UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

PRISCILA GIÁCOMO FASSINI

Estudo experimental do efeito da proteína glicinina da soja (*Glycine max* L.) no metabolismo do colesterol

ARARAQUARA
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

PRISCILA GIÁCOMO FASSINI

Estudo experimental do efeito da proteína glicinina da soja (*Glycine max* L.) no metabolismo do colesterol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR/UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, na área de Ciências Nutricionais.

Orientadora: Profa. Dra. Aureluce Demonte

ARARAQUARA
2010

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

Fassini, Priscila Giácomo
F249e Estudo experimental do efeito da proteína glicinina da soja (*Glycine* Max L.) no metabolismo do colesterol / Priscila Giácomo Fassini. – Araraquara, 2010
87 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Aureluce Demonte

. 1. Soja. 2. Glicinina. 3. Modelo experimental. 4. Rosuvastatina. 5. Hipercolesterolemia. I. Demonte, Aureluce, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

PRISCILA GIÁCOMO FASSINI

Estudo experimental do efeito da proteína glicinina da soja (*Glycine max* L.) no metabolismo do colesterol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR/UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, na área de Ciências Nutricionais.

Araraquara, 29 de novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Aureluce Demonte (Orientadora)

_____

Prof. Dr. Valdir Augusto Neves (Membro titular)

_____

Profa. Dra. Olga Luisa Tavano (Membro titular)

_____

Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini (Membro Suplente)

_____

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Membro Suplente)

Dedico:

Aos meus amados pais Mércia e João Carlos, que sempre lutaram para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs Ludmila e Camila, e sobrinhas Ana Luiza e Manuela por estarem sempre iluminando os meus dias.

Aos meus avós, e com carinho ao meu avô João Giácomo, que a vida toda me incentivou e torceu por mim. Sei que onde quer que esteja, estará vibrando por esta conquista, e sempre vivo dentro do meu pensamento e do meu coração.

Agradeço:

A Deus, pela vida, pela saúde física e mental e pelas oportunidades de crescimento concedidas.

À Profa. Dra. Aureluce Demonte, exemplo de dedicação e comprometimento profissional, pela oportunidade, amizade, carinho e pelas preciosas orientações e incentivos demonstrados permanentemente no decorrer deste aprendizado. Levarei comigo seus ensinamentos e sua imagem como pessoa e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Valdir Augusto Neves, que colaborou com sua infinita sabedoria para a concretização deste estudo, pela amizade e pelas valiosas contribuições em todos os passos desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini e À Profa. Dra. Olga Luisa Tavano, por terem aceitado compor a banca examinadora, por toda atenção e enriquecedoras sugestões ao trabalho.

À Mara, pelo auxílio incondicional em todas as etapas deste trabalho, pelo incentivo e pela amizade.

Ao Ederlan, pela dedicação e ajuda no início dos experimentos.

Ao Roberto Noda, Guto Baio, Valéria, Roseli e Elisabete, pelo valioso auxílio prestado.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca pela inestimável e constante atenção em todos os momentos que necessitei.

Aos docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, o meu sincero agradecimento pelo conhecimento disponibilizado e pela contribuição fundamental em minha formação acadêmica e pessoal.

À minha família, personagens importantes em cada novo desafio, pelo amor, ensinamentos, apoio e cumplicidade durante toda a minha vida.

Ao Caio, pelo companheirismo, carinho, paciência e suporte indispensável nesta caminhada.

Às queridas amigas Kakaia, Luciana, Pri Angelo e Patrícia, que sempre me fortaleceram e incentivaram a ultrapassar as barreiras e dificuldades, tornando meus dias mais alegres e iluminados. Obrigada por fazerem parte da minha vida, por serem tão especiais! Vocês estarão sempre em meu coração.

Ao Renato, pela importante ajuda, apoio e incentivo neste projeto.

A todos os colegas de turma, companheiros de disciplinas e desafios, por compartilhar estes anos de estudo e pelos momentos de descontração.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Dizer-lhes muito obrigada é muito pouco e não expressa em plenitude toda a gratidão que sinto por vocês!

CAPÍTULO 1

RESUMO

A globulina 11S (glicinina) é a proteína predominante da soja e tem sido extensivamente caracterizada. Além das suas propriedades nutricionais, há evidências de sua participação na redução das concentrações lipídicas do soro. Por outro lado, o fármaco rosuvastatina tem suas ações demonstradas no metabolismo lipídico, por reduzir a fração LDL-colesterol, bloqueando a chave do processo de produção de colesterol hepático. Embora a eficiência do medicamento seja comprovada, é importante considerar a alimentação como uma possível ação somatória, tendo em vista os graves problemas ocasionados pelas alterações lipídicas no organismo. À vista do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo estudar o efeito da glicinina isolada da soja em comparação ao fármaco rosuvastatina em animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Foram elaboradas duas dietas, uma padrão, contendo caseína como proteína (AIN-93M), e outra hipercolesterolêmica, composta pela dieta padrão adicionada de 1% de colesterol e 0.5% de ácido cólico. A proteína glicinina de soja (300 mg/kg de peso corporal) e o fármaco rosuvastatina (10 mg/Kg de peso corporal), ambos solubilizados em solução salina, foram administrados por gavagem. Foram utilizados ratos machos Wistar mantidos em gaiolas individuais sob condições adequadas. Os animais foram separados em cinco grupos (n = 9): 1) grupo padrão (STD) recebeu a dieta padrão; 2) grupo hipercolesterolêmico (HC) recebeu apenas a dieta hipercolesterolêmica; 3) grupo (HC+11S) recebeu a dieta e a proteína glicinina da soja; 4) grupo (HC+ROS) recebeu a dieta e o fármaco; 5) grupo (HC+ROS+11S) recebeu a dieta, a proteína e o fármaco. Ao final de 28 dias os animais foram sacrificados e o sangue removido para análises bioquímicas de colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C) e triglicérides (TG) plasmático, CT e TG hepático. Os resultados indicaram que a dieta experimental foi capaz de assegurar o modelo hipercolesterolêmico e que a dose única da proteína isolada simulou, de forma eficiente, a comparação com o fármaco. No grupo HC+11S foi observada a influência da glicinina, especialmente no aumento da lipoproteína HDL-colesterol plasmático e na redução do triglicerídeo hepático. Por outro lado, os resultados do grupo HC+11S+ROS indicaram interação negativa entre o fármaco e a glicinina no metabolismo lipídico, sugerindo continuidade dos estudos para elucidação do mecanismo.

Palavras-chave: soja, glicinina, modelo experimental, rosuvastatina, hipercolesterolemia.

ABSTRACT

The 11S globulin (glycinin) is the predominant protein of soybeans and has been extensively characterized. In addition to its nutritional properties there is evidence of its action in reducing serum lipid concentrations. Moreover, the drug rosuvastatin has demonstrated its effects on lipid metabolism, by reducing LDL cholesterol and blocking the key enzyme in the process of cholesterol production in the liver. Although the efficiency of the drug is proven, it is important to consider the sum of its action and that of food, in view of the serious problems caused by changes in body fat. In view of the foregoing, the aim of the present study was to investigate the effects of isolated soy glycinin, as compared to the drug rosuvastatin, in rats subjected to a hypercholesterolemic diet. Two diets were prepared, a standard diet, containing casein as protein (AIN-93M), and a hypercholesterolemic, consisting of the standard diet plus 1% cholesterol and 0.5% cholic acid. The glycinin (300 mg/kg body weight) and the rosuvastatin (10 mg/kg body weight), both dissolved in saline, were administered by gavage. Male Wistar rats were kept in individual cages under appropriate conditions. The animals were divided into five groups (n=9): 1) standard group (STD) received the standard diet; 2) hypercholesterolemic group (HC) received the hypercholesterolemic diet alone; 3) group HC+11S received the HC diet and the glycinin; 4) group HC+ROS received the HC diet and the drug; 5) group HC+ROS+11S received the HC diet, the protein and the drug. After 28 days, the animals were sacrificed and the blood removed for biochemical analysis of total plasma cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG), and hepatic TC and TG. The results indicated that the experimental HC diet was able to induce hypercholesterolemia and that a single daily dose of the isolated protein was appropriate for a comparative study with the drug. In group HC+11S, the influence of glycinin was observed especially in increasing plasma HDL-cholesterol and reducing hepatic triglycerides. However, the results of the group HC+11S+ROS indicated a negative interaction between the drug and glycinin in lipid metabolism, suggesting a need for continuing studies to elucidate the mechanisms involved.

