein, taken as a daily dose or a sole protein source by rats fed a hypercholesterolemic diet, on TC and TG levels have been described in previous studies [13-15]. However, the combination of this protein with other antihyperlipidemic drugs has not been much reported. Drug-diet approaches may help in controlling the prescription of drugs, but studies are needed to be performed to explore novel combinations and assess the potential safety and effectiveness of the association, comparing its efficacy with treatment by each component alone. To observe of the effect of soybean β -conglycinin alone and in combination with two drugs effective in the treatment of dyslipidemia, fenofibrate and rosuvastatin, the present study was conducted to determine whether the association of β -conglycinin soy protein and either drug could result in an alteration of the action of the protein or the drug alone.

Methods

Isolation and characterization of β -conglycinin (7S)

Soybean flour from the local market (60 mesh) was defatted with hexane (1:8 w/v flour to solvent ratio) by rocking at room temperature for 12 h, followed by reextraction in the same solvent (1:6 w/v), dried in air at room temperature and used for protein extraction. Soybean β -conglycinin was isolated by the method of Nagano et al. [24] with some modifications. Defatted soybean flour was extracted by shaking with water (1:15 w/v flour to water ratio) adjusted to pH 7.5. The soluble extract was centrifuged at $2000 \times g$ for 30 min. The supernatant was treated with anhydrous sodium bisulphite (0.98 g/L) and the pH adjusted to 6.4. The solution was stirred and stored on ice overnight, followed by centrifugation at $6500 \times g$ for 20 min. The insoluble fraction, containing 11S globulin, was washed, centrifuged again under the same conditions, suspended in distilled water, dialyzed overnight against distilled water in appropriate dialysis sacs (pore size of

about 10 kDa) and lyophilized. The soluble fraction was treated with 0.25 mol/L NaCl and adjusted to pH 5.0 and, after 1 h, centrifuged at $9000 \times g$ for 30 min. The precipitate (7S or β -conglycinin) was solubilized in 0.25 mol/L sodium phosphate buffer (pH 7.0) and stored at -14°C . All steps were realized at 4°C . All chemicals were of analytical purity. Protein was determined by the method of Lowry et al. [25], using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Electrophoresis of 7S-globulin was performed on 10 g/100 g polyacrylamide gels containing 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), as described by Laemmli [26], in a Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (SDS-PAGE). The gels were stained in Coomassie Brilliant Blue (R-250) and destained by diffusion in methanol-acetic acid-water (1:1:8, v/v/v). Marker proteins of known molecular weight (MW) were rabbit muscle phosphorylase b, bovine serum albumin, hen egg white albumin, bovine carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor and hen egg white lysozyme. Gel images were digitalized and analyzed by densitometry with an alpha Imager 6.0 scanner (Alpha Innotech[®], San Leandro, CA, USA), to quantify the bands and level of purity (data not shown). The content and homogeneity of the isolated β -conglycinin and glycinin, determined by SDS-PAGE and densitometric gel analysis, showed that these were the main fractions. The gels showed the characteristic bands for subunits α , α' and β of conglycinin (7S). The procedure used to isolate 7S did not cause changes in the subunits; this step was essential to ensure a pure protein, suitable for the *in vivo* studies [15].

Animals, diets and experimental design

This study was performed with the approval of the Committee on Animal Research of the University (UNESP) and these experiments were approved by the Research Ethics Committee of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP) at Araraquara (res. 19/2007). All procedures were performed in accordance with the principles in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1985). Fifty-four male weanling Wistar rats, weighing 148 ± 12.3 g were obtained from the Central Laboratory for animals of UNESP at Botucatu. The animals were acclimatized for a week and fed standard laboratory rat chow (Purina[®]). After this period, they were randomly divided into 6 hypercholesterolemic groups (HC) ($n = 9$): (1) control HC; (2) 7S globulin, $300 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (HC+7S); (3) fenofibrate group (HC+FF, $30 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$); (4) rosuvastatin group (HC+RO $10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$); (5) β -conglycinin/fenofibrate group (HC+7S+FF, 300 and $30 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and (6) β -conglycinin/rosuvastatin group (HC+7S+RO, 300 and $10 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$). All HC groups were fed an AIN-93 diet, following the recommendation of American

Institute Nutrition 93-Maintenance [27], modified by adding 10 g.kg⁻¹ cholesterol and 5 g.kg⁻¹ g cholic acid [13,28], as described in Table 1. Animals were individually housed in stainless steel cages, with free access to food and water. The room temperature was maintained at a constant 23 ± 2°C and relative humidity at 60 ± 5%, with a 12-12 h light:dark cycle, lights on at 6:00 a.m. The proteins (7S globulins) and drugs were administered daily by gavage at 9:00 and 14:00 hours, in proportion to the body weight of each animal, while vehicle alone was administered to HC groups. Body weight, food intake, fecal excretion and feeding efficiency were measured every other day for comparative analysis between groups during the 28 days of the experiment. The feeding efficiency coefficient was calculated as the ratio of weight gain/daily intake × 100.

Blood collection, organ weight and tissue collection

On the last day, the animals were deprived of food for 12 h and euthanized by guillotine. Blood was then collected in tubes containing gel separator SST II (Vacutainer BD D[®], Franklin Lakes, NJ, USA) and centrifuged at 1900 × *g* for 15 min. The serum was separated, stored at -24°C and used for biochemical analysis. Retroperitoneal fat, liver and heart were removed, washed immediately in cold saline, dried and weighed, frozen and stored at -40°C for a period of less than a month for subsequent comparative analysis.

Biochemical analysis in plasma and liver

Plasma total cholesterol (TC) of all groups was measured by the liquid cholesterol CHOD-PAP method

described by Stockbridge et al. [29]. Serum high density lipoprotein (HDL-C) was measured by the HDL cholesterol precipitant method, as described by Assmann [30]. Triglycerides (TG) were measured by the liquid triglyceride GPO-PAP method, as described by Annoni et al. [31]. All analyses were carried out by enzymatic colorimetric methods, using commercially available reagent kits (Laborlab[®]Co., Ribeirão Preto, Brazil). The non-HDL-cholesterol fraction (non-HDL-C or LDL-C + VLDL-C) was calculated as the difference between the TC and HDL-C. The atherogenic index (AI) (TC-HDL-C/HDL-C) was calculated, as proposed by Liu et al. [32], and compared among groups. Hepatosomatic index (HSI) was calculated as follows: liver weight/body weight × 100. Liver lipids were extracted by the method of Haug et al. [33]. The liver TC and TG concentrations were measured as described earlier for plasma analysis.

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and *Bonferroni t-test* multiple comparisons versus the control group and multiple range tests, employing SigmaStat[®] 3.5 software (Dundas software, Germany, 1999). All values are presented as mean ± standard error for nine values per group. A difference was considered statistically significant when *P* < 0.05.

Results

Isolation of the soybean β-conglycinin

SDS-PAGE electrophoresis, conducted on the 7S globulin after separation from other protein components in soybean flour, showed the characteristic bands of

Table 1 Composition (g/kg diet) of the hypercholesterolemic diet and treatments by gavage*

Ingredient	Diets					
	HC	HC+7S	HC+FF	HC+RO	HC+7S+FF	HC+7S+RO
Casein ¹	150	150	150	150	150	150
Starch	590.57	590.87	590.87	590.87	590.87	590.87
Sucrose	100	100	100	100	100	100
Soybean oil	40	40	40	40	40	40
Cellulose powder	50	50	50	50	50	50
Mineral mixture ²	35	35	35	35	35	35
Vitamin mixture ²	10	10	10	10	10	10
L-Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline birtatrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Cholesterol ³	1	1	1	1	1	1
Cholic acid ¹	5	5	5	5	5	5
<i>Treatment (mg/kg/day)</i>						
β-conglycinin	-	300.0	-	-	300	300
Fenofibrate	-	-	30	-	30	-
Rosuvastatin	-	-	-	10	-	10

*HC = hypercholesterolemic diet (AIN-93 composition + 1% cholesterol and 0.5% cholic acid); HC+7S = HC diet + β-conglycinin 300 mg/Kg/day; HC+FF = HC diet + fenofibrate 30 mg/Kg/day; HC+RO = HC diet + rosuvastatin 10 mg/kg/day; HC+7S+FF = HC diet + β-conglycinin + fenofibrate 300 and 30 mg/kg/day and HC +7S+RO = HC diet + β-conglycinin + rosuvastatin 300 and 10 mg/kg/day. ¹Sigma-Aldrich, Co., USA, ²PragSoluções[®], Co., Brazil. ³Reagen, Co., USA.

conglycinin (7S), arising from α , α' , β polypeptide subunits, and densitometric gel analysis showed that this was the main fraction, containing 92.2% of the protein. The isolation procedure did not cause any change in the subunits and was important to obtain purified protein suitable for the *in vivo* studies [14,15]. Our previous results and those described by Duranti et al. [13] have shown that the addition of 1% cholesterol and 0.5% cholic acid to the AIN-diet is sufficient to induce hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in rats. The mechanism of these effects on the lipid metabolism of rats was reported by Wang et al. [34], recently.

β -conglycinin protein and drugs were given by gavage in single daily doses in the experimental design as described in methods. Table 2 shows the effects of daily administration of β -conglycinin, fenofibrate and rosuvastatin alone and in drug-protein combinations, on the food consumption, weight gain, feeding efficiency ratio and fecal excretion of rats fed the cholesterol-enriched diets. After 28 days, no statistical differences ($p > 0.05$) were found in body weight gain between groups during the experimental period, nor any significant ($p > 0.05$) alterations in the feeding efficiency ratio or food intake between groups (Table 2). However, the animal fecal excretion of the HC group was higher by 18.1, 18.1, 42.9, 21.7 and 50.7% than groups HC+7S, HC+FF, HC+RO, HC+7S+FF and HC+7S+RO, respectively ($p < 0.001$), despite the lack of differences in food intake or feeding efficiency ratio between groups. However, the rosuvastatin-treated animals did show an intake 8.72% higher than HC animals ($p < 0.001$). The fenofibrate and rosuvastatin groups showed increases of 55.8 and 63.2% ($p < 0.001$), and 26.1 and 21.1% ($p < 0.05$), in the relative liver weight and in the hepatosomatic index (HIS), respectively (Table 3). The simultaneously administration of protein and drugs reduced these effects by 8.4 and 16.1% for fenofibrate (HC+7S+FF) and 24.8 and 16.7% for rosuvastatin (HC+7S+RO), relative to groups HC+FF and HC+RO, respectively. Alterations in heart weight and the ratio heart weight/body weight were not observed.

Effects on plasma lipids

The levels of plasma lipids in group HC were significantly different ($p < 0.001$) from those fed a standard diet [14]; these animals showed a 43.6% reduction in HDL-C levels and an increase in non-HDL-C and in the atherogenic index of 4 and 7 times, relative to a group on the standard diet in the first part of this study [15]. Relative to HC groups HC+7S, HC+FF and HC+RO had their total plasma cholesterol (TC) reduced by 22.9 ($p < 0.01$), 35.8 ($p < 0.001$) and 18.8% ($p < 0.05$), respectively (Table 4). There was no significant alteration in the animals that received the 7S protein plus fenofibrate (HC+7S+FF), whereas the association of protein plus rosuvastatin (HC+7S+RO) caused a negative effect, when the TC levels of these groups were compared with those administered only protein (HC+7S) or drug (HC+FF and HC+RO). For the fraction non-HDL-C, a similar effect was observed with reductions of 33.2, 53.1 and 28% ($p < 0.001$) for groups HC+7S, HC+FF and HC+RO, respectively, while decreases of 59.5 ($p < 0.001$) and 15.2% ($p < 0.05$) were registered for groups HC+7S+FF and HC+7S+RO. In contrast to rosuvastatin, the protein-fenofibrate association led to an increase of 11.2% ($p < 0.05$) (Table 4). The administration of the protein, fenofibrate and rosuvastatin alone caused increases in the plasma HDL-C of the animals by 55.6, 95.6 and 51.1% in relation to HC, respectively, ($p < 0.001$), while the protein-drug associations led to increases of 6 and 37%, compared to HC+FF and HC+RO groups, respectively ($p > 0.05$) (Table 4). The atherogenic index (AI) showed decreases of 56.5, 75.8 and 49.4% in HC+7S, HC+FF and HC+RO ($p < 0.001$) in relation to HC, respectively, as a consequence of these effects. The combination of the protein-FF and protein-RO led to increases in AI of 5.3 and 5.2%, respectively ($p > 0.05$).