Keywords: soybean, glycinin, experimental model, rosuvastatin, hypercholesterolemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de obtenção da fração protéica globulina 11S. 35

Figura 2 – SDS-PAGE em condições redutoras das globulinas 11S, 7S e extrato protéico total isoladas da soja 46

Figura 3 – Concentração sérica de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias..... 51

Figura 4 – Concentração sérica de triglicerídeo dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias..... 54

Figura 5 – Concentração sérica da lipoproteína HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias..... 56

Figura 6 – Concentração sérica da fração não-HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias..... 59

Figura 7 – Índice aterogênico dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias 61

Figura 8 – Concentração hepática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias..... 64

Figura 9 – Concentração hepática de triglicerídeo dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais 39

Tabela 2 – Grupos de animais e os diferentes tratamentos empregados no experimento durante 28 dias..... 40

Tabela 3 – Composição centesimal da farinha de soja. 45

Tabela 4 – Peso corpóreo e ingestão alimentar dos grupos experimentais após 28 dias. 49

Tabela 5 – Peso do fígado e índice hepato-somático (IHS) dos grupos experimentais após 28 dias 50

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN	American Institute of Nutrition
AHA	American Heart Association
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Apo B	Apolipoproteína B
Da	Dalton
DCV	Doenças cardiovasculares
FDA	Food and Drud Administration
g	unidade de medida da força centrífuga
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade - Colesterol
Hep G2	Cultura de célula hepática humana
HMG-CoA	Enzima 3-hidroxi-3-Metilglutaril CoA redutase
IHS	Índice hepato-somático
ILSI Europe	International Life Institute
IMC	Índice de massa corporal
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade - Colesterol
mmol/L	Milimol por litro
NCEP	National Cholesterol Education Program
µmol/g	Micromol por grama
m/v	Relação massa-volume
kDa	Quilo dalton
VLDL-C	Lipoproteína de muito baixa densidade - Colesterol
rpm	Rotação por minuto
S	Unidades Svedberg
SREBPs	Proteínas ligantes do elemento regulatório de esterol
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

1.1 O grão de soja 13
1.2 Composição da proteína da soja 14
1.3 A proteína da soja como composto funcional 16
1.4 O papel das globulinas no metabolismo lipídico 23
1.5 Tratamento farmacológico da hipercolesterolemia 25
1.6 Interação fármaco-nutriente 27

2. OBJETIVOS 29

2.1 Objetivo Geral 30
2.2 Objetivos Específicos 30

3. MATERIAL E MÉTODOS 31

3.1 Material 32
3.1.1 Análise da composição química da farinha de soja 32
3.1.2 Extração da fração lipídica da farinha de soja 33
3.1.3 Extração e isolamento da proteína glicinina da soja 33
3.1.4 Determinação da proteína 35
3.1.5 SDS-PAGE da proteína globulina 11S 36
3.2 Avaliação biológica 37
3.2.1 Dietas experimentais 37
3.2.2 Protocolo experimental 37
3.2.3 Crescimento ponderal e consumo alimentar 40
3.2.4 Coleta do material biológico 40
3.2.5 Análises bioquímicas séricas 41
3.2.6 Análises dos lipídeos hepáticos 42
3.2.7 Índice hepato somático 42
3.3 Análise estatística 42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44

4.1 Análise da composição química da farinha de soja 45
4.2 Determinação da proteína glicinina 45
4.3 SDS-PAGE da proteína globulina 11S 46
4.4 Dietas experimentais, peso corpóreo e consumo alimentar 47
4.5 Peso do fígado e índice hepato-somático 47
4.6 Lipídeos e lipoproteínas plasmáticas 51
4.7 Lipídeos hepáticos 64

5. CONCLUSÃO 68

6. REFERÊNCIAS 70

ANEXO 86

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 87

1. INTRODUÇÃO

1.1 O grão de soja

Os grãos de leguminosas são considerados valiosas fontes de proteínas dos alimentos. Nesse sentido, a soja se destaca, uma vez que apresenta um elevado teor de proteínas em relação a outras leguminosas (SCARAFONI et al., 2007).

Os grãos de soja se caracterizam por conter cerca de 20% de óleo, 40% de proteína, 35% de carboidratos, 5% de cinzas e, em menor concentração, saponinas, isoflavonas, ácido fítico e outros componentes responsáveis pelo sabor característico da farinha de soja crua, sendo que as quantidades dos nutrientes variam entre os diferentes cultivares. Uma vez que o teor de água do grão maduro é 13%, o que garante a estabilidade de armazenamento, em base úmida a soja contém cerca de 35% de proteína, 17% de óleo, 31% de carboidratos, 4,4% de cinzas. A maioria dos ácidos graxos presentes na soja são insaturados, sendo que o ácido linoléico compreende aproximadamente 53% do total de ácidos graxos do óleo de soja, seguido, em ordem decrescente, pelo ácido oléico (23,4%), palmítico (11%), linolênico (7,8%) e esteárico (4%). Em proporções mais reduzidas, também estão presentes os ácidos graxos docosanóico, araquídico, palmitoléico e mirístico (LIU, 1999).

A composição dos carboidratos mostra a presença de traços de monossacarídeos, como glicose e arabinose, e quantidades mensuráveis de dissacarídeos e oligossacarídeos, podendo a sacarose variar de 2,5 a 8,2%, a rafinose de 0,1 a 0,9%, e estaquiose de 1,4 a 4,1%. Encontram-se, ainda, polissacarídeos insolúveis em água incluindo a celulose, hemicelulose, além de traços de amido. Dentre os minerais presentes na soja, o potássio é encontrado em maior concentração, seguido por fósforo, magnésio, enxofre, cálcio e sódio. O grão de soja também apresenta as vitaminas hidrossolúveis tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, e as vitaminas lipossolúveis alfa-tocoferol e a pró-vitamina β-caroteno. (LIU, 1999).

A soja possui uma longa história como fonte protéica de gêneros alimentícios, especialmente ligados a produtos da tradição oriental como tofu, shoyu, missô,

dentre outros. Embora com padrões alimentares bem estabelecidos no Oriente, o uso da proteína de soja no Ocidente ocorreu a partir da década de 1930 (pós I Guerra Mundial), dado o desenvolvimento industrial iniciado nesse período (WOLF, 1970). A produção e a disponibilidade de uma grande variedade de espécies tecnologicamente desenvolvidas da proteína de soja e os crescentes custos da produção de proteína animal geraram considerável interesse neste alimento como substituto às proteínas de carne e leite (IQBAL et al., 2006). Atualmente, várias formas comerciais onde se encontra proteína de soja estão disponíveis, sendo uma delas a "farinha de soja" – material inicial deste estudo –, cujo conteúdo mínimo de proteína oscila entre 40 a 50%, dependendo da quantidade de gordura, carboidrato, e do tipo de cultivo (WOLF, 1970).

1.2 Composição da proteína da soja

As proteínas da soja são constituídas por uma mistura de α-, β-, e γ-conglicininas, glicinina e outras globulinas, cujos pesos moleculares variam de 140 a 300 kDa, diferenciando-se pelas suas propriedades físico-químicas, heterogeneidade das cadeias polipeptídicas advindas do tamanho e níveis de carga de sua origem multigênica, e modificações pós-translacionais que sofrem após biossíntese (SCARAFONI et al., 2007). Além do quadro protéico majoritário, os grãos apresentam outras proteínas, incluindo β-amilase, citocromo c, lectina, lipoxigenase, urease, o inibidor de tripsina Kunitz e o inibidor de quimotripsina e tripsina Bowman-Birk (FRIEDMAN e BRANDON, 2001).

O principal grupo das proteínas de reserva presente nas leguminosas, incluindo a soja, são as globulinas, assumindo importância significativa na alimentação humana e animal (DURANTI, 2006). A proporção de globulinas na proteína total varia com o gênero, a espécie e a variedade botânica, compreendendo 50 a 80% da fração protéica. Por serem majoritárias, são, de modo geral, responsáveis pelas propriedades físicas e nutricionais dessas sementes, de suas farinhas e dos

produtos protéicos delas obtidos (LOURENÇO, 2000). São insolúveis em água, podendo ser extraídas da semente utilizando-se soluções salinas em valores de pH acima de seu ponto isoelétrico (SGARBIERI, 1996; DURANTI e GIUS, 1997; WOLF, 1970).

A globulina de leguminosas é constituída de duas proteínas, isoladas pela primeira vez em ervilhas e denominadas legumina e vicilina, que apresentam coeficientes de sedimentação em ultracentrifugação de 11 e 7 unidades Svedberg, respectivamente. Por isso, as globulinas, isoladas de outras leguminosas que apresentam coeficientes de sedimentação semelhantes, são referidas na literatura como globulinas 11S e 7S (SGARBIERI, 1996; DURANTI e GIUS, 1997). No caso das globulinas da soja, a ultracentifugação separa as proteínas em quatro frações com velocidades de sedimentação equivalentes a 2, 7, 11 e 15S. A globulina 11S é denominada glicinina e a 7S β-conglicinina, representando as duas principais proteínas da soja e, juntas, perfazendo 70% da proteína total contida nesta leguminosa (WOLF, 1970; LOURENÇO, 2000). As globulinas são reconhecidamente pobres em aminoácidos sulfurados metionina e cisteína, sendo que, as globulinas 11S, de uma forma geral, contêm maiores quantidades desses aminoácidos do que a globulina 7S (DURANTI e GIUS, 1997; LOURENÇO, 2000). Por outro lado, contêm quantidades adequadas de lisina (LOURENÇO, 2000; IQBAL et al., 2006; DURANTI, 2006).

A estrutura da 7S é formada, geralmente, por um trímero de polipeptídeos de 40 a 75 kDa, constituindo uma proteína nativa de aproximadamente 150 a 170 kDa, enquanto a 11S apresenta-se na forma oligomérica (normalmente hexâmeros), com cerca de 350 kDa, sendo menos suscetíveis à dissociação, exceto em pH muito baixo (DURANTI e GIUS, 1997; LOURENÇO, 2000).

A globulina 11S representa mais de 50% da proteína total na maioria das variedades da soja e apresenta estrutura quaternária complexa, constituída por dois anéis hexagonais justapostos com seis subunidades, estabilizada por interações hidrofóbicas e eletrostáticas (LOURENÇO, 2000). Cada subunidade é composta por

um polipeptídeo ácido (A) e um básico (B), que são unidos entre si por ligação dissulfeto. Cinco subunidades principais foram identificadas, $A_{1a}B_{1b}$, A_2B_{1a}, $A_{1b}B_2$, A_3B_4 e $A_5A_4B_3$, que podem ser divididas em dois grupos com base na homologia da sequência de aminoácidos, sendo o grupo I ($A_{1a}B_{1b}$, A_2B_{1a}, $A_{1b}B_2$) e grupo II (A_3B_4 e $A_5A_4B_3$). A composição de subunidades da glicinina varia entre os diferentes cultivares de soja e a heterogeneidade de cada espécie provavelmente afeta a função das proteínas da soja (ZHANG et al., 2002; CHOI et al., 2002). Devido à sua importante contribuição para a qualidade nutricional do grão de soja, ela tem sido extensivamente caracterizada. Até o momento, têm sido descritos cinco genes que codificam cada uma das subunidades conhecidas por compor a glicinina (BEILINSON et al., 2002).

1.3 A proteína da soja como composto funcional

Além de suas propriedades nutricionais, as proteínas das leguminosas podem ser precursoras de peptídeos biologicamente ativos e se inserem no crescente campo de investigação de compostos funcionais dos alimentos (SUGANO et al., 1990; DURANTI, 2006; WANG e MEJIA, 2005; SCARAFONI et al., 2007).

O termo "alimentos funcionais" não possui uma definição aceita universalmente, mas um significado mais completo foi proposto pelo International Life Sciences Institute (ILSI Europe, 1999), afirmando que "um alimento pode ser considerado funcional se demonstrar afetar satisfatoriamente uma ou mais funções benéficas no corpo, além de uma nutrição adequada, de forma que seja relevante para um melhor estado de saúde e bem-estar e/ou para a redução de risco de doença".

A dieta e o estilo de vida voltados à prevenção de doenças cardiovasculares têm recebido incentivos significativos a partir de recentes recomendações dietéticas, com o potencial de diminuir os níveis séricos de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) em 30% ou mais, assim como reduzir a pressão arterial e,

possivelmente, o peso corporal. Proteínas vegetais de leguminosas, particularmente da soja, podem reduzir o LDL-C em animais experimentais e em humanos com hipercolesterolemia. Portanto, os benefícios auxiliares da soja e de outras proteínas vegetais são de considerável interesse terapêutico (SIRTORI et al., 2009).

Neste contexto, as proteínas da soja vêm sendo estudadas em relação à sua funcionalidade com possível interferência no metabolismo do colesterol. A substituição de proteínas de origem animal por proteínas vegetais, como as derivadas da soja, associadas a dietas contendo colesterol, reduz os níveis séricos do colesterol total e do LDL-C em diversas espécies animais (NAGATA et al., 1982; TERPSTRA, 1982; SIRTORI et al. 1984; CARROLL e KUROWSKA, 1995). As informações de estudos experimentais em animais sobre o efeito hipocolesterolêmico da proteína da soja têm sido confirmadas em numerosos estudos em humanos (SIRTORI et al., 1979; LOVATI et al., 1987; NAGATA et al., 1998; WONG et al., 1998; CARROLL e KUROWSKA, 1995; TONSTAD et al., 2002), apontando uma redução de colesterol estatisticamente significativa na ordem de 6 a 12% (FRIEDMAN e BRANDON, 2001).

Os dados da literatura sugerem que o consumo de proteínas de soja reduz os fatores de risco para doença cardiovascular e pode estar associado a uma menor incidência de doenças crônicas (XIAO, 2008). Estudos epidemiológicos constataram que as populações asiáticas, que consomem 30 a 50 vezes mais soja do que as populações ocidentais apresentam uma menor prevalência de muitas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares (DCV) (WAKAI et al., 1999). O consumo de leguminosas por pelo menos quatro vezes na semana reduz o risco de doenças do coração em 22% comparado à frequência de uma vez na semana (BAZZANO et al., 2001).

A sugestão de que a soja apresenta efeito hipocolesterolêmico data de 1940, quando Meeker e Kesten (1940) observaram que coelhos alimentados com farinha de soja bruta não desenvolviam hipercolesterolemia comparados a coelhos alimentados com caseína como proteína padrão.

O primeiro estudo sobre o efeito da proteína de soja na redução de colesterol em humanos foi relatado em 1967 e demonstrou que a substituição de proteínas mistas por produtos contendo proteína de soja isolada, numa ingestão de 100 gramas por dia, reduziu em 2,59 mmol/L os níveis de colesterol de homens hipercolesterolêmicos (HODGES et al, 1967). No entanto, maior atenção foi voltada a esse benefício quando uma meta-análise publicada por Anderson et al. (1995) analisou 38 estudos envolvendo 743 indivíduos com uma ingestão média de 47 gramas de proteína de soja por dia, sendo que em 14 dos estudos a ingestão foi menor ou igual a 31 gramas por dia. Verificou-se uma redução significativa de 9,3% do colesterol total, 12,95% do LDL-colesterol e 10,5% do triglicerídeo nas concentrações plasmáticas.

Em estudo envolvendo 4838 japoneses, de ambos os sexos, foi verificada uma relação inversa significativa entre o consumo de soja e o nível de colesterol plasmático com base na aplicação de um questionário de frequência alimentar (NAGATA et al., 1998).

Wong et al. (1998) observaram que o consumo de dieta à base de soja induziu uma diminuição significativa dos níveis de LDL-C em homens normocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos.

Após dezenas de evidências científicas demonstrarem que o consumo de proteínas da soja – substituindo proteínas animais – reduz o nível de colesterol sanguíneo, em 1999 o Food and Drug Administration (FDA) aprovou a seguinte alegação de saúde referente às proteínas da soja: "As dietas com baixo teor de gordura saturada e colesterol que incluem 25 gramas de proteína de soja por dia podem reduzir o risco de doenças do coração". Além disso, também afirmou que "as evidências não sustentam que as isoflavonas da soja apresentem papel significativo nos efeitos de redução do colesterol da proteína da soja".

As alegações de saúde sobre uma possível associação entre o consumo de proteína de soja e a redução dos níveis de colesterol sanguíneo ou diminuição do

risco de doença cardíaca têm sido aprovadas em nove países desde 1996 (XIAO, 2008).

Mais recentemente, os resultados de uma meta-análise que avaliou 41 estudos randomizados e controlados, totalizando 1756 indivíduos adultos com ou sem hipercolesterolemia, indicou que a suplementação de proteína de soja isolada, variando de 20 a 61 gramas por dia, reduziu o colesterol total, a lipoproteína LDL-C, o triglicerídeo e aumentou ligeiramente a lipoproteína de alta densidade (HDL-C), concluindo que a substituição de alimentos ricos em gordura saturada e colesterol por proteína de soja pode ter um efeito benéfico sobre os fatores de risco coronariano (REYNOLDS et al., 2006).

Em 2000, o Comitê de Nutrição da American Heart Association (AHA) divulgou uma consultoria científica sobre proteína de soja e doença cardiovascular, concluindo que "é prudente recomendar a inclusão de alimentos com proteína de soja em uma dieta baixa em gordura saturada e colesterol para promover a saúde cardíaca" (ERDMAN, 2000). Desde então, muitos estudos foram conduzidos com proteína de soja e isoflavonas. Por esta razão, o Comitê de Nutrição da AHA decidiu reavaliar as evidências sobre proteína de soja e DCV e atualizar a sua assessoria científica com foco na lipoproteína LDL-C, por ser o fator de risco para DCV mais estudado e o principal critério utilizado pelo National Cholesterol Education Program (NCEP) para estimativa de risco e recomendação de terapia, constituindo base para a alegação de saúde aprovada pelo FDA (1999). Os resultados de 22 ensaios clínicos randomizados avaliados mostraram que o consumo médio de 50 gramas por dia de proteína de soja contendo isoflavonas diminuiu em 3% a concentração sérica do colesterol LDL, em comparação à caseína ou proteína do leite. Não foram evidenciados efeitos significativos sobre o colesterol HDL, triglicérides, lipoproteína (a) ou pressão arterial (SACKS et al., 2006).