Triacylglycerol (TG) plasma concentrations of the animals in groups HC+7S and HC+FF showed significant reductions ($p < 0.001$) of 34.8 and 45.7%, whereas group HC+RO had only a slight reduction of 7.6% ($p > 0.05$), relative to HC. For protein-drug combinations, the β -conglycinin/fenofibrate group (HC+7S+FF) did not show

Table 2 Body weight change, food intake, and feeding efficiency ratio (FER) of rats fed HC diets and treated with separate and combined doses of β -conglycinin, fenofibrate and rosuvastatin

	Dietary groups ¹					
	HC	HC+7S	HC+FF	HC+RO	HC+7S+FF	HC+7S+RO
Initial weight (g/rat)	196.55 $\pm$ 4.63	195.26 $\pm$ 3.64	193.26 $\pm$ 3.64	193.33 $\pm$ 2.27	193.18 $\pm$ 3.62	194.22 $\pm$ 3.14
Final weight (g/rat)	295.01 $\pm$ 5.43	300.64 $\pm$ 7.71	281.14 $\pm$ 4.25	306.11 $\pm$ 3.79	306.64 $\pm$ 7.71	284.33 $\pm$ 8.01
Weight gain (g/rat/day)	3.51 $\pm$ 0.32	3.76 $\pm$ 0.29	3.14 $\pm$ 0.29	4.02 $\pm$ 0.16	4.05 $\pm$ 0.17	3.22 $\pm$ 0.28
Food intake (g/rat/day)	16.74 $\pm$ 0.33	16.25 $\pm$ 0.22	16.25 $\pm$ 0.22	18.20 $\pm$ 0.17**	15.61 $\pm$ 0.30	17.68 $\pm$ 0.25
Fecal excretion (g/rat/day)	3.59 $\pm$ 0.12	2.94 $\pm$ 0.09*	2.94 $\pm$ 0.09*	2.05 $\pm$ 0.12**	2.83 $\pm$ 0.09*	1.77 $\pm$ 0.13**
Feeding efficiency (%)	21.01 $\pm$ 1.44	23.05 $\pm$ 1.93	23.21 $\pm$ 1.93	21.35 $\pm$ 0.85	20.90 $\pm$ 1.51	18.25 $\pm$ 1.34

¹Values are means $\pm$ SEM for nine rats. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ by the Bonferroni t-test for multiple comparisons versus control group (HC). HC = hypercholesterolemic diet; HC+7S = HC diet + β -conglycinin 300 mg/kg/day; HC+FF = HC diet + fenofibrate 30 mg/kg/day; HC+RO = HC diet + rosuvastatin 10 mg/kg/day; HC+7S+FF = HC diet + β -conglycinin + fenofibrate, 300 and 30 mg/kg/day respectively, and HC+7S+RO = HC diet + β -conglycinin + rosuvastatin, 300 and 10 mg/kg/day respectively.

Table 3 Tissue weight of rats fed HC diets and treated with doses of β -conglycinin, fenofibrate, rosuvastatin and mixtures

	Dietary groups ¹					
	HC	HC+7S	HC+FF	HC+RO	HC+7S+FF	HC+7S+RO
Liver weight (g/rat)	13.54 $\pm$ 0.36	13.55 $\pm$ 0.87	21.10 $\pm$ 0.69**	17.07 $\pm$ 0.92*	19.32 $\pm$ 0.38**	12.83 $\pm$ 0.51
Heart (g/rat)	1.03 $\pm$ 0.04	0.94 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.03	1.26 $\pm$ 0.05	0.96 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.05
Hepatosomatic index* (HI)	4.59 $\pm$ 0.14	4.41 $\pm$ 0.20	7.51 $\pm$ 0.27**	5.56 $\pm$ 0.27*	6.30 $\pm$ 0.12**	4.63 $\pm$ 0.16
Heart weight/body weight (g/100 g)	0.34 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.02*	0.33 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01

¹Values are means $\pm$ SEM for nine rats. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ by the Bonferroni t-test multiple comparisons versus control group (HC). HC = hypercholesterolemic diet; HC+7S = HC diet + β -conglycinin 300 mg/kg/day; HC+FF = HC diet + fenofibrate 30 mg/kg/day; HC+RO = HC diet + rosuvastatin 10 mg/kg/day; HC+7S+FF = HC diet + β -conglycinin + fenofibrate, 300 and 30 mg/kg/day respectively, and HC+7S+RO = HC diet + β -conglycinin + rosuvastatin, 300 and 10 mg/kg/day respectively. Hepatosomatic index (HI) = liver weight/body weight $\times$ 100.

any change, but the β -conglycinin/rosuvastatin group (HC+7S+RO) showed a reduction of 23.9% in the TG levels ($p < 0.05$) relative to the respective drug-treated groups (HC+FF and HC+RO) (Table 4).

Effects on hepatic lipids

Table 4 shows that groups HC+7S had reductions of 20.9 and 14.8% in the liver cholesterol and triacylglycerol concentrations, compared to HC, respectively ($p < 0.001$). Groups HC+FF and HC+RO had 32.3 and 38.3% less cholesterol than HC, respectively (Table 4); on the other hand, group HC+RO had a 27.3% reduced liver TG concentration, while HC+FF did not show significant alteration in this parameter ($p < 0.001$).

Discussion

The effects of fibrates and statins as drugs for the treatment of dyslipidemias are well described in the literature and their mechanisms of action practically established [21,23]. The action of these compounds is associated with transcriptional control of triglycerides metabolism by the activation of the transcription factor PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor) and consequent

induction of the enzymes of β -oxidation of fatty acids in mitochondria. Statins inhibit endogenous cholesterol synthesis by inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutamyl-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis. Depending on which generation of statin is used the various doses lead to reductions of LDL-C (low-density lipoprotein cholesterol) in a range between 20 and 60% [23]. Diet components, such as plant sterols/stanols, soluble fibers, omega-3-fatty acids, niacin and soybean components; have been combined with a variety of drugs, in experiments *in vitro* and *in vivo*, to treat dyslipidemia [18].

In our experiment, the differences in body weight gain between groups were not significant, although the weights of the livers of rats consuming the mixture of drugs and 7S-FF were much higher than those of other groups. The group that received rosuvastatin had a liver weight gain lower than those given fenofibrate. The observed increase in liver weight by administration of fenofibrate is reported in the literature. Yamamoto et al. [22] found such an increase on administering fenofibrate at 0.05% in diet of rats, while, Mancini et al. [35] observed an increase of 30.2% in the liver weight of hyperlipidemic rats after daily

Table 4 Effect of diets on plasma lipid profiles and hepatic lipid contents in rats fed hypercholesterolemic diets and treated with doses of β -conglycinin, fenofibrate, rosuvastatin and mixtures

	Dietary groups					
	HC	HC+7S	HC+FF	HC+RO	HC+7S+FF	HC+7S+RO
<i>Plasma (mmol/L)</i>						
Total cholesterol	3.88 $\pm$ 0.22	2.99 $\pm$ 0.10*	2.49 $\pm$ 0.15**	3.15 $\pm$ 0.12*	2.33 $\pm$ 0.22**	4.00 $\pm$ 0.12
HDL-C	0.45 $\pm$ 0.02	0.70 $\pm$ 0.05*	0.88 $\pm$ 0.13*	0.68 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.10**	0.90 $\pm$ 0.15*
non-HDL-C	3.43 $\pm$ 0.12	2.29 $\pm$ 0.10**	1.61 $\pm$ 0.06**	2.47 $\pm$ 0.14**	1.39 $\pm$ 0.12**	2.91 $\pm$ 0.22*
Triacylglycerides	0.92 $\pm$ 0.05	0.60 $\pm$ 0.04**	0.50 $\pm$ 0.02**	0.85 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.03**	0.70 $\pm$ 0.05*
AI*	8.09 $\pm$ 0.07	3.52 $\pm$ 0.11**	1.96 $\pm$ 0.12**	4.09 $\pm$ 0.35**	1.53 $\pm$ 0.15**	3.67 $\pm$ 0.33**
<i>Liver (μmol/g)</i>						
Total cholesterol	58.43 $\pm$ 0.85	46.22 $\pm$ 0.65**	39.58 $\pm$ 0.85**	36.04 $\pm$ 2.07**	37.86 $\pm$ 0.80**	47.13 $\pm$ 2.12**
Triacylglycerides	56.97 $\pm$ 2.15	48.52 $\pm$ 2.28*	60.06 $\pm$ 1.76	41.42 $\pm$ 2.46**	47.64 $\pm$ 2.38*	46.05 $\pm$ 2.59*

¹Values are means $\pm$ SEM for nine rats. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ by the Bonferroni t-test multiple comparisons versus control group (HC). HC = hypercholesterolemic diet; HC+7S = HC diet + β -conglycinin 300 mg/kg/day; HC+FF = HC diet + fenofibrate 30 mg/kg/day; HC+RO = HC diet + rosuvastatin 10 mg/kg/day; HC+7S+FF = HC diet + β -conglycinin + fenofibrate, 300 and 30 mg/kg/day respectively, and HC+7S+RO = HC diet + β -conglycinin + rosuvastatin, 300 and 10 mg/kg/day respectively. * AI = atherogenic index were calculated as proposed by Liu et al. (2006).

administration of 320 mg.kg⁻¹ of fenofibrate for 120 days. Ji et al. [36] observed an increase in the liver weight of the animals fed on a hyperlipidemic diet and treated with atorvastatin at a dose of 30 mg.kg⁻¹ day⁻¹ for 8 weeks; the authors also showed an increase in the hepatosomatic index of these animals. These results are consistent with published reports of liver hypertrophy after fenofibrate administration, due to proliferation of peroxisomes and mitochondria. In our study, the raised hepatosomatic index of the animals that received fenofibrate thus resulted from the high liver weight and the insignificant body weight gains of the animals (Table 2 and 3). The protein-drug combination caused reductions of 16 and 16.7% in the hepatosomatic indices of the animals that ingested fenofibrate and rosuvastatin, respectively, and in the latter case practically annulled the effect of the drug alone. Therefore, the β -conglycinin was able to reverse the increase in the liver weight and hepatosomatic index of the animals that ingested rosuvastatin, but not those of the 7S+FF animals.

The protein β -conglycinin has been studied for its effects on dyslipidemia, both as a single protein added to the diet, and as a daily dose [7,8,10,12-14,37,38], and in both cases distinct effects on lipid metabolism were observed. Studies using animals subjected to a daily dose of β -conglycinin [13-15], and our study, show that the 7S protein has an effect comparable to that of rosuvastatin, but weaker than fenofibrate, in reducing levels of total cholesterol. Surprisingly, the β -conglycinin/rosuvastatin combination raised the total cholesterol to a higher level than in any other group, even the hypercholesterolemic group, while the combination with fenofibrate led to lower values of TC than either separately.