Além das proteínas, uma variedade de compostos da soja, incluindo aminoácidos e peptídeos, saponinas, ácido fítico, inibidores de tripsina, fibras e isoflavonas estão descritos isolados ou em combinação influenciando o metabolismo

do colesterol (POTTER et al., 1995). A identificação dos componentes da soja responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico recebeu uma contribuição significativa a partir dos estudos clínicos iniciais, em que os produtos de proteína de soja continham menos de 0,15 mg/g de isoflavonas comparados ao conteúdo de 2 a 3 mg/g encontrado frequentemente na maioria dos produtos comerciais (SIRTORI et al., 1997). Os resultados mostraram que, embora a responsabilidade de redução do colesterol tenha sido atribuída inicialmente aos fitoestrógenos a partir de estudo em macacos (ANTHONY et al., 1996), pesquisas mais recentes concluíram que as isoflavonas da dieta não contribuem para a ação hipocolesterolêmica, sendo a porção de proteínas, isenta de componentes de isoflavonas, a provável responsável pelo efeito hipocolesterolêmico (SACKS et al., 2006; GREAVES et al., 1999; LOVATI et al., 2000; SIRTORI et al., 2005).

Esta constatação foi confirmada por Fukui et al. (2002), que verificaram, em ratos tratados com isolado protéico de soja isento de isoflavonas, uma redução significativa da concentração sérica do colesterol total, quando comparado àqueles tratados com caseína. A adição de concentrado de isoflavona nestes grupos não influenciou este parâmetro lipídico. Da mesma forma, o efeito da redução do colesterol plasmático em ratos foi atribuído exclusivamente à proteína da soja por Fukui et al. (2004), após comparação da administração de isolado protéico de soja antes e após o tratamento com etanol para remoção de isoflavonas e saponinas. Deste modo, os resultados mostraram que o efeito hipocolesterolêmico estaria relacionado diretamente com os componentes protéicos da soja.

Numerosos avanços vêm sendo realizados para explicar os mecanismos pelos quais a proteína de soja exerce efeitos benéficos sobre as concentrações de colesterol e triglicérides. Contudo, os mecanismos moleculares e os componentes da proteína de soja responsáveis por estas respostas estão ainda indefinidos. Potter (1995) relata que algumas hipóteses são sugeridas na literatura, dentre elas, o aumento da excreção fecal de ácidos biliares (especialmente em ratos e coelhos), metabolismo hepático do colesterol associado com o aumento da remoção de LDL-C

e VLDL-C pelos hepatócitos, e efeitos endócrinos, pela alteração da concentração de hormônios envolvidos no metabolismo do colesterol. Mais recentemente, Shukla et al. (2007) sugeriram que a proteína da soja afeta a homeostase lipídica celular pela regulação de SREBPs e seu genes-alvo no fígado, que estão envolvidos na síntese de colesterol e triglicérides.

Outras evidências científicas indicam uma ligação dos ácidos biliares com a proteína da soja, a partir do isolamento de um polipeptídeo de peso molecular 37kDA, tratando-se provavelmente de uma subunidade ácida de globulina 11S, que mostrou afinidade para ânions de sais biliares (MAKINO et al., 1988). Entretanto, uma mistura de aminoácidos correspondente à proteína da soja pareceu ser responsável pela diminuição da síntese de colesterol hepático em ratos (NAGATA et al., 1982).

Sirtori et al. (1984), comparando o efeito da proteína de soja em relação à caseína em ratos tratados com dieta hipercolesterolêmica, constataram que a regulação dos receptores hepáticos relacionados ao metabolismo do colesterol é afetada de maneira diferente por proteínas animais e vegetais na dieta. Portanto, um possível mecanismo do efeito redutor de colesterol da proteína de soja é a sua capacidade de modular os níveis dos receptores de LDL-C no fígado, suprimidos pela hipercolesterolemia ou pela administração de colesterol dietético no homem, assim como em animais de experimentação (CARROLL e KUROWSKA, 1995; SIRTORI et al., 1995).

Uma possibilidade que relaciona a presença de peptídeos formados durante a digestão protéica envolvidos na regulação do metabolismo lipídico é reportada por Pak et al. (2005a), Duranti et al. (2004) e Lovati et al. (2000). Estudos com células Hep G2 propõem que peptídeos derivados da proteína da soja podem estar ligados a uma ativação direta dos receptores LDL (LDL-R) nas células hepáticas (LOVATI et al., 1987; LOVATI et al., 1992; LOVATI et al., 1996; BAUM et al., 1998).

Uma vez que as proteínas são hidrolisadas no trato gastrintestinal, e que peptídeos cruzam a barreira intestinal e alcançam a corrente sanguínea, é provável que os componentes da soja responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico sejam

peptídeos com menos de 15 aminoácidos, considerando o seu potencial em serem absorvidos (BLOCH et al., 1988; SIRTORI et al., 2009). Estudos em animais e *in vitro* têm demonstrado os efeitos de peptídeos de soja no perfil de lipídeos plasmáticos e metabolismo lipídico (LOVATI et al., 2000; LOVATI et al., 2008; PAK et al., 2005a). Dois estudos clínicos relataram importante redução da lipoproteína LDL-C pela administração de preparações contendo peptídeos derivados da soja em humanos (WANG et al., 1995; HORI et al., 2001). Cho et al. (2008) fornecem evidências de que os peptídeos derivados da proteína de soja podem influenciar na transcrição de receptores de LDL-C nos hepatócitos.

A influência das proteínas da soja no metabolismo lipídico é inconteste, de modo que a dieta com soja parece ser uma importante ferramenta para o tratamento dietético de pacientes hipercolesterolêmicos (SUGANO, 2005). A intervenção na dieta é geralmente a primeira linha de terapia estabelecida pela National Cholesterol Education Program (NCEP) para reduzir os níveis de lipídeos plasmáticos (HECKER, 2001).

Alguns lipídeos dietéticos são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de dislipidemias e no processo da aterosclerose, principal causa de morte em países ocidentais industrializados, sendo caracterizada pela deposição de colesterol e seus ésteres das lipoproteínas contendo apo B-100 no tecido conectivo das paredes arteriais. O risco de desenvolvê-la é diretamente relacionado com a concentração plasmática de LDL-C e inversamente proporcional ao nível de HDL-C (MURRAY et al., 2002; DEVLIN, 2007).

O LDL-C é potencialmente aterogênico, e o aumento de sua concentração a cada 10 mg por decilitro de sangue eleva o risco de um ataque cardíaco em quase 20% (SCIRICA e CANNON, 2005). A redução do colesterol total e do LDL-C leva a um menor índice da morbidade e da mortalidade por doenças cardiovasculares (HECKER, 2001). É descrito que uma redução de aproximadamente 10% do colesterol total e 15% do LDL-C, através de mudanças dos hábitos alimentares, diminui a mortalidade

por doença isquêmica do coração em 25 a 30% em indivíduos com idade entre 55 a 64 anos. (LAW et al., 1994).

Em contraposição, o HDL-C é benéfico devido a sua propriedade de transportar lípides, principalmente ésteres de colesterol, dos tecidos periféricos para o fígado, processo conhecido como transporte reverso do colesterol (FREDENRICH e BAYER, 2003; VON ECKARDSTEIN et. al., 2001). Estudos clínicos e epidemiológicos relacionam o aumento da fração HDL-C como fator protetor no desenvolvimento de doenças coronarianas (LIMA e COUTO, 2006; YOUNG et al., 2004). Logo, pessoas com níveis elevados desta lipoproteína apresentam menor risco de eventos cardíacos (SCIRICA e CANNON, 2005). É apontado que a baixa razão LDL-C/HDL-C, e baixos níveis plasmáticos de triglicérides reduzem o risco de doenças cardiovasculares (GOULD et al., 1998; ERDMAN, 2000; FRIEDMAN e BRANDON, 2001; SIRTORI et al., 2009).

Estudo de Tonstad et al. (2002) demonstrou que a adição de 30 a 50 gramas de isolado protéico de soja/dia reduziu as concentrações plasmáticas da lipoproteína LDL-C e homocisteína em indivíduos com hipercolesterolemia, entretanto, os dados da literatura apontam controvérsias nesse campo de investigação. Uma revisão de Basu et al. (2006) concluiu que não há evidências de que o consumo de produtos contendo proteína de soja exerça influência sobre biomarcadores de inflamação que têm sido associados com risco coronariano aumentado (BASU et al., 2006).

Desta forma, compostos funcionais que auxiliam na redução do colesterol, melhorando o perfil das lipoproteínas plasmáticas, poderiam desempenhar um importante papel na redução de risco de doença cardíaca, com maiores evidências ainda a serem investigadas.