The LDL-C/HDL-C ratio is used as risk factor for coronary heart diseases (CHD), on account of the effect of each fraction on the atherosclerotic process [39]. Thus, the atherogenic index (AI) of the hypercholesterolemic diet group (HC), in this experiment, was 8 times higher than that of rats on the casein standard diet [14], as also observed by other authors [10]. All treatments resulted in reductions in AI of the animals, the combination of 7S protein and fenofibrate (HC+7S+FF group) being the most efficient, followed by fenofibrate (HC+FF group), protein (HC+7S group), protein plus rosuvastatin (HC+7S+RO group) and rosuvastatin (HC+RO group), with falls of 81, 76, 57, 55 and 50%, relative to HC, respectively (Table 4). These data indicate that the protein-fenofibrate and protein-rosuvastatin combinations resulted in lower cardiovascular risks than did the drugs alone (Table 4). Even though the combination of protein with rosuvastatin rose the level of total cholesterol approximately to that observed in the group HC, the combination reduced the cardiovascular risk by increasing the HDL-C fraction (Table 4).

The mechanisms of action of these drugs are properly established, as mentioned above. However, the mechanisms of action of soybean proteins on lipid metabolism are not yet clear, as various studies point to different actions, such as increasing the amount of LDL-receptors [7,8,40,41], inhibiting HMG-CoA reductase [42], sequestering bile acids [38], activating β -oxidation related enzymes [38,43], gene expression [40,43] and others [11,12,38,41]. However, a lot of evidence suggests that the effects of soybean proteins could be due to biologically active peptides produced by digestion of the proteins in the gastrointestinal tract, and that these peptides would be the main agents affecting cholesterol and triacylglyceride metabolism, since the protein itself cannot be absorbed intact.

The behaviors of these combinations suggest a possible synergy between the protein and fenofibrate and an antagonistic effect with rosuvastatin, in relation to serum total cholesterol. Although, in the case of rosuvastatin, the increase in the HDL-C fraction to a level above that with the protein or drug alone may be due to a higher rate of cholesterol catabolism, an important function of this fraction is as a carrier of cholesterol to the liver. Fenofibrate has been characterized as a drug that causes an increase in HDL-C levels [44], while the literature indicates only a slight modification of this fraction by the statins, unrelated to dose [20]. These observations were confirmed by our experiment, but β -conglycinin had a positive effect in combination with rosuvastatin, resulting in a higher increase than with the drug alone. The non-HDL-C levels followed the same trend as total cholesterol. The combinations of protein with the drugs did not affect the TG levels, although the rosuvastatin improved the action of the protein in the combination and reduced the level compared to the drug alone.

The liver cholesterol concentration was reduced by all treatments, relative to HC, the greatest reduction (37%) being seen in the HC+RO group. Nevertheless, 7S-rosuvastatin combination annulled the effect of the drug, showing the same value as the protein alone and much higher than with the drug alone. The 7S-fenofibrate combination resulted in a fall in concentration of hepatic triacylglycerides, relative to HC and to the drug alone (which led to a rise in this level), to the same concentration as HC+FF. However, the fenofibrate, without or with 7S protein, maintained the hepatosomatic index above that of the HC group, due to the appreciable increase in the liver weight of the animals.

The meta-analysis of studies by Anderson et al. [45] demonstrated a 12.5% reduction in the levels of LDL-C for 1.5 to 2 oz of soy protein daily (50 g/d), whereas a recent meta-analysis reported only 4-6% [46]. More recently, Jenkins et al. [16] discussed the effect of cholesterol reduction by soy proteins in light of a review of

claims for heart health by the U.S. FDA and a meta-analysis of studies on the action of soy protein; they concluded that soy remains one of the few food components that reduce serum cholesterol when added to the diet. Results in the literature show that soybean protein, when used as the only protein source in the diet affects these serum parameters in various ways, depending on the experimental model, animal, dose and other factors [3]. However, when administered as a daily dose in hypercholesterolemic animals fed a standard casein diet, enriched by cholesterol and cholic acid, it had the effect of reducing TC, LDL-C and TG levels in a dose-dependent manner [13,14]. It is important to note that in our study the β -conglycinin was administered by gavage, alone and/or in combination with the drugs at a concentration equivalent to 2.75-2.90% of the daily total protein intake, and that the doses were given separately to the animals, with a difference of 6 hours between drug and the protein. The fact that the β -conglycinin was isolated may be the cause of its higher effect on the cholesterol metabolism relative to the total protein or soybean protein products. We may note that, despite the use of various experimental models with different *in vitro* and *in vivo* approaches, the mechanism of action of soy protein on lipid metabolism is still controversial and deserves further study, especially in relation to its interactions with drugs of similar effect. At the moment, studies to reveal the mechanism of action of β -conglycinin, alone and combined with statins are in progress in our lab.

Conclusion

The 7S soybean protein-fenofibrate combination was shown to have a positive in reducing the serum total cholesterol levels of hypercholesterolemic animals, as well as raising the levels of HDL-C, and relative to the protein and drug alone. This enhancing effect was reflected in a greater reduction of the cardiovascular risk by up to 81% relative to HC animals. This combination also had a positive effect on the levels of hepatic triacylglycerides, with a reduction of 20.6% relative to the drug alone. The association of protein-rosuvastatin produced an unexpected action on serum total cholesterol, maintaining it at the level shown by the HC group, which was 25 and 21% higher than those observed with the protein and drug alone. However, it also caused an increase in HDL-C of 23%, compared to protein and drug alone. Surprisingly, it achieved a reduction in the cardiovascular risk of 55%, relative to group HC.

Acknowledgements and Funding

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), (2009/11511-0), FUNDUNESP (00583/07-DFP and 0041/10-DFP) and PADC-FCF-UNESP Scientific Program. The authors acknowledge the careful proofreading of the text by Timothy John C. Roberts (MSc).

Authors' contributions

VAN and ESF designed the research; ESF and MAS conducted the research; ESF, VAN and AD analyzed the data; VAN and ESF wrote the paper; and VAN had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 November 2011 Accepted: 13 January 2012

Published: 13 January 2012

References

- Duranti M: Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 2006, **77**:67-82.
- Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR: Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nut Biochem* 2006, **17**:365-373.
- Sirtori CR, Galli C, Anderson JW, Arnoldi A: Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention; Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis* 2009, **203**:8-17.
- Scarafoni A, Magni C, Duranti M: Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human healthy. *Trends Food Sci Technol* 2007, **18**:454-463.
- Bazzano LA, Thompson AM, Tees MT, Nguyen CH, Winham DM: Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metabol Cardio Dis* 2011, **21**:94-103.
- Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Fumagalli R, Sirtori CR: Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J Nut* 1992, **22**:1971-1978.
- Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Fumagalli R, Sirtori CR: 7S Globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system. *J Nut* 1996, **126**:2831-2842.
- Lovati MR, Manzoni C, Pizzagalli A, Castiglioni S, Duranti M, Magni C: Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nut* 2000, **130**:2543-2549.
- Rho SJ, Park SP, Ahn CW, Shin JK, Lee HG: Dietetic and hypocholesterolaemic action of black soy peptide in dietary obese rats. *J Sci Food Agric* 2007, **87**:908-913.
- Aoyama T, Kohno M, Saito T, Fukui K, Takamatsu K, Yamamoto T: Reduction by phytate-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. *Biosc Biotech Biochem* 2001, **65**:1071-1075.
- Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tsuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Shimoda T: Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric Food Chem* 2002, **50**:5717-5721.
- Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M, Kito M: Effects of soybean conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosc Biotech Biochem* 2004, **68**:1153-1155.
- Duranti M, Lovati MR, Dani V, Barbiroli A, Scarafoni A, Castiglioni S, Ponzzone C, Morazzoni P: The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J Nut* 2004, **134**:1334-1339.
- Ferreira ES, Silva MA, Demonte A, Neves VA: β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed high-cholesterol diet. *J Func Foods* 2010, **2**:275-283.
- Ferreira ES, Silva MA, Demonte A, Neves VA: Soy β -conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. *J Med Food* 2011, **14**:94-100.
- Jenkins DJA, Mirrahimi A, Srichaikul K, Berryman CE, Wang L, Carleton A, Abdulnour S, Sievenpiper JL, Kendall CWC, Kris-Etherton PM: Soy protein reduces serum cholesterol by both intrinsic and food displacement mechanism. *J Nut* 2010, **140**:2302S-2311S.
- Food and Drug Administration (FDA) Food labeling: health claims; soybean protein and coronary heart disease. *Federal register, rules and regulations* 1999, **64**:57700-57733.
- Redeout TC, Hrading ST, Marinangeli CPF, Jones PJH: Combination drug-diet therapies for dyslipidemia. *Transl Res* 2010, **155**:220-227.
- Polli A, Marangoni F, Paoletti R, Mannarino E, Lupattelli G, Notarbartolo A, Aureli P, Bernini F, Cicero A, Gaddi A, Catapano A, Cricelli C, Gattone M,

- Marroco W, Porrini M, Stella R, Vanotti A, Volpe M, Volpe R, Cannella C, Pinto A, Del Toma E, La Vecchia C, Tavani A, Manzato E, Ricardi G, Sirtori C, Zamboni A: **Non-pharmacological control of plasma cholesterol levels.** *Nut Metabol Cardio Dis* 2008, **18**:S1-S16.
20. Xydakis AM, Ballantyne CM: **Combination therapy for combined dyslipidemia.** *Am J Cardiol* 2002, **90**:21K-29K.
 21. Ferreira AVM, Parreira GG, Green A, Botion LM: **Effects of fenofibrate on lipid metabolism in adipose tissue of rats.** *Metabol Clin Experimentl* 2006, **55**:731-735.
 22. Yamamoto K, Fukuda N, Zhang L, Sakai T: **Altered hepatic metabolism of fatty acids in rats fed hypolipidaemic drug, fenofibrate.** *Pharmacol Res* 1996, **33**:337-342.
 23. Kobayashi M, Chisaki I, Narumi K, Hidaka K, Kagawa T, Itagaki S, Hirano T, Iseki K: **Association between risk of myopathy and cholesterol-lowering effect: A comparison of all statins.** *Life Sci* 2008, **82**:969-975.
 24. Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, Kohyama K, Nishinari K: **Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans.** *J Agric Food Chem* 1992, **40**:941-944.
 25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the folin-phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-275.
 26. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-684.
 27. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *J Nut* 1993, **123**:1939-1951.
 28. Nath N, Wiener R, Harper AE, Elvehjem CA: **Diet and cholesterolemia. I. Development of a diet for the study of nutritional factors affecting cholesterolemia in the rat.** *J Nut* 1959, **67**:289-307.
 29. Stockbridge H, Hardy RL, Glueck CJ: **Photometric determination of cholesterol (CHOD-PAP method).** *J Labor Clin Med* 1989, **114**:142-151.
 30. Assmann G: **HDL-cholesterol precipitant.** Randox Labs. Ltd. Crumlin Co. Antrim Northern Ireland Internist; 1979:**20**:559.
 31. Annoni G, Botasso BM, Ciacci D, Donato MF, Tripodi A: **Liquid triglycerides (GPO-PAP).** *Medi Diagnostic Italy.* *J Labor Clin Med* 1982, **9**:115.
 32. Liu JR, Wang SY, Chen MJ, Chen HL, Yuerh PY, Lin CW: **Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters.** *British J Nut* 2006, **95**:939-946.
 33. Haug A, Hostmark AT: **Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil.** *J Nut* 1987, **117**:1011-1017.
 34. Wang YM, Zhang B, Xue Y, Li ZJ, Wang JF, Yanagita T: **The mechanism of dietary cholesterol effects on lipid metabolism in rats.** *Nut Met Card Res* 2010, **9**:4.
 35. Mancini FP, Lanni A, Sabatino L, Moreno M, Giannino A, Contaldo F, Colantuoni V, Goglia F: **Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats.** *FEBS Letter* 2001, **491**:154-158.
 36. Ji G, Shao X, Leng L, Liu P, Jiang Z: **Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats.** *Lip Health Dis* 2011, **10**:23-32.
 37. Kohono M, Hirotsuka M, Kito M, Matsuzawa Y: **Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin.** *J Atheroscl Thromb* 2006, **13**:247-255.
 38. Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M: **Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride level in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, down regulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption.** *Biosc Biotech Biochem* 2004, **68**:352-359.
 39. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB: **Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study.** *J Amer Med Assoc* 1986, **256**:2835-2838.
 40. Mochizuki Y, Maebuchi M, Kohno M, Hirotsuka M, Wadahama H, Moriyama T, Kawada T, Urade R: **Changes in lipid metabolism by soy β -conglycinin-derived peptides in HepG2 cells.** *J Agric Food Chem* 2009, **57**:1473-1480.
 41. Adams MR, Golden DL, Franke AA, Potter SM, Smith HS, Anthony MS: **Dietary Soy β -Conglycinin (7S Globulin) Inhibits Atherosclerosis in Mice.** *J Nut* 2004, **134**:511-516.
 42. Pak VV, Koo M, Kasimova TD, Kwon DY: **Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity.** *Chem Nat Comp* 2005, **41**:710-714.
 43. Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez F J, Hernández-Pando R, Tovar AR: **Soy Protein Affects Serum Insulin and Hepatic SREBP-1 mRNA and Reduces Fatty Liver in Rats.** *J Nut* 2004, **134**:522-529.
 44. Depres JP: **Increasing high-density lipoproteins cholesterol: an update on fenofibrate.** *Am J Cardiol* 2001, **88**:30N-6N.
 45. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME: **Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids.** *N Engl J Med* 1995, **333**:276-282.
 46. Harland JL, Haffner TA: **Systematic review, meta-analysis and regression randomized controlled trials reporting an association between an intake of circa 25 g soya protein per day and blood cholesterol.** *Atherosclerosis* 2008, **200**:13-27.