1.4 O papel das globulinas no metabolismo lipídico

Dentre as proteínas da soja, a globulina 7S demonstra ser a principal responsável pelo efeito hipocolesterolêmico (AOYAMA et al., 2001; MOCHIZUKI et al.,

2009; CONSONNI et al., 2010), ao passo que o papel da globulina 11S é inconclusivo (LOVATI et al., 1992; LOVATI et al., 1996; LOVATI et al., 1998). O efeito hipolipemiante da subunidade α' da 7S em ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica apontou uma regulação de receptores de β-VLDL no fígado e uma importante redução plasmática de colesterol e triglicérides (DURANTI et al., 2004).

Embora majoritárias no grão, são mais escassas as citações da fração 11S neste contexto, sugerindo um campo de investigação a ser explorado. Kwon et al. (2002) isolaram, a partir da hidrólise da glicinina da soja com tripsina, um tetrapeptídeo com atividade hipocolesterolêmica, com capacidade de ligação a ácidos biliares ou inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) *in vitro*. A sequência de aminoácidos foi determinada (LPYP) e o efeito hipocolesterolêmico deste peptídeo foi relacionado a um resíduo de leucina no amino terminal.

Pak et al. (2005b) isolaram vários peptídeos com propriedade hipocolesterolêmica a partir da globulina 11S da soja. Os mesmos apresentaram, *in vitro*, uma inibição da atividade da HMG-CoA redutase na ordem de 12,4 a 62,3%. Um destes peptídeos foi isolado a partir da hidrólise da globulina 11S com pepsina, e o seu peso molecular (755,2 Da) e a sequência de aminoácidos (Ile-Val-Ala-Pro-Gly-Glu-Val-Ala) foram estabelecidos. Através de análises *in vitro*, a redução da concentração de colesterol foi explicada pela ligação dos peptídeos com os ácidos biliares, cólico e deoxicólico, impedindo-os de serem reabsorvidos, e estimulando a transformação de colesterol no plasma sanguíneo, além da inibição da atividade da HMG-CoA redutase (PAK et al., 2005a).

A comparação entre o efeito das frações 7S e 11S da soja foi analisada por Adams et al. (2008) em estudo com macacos que receberam isolado protéico da soja comparado a um concentrado da fração 7S e a um concentrado da fração 11S da soja. Os resultados mostraram que a substituição da caseína e lactoalbumina, como fonte protéica da dieta, por proteína de soja isolada apresentou efeitos favoráveis nas lipoproteínas plasmáticas, com redução no colesterol total e VLDL-C + LDL-C de 8% e

14%, respectivamente, e aumento de 41% no HDL-C. No entanto, a substituição da proteína isolada de soja por dieta concentrada com globulina 7S ou 11S não resultou em melhora nos perfis de lipoproteínas plasmática ou biomarcadores cardiovasculares.

Por outro lado, Lovati et al. (1992) demonstraram uma redução da concentração de colesterol plasmático de 34,84% e 32,70% respectivamente, após a administração das globulinas 7S e 11S em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta hipercolesterolêmica.

Já os estudos *in vitro* com cultura de célula hepática humana (Hep G2) e em animais revelaram que a regulação do colesterol sofre alteração pelo efeito das frações globulina 7S e, em menor intensidade, pela 11S, confirmando que a β-conglicinina modula a ativação e o aumento de receptores da LDL, promovendo aumento na captação e degradação desta lipoproteína pelas células hepáticas e redução significativa da concentração plasmática de colesterol (LOVATI et al., 1992; LOVATI et al., 1998; LOVATI et al., 2000).

1.5 Tratamento farmacológico da hipercolesterolemia

O tratamento farmacológico da hipercolesterolemia mudou drasticamente nos últimos anos após a introdução das estatinas como principal abordagem terapêutica para modular os níveis de colesterol no organismo. Os níveis plasmáticos de colesterol são primariamente regulados por dois órgãos: o fígado, que sintetiza colesterol para inúmeras funções que incluem, dentre outras, digestão, formação de pró-vitamina D e bainha de mielina dos neurônios, e o intestino, onde ocorre a absorção do colesterol advindo do alimento e dos ácidos biliares (NORATA e CATAPANO, 2004). As estatinas reduzem o LDL-C bloqueando a chave do processo de produção de colesterol no fígado, a enzima HMG-CoA redutase. A dose média inicial de todas as estatinas reduz o LDL-C em aproximadamente 35 a 40% e eleva o HDL-C em 5 a 10%. Além dos seus efeitos sobre o colesterol, as estatinas agem na

redução da inflamação, em particular da proteína C-reativa, que se encontra elevada em pessoas com alto risco para ataques cardíacos (SCIRICA e CANNON, 2005).

A rosuvastatina é a estatina mais recente. É um composto sintético constituído por um único enantiômero (3R5S) formulado e administrado na forma de sal de cálcio (CHAPMAN e McTAGGART, 2002). Ensaios clínicos com pacientes hipercolesterolêmicos têm mostrado que a rosuvastatina leva a uma redução da lipoproteína LDL-colesterol, que supera os resultados obtidos pelas demais estatinas disponíveis e melhora significativamente outros marcadores lipídicos, além de manter um perfil de segurança coerente com o das demais estatinas conhecidas (McTAGGART, 2003). Também é preciso considerar que as estatinas, incluindo a rosuvastatina, baixam a progressão e induzem a regressão da aterosclerose, reduzem a formação de novas lesões e a incidência de eventos coronarianos (MARON et al., 2000).

Extensas investigações sobre os efeitos deste fármaco na redução das lipoproteínas, suas características farmacológicas, assim como tolerância e segurança, indicam que essa estatina se mostra um agente terapêutico para o tratamento de pacientes com risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (BREWER, 2003). Pacientes com alto risco de doença arterial coronariana necessitam de redução agressiva de lipídeos, que combina a administração de uma estatina com drogas que afetam a absorção do colesterol, a fim de assegurar um manejo ideal da dislipidemia (NORATA e CATAPANO, 2004).

É importante considerar que as estatinas, exceto a pravastatina, requerem CYP3A4 para sua metabolização (DE ANDRÉS et al., 2004; SMITH et al., 2004). O citocromo P450 (isoforma CYP3A4) está presente no fígado e desempenha um papel na regulação da biodisponibilidade oral de aproximadamente 50% dos fármacos comumente usados e talvez de nutrientes (RENDIC e DICARLO, 1997). A indução ou inibição da enzima por nutrientes pode levar a mudança significativa na biodisponibilidade oral de fármacos ou vice-versa. Em geral, a indução da CYP leva à falha terapêutica e a inibição da CYP aumenta o risco de toxicidade (CHAN, 2002;

CHAN, 2006). Inibidores da HMG-CoA redutase (estatinas), benzodiazepínicos e a ciclosporina estão entre os fármacos mais afetados (DAHAN e ALTMAN, 2004). Assim, torna-se necessário considerar as interações que possam ocorrer entre o medicamento e os componentes presentes no alimento.

1.6 Interação fármaco-nutriente

As interações fármaco-nutriente são definidas como alterações produzidas nos efeitos terapêuticos de um medicamento em razão da ingestão concomitante com o alimento. A absorção dos nutrientes e de alguns fármacos ocorre por mecanismos semelhantes e frequentemente competitivos e, portanto, apresentam como principal sítio de interação o trato gastrintestinal (MOURA e REYES, 2002).

A maior parte das interações envolve mudanças na biodisponibilidade oral e absorção, embora outros mecanismos também sejam sugeridos. Fatores que influenciam a interação medicamento-nutriente podem estar ligados ao hospedeiro, ao medicamento ou ao próprio nutriente. De modo geral, as interações entre o medicamento e o nutriente podem ser prevenidas evitando-se a mistura do nutriente e o fármaco na mesma infusão. As interações que afetam a absorção de medicamentos e nutrientes administrados via oral ou enteral, causando aumento ou diminuição da biodisponibilidade, podem ser evitadas separando-se o tempo de administração do medicamento e o nutriente. Contudo, as interações envolvendo metabolismo e transporte não podem ser impedidas pela separação temporal da administração da alimentação e do medicamento. O manejo inapropriado de algumas interações pode desencadear falha na terapêutica ou severos efeitos adversos ao paciente (SCHWEIGERT et al., 2008).

Apesar da comprovada existência de interações de diferentes fármacos entre si, as interações destes com a dieta ainda é pouco explorada na literatura. Se por um lado, as estatinas são medicamentos amplamente utilizados na atualidade para o tratamento de hiperlipidemias, por outro, a dieta tem uma grande influência na

prevenção e tratamento destas patologias. Desta forma, a estratégia que se emprega consiste em uma dieta adequada e, se esta não apresenta resultado, a terapia farmacológica é iniciada em combinação com o aconselhamento dietético. Por essa razão, é necessário o conhecimento das possíveis interações entre este tipo de fármaco e os alimentos, a fim de evitar alterações nos benefícios terapêuticos e também o aparecimento de efeitos adversos (DE ANDRÉS et al., 2004).