doi:10.1186/1476-511X-11-11

Cite this article as: Ferreira et al.: β -conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. *Lipids in Health and Disease* 2012 **11**:11.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Capítulo III

**Hypocholesterolemic effect of oral doses of vicilins from cowpea and adzuki
beans in rats (submetido: Ferreira et al.)**

Hypocholesterolemic effect of oral doses of vicilins from cowpea and adzuki beans in rats

Ederlan S. Ferreira[§], Ana Lucia S. Amaral[§], Marcelo Duranti[†], Aureluce
Demonte[§], Valdir A. Neves^{§*}

[§]Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University.
Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

[†]Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, Università Degli Studi Di Milano, Via
G. Celoria, 2, 20133, Milan, Italy

*Corresponding author

Valdir Augusto Neves: Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, São
Paulo State University. Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil
Telephone: 055 (16) 3301-6935; FAX: 055 (16) 3301-6920.
e-mail: nevesva@fcfar.unesp.br

ABSTRACT

In recent years, protein from legumes have been studied in relation to lipid disorders especially hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia, and evidences have been presented for soybean proteins in special to the B-conglycinin fraction. The fact that 7S proteins present a high sequential homology in the primary structure could reflect in a similar biological function. The objectives were verifying the hypolipidemic effects of vicilins from cowpea and adzuki beans and the drug simvastatin when administered to rats fed a hypercholesterolemic diet. Rats were divided into groups ($n=9$): 1.standard (STD; casein), 2.high-fat and cholesterol diet (HC), 3.HC+7S-C (HC+300mg/kg/day), 4. HC+7S-A (HC+300mg/kg/day), and 4. HC+SVT (HC+50 mg/kg/day). The protein and the drug were administered by gavage for 28 days. The animals that ingested 7S-proteins and drug showed an average weight gain and a final body weight significantly lowers than those fed only HC diet. Fecal excretion and feeding efficiency were similar among the groups fed HC diet, however, these were higher ($P<.001$) when compared to STD. The 7S and simvastatin groups showed increased excretion fecal of total lipids and cholesterol compared to HC. However, it was observed a decrease in the total serum cholesterol, non-HDL-C and the atherogenic index compared to rats fed HC diet, and these values were higher than those treated with simvastatin. Serum HDL-cholesterol levels were increased in the 7S-C (57.1%), 7S-A (52.9%) and SVT (18.6%) groups, and hepatic cholesterol and triglyceride contents were also significantly lower than in the HC group. The lipoprotein lipase activity was significantly ($P < .001$) higher in the 7S and SVT groups relative to HC. These data suggest that the oral daily administration of isolated vicilin from cowpea and adzuki beans (300mg/kg/day) can promote a hypolipidemic and body fat-lowering effects in rats fed hypercholesterolemic diets.

Keywords: *Vigna unguiculata*, *Vigna angularis*, vicilins, cholesterol, rats

INTRODUCTION

Dietary interventions have been used to control triglycerides and plasma cholesterol and thereby to prevent coronary heart diseases, hence diets containing soybean and other legumes seeds have been related to a reduction in a series of risk factors associated to these illnesses.^{1,2,3,4} In this aspect, soybean proteins have been much studied, and this protein has gained recognition as a potential reducer of risk factors for cardiovascular disease in 1999, when the U.S. Food and Drug Administration⁵ (FDA) postulated the recommendation of intake of 25 g of soy protein per day. The FDA, based on a survey of clinical studies indicated that these levels of daily consumption of soy protein may reduce total cholesterol and LDL-C.^{6,7} However proteins of other legumes also show some action on lipid metabolism and especially that of cholesterol,^{1,8,9} although these other proteins have not been studied so much. Despite soybean proteins, in the crude form or protein isolate, to be associated with these effects, the search for possible protein fraction responsible as well as the mechanisms involved are still the subject of many studies.^{10,11,12,13,14,15,16} In this sense, a dyslipidemic effect of the vicilin fraction from soybean has been well documented in the literature, both in animals and humans.^{3,10,11,12,17} The vicilin-like proteins (7S proteins) of many leguminous seeds are composed of subunit combinations yielding a molecular mass of approximately 150-220 kDa and the subunits may vary in size and in number within and between species.¹⁸ Despite these differences in molecular characteristics, when comparing partial nucleotide sequences of genes and mRNAs encoding them it can be observed a considerable homology.¹⁹ Various authors have described that the subunits of the 7S legume storage proteins are similar in amino acid sequence,²⁰ and this bring us to assume that they are broken down in similar ways by digestive enzymes. In fact, Nielsen and colleagues²¹ indicated that the cleavage region in phaseolin by pepsin, trypsin and chymotrypsin, is highly homologous

in sequence with the other 7S proteins such as pea vicilin and β -conglycinin. The authors also verified that regions in native phaseolin cleaved by proteinases are homologous to other 7S proteins, indicating that legume proteins are well similar in their degradation by proteinases. Previous studies have indicated that B-conglycinin shows hypocholesterolemic and hypolipidemic action, both as added to the diet like the only source of protein or even as a daily dose,^{10,12,22,23} and recently various authors have demonstrated that alfa' fraction is the component which owns the action.^{10,24} These effects of soybean 7S were also compared to those observed with the drugs rosuvastatin, simvastatin and fibrates.^{10,11,23} It appears a consensus that these effects observed with the 7S proteins in the lipid metabolism is due to the peptides derived from the protein after their gastrointestinal digestion. In analyzes from in silico simulations (Tools on the ExPASy Server, NCBI Blast/UniProtKB) we can observe that the 7S fraction of cowpea (AM905848/A8YQH5_VIGUN), and adzuki bean (AB292246.1/A4PI98_PHAAN) have similar primary structure to that α' subunit from soybean β -conglycinin (AY221105.1/Q84UB3_SOYBN), and therefore their gastrointestinal digestion probably leads to production of peptides like, and it is also possible, exhibit the same biological actions detected with the 7S soy protein. Also, the analysis of results of virtual hydrolysis of these proteins in different simulations, performed by pepsin, trypsin, chymotrypsin (PeptideCutter, Server: Bioinformatics Resource Centre), or by simulation of the gastrointestinal tract (Biopep: www.uwm.edu.pl/biochemia), showed large numbers of peptides similar for 7S proteins from different species. Thus, the objectives of this study were to investigate the effects of isolated vicilins from cowpea and adzuki beans, compared to simvastatin, on lipid metabolism of rats fed a hypercholesterolemic diet

MATERIALS AND METHODS

Materials.

Cowpea (*Vigna unguiculata*, L) and Adzuki (*Vigna angularis*, L) seeds were obtained from Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais at Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The seeds were selected, soaked in distilled water (4°C/12 h), manually decorticated, dried at room temperature and powdered to 60 mesh sizes. These flours were stored to 4°C and used for protein extractions.

Isolation of 7S globulins

Cowpea: Sample of cowpea flour was weight and homogenized with solution (1:20 [w/v] flour to solvent ratio) and adjusted to pH 7.5. Then, the soluble extract was centrifuged at 18000 x *g* for 40 min/4°C. The following preparation procedure was performed at the same temperature. The supernatant was diluted (1X) with water, adjusted to pH 5.0 with HCl 2 mol/L and kept in stand overnight. Thereafter, the material was centrifuged as described, the precipitate was homogenized in water (1:20 w/v, initial weight), and left stirring for 10 min. Then, pH was adjusted to 5.0 and centrifuged as described. Pellet was dissolved in 0.1 mol/L NaCl (1:20 w/v, initial weight), adjusted to pH 7.0 and left stirring for 20 min. After centrifugation at 18000 x *g* for 40 min the supernatant was diluted (1X) with water, adjusted to pH 5.0 and kept in stand overnight. Finally, centrifuged and the pellet (essentially 7S globulin) was recovered, dissolved in NaCl (0.2 mol/L) solution; adjusted to pH 7.0 and stored. **Adzuki:** Samples of adzuki flour were weight and homogenized with distilled water (1:20 [w/v] flour to solvent ratio), adjusted to pH 7.5, homogenized by 30 minutes at room temperature and centrifuged. The supernatant (S1) was reserved and the precipitate was solubilized in 0.5 mol/L NaCl (1:10 w/v initial weight), adjusted to pH 7.5, stirring by more 30 minutes at room temperature and centrifuged as described. The supernatant (S2) was

collected and mixed to S1. All subsequent procedures were performed at temperature of 4 °C. The extracted protein (S1+S2) was diluted to water (5 X) at 0.05 mol/L NaCl concentration, homogeneized, adjusted to pH 4.8 and left without stir overnight at 4° C. After, it was centrifuged, the precipitate solubilized in distilled water (1:20 w/v) followed by centrifugation at 18000 x *g* for 40 min. Once again, the pellet was solubilized in 0.25 mol/L NaCl (1:10 w/v initial weight) and left on stir by 10 minutes, and centrifuged as described. The supernatant was diluted with water (5X) until 0.05 mol/L NaCl concentration, homogenized, the pH adjusted to 4.8 and left without stir overnight at 4° C. Finally, the solution was centrifuged at 18000 x *g* for 40 min and the precipitate obtained (essentially 7S globulin) dissolved in NaCl (0.2 mol/L) solution and adjusted to pH 7.0. All chemicals were of analytical purity. Protein content was determined by the method of Lowry and colleagues²⁵, using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The homogeneity of the isolated proteins were performed by SDS-PAGE accord to Laemlli²⁶.