Um conhecimento mais amplo em relação ao processo de interação pode conduzir a um controle mais efetivo da administração do medicamento e da ingestão de alimentos, favorecendo, assim, a adoção de terapias mais eficazes. Dessa maneira, embora a eficiência desse medicamento seja comprovada, é importante considerar, neste contexto, o papel dos alimentos à base de soja. Estudos experimentais que indiquem os efeitos da associação de uma proteína alimentar e de um fármaco associado são ainda escassos. Considera-se, por conseguinte, justificada a proposição do trabalho, no sentido de investigar os efeitos da ingestão da proteína glicinina da soja de forma isolada ou associada ao fármaco rosuvastatina no quadro de controle da hipercolesterolemia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da fração protéica glicinina da soja (*Glycine max* L.) nos níveis séricos e hepáticos de triglicérides e colesterol em animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Isolar a fração protéica glicinina da soja;

- Comparar os efeitos da administração da glicinina da soja, como dose única diária, com ou sem administração do fármaco rosuvastatina nas concentrações de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides plasmáticos, colesterol total e triglicérides hepáticos, em ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Utilizou-se farinha de soja comercial, com granulação de 60 mesh, obtida na região de Araraquara – SP.

3.1.1 Análise da composição química da farinha de soja

A composição química da farinha de soja integral e desengordurada foi determinada de acordo com metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1998).

3.1.1.1 Umidade

A determinação da umidade foi realizada por gravimetria, com emprego de estufa com circulação de ar. O material foi mantido a 105ºC até obtenção do peso constante.

3.1.1.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria após carbonização da amostra e posterior calcinação a 550ºC.

3.1.1.3 Lipídeos

A determinação de lipídeos foi feita pelo método de Bligh-Dyer (1959). A amostra foi pesada e misturada juntamente com clorofórmio, metanol e água (1:2:0,8). Após agitação por 30 minutos, foi adicionado clorofórmio e sulfato de sódio 1,5%, causando a separação total do clorofórmio que carrega os lipídeos. A camada inferior formada (clorofórmio) foi retirada e a ela foi acrescentado sulfato de sódio

anidro para remoção dos traços de água. Uma alíquota desse extrato foi mantida em estufa a 65ºC até evaporação do solvente, resfriada e pesada para determinação da porcentagem de lipídeos totais.

3.1.1.4 Proteína

O nitrogênio total foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. A digestão foi feita com ácido sulfúrico concentrado utilizando-se, como catalisador, mistura de sulfato de cobre e sulfato de potássio (1:4). Posteriormente, adicionou-se hidróxido de sódio à amostra para destilação, utilizando-se ácido bórico para fixação do nitrogênio, e titulou-se com solução de ácido clorídrico. O teor de proteína foi estimado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25.

3.1.2 Extração da fração lipídica da farinha de soja

A farinha de soja foi desengordurada com a utilização de hexano, na relação 1:8 massa-volume, permanecendo sob agitação por um período de 4 horas em temperatura ambiente para solubilização do óleo da farinha. O procedimento foi repetido, alterando-se a proporção massa-volume em 1:4. Posteriormente, a farinha foi filtrada, seca em temperatura ambiente durante 24 horas e armazenada a 4ºC.

3.1.3 Extração e isolamento da proteína glicinina da soja

A obtenção da globulina 11S extraída a partir da farinha desengordurada de soja baseou-se no procedimento descrito por Nagano et al. (1992).

No processo de extração e isolamento da proteína glicinina da soja, a farinha de soja desengordurada foi homogeneizada em água destilada (relação massa-volume de 1:15), e o pH foi ajustado a 7,5 com NaOH 2N. Essa mistura foi mantida

sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente, para depois ser submetida, em temperatura de 4ºC, à centrifugação a 17696 x *g* durante 30 minutos.

Descartado o precipitado originado da centrifugação, adicionou-se ao sobrenadante, que foi envolto em gelo, metabisulfito de sódio a 0,98 g/L ajustando-se o pH para 6,4 com HCl 2N, causando precipitação da globulina 11S. Essa mistura permaneceu *overnight* à temperatura de 4ºC. Após este período, realizou-se uma centrifugação a 7477 x *g* por 30 minutos, a 4ºC, em que sobrenadante contendo a fração globulina 7S foi descartado, e o precipitado recolhido por solubilização em água destilada a pH 7,5. O pH foi novamente ajustado com HCl 2N a 6,4 para ser submetido a uma nova centrifugação a 7477 x *g* por 30 minutos, a 4ºC. Descartou-se novamente o sobrenadante, e o precipitado com a fração globulina 11S foi recolhido por solubilização em água destilada a pH 7,5, dialisado *overnight* e armazenado à temperatura de -20ºC para posterior utilização no período experimental (figura 1).

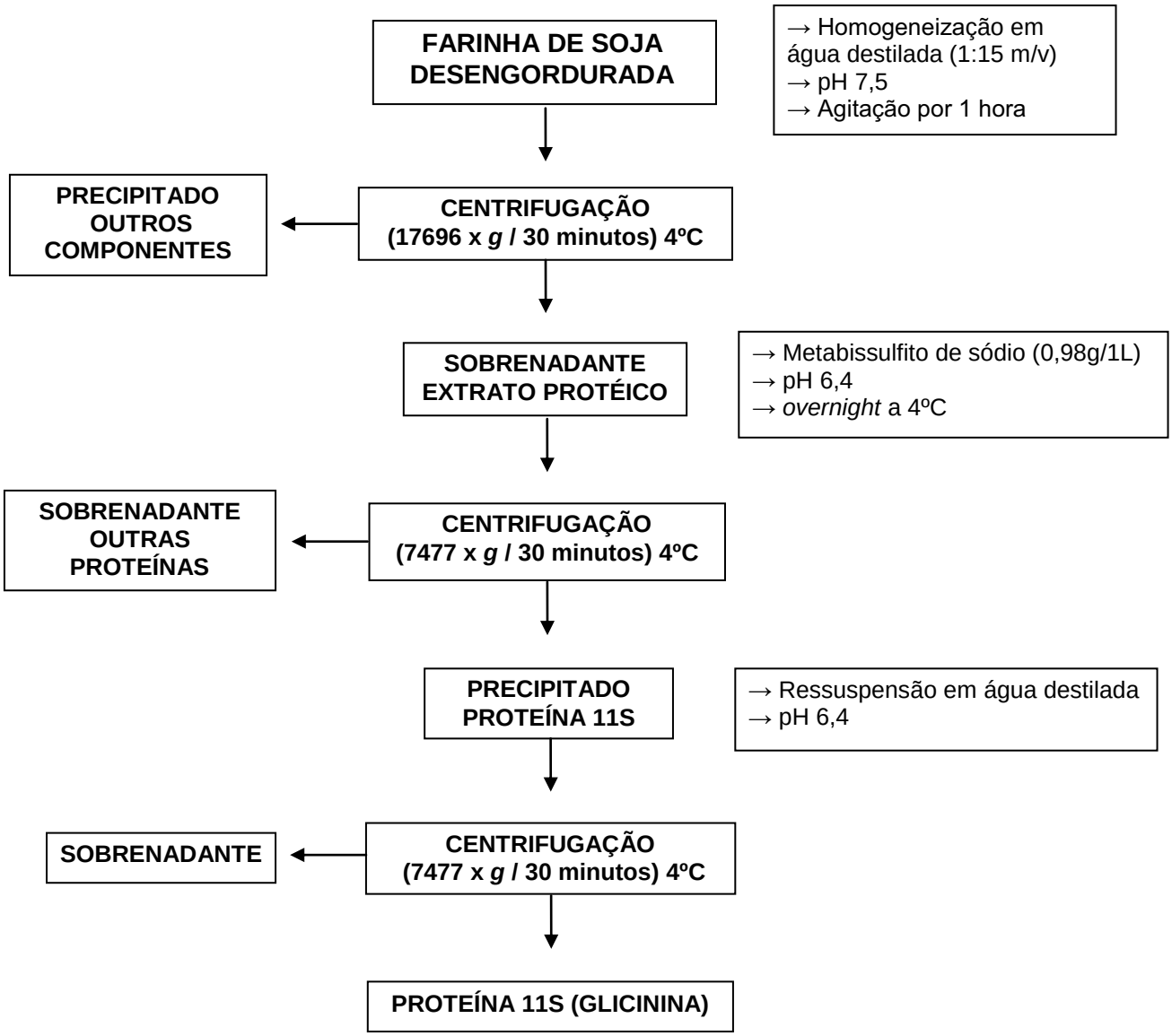

Figura 1 – Fluxograma de obtenção da fração protéica globulina 11S. Adaptado e modificado a partir da metodologia descrita por Nagano et al. (1992).

3.1.4 Determinação da proteína

A quantificação da proteína obtida após a primeira e a última centrifugação (vide item 3.1.3) foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951). Uma curva de referência foi preparada utilizando-se albumina de soro bovino como proteína padrão. O método baseia-se na interação das proteínas com o reagente fenol e cobre em condições alcalinas. A reação colorimétrica envolve uma oxidação, catalisada por

cobre, de aminoácidos aromáticos por um reagente heteropolifosfato (fosfotungístico-fosfomolibídico), desenvolvendo uma cor azul, que foi medida a 750 nm.