Diets and Experimental protocol. All experiments were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals²⁷ and were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP) protocol 25/2009. Forty-five male Wistar rats aged 2 weeks (40–50 g) were obtained from the Central Laboratory for animals of the São Paulo State University (UNESP) at Botucatu (Brazil). All the rats were fed a pelletized commercial (Purina®) diet for 2 week after arrival until reaching 150-160 g. Afterwards, the animals were housed individually in stainless steel cages in a room with a 12:12-h light/dark cycle and an ambient temperature of 23 ± 2 °C. They were then divided into five groups (*n* = 9). A standard group (STD) was fed with a normal control diet, following the recommendations of The American Institute of Nutrition (AIN-93G) for

growth,²⁸ and four hypercholesterolemic groups (HC): (1) HC-control, (2) 7S-cowpea, (3) 7S-adzuki, (4) SVT (simvastatine) were fed with a AIN-93G diet, modified by adding of 20g/100g palm oil, 1g/100g cholesterol and 0.5g/100g cholic acid,^{10,29} as described in Table 1. To the animals of the protein groups were administered an oral dose of 300 mg/kg/day of the isolated 7S protein and the last one an oral dose of simvastatin of 50 mg/Kg/day daily by gavage at 14:00h. The proteins and drug were dissolved in saline and only the vehicle alone was given to the HC group. All animals were given food and water ad libitum during 28 days the experimental period. Food consumption, weight gain, fecal excretion and feeding efficiency were measured every other day during all time of the experiment. The feeding efficiency coefficient was calculated from the ratio of weight gain/daily intake x 100.

Blood and organ collection. On the last day, the animals were deprived of food for 12 h and euthanized by guillotine. Blood was then collected in tubes containing gel separator SST II (Vacutainer BD D®, FranklinLakes, NJ, USA) and centrifuged at 1900 *g* for 15 min. The serum was separated, stored at -24°C and used for biochemical analysis. Retroperitoneal fat, liver and heart were removed, washed immediately in cold saline, dried and weighed, frozen and stored at -40°C for a period of less than a month for subsequent comparative analysis.

Biochemical analyses in the plasma. Plasma total cholesterol (TC) of was measured by liquid cholesterol CHOD-PAP as method described by Stockbridge and colleagues.³⁰ Serum high density lipoprotein (HDL-C) was measured by HDL cholesterol precipitant method as described by Assmann.³¹ Triglycerides (TG) were measured by liquid triglycerides GPO-PAP method as described by Annoni and colleagues.³² Plasma glucose concentration was determined using a liquid glucose GOD-PAP method as described by Trinder.³³ All these were measured colorimetrically with commercially available kits (Laborlab® Co., Ribeirão Preto, Brazil). The fraction non-HDL-cholesterol was determined by difference between the

total cholesterol level from the HDL-cholesterol, and the atherogenic indexes were calculated as proposed by Liu and colleagues.³⁴ Hepato-somatic and visceral fat indexes were calculated by the following relations, respectively: liver weight/body weight x 100%, and fat visceral weight/body weight x 100%, as described by Chen and colleagues.³⁵ The lipoprotein lipase (LPL) activity was determined as described by Roe and Byler³⁶ and glutamic pyruvic transaminase (GPT) was determined as described by Tonks³⁷ using a commercially available kit (Bioclin[®] Co., Belo Horizonte, Brazil). Serum insulin level was analyzed using a commercially available ultrasensitive rat insulin ELISA kit (DGR Instruments[®] GmbH, Frauenbergstr, Germany), as previously described previously by Korner and colleagues.³⁸ This assay has 100% cross-reactivity to rat insulin.

Analysis of hepatic and fecal lipids. Liver and fecal lipids were extracted with chloroform/methanol (2:1 v/v) according to the method described previously by Folch and colleagues.³⁹ Total cholesterol and triacylglycerides were extracted by the method of Haug and Hostmark.⁴⁰ All TC and TG concentrations were measured as described earlier for plasma analysis.

Data Analyses. All data are presented as the mean $\pm$ standard error for nine values. The statistical analyses were performed using the SigmaStat[®] 3.5 program (Dundas software, Germany, 1999). Significant differences among the groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and student-Newman-Keuls multiple-range test was performed were identified between the groups. A difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Isolation of 7S proteins. The applied procedures to the quantitative isolation of both 7S proteins have resulted in homogeneous proteins, and adequate for use in the *in vivo* experiment, as showed in Figure 1.

Food intake, body weight, food efficiency. The effects of daily administration of β -vignins and simvastatin on the food consumption, weight gain, feeding efficiency ratio and fecal excretion in the animals of all groups fed the diets for 28 days are shown in the Table 2. It can be observed that 7S adzuki protein and simvastatin had produced a decrease of about 12% on the final body weight of the animals with a reduction on the average body weight gain of 23% in relation to HC group animals. This fact can have resulted by reduction in the food intake between groups in the period (Table 2). The HC group showed an increase of 72.8.2% and 72.2% in the relative liver weight of rats and in the hepatosomatic index, respectively, relative to the STD group ($P < 0.001$) (Table 2); for the other hand only the adzuki group has presented a decrease of 18.6% in the liver weight in relation to HC. Meanwhile, no significant difference was found between HC groups in respect to the other parameters (Table 2).

Plasma parameters. Oral administration of β -vignins and simvastatin to hypercholesterolemic rats significantly reduced the levels of TC and TG in the plasma of the animals relative to HC by the end of the 28-day treatment. In rats fed the hypercholesterolemic diet (HC), the plasma lipid levels were significantly higher than in those given the standard diet (STD) ($P < 0.001$) (Figure 2). The animals that ingested the proteins showed a reduction of 32.5% and 33% ($P < 0.001$) in the total plasma cholesterol, while those that received simvastatin were reduced by 20.3% ($P < 0.001$). It can be observe in the Figure 2 that the levels of plasma TG were higher in the animals of HC group than those STD group ($P < 0.001$), however the differences observed with the other groups were not significant in relation to HC, except for the adzuki

protein, that showed a decrease of 17.8 % ($P < 0.05$). Table 3 shows that the HC diet caused an increase of 5.86 times in the plasma non-HDL cholesterol of the animals when compared to STD diet ($P < 0.001$), moreover, both vignins had reduced by 46% ($P < 0.001$), while only 30.7% of reduction was observed by the simvastatin ($P < 0.001$) relative to HC. The HDL-C levels in the plasma of the animals were affected by HC diet that showed a decrease of 27%, compared to STD group, however the 7S proteins presented an increase of 157% and 153% for cowpea and adzuki ($P < 0.001$), respectively, with values above of STD group. The animals from simvastatin group have increased only 18.5% and below of the values from the animals of STD group (Table 3). The atherogenic index, an indicator of the heart disease predisposition, has increased 7.69 times by the effect of the hyperlipidic diet , moreover both proteins presented a reductor effect on it with values of 70.6% and 67% lower than HC group and more efficient than simvastatin group. This effect already has been observed with the 7S and 11S isolated proteins from soybean.^{23,41}

The glucose levels in the plasma practically were not affected in the experiment in spite of a decrease in the insulin levels to the groups that fed the HC diet comparative to the STD diet ($P < 0.001$) (Table 3). The table 4 shows that the values of the lipoprotein lipase activity were significantly higher in all groups that received the HC diet; however, this effect was stronger in the group treated by cowpea vicilin. The groups that received the drug simvastatin or adzuki protein had a lower effect and similar between them. The activator effect of the proteins and simvastatin in the enzyme activity lipoprotein lipase reached values near a twice in relative to animals of the HC group.

Liver parameters. The HC diet was sufficient to increase the levels of cholesterol and triglycerides in the liver (Figure 2) relative to STD; however, only the oral daily dose of the cowpea 7S protein has reduced both parameters in 14% and 17% respectively ($P < 0.05$).

Moreover, the drug has affected the deposition of cholesterol in the liver with a little reduction comparative to HC group. The 7S protein from adzuki did not alter the levels of TC and TG in the liver in relation to HC. Microscopic examination of liver tissue revealed that, for the animals in the STD group, most regions of hepatocytes have presented aspects of normal and centralized nuclei. In liver tissue sections of animals that received the HC diet were observed microvesicles fat accumulation within hepatocytes where the cores were driven back towards the periphery of the cell. This analysis characterizes hepatic steatosis and ballooning in the liver tissue of animals fed the HC diet (data not shown). This observation can be the result of increased levels of triacylglycerides in the liver tissue of these animals in comparison to animals of group STD.

Fecal excretion. Fecal excretions of fat and cholesterol have suffered considerable increase in the groups consuming the HC diet. Approximately 2.50 to 2.95 times more cholesterol was eliminated by the groups HC diet compared with the STD group. TG excretion was increased in 11.2% and 17.6% to the groups receiving the proteins of cowpea and adzuki beans, respectively, while the group that ingested the drug was 10.4% ($P < 0.05$). In the case of cholesterol, the fecal excretion had a very large increase in those hypercholesterolemic groups compared to STD group; however both groups receiving the drug or the proteins still showed greater excretion than the HC group (Table 3).

DISCUSSION

The effects of statins on cholesterol metabolism are well established, as well as their mechanisms of action.^{42,43,44} Statins are able to inhibit the synthesis of cholesterol by interfering with the action of 3-hydroxy-3-methyl-glutamyl-CoA reductase; and moreover, different generations of these drugs has allowed a better fit dose-response where it can be reached ranges of reduction of total cholesterol and LDL-C in the plasma well expressive of

up to 60%, however the action of these drugs on HDL-C appears to be insignificant.⁴². Different reasons have been a matter for the use of a number of components present in food associated with different types of drugs to face the cases of dyslipidemia, both in experiments *in vitro* as *in vivo*,⁴³ and some of these components can have a significant positive role in reducing of the well known side effects of drugs. The literature shows that biochemical parameters related to the metabolism of cholesterol and triglycerides are affected by eating 7S and 11S soy protein as the only protein source^{6,7,13,14,45,46,47}; however, only in some cases these proteins, or their fractions, have been offered to the animals in small doses and so have confirmed the hypocholesterolemic and hypolipidemic actions.^{10,11,12,17,22,46,48} Few studies have been conducted with the proteins of cowpea bean showing a hypocholesterolemic effect in animals and in humans.^{8,49,50} Furthermore, there is little data on the effect of adzuki bean proteins on lipid metabolism in the literature.⁵¹ In an experiment using cowpea as only source of protein the effect of the administration of crude flour and protein isolate resulted in a significant decrease in total cholesterol and non-HDL-C in the plasma and an increase of fecal cholesterol in hamsters.⁸ Contrary to them, Olivera and colleagues⁵⁰ verified that a protein isolate from cowpea, as single protein source, did not alter the levels of total cholesterol and triglycerides in plasma of rats submitted a normolipidemic diet. Meanwhile, Mahadevappa and Raina⁴⁹ have observed that the addition of whole cowpea flour, as source of protein, in a hypercholesterolemic and hyperlipidemic diet caused a reduction of up to 55% in total serum cholesterol in rats. Chau and colleagues⁵¹ using protein concentrate of *P. angularis*, as protein source, and a hypercholesterolemic diet verified that there were no changes in total cholesterol, LDL-C and HDL-C levels in the plasma of hamsters. In our study, the vicilins from cowpea and adzuki (7S proteins) were extensively isolated and given as a single daily oral dose to rats submitted to a hypercholesterolemic and hypolipidemic diet during 28 days.

It is important to remember that these doses are only 2.75% of the total protein ingested daily by the animals during the period. Ours results showed that cowpea and adzuki 7S proteins and simvastatin resulted in a significant decrease in food intake of rats comparative to HC and STD groups, and resulting in food efficiency higher than STD group. This lower daily food intake is probably responsible by the reduction on the medium weight gain and final weight of the rats in these groups relative to HC group. Though there is no easy explication for these observations, some authors⁵² have verified that B-conglycinin presented a suppressing effect on the food intake in rats by an increase in the cholecystokinin secretion. Hira and colleagues⁵³ verified that intake of 3 g hydrolyzate B-conglycinin was effective to Enhance fullness and reducing the feeling of hunger in human saudáveis. Also, Kohno and colleagues¹⁷ found, in a study with 126 volunteers, that the B-conglycinin consumption during 4 weeks, in the form of a sweet, resulted in a significant reduction in visceral fat, contributing to the prevention of obesity. Soybeans enriched in B-Conglycinin can provide hydrolysates that limit fat accumulation in fat cells and inflammatory pathways *in vitro* and therefore warrant further studies as a healthful food.⁵⁴ In this experimental model we observed that soybean B-conglycinin, supplied in the same daily dose to rats, led to a reduction in total plasma cholesterol in 22.9%, while the drugs rosuvastatin and fenofibrate in 35.8% and 18.8%, respectively.^{11,23} Duranti and colleagues¹⁰ verified that B-conglycinin and its sub-fraction alfa' administered to hypocholesterolemic rats have decreased by 50% the levels of cholesterol and triglycerides in the plasma; these values were comparable to the drug clofibrate in the same experiment. It is possible observe in different studies in the literature, where B-conglycinin is used as the only source of protein in the diet, its hypcholesterolemic properties.^{6,13,14,46} In the case of vicilins isolated from cowpea and adzuki beans, in this experiment (Figure 2), the levels of reduction in plasma total cholesterol were higher than

simvastatin, as well as rosuvastatin and B-conglycinin, in an another experiment.²³ However, the reduction in the triacylglycerides levels was larger for both soy B-conglycinin²³ and adzuki protein, while cowpea protein and simvastatin, practically did not affect the TG levels.

The result of the increased fecal excretion of total cholesterol observed in the groups that have ingested the proteins and simvastatin in relation to HC group, suggests that this fact can to have contributed for a reduction in the plasma levels of total cholesterol in the rats. This same observation already have been made for B-conglycinin,¹⁴ glycinin,⁴⁶ black soy peptides⁵⁵ and other legumes.⁵⁶ Nagaoka and colleagues⁵⁷ verified that a hydrolysate of soy protein presented a cholesterol-lowering effect similar to that of intact soy protein. As soy protein is not fully degraded by digestive enzymes and produces peptides that are absorbed as such; these resistant peptides may have effects on cholesterol metabolism, or even properties similar to dietary fibers and thus increase their fecal excretion, or both possibilities. Increased levels of lipoprotein lipase observed in the animals that received the protein of cowpea and adzuki and also simvastatin may be associated with reduction of TC and TG in the plasma of the animals, as noted by Mochizuki and colleagues⁵⁸ when had administered 7S soy peptides in HepG2 cells and has observed a reduction in mRNA expression of angiopoietin-like 3 (ANGPTL3), resulting in increased LPL activity in plasma and its possible consequences. ANGPTL3 is secreted by the liver into the bloodstream and directly inhibits the activity of LPL and its consequences. It is interesting to note that the increase in the non-HDL fraction was very affected by the HC diet (Table 3), however the effect of the proteins in its reduction was much greater than simvastatin. The vignins of cowpea and azuki have promoted a reduction 40% greater than than B-conglycinin,²³ in this same experimental model; 60% higher than two statins and near of the fenofibrate,¹¹ another lipid-lowering drug. The reduction of the levels of insulin observed in the animals of the groups that have received HC

diet (Table 3) can have favored the high values of the lipoproteins (non-HDL and HDL) in the plasma. Several authors have observed this reductor effect of B-conglycinin in LDL, *in vivo* and *in vitro*. A possible mechanism for the reduction of LDL has been appointed that the protein/peptide leads to an increase in mRNA expression of cellular LDL receptors,^{7,16,22,47,58,59} with the removal of the particle from bloodstream, and also promoting the secretion of ApoB-100 and consequently decreasing the secretion of VLDL.⁵⁸

The HDL-C fraction plays the important function of carry cholesterol to the liver increasing the catabolism. Statins, regardless of the dose, show a small influence on the levels of HDL-C fraction,⁶⁰ however, the association statin-B-conglycinin showed a positive effect, resulting in a higher level of HDL-C in the plasma of rats than the drug alone,²³ suggesting that the combination protein-drug had a synergic effect on the cholesterol metabolism. The most surprising effect observed with the vignins was with in HDL fraction of the animals. The vicilins increased HDL-C by 56 and 53%, while only 18.6% for simvastatin (Table 3); although expected, this is an important result since the protein drug combination may improve these values, as observed for the B-conglycinin.²³ The most interesting is that the HDL value obtained for the proteins overcomes even those of the STD group with normolipidemic diet. The ratio of HDL to total cholesterol (HDL/TC) was found to be highest for the proteins (2.33 and 2.28 times) than for simvastatin (1.49 times), this shows the importance of the effect of the protein fractions in the decrease of the non-HDL fraction in relation to statin. Contrast can be observed in LDL/HDL ratio, which showed values close for the proteins from cowpea and adzuki (1.22 and 1.28, respectively), and well greater for simvastatin (2.45). One of the risk factors for coronary heart disease (CHD) is represented by the ratio LDL/HDL cholesterol, considering the effect of each fraction separately in the atherosclerotic process.⁶¹ Thus, the atherogenic index (AI) (Table 3) reveals a sharp drop for the animals that have

ingested 7S proteins of cowpea and adzuki compared to the HC group, and reaching twice the reduction observed with simvastatin. These data suggest that these proteins may be as efficient as the simvastatin in the cardiovascular protection. From a source of different data in the literature, Anderson⁴ suggested that a prudent diet, containing soy proteins, can be a powerful tool for achieving the reduction of plasma lipids, particularly in patients who are inadequate or can not tolerant drug therapy. However, any treatment using combination drug-protein needs to be better investigated, because the safety and efficacy of such combinations do not always reflect those of the separately elements, as already observed by other authors.^{23,41} Although a number of studies have been conducted with isolated 7S soy protein, which verified their effects on the metabolism of cholesterol and tryglycerides, still there are a number of evidences that there should not be only one mechanism of action. As mentioned, different authors have shown a biochemical action, by the inhibition of certain enzymes in the metabolism of cholesterol and triglycerides.^{2,13,14,44} Also an action on gene expression, like the effect on the expression of mRNA levels of some key enzymes of sterol metabolism or mRNA of LDL-receptors, particularly in the liver tissue;^{22,24,46,54,58,59} as well as through modulation of transcription factors such as SREBP-1c, SREBP-2.^{2,54,58} The observed hypocholesterolemic effects of cowpea and adzuki 7S proteins are in agreement with those for B-conglycinin reported by different authors that have studied this fraction and the sub-fraction alfa', both *in vivo* and *in vitro*.^{10,11,12,17,22,23,46,54,58,59} The fact that these proteins were administered by an oral daily dose equivalent to only 2.75% of the daily protein intake suggests that peptides resulting of their digestion could be the active elements as already cited by Sirtori and colleagues¹ and other authors,^{16,22,44,57,58} in studies *in vivo* and *in vitro*. For the other hand, data from a hypolipidemic action of the 7S fraction from cowpea and adzuki bean represent the first confirmation that vicilins from different species, with a great sequential

homology, may have the same biological action, especially in the lipid and cholesterol metabolism.

Our results suggest that the 7S protein isolated from cowpea and adzuki present an effect in the reduction of cholesterol levels in rats, and may do so, possibly through down regulation of genes involved in cholesterol synthesis (such as HMG -CoA reductase inhibitors), cholesterol absorption (such as the LDL receptor), either by reducing the level of mRNA encoding the SREBP-2, as indicated for B-conglycinin. Moreover, there are no reports in the literature to the cited effects with the isolated proteins from cowpea and adzuki bean, and at present; our laboratory is engaged in studies to explore possible mechanisms of action of these proteins, either alone or in combination with cholesterol-lowering drugs, such as different statins. Priliminar study in our laboratory have demonstrated that the proteins B-conglycinin, cowpea and adzuki 7S fractions, and simvastatin, in this same experimental model, had affected mRNA concentrations of various enzymes such as fatty acid synthase (FAS), HMG-CoA reductase, HMG-CoA synthetase; as well as regulatory factors as SREBP-1c, SREBP-2, and LDL-receptor.

AUTHOR INFORMATION

*Corresponding author

Valdir Augusto Neves:Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences,São PauloStateUniversity. Rodovia Araraquara – Jaú, km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

Telephone: 055 (16) 3301-6935; FAX: 055 (16) 3301-6920.

e-mail: nevesva@fcfar.unesp.br

Funding

This work was funded by AgResearch Capability Fund (2009/

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/11779-3). The authors acknowledge the careful proofreading of the text by Timothy John C. Roberts (MSc).

REFERENCES

- (1) Sirtori, C.R.; Galli, C.; Anderson, J.W.; Arnoldi, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*, **2009**, *203*, 8-17.
- (2) Torres, N.; Torres-Villalvazo, I.; Tovar, A.R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J. Nut. Bioch.*, **2006**, *17*, 365-373.
- (3) Scarafoni, A.; Magni, C.; Duranti, M. Molecular nutraceuticals as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. *Trends Food Sci Technol.*, **2007**, *18*, 454-463.
- (4) Anderson, J.W. Diet first, then medication for hypercholesterolemia. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *290*, 531-533.
- (5) Food and Drug Administration. **Food labeling: health claims; soybean protein and coronary heart disease, Federal register/ rules and regulations.** **1999**, *64*, 57700-57733.
- (6) Harland, J.I.; Haffner, T.A. Systematic review, meta-analysis and regression randomized controlled trials reporting an association between an intake of circa 25 g soya protein per day and blood cholesterol. *Atherosclerosis*, **2008**, *200*, 13-27.
- (7) Jenkins, D.J.A.; Mirrahimi, A.; Srichaicul, K.; Berryman, C.E.; Wang, L.; Carleton, A.; Abdulnour, S.; Sievenpiper, J.I.; Kendall, C.W.C.; Kris-Etherton, P.M. Soy protein reduces serum cholesterol by both intrinsic and food displacement mechanism. *J Nutr.*, **2010**, *140*, 2302S-2311S.
- (8) Frota, K.M.G.; Mendonça, S.; Saldiva, R.J.C.; Arêas, J.A.G. Cholesterol-Lowering Properties of Whole Cowpea Seed and Its Protein Isolate in Hamsters. *J. Food Sci.*, **2008**, *73*, 235-240.
- (9) Macarulla, M.T.; Medina, C.; De Diego, M.A. Effects of the whole seed and protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic rats. *Br. J. Nutr.*, **2001**, *85*, 607-614.
- (10) Duranti, M.; Lovati, M.R.; Dani, V.; Barbiroli, A.; Scarafoni, A.; Castiglioni, S.; Ponzzone, C.; Morazzoni, P. The subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr.*, **2004**, *134*, 1334-1339.
- (11) Ferreira, E.S.; Silva, M.A.; Demonte, A.; Neves, V.A. B-conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Func. Foods*, **2010**, *2*, 275-283.
- (12) Ferreira, E.S.; Silva, M.A.; Demonte, A.; Neves, V.A. Soy beta-Conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. *J. Med. Food*, **2011**, *14*, 94-100.
- (13) Aoyama, T.; Kohno, M.; Saito, T. Reduction by phytate-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 1071-1075.