3.1.5 SDS-PAGE da proteína globulina 11S

A estimativa do número e da massa molecular das subunidades da proteína 11S isolada foi feita em eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), sistema de pH descontínuo, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970), na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol.

A eletroforese foi desenvolvida em placa de vidro de 10,0 x 10,6 cm, com gel de separação e de concentração contendo 12% e 4,5% de acrilamida, respectivamente. As amostras da globulina 11S isolada foram dissociadas em solução contendo 62,5 mM de Tris pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 1% de 2-mercaptoetanol, 0,02% de azul de bromofenol, submetidas a banho fervente por 3 minutos, resfriadas e então aplicadas no gel de concentração. Como padrão, foi utilizada uma mistura de proteínas de massa molecular conhecidas, contendo fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa), e submetida ao tratamento descrito acima.

A corrida eletroforética foi realizada em cubas de acrílico e o tampão usado foi Tris/glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS. A voltagem usada inicialmente foi de 100 V até que o corante atingisse o gel de separação. Em seguida, foi alterada para 150 V, permanecendo sob corrente constante até o final da corrida, que durou aproximadamente 3 horas.

O gel foi corado por imersão em solução de coomassie blue R-250 a 0,25% em ácido acético:metanol:água destilada durante 30 minutos e descorado por imersão em solução de ácido acético glacial, metanol e água destilada na proporção de 1,5:1:17,5, respectivamente, com várias trocas desta solução.

3.2 Avaliação biológica

3.2.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram elaboradas conforme as recomendações de composição para ratos e roedores, sugeridas pelo American Institute of Nutrition (AIN-93M) e descritas por Reeves et al. (1993), adequando-se a proteína para aproximadamente 15% do valor calórico total da dieta. Foram preparadas duas dietas, sendo uma padrão e outra hipercolesterolêmica, acrescida de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (NATH et al., 1959). As dietas foram produzidas pela empresa PragSoluções® Ltda, conforme descrito na tabela 1.

3.2.2 Protocolo experimental

Ratos machos (Rattus norvegicus var. Albinus), linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus Botucatu, permaneceram em gaiolas coletivas e em ambiente controlado com ciclo de claro-escuro de 12 horas e temperatura de 22 ± 2ºC. Os animais foram alimentados com dieta comercial padrão Purina® e água *ad libitum* para adaptação e aquisição da idade adulta (peso médio de 180 a 200 gramas) por período de 14 dias. Em seguida, foram separados em cinco grupos (n = 9 animais por grupo) e mantidos em gaiolas metabólicas individuais.

Durante os 28 dias do experimento, o grupo padrão (STD) recebeu dieta contendo caseína como proteína. Os demais grupos receberam dieta hipercolesterolêmica, composta pela dieta padrão adicionada de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico. A proteína glicinina de soja usada na concentração de 300 mg/kg de peso corporal/dia, conforme Ferreira et al. (2010), e o fármaco rosuvastatina (10 mg/Kg de peso corporal/dia), ambos solubilizados em solução salina, foram administrados por técnica de gavagem. O grupo hipercolesterolêmico

(HC) recebeu apenas a dieta, o grupo HC+11S recebeu a dieta e a proteína glicinina da soja, o grupo HC+ROS, a dieta e o fármaco, e o grupo HC+ROS+11S, a dieta, a proteína e o fármaco, conforme descrito na tabela 2.

A administração das doses da proteína glicinina e do fármaco foi realizada diariamente, em horários diferentes, durante o período do experimento, sendo a glicinina administrada às 9 horas e o fármaco às 14 horas.

Os procedimentos realizados com os animais foram executados de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1985).

O procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (protocolo nº 32/2008), conforme anexo.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

INGREDIENTE (g/kg de dieta)	STD	HC	HC+11S	HC+ROS	11S+ROS
Caseína*	147.4	147.4	147.4	147.4	147.4
Amido	458.3	443.3	443.3	443.3	443.3
Amido dextrinizado	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0
Sacarose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Óleo de soja	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Celulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mistura mineral**	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Mistura vitamínica**	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-Cistina	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Bitartarato de colina	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Colesterol***	0.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Ácido cólico*	0.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteína (% energia)	15.66	15.91	15.91	15.91	15.91
Lipídio (% energia)	9.45	9.60	9.60	9.60	9.60
Carboidrato (% energia)	74.89	74.49	74.49	74.49	74.49

STD = Grupo padrão; HC = Grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = Grupo glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = Grupo rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = Grupo glicinina 300mg/kg/dia associado à rosuvastatina 10mg/kg/dia. *Sigma-Aldrich, Co., USA. **PragSoluções®, Co., Brasil. ***Reagen, Co., USA.

Tabela 2 – Grupos de animais e os diferentes tratamentos empregados no experimento durante 28 dias

GRUPOS	DIETA	TRATAMENTO
STD	Padrão*	Solução salina
HC	Hipercolesterolêmica**	Solução salina
HC+11S	Hipercolesterolêmica	Glicinina (300 mg/kg de peso/dia)
HC+ROS	Hipercolesterolêmica	Rosuvastatina (10 mg/kg de peso/dia)
HC+11S+ROS	Hipercolesterolêmica	Glicinina (300 mg/kg de peso/dia) e Rosuvastatina (10 mg/kg de peso/dia)

STD = Grupo padrão; HC = Grupo hipercolesterolêmico; HC+11S = Grupo glicinina; HC+ROS = Grupo rosuvastatina e HC+11S+ROS = Grupo glicinina associado à rosuvastatina. *Dieta padrão segundo AIN-93M. **Dieta hipercolesterolêmica = dieta padrão acrescida de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico.

3.2.3 Crescimento ponderal e consumo alimentar

A averiguação do peso dos animais foi realizada em dias intercalados para acompanhamento do crescimento ponderal dos grupos experimentais. O controle da ingestão alimentar foi determinado pela diferença entre os pesos da ração ofertada diariamente e da sobra deixada na gaiola metabólica pelos animais. Para as pesagens, utilizou-se balança semi-analítica com precisão de 0,01 g.

3.2.4 Coleta do material biológico

Ao final do experimento e após 12 horas de jejum, os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos contendo gel separador SST II (Vacutainer BD®) e, em seguida, centrifugado a 1900 x *g* por 15 minutos. O soro foi recolhido e armazenado a -20C.

O fígado foi removido, lavado em solução salina (9 g NaCl/L), pesado e imediatamente armazenado sob congelamento a -20ºC, para posteriores análises bioquímicas.

3.2.5 Análises bioquímicas séricas

Foram realizadas análises bioquímicas séricas de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides por meio de kits enzimáticos da marca Labtest®.

3.2.5.1 Determinação do colesterol total

O colesterol total foi determinado após a hidrólise dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre foi oxidado pela colesterol oxidase, e o peróxido de hidrogênio formado sofreu reação com fenol e 4-aminoantipirina, originando antipirilquinonimina, que tem absortividade máxima a 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

3.2.5.2 Determinação do HDL-colesterol

A determinação da fração HDL-C foi realizada pela precipitação seletiva e quantitativa das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), mediante adição de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL), presente no sobrenadante, foi determinado conforme reações descritas anteriormente para colesterol total.

3.2.5.3 Determinação de triglicérides

O triglicerídeo foi hidrolisado por uma lipase, liberando glicerol, que foi convertido pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este foi oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorreu uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-

aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que possui um máximo de absorbância em 505 nm.

3.2.5.4 Determinação da fração não HDL-colesterol e índice Aterogênico

A fração não-HDL-C (LDL-C + VLDL-C) foi calculada pela diferença entre colesterol total e o HDL-C, e o índice aterogênico calculado pela relação colesterol total – HDL-C/HDL-C.

3.2.6 Análises dos lipídeos hepáticos

A determinação do colesterol total e triglicerídeo hepático foi baseada na metodologia descrita por Haug e Hostmark (1987). Amostras do tecido hepático foram homogeneizadas com solução de álcool isopropílico na proporção 1:10 (m/v), com o auxílio do Potter-Elvehjem, por aproximadamente cinco minutos, e armazenadas a 4^{o}C por 24 horas. Posteriormente, foram submetidas à centrifugação em 1000 x *g* por 10 minutos. As análises de colesterol e triglicérides foram realizadas no sobrenadante originado da centrifugação, com uso de kits enzimáticos da marca Labtest®, conforme descrito para as análises séricas (item 3.2.5).

3.2.7 Índice hepato somático

O índice hepato-somático foi calculado pela relação (peso do fígado/peso corpóreo) x 100.