- (14) Fukui, K.; Kojima, M.; Tachibana, N. Effects of soybean conglucinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2004**, *68*, 1153-1155.
- (15) Pak, V.V.; Koo, M.; Lee, N. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. *Chem. Nat. Comp.*, **2005**, *41*, 710-714.
- (16) Zhong, F.; Liu, J.; Ma, J. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Inter.*, **2007**, *40*, 661-667.
- (17) Kohno, M.; Hirotaka, M.; Kito, M.; Matsuzawa, Y. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean B-conglycinin. *J. Atherosclerosis and Trombosis*, **2006**, *13*, 247-255.
- (18) Derbyshire, E.; Wright, D.J.; Boulter, D. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 3-24.
- (19) Fukuda, T.; Maruyama, N.; Salleh, M.R.M.; Mikami, B.; Utsumi, S. Characterization and crystallography of recombinant 7S globulin of adzuki bean and structure-function relationship with 7S globulins of various crops. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 4145-4153.
- (20) Schuler, M.A.; Ladin, B.F.; Pollaco, J.C. Structural sequences are conserved in the genes coding for the alpha, alpha' and beta-subunits of the soybean 7S seed storage protein. *Nucleic Acids Res.*, **1982**, *20*, 8245-8261.
- (21) Nielsen, S.S.; Deshpande, S.S.; Hermanson, M.K. et al. Comparative digestibility of legume storage proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, *5*, 896-902.
- (22) Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Gianza, E.; Arnoldi, A.; Kurowska, E.; Carroll, K.K.; Sirtori, C.R. Soy Protein Peptides Regulate Cholesterol Homeostasis in Hep G2 Cells. *J. Nutr.*, **2000**, *130*, 2543-2549.
- (23) Ferreira, E.S.; Silva, M.A.; Demonte, A.; Neves, V.A. B-conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. *Lipids Health Dis.*, **2012**, *11*, 11-18.
- (24) Consonni, A.; Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Pizzagalli, A.; Morazzoni, P.; Duranti, M. Heterologous expression and purification of the soybean 7S globulin α' subunit extension region: In vitro evidence of its involvement in cell cholesterol homeostasis. *Prot. Expr. Purif.* **2011**, *80*, 125-29.
- (25) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *193*, 265-275.
- (26) Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680-684.
- (27) National Research Council. **Guide for care and use of laboratory animals**. Publication 85-23. Revised ed. Washington, DC: National Academy of Sciences; 1985.
- (28) Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **1993**, *123*, 1939-1951.
- (29) Nath, N.; Wiener, R.; Harper, A. E. Diet and cholesterolemia, I. Development of a diet for the study of nutritional factors affecting cholesterolemia in the rat. *J. Nutr.*, **1959**, *67*, 289-307.
- (30) Stockbridge, H.; Hardy, R.I.; Glueck, C.J. Photometric determination of cholesterol (CHOD-PAP method). *J. Labor. Clin. Med.*, **1989**, *114*, 142-151.
- (31) Assmann, G. HDL-cholesterol precipitant. Randox Labs. Ltd. Crumlin Co. Antrim Northern Ireland *Internist* **1979**, *20*, 559.
- (32) Annoni, G.; Botasso, B.M.; Ciacci, D.; Donato, M.F.; Tripodi, A. Liquid triglycerides (GPO-PAP) Medi Diagnostic Italy. *J. Labor. Clin. Med.*, **1982**, *9*, 115.
- (33) Trinder, P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, **1969**, *6*, 24-25.
- (34) Liu, J.R.; Wang, S.Y.; Chen, M.J.; Chen, H.L.; Yuerh, P.Y.; Lin, C.W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British J. Nutr.*, **2006**, *95*, 939-946.

- (35) Chen, J. R.; Chiou, S. F.; Suetsuna, K.; Yang, H. Y.; Yang, S. C. Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. *Nutrition* **2003**, *19*, 676-680.
- (36) Roe, J. H.; Byler, R. E. Serum lipase determination using a one-hour period of hydrolysis. *Anal. Biochem.*, **1963**, *6*, 451-460.
- (37) Tonks, D.B.A. Study of the Accuracy and Precision of **Clinical Chemistry** Determinations in 170 Canadian Laboratories. *Clin Chem.*, **1963**, *9*, 217-233.
- (38) Korner, J.; Savontaus, E.; Chua, S. C.; Leibel, R. L.; Wardlaw, S. L. Leptina regulation of agrp and Npy mRNA in the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.*, **2001**, *13*, 959-966.
- (39) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **1957**, *226*, 497-509.
- (40) Haug, A.; Hostmark, A.T. Lipoprotein lipases, lipoaproteins and tissue lipids in rats fed fish or coconut oil. *J. Nutr.*, **1987**, *117*, 1011-1017.
- (41) Fassini, P.G.; Noda, R.W.; Ferreira, E.S.; Silva, M.A.; Neves, V.A.; Demonte, A. Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. *Lipids Health Dis.*, **2011**, *10*, 165-172.
- (42) Kobayashi, M.; Chisaki, I.; Narumi, F.; Hidaka, K.; Kagawa, T.; Itagaki, S.; Hirano, T.; Iseki, K. Association between risk of myopathy and cholesterol-lowering effect: A comparison of all statins. *Life Sci.*, **2008**, *82*, 969-975.
- (43) Redout, T.C.; Haranding, S.T.; Marinangeli, C.P.F.; Jones, P.J.H. Combination drug-diet therapies for dyslipidemia. *Transl. Res.*, **2010**, *155*, 220-227.
- (44) Wang, Y.M.; Zhang, B.; Xue, Y.; Li, Z.J.; Wang, J.F.; Yanagita, T. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipid metabolism in rats. *Nut. Met. Card. Res.*, **2010**, *9*, 4-8.
- (45) Adams, M.R.; Golden, D.L.; Franke, A.A.; Potter, S.M.; Smith, H.S.; Anthony, M.S. Dietary Soy β -Conglycinin (7S Globulin) Inhibits Atherosclerosis in Mice. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 511-516.
- (46) Moriyama, T.; Kishimoto, K.; Nagai, K. Soybean p-conglycinin diet suppresses serum triglyceride level in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, *68*, 352-359.
- (47) Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Corsini, A.; Granata, A.; Fumagalli, R.; Sirtori, C.R. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J. Nutr.*, **1992**, *122*, 197-198.
- (48) Fassini, P.G.; Ferreira, E.S.; Silva, M.A.; Neves, V.A.; Demonte, A. Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats. *Nutr. Food Sci.*, **2012**, *42*, 102-110.
- (49) Mahadevappa, V.G.; Raina, P.L. Hypocholesterolemic effect of cowpea in rats on atherogenic diet. *Indian J Med Res.*, **1983**, *78*, 819-823.
- (50) Olivera, L.; Canul, R.R.; Pacheco, F.P.; Cockburn, J.; Soldani, F.; McKenzie, N.H.; Duncan, M.; Olvera-Novoa, M.A.; Grant, G. Nutritional and Physiological Responses of Young Growing Rats to Diets Containing Raw Cowpea Seed Meal, Protein Isolate (Globulins), or Starch. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 319-325.
- (51) Chau, C-F; Cheung, P.C.K.; Wong, Y-S. Hypocholesterolemic effects of protein concentrate from three Chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3698-3701.
- (52) Nishi, T.; Hara, H.; Tomita, F. Soybean B-conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 2537-2542.
- (53) Hira, T.; Mori, N.; Nakamori, T.; Furuta, H.; Asano, K.; Chiba, H.; Hara, H. Acute effect of soybean beta-conglycinin hydrolysate ingestion on appetite sensations in healthy humans. *Appetite*, **2011**, *57*, 765-768.
- (54) Martinez-Villaluenga, C.; Dia, V.P.; Berhow, M.; Bringe, N.A.; Mejia, E.J. Protein hydrolysates from B-conglycinin enriched soybean genotypes inhibit lipid accumulation and inflammation in vitro. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, *53*, 1007-1018.
- (55) Rho, S.J.; Park, S.P.; Ahn, C.W.; Shin, J.K.; Lee, H.G. Dietetic and hypocholesterolemic action of black soy peptide in dietary obese rats. *J Sci Food Agric.*, **2007**, *87*, 908-913.

(56) Dabai, F.D.; Walker, A.F.; Sambrook, I.E. Comparative effects on blood lipids and faecal steroids of five legume species incorporated into a semi-purified, hypercholesterolaemic rat diet. *Br. J. Nutr.*, **1996**, 75;557-511.

(57) Nagaoka, S.; Kiwa, K.; Eto, M.; Kuzuya, Y.; Hori, G.; Yamamoto, K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and Caco-2 cells. *J. Nutr.*, **1999**, 1229,1725-1730.

(58) Mochizuki, Y.; Maebuchi, M.; Kohno, M.; Hirotsuka, M.; Wadahama, H.; Moryama, T.; Kawada, T.; Urade, R. Changes in lipid metabolism by soy β -conglycinin-derived peptides in HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57,1473–1480.

(59) Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Pizzagalli, A. Polypeptide from 7S soy globulin alfa' subunit up-regulates LDL-receptors in Hep-G2 cells. *FASEB J.*, **2008**, 22,303-307.

(60) Xydakis, Am., Ballantyne, C.M. Combination therapy for combined dyslipidemia. *Am. J. Card.*, **2002**, 90, 21K-29K.

(61) Castelli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W.F., Abbott, R.D., Kalousdian, .S, Kannel, W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *J. Amer. Med. Assoc.* **1986**, 256, 2835–2838.

FIGURES CAPTIONS

Figure 1. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. Proteins obtained from (A) cowpea and (B) adzuki beans. Column 1 shown total protein extract, column shown 2 protein β -vignin (7S) isolated and column MW, represent marker proteins (97 to 14.4 kDa). Sample amounts ranged from 10 μ g.

Figure 2. Plasma total cholesterol (A) and triglyceride (B) levels of rats fed HC diet without and with oral daily doses of β -vignins or simvastatin for 4 wk. Data were analyzed by one-way ANOVA. Different superscript indicators in the same figure differ significantly, where $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $^{\dagger}p < 0.001$ by the Bonferroni t-test multiple comparisons versus HC group. Each value is the mean $\pm$ SEM ($n = 9$).

Figure 3. Liver cholesterol (A) and triglyceride (B) levels of rats fed HC diet without and with oral daily doses of β -vignins or simvastatin for 4 wk. Data were analysed by one-way ANOVA. Different superscript indicators in the same figure differ significantly, where $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $^{\dagger}p < 0.001$ by the Bonferroni t-test multiple comparisons versus HC group. Each value is the mean $\pm$ SEM ($n = 9$).

TABLES

Table 1. Diet composition and treatments

	Normal diet ¹		Hypercholesterolemic diet ²		
	STD	HC	HC+7S-C	HC+7S-A	HC+SVT
<i>Ingredients (g/kg of chow)</i>					
Casein*	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Corn starch	514.5	384.5	384.5	384.5	384.5
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	-	-	-	-
Palm oil	-	200.0	200.0	200.0	200.0
Cellulose powder	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
AIN-93G mineral mixture**	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
AIN-93G vitamin mixture**	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-cystine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline birtatrate	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Cholesterol*	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cholic acid*	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Calorie percentage (%)</i>					
Protein	23.85	22.87			
Carbohydrate	69.27	54.59			
Lipid	7.88	22.54			
Calorie (kcal/g)	3.90	4.55			
<i>Treatments (mg/bw/d)</i>					
Cowpea β -vignin	-	-	300	-	-
Adzuki β -vignin	-	-	-	300	-
Simvastatin	-	-	-	--	50

¹based following the recommendation of American Institute Nutrition (AIN-93G) and ²Nath's diet [29] by adding 200 g.kg⁻¹ palm oil, 10 g.kg⁻¹ cholesterol and 5 g.kg⁻¹ g cholic acid. *Sigma-Aldrich[®], Co., USA; **PragSoluções[®], Co., Brazil. HC+7S-C = HC diet plus oral daily doses of cowpea β -vignin (300 mg/kg/day); HC+7S-A = HC diet plus oral daily doses of adzuki β -vignin (300 mg/kg/day) and HC+SVT = HC diet plus oral daily doses of simvastatin (50 mg/kg/day).

Table 2. Parameters measured of rats fed HC diet without and with oral daily doses of β -vignins or simvastatin for 4 wk¹.

	Normal diet		Hypercholesterolemic diet		
	STD	HC	HC+7S-C	HC+7S-A	HC+SVT
<i>Body weight (g/rat)</i>					
Initial	184.30 $\pm$ 3.73	183.80 $\pm$ 3.87	182.10 $\pm$ 3.90	182.00 $\pm$ 3.23	182.10 $\pm$ 3.62
Final	351.00 $\pm$ 3.48	372.50 $\pm$ 6.32	345.00 $\pm$ 7.34*	328.50 $\pm$ 8.54 [‡]	327.87 $\pm$ 6.90 [‡]
average gain	5.88 $\pm$ 0.08**	6.79 $\pm$ 0.23	5.85 $\pm$ 0.20**	5.22 $\pm$ 0.20 [‡]	5.26 $\pm$ 0.19 [‡]
Food intake (g/rat/day)	18.92 $\pm$ 0.31	18.19 $\pm$ 0.47	16.42 $\pm$ 0.53*	16.00 $\pm$ 0.46**	15.66 $\pm$ 0.45 [‡]
Fecal excretion (g/rat/day)	1.43 $\pm$ 0.04	1.60 $\pm$ 0.04	1.74 $\pm$ 0.05	1.60 $\pm$ 0.06	1.56 $\pm$ 0.05
Feeding efficiency (%)	30.18 $\pm$ 0.67 [‡]	36.01 $\pm$ 0.74	36.93 $\pm$ 0.76	34.74 $\pm$ 0.86	34.85 $\pm$ 0.86
<i>Organ weights (g/rat)</i>					
Liver	11.41 $\pm$ 0.32 [‡]	19.72 $\pm$ 0.72	19.34 $\pm$ 0.65	16.06 $\pm$ 0.65 [‡]	18.49 $\pm$ 0.71
Adipose tissue epididymal	2.58 $\pm$ 0.21 [‡]	5.16 $\pm$ 0.33	4.16 $\pm$ 0.33	4.31 $\pm$ 0.34	4.72 $\pm$ 0.31
Heart	1.21 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.03	1.19 $\pm$ 0.04	1.11 $\pm$ 0.05	1.06 $\pm$ 0.03*
<i>Tissue weight/body weight (% , g/100g)</i>					
Hepatic	3.20 $\pm$ 0.08 [‡]	5.51 $\pm$ 0.10	5.79 $\pm$ 0.18	4.95 $\pm$ 0.12*	5.43 $\pm$ 0.18
Epididymal fat	0.71 $\pm$ 0.06 [‡]	1.39 $\pm$ 0.09	1.17 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.09	1.52 $\pm$ 0.09
Cardiac	0.36 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01

¹Values with different superscript indicators in the same row differ significantly, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and [‡] $p < 0.001$ by the Bonferroni *t*-test multiple comparisons versus HC group. Each value is the mean $\pm$ SEM ($n = 9$). STD = normal diet, AIN-93G composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93G plus 20 g/100 g palm oil, 1 g/100 g cholesterol and 0.5 g/100 g cholic acid; HC+7S-C = HC diet plus oral daily doses of cowpea β -vignin (300 mg/kg/day); HC+7S-A = HC diet plus oral daily doses of adzuki β -vignin (300 mg/kg/day) and HC+SVT = HC diet plus oral daily doses of simvastatin (50 mg/kg/day).

Table 3. Plasma, liver and fecal parameters analyzed of rats fed HC diet without and with oral daily doses of β -vignins or simvastatin for 4 wk¹

	Normal diet		Hypercholesterolemic diet		
	STD	HC	HC+7S-C	HC+7S-A	HC+SVT
<i>Plasma (mmol/L)</i>					
nonHDL-C	0.50 $\pm$ 0.06 [‡]	2.93 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.16 [‡]	1.37 $\pm$ 0.01 [‡]	2.03 $\pm$ 0.25 [‡]
HDL-C	0.96 $\pm$ 0.04*	0.70 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.05 [‡]	1.07 $\pm$ 0.08 [‡]	0.83 $\pm$ 0.09
AI	0.55 $\pm$ 0.08 [‡]	4.23 $\pm$ 0.26	1.24 $\pm$ 0.16 [‡]	1.39 $\pm$ 0.20 [‡]	2.89 $\pm$ 0.28 [‡]
Glucose	6.27 $\pm$ 0.15	5.86 $\pm$ 0.15	6.27 $\pm$ 0.12	5.42 $\pm$ 0.27	6.85 $\pm$ 0.26*
Insulin	0.60 $\pm$ 0.09 [‡]	0.30 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.08
<i>Liver (μmol/g)</i>					
Total cholesterol	4.39 $\pm$ 0.20 [‡]	23.37 $\pm$ 0.91	20.18 $\pm$ 0.53**	21.23 $\pm$ 1.01	20.73 $\pm$ 0.38*
Triacylglycerides	45.82 $\pm$ 2.76 [‡]	76.65 $\pm$ 2.94	63.58 $\pm$ 2.24 [‡]	74.54 $\pm$ 1.64	72.10 $\pm$ 1.53
<i>Fecal(mg/d)</i>					
Total fat	60.97 $\pm$ 1.26 [‡]	152.99 $\pm$ 1.97	170.99 $\pm$ 1.05 [‡]	179.86 $\pm$ 0.73 [‡]	168.96 $\pm$ 1.51 [‡]
Total cholesterol	1.77 $\pm$ 0.03 [‡]	21.93 $\pm$ 0.09	23.55 $\pm$ 0.08 [‡]	24.74 $\pm$ 0.10 [‡]	23.62 $\pm$ 0.12 [‡]

¹Values with different superscript indicators in the same row differ significantly, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and [‡] $p < 0.001$ by the Bonferroni *t*-test multiple comparisons versus HC group. Each value is the mean $\pm$ SEM ($n = 9$). STD = normal diet, AIN-93G composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93G plus 20 g/100 g palm oil, 1 g/100 g cholesterol and 0.5 g/100 g cholic acid; HC+7S-C = HC diet plus oral daily doses of cowpea β -vignin (300 mg/kg/day); HC+7S-A = HC diet plus oral daily doses of adzuki β -vignin (300 mg/kg/day) and HC+SVT = HC diet plus oral daily doses of simvastatin (50 mg/kg/day).

Table 4. Plasma enzyme activity of rats fed HC diet without and with oral daily doses of β -vignins or simvastatin for 4 wk¹

Enzyme activity (mmol/L)	Normal diet		Hypercholesterolemic diet ¹		
	STD	HC	HC+7S-C	HC+7S-A	HC+SVT
Lipoprotein lipase	5.42 $\pm$ 0.27 [*]	16.73 $\pm$ 0.81	32.16 $\pm$ 2.68 [*]	27.22 $\pm$ 1.56 [*]	29.01 $\pm$ 1.31 [*]
Glutamic pyruvic transaminase	12.28 $\pm$ 0.31 [‡]	19.18 $\pm$ 1.06	18.75 $\pm$ 0.93	20.89 $\pm$ 0.92	19.32 $\pm$ 0.77

¹Values with different superscript indicators in the same row differ significantly, where * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and [‡] $p < 0.001$ by the Bonferroni t-test multiple comparisons versus HC group. Each value is the mean $\pm$ SEM ($n = 9$). STD = normal diet, AIN-93G composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93G plus 20 g/100 g palm oil, 1 g/100 g cholesterol and 0.5 g/100 g cholic acid; HC+7S-C = HC diet plus oral daily doses of cowpea β -vignin (300 mg/kg/day); HC+7S-A = HC diet plus oral daily doses of adzuki β -vignin (300 mg/kg/day) and HC+SVT = HC diet plus oral daily doses of simvastatin (50 mg/kg/day).

FIGURE/GRAPHICS

Figure 1

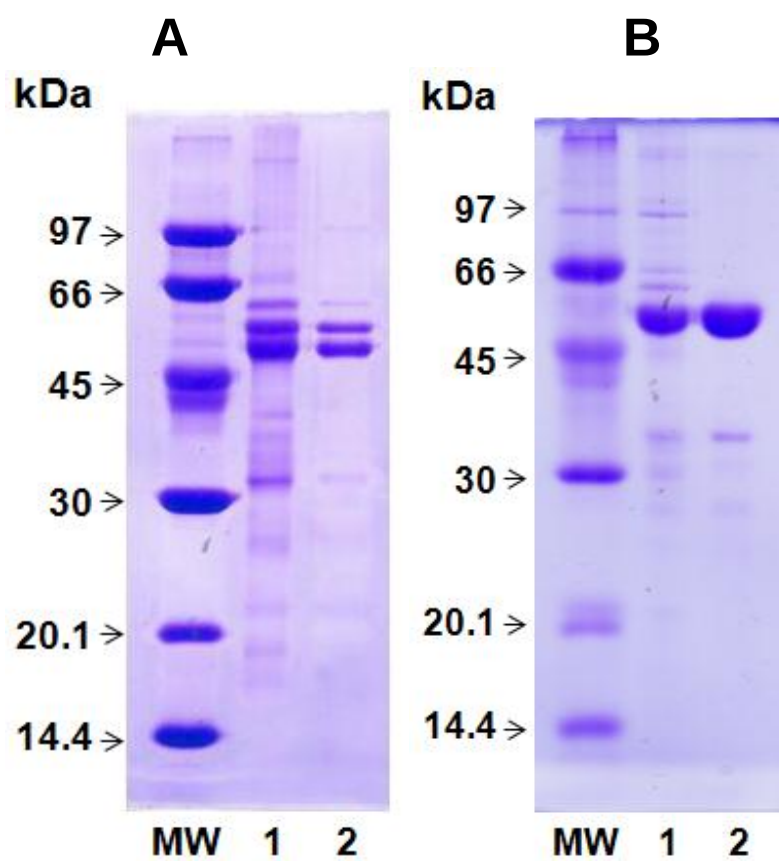


Figure 2

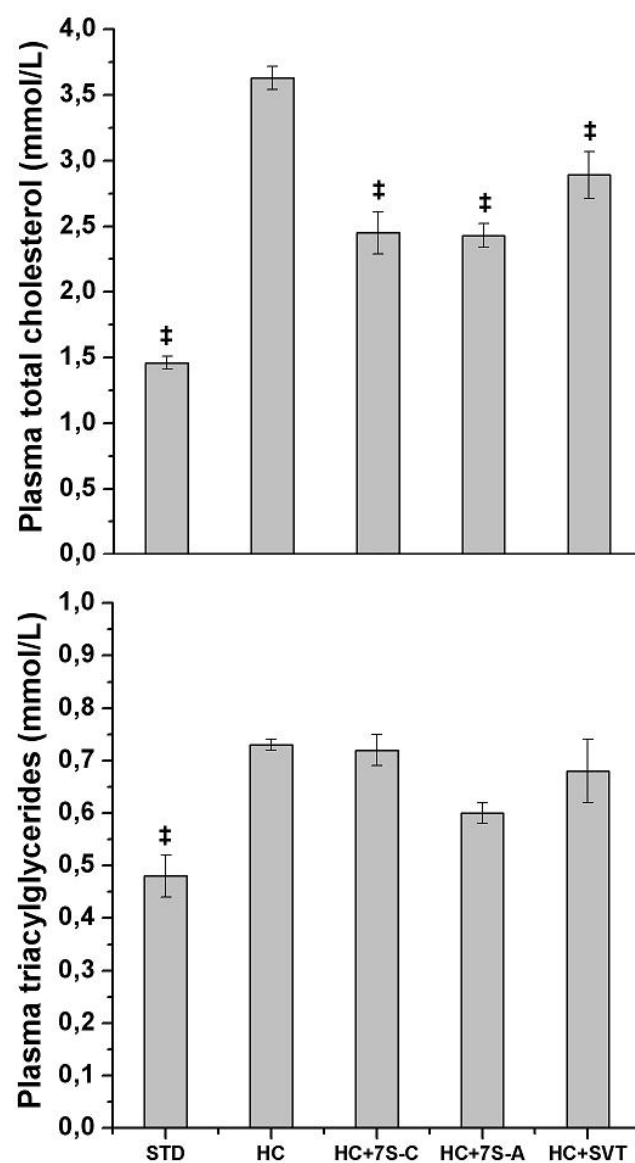


Figure 3.