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o software SigmaStat® 3.5 (Dundas software, Germany, 1999), por meio da análise de variância (ANOVA) e pelo teste de

Student-Newman-Keuls (SNK), para comparação múltipla entre os tratamentos. Estabeleceu-se $p<0,05$ como nível de significância. Todos os resultados foram apresentados pela média ± erro padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da composição química da farinha de soja

A tabela 3 ilustra a composição química da farinha de soja utilizada no estudo para obtenção da fração glicinina, antes e após ser submetida ao processo de desengorduramento. A concentração protéica representou 41,59% da farinha de soja integral e 51,02% da farinha de soja desengordurada, conforme citado por Wolf et al. (1970), que referem um conteúdo mínimo de proteína na farinha de soja oscilando entre 40 a 50%, dependendo da quantidade de gordura, carboidrato e do tipo de cultivo.

Tabela 3 – Composição centesimal da farinha de soja

COMPONENTE	FARINHA DE SOJA INTEGRAL (%)	FARINHA DE SOJA DESENGORDURADA (%)
Proteína	41.59 ± 0.38	51.02 ± 0.22
Umidade	7.55 ± 0.13	6.82 ± 0.14
Cinzas	4.65 ± 0.05	6.53 ± 0.08
Lipídeos	24.32 ± 0.29	6.14 ± 0.11
Carboidratos	21.89	29.49

Composição química determinada segundo AOAC (1998). Valores representados em média ± desvio padrão.

4.2 Determinação da proteína glicinina

A determinação de proteína indicou que a fração protéica glicinina representou 14,40% da proteína total presente no extrato protéico solúvel da farinha de soja (fluxograma descrito na figura 1). Verificou-se um baixo rendimento da globulina 11S obtida a partir da farinha desengordurada de soja, sendo necessárias extrações sucessivas para a obtenção de amostra significativa visando o experimento biológico.

4.3 SDS-PAGE da proteína globulina 11S

A figura 2 mostra a eletroforese do isolado protéico da soja (PI), glicinina (11S) e β-conglicinina (7S). A proteína tratada com o agente redutor indicou, na eletroforese, a presença de bandas com massa molecular na faixa de 22,07 a 58,14 kDa. Uma contaminação pela subunidade da globulina 7S na fração globulina 11S foi detectada pelo método SDS-PAGE. Esse fato também é mencionado na literatura, uma vez que na faixa de pH 6,1 a 6,6, em que ocorre a precipitação da 11S, a 7S apresenta-se dissolvida (THANH e SHIBASAKI, 1976). Segundo Nagano et al. (1992) a pureza da fração globulina 11S obtida de acordo com o método é maior que 90%.

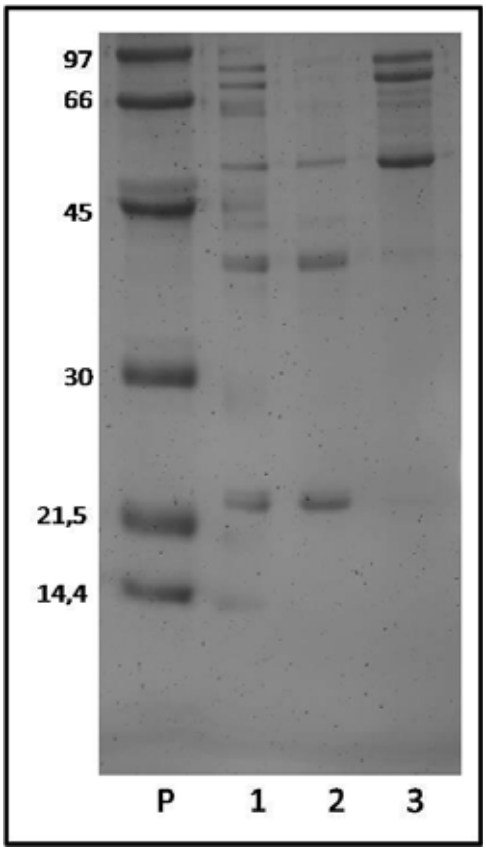

Figura 2 – SDS-PAGE em condições redutoras das globulinas 11S, 7S e extrato protéico total isoladas da soja. Linha P: proteínas padrão; Linha 1: extrato protéico total; Linha 2: globulina 11S isolada (glicinina); Linha 3: globulina 7S isolada (β-conglicinina). Números à esquerda indicam os valores de massa molecular em kDa dos padrões de peso molecular descritos em materiais e métodos (item 3.1.5).

4.4 Dietas experimentais, peso corpóreo e consumo alimentar

Todos os grupos envolvidos no experimento receberam a dieta formulada segundo a AIN-93M (REEVES et al., 1993), com caseína como fonte protéica padrão.

A oferta da proteína glicinina através de gavagem (300 mg/kg de peso corporal/dia) resultou em uma adição de aproximadamente 2,75% do consumo protéico da dieta, indicando que a dose única diária da mesma pode ser considerada um composto funcional, uma vez que os resultados a seguir comprovam a sua participação no metabolismo do colesterol.

Os resultados do ganho de peso corpóreo e do consumo alimentar dos grupos experimentais estão descritos na tabela 4. Os grupos HC+ROS e HC+11S+ROS apresentaram maior consumo alimentar em comparação aos demais grupos, sendo que no grupo STD foi observado o menor consumo alimentar. Mas essa diferença não influenciou o ganho de peso dos animais.

Não se observou diferença estatística significativa ao analisar a evolução de peso dos animais (tabela 4), portanto, conclui-se que a adição de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico contribuiu para criar somente o quadro hipercolesterolêmico necessário ao estudo, assim como observado em outros trabalhos (LOVATI et al., 1992; FUKUI et al., 2002; FUKUI et al., 2004; DURANTI et al., 2004).

4.5 Peso do fígado e índice hepato-somático

A tabela 5 indica que o peso do fígado e o índice hepato-somático (IHS) foram significativamente maiores nos grupos que receberam 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico na dieta em comparação ao grupo STD. Esse resultado foi semelhante ao reportado por Sirtori et al. (1984), em que ratos alimentados com caseína e dieta suplementada com 1,2% de colesterol apresentaram aumento significativo do peso do fígado em comparação ao grupo que não recebeu colesterol na dieta.

Quando comparados ao grupo HC, os resultados do peso do fígado encontrados nos grupos HC+11S, HC+ROS e HC+11S+ROS foram significativamente maiores. Os dados contrastam com os resultados observados por Nagata et al. (1982) e Terpstra et al. (1982), nos quais o peso do fígado foi significativamente menor em ratos alimentados com proteína de soja comparados àqueles alimentados com caseína. O mesmo foi notado por Lovati et al. (1992), que apuraram uma redução no peso do fígado após a administração da globulina 11S ou 7S em ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica contendo caseína como fonte protéica. Por outro lado, Chen et al. (2003) não observaram diferença no peso do fígado de ratos hipercolesterolêmicos após a substituição da caseína por diferentes quantidades da fração não-hidrolisada derivada da proteína de soja na dieta.

Além dessas evidências, a administração de isolado protéico de soja em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hipercolesterolêmica não causou diferenças no peso do fígado dos animais em comparação ao grupo controle caseína (FUKUI et al., 2002; FUKUI et al., 2004). Desta forma, pode-se inferir que os resultados do peso do tecido hepático nos estudos que envolvem as proteínas da soja são ainda inconclusivos.

Tabela 4 – Peso corpóreo e consumo alimentar dos grupos experimentais após 28 dias

VARIÁVEIS	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	STD	**HC**	**HC + 11S**	**HC + ROS**	**HC+11S+ROS**
Peso Inicial (g)	195.23 ± 5.03[a]	196.55 ± 4.63[a]	194.55 ± 3.92[a]	193.6 ± 2.31[a]	193.44 ± 2.35[a]
Peso Final (g)	287.77± 7.07[a]	295.01 ± 5.43[a]	298.53 ± 5.26[a]	306.5 ± 3.79[a]	301.49 ± 3.88[a]
Ganho de peso (g/dia)	3.31 ± 0.24[a]	3.51 ± 0.32[a]	3.71 ± 0.22[a]	4.02 ± 0.11[a]	3.84 ± 0.10[a]
Consumo alimentar (g/dia)	15.47 ± 0.27[c]	16.74 ± 0.33[b]	17.27 ± 0.29[b]	18.86 ± 0.14[a]	18.34 ± 0.18[a]

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os grupos experimentais. STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

Tabela 5 – Peso do fígado e índice hepato-somático (IHS) dos grupos experimentais após 28 dias

VARIÁVEIS	GRUPOS EXPERIMENTAIS				
	STD	**HC**	**HC + 11S**	**HC + ROS**	**HC+11S+ROS**
Fígado (g)	10.90 ± 0.45^{c}	13.54 ± 0.36^{b}	17.63 ± 0.28^{a}	17.07 ± 0.92^{a}	17.14 ± 0.78^{a}
IHS* (g)	3.79 ± 0.12^{c}	4.59 ± 0.14^{b}	5.91 ± 0.12^{a}	5.56 ± 0.27^{a}	5.68 ± 0.22^{a}

Valores representados em média ± erro padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os grupos experimentais. STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia. *IHS = (peso do fígado/peso corpóreo) x 100.

4.6 Lipídeos e lipoproteínas plasmáticas

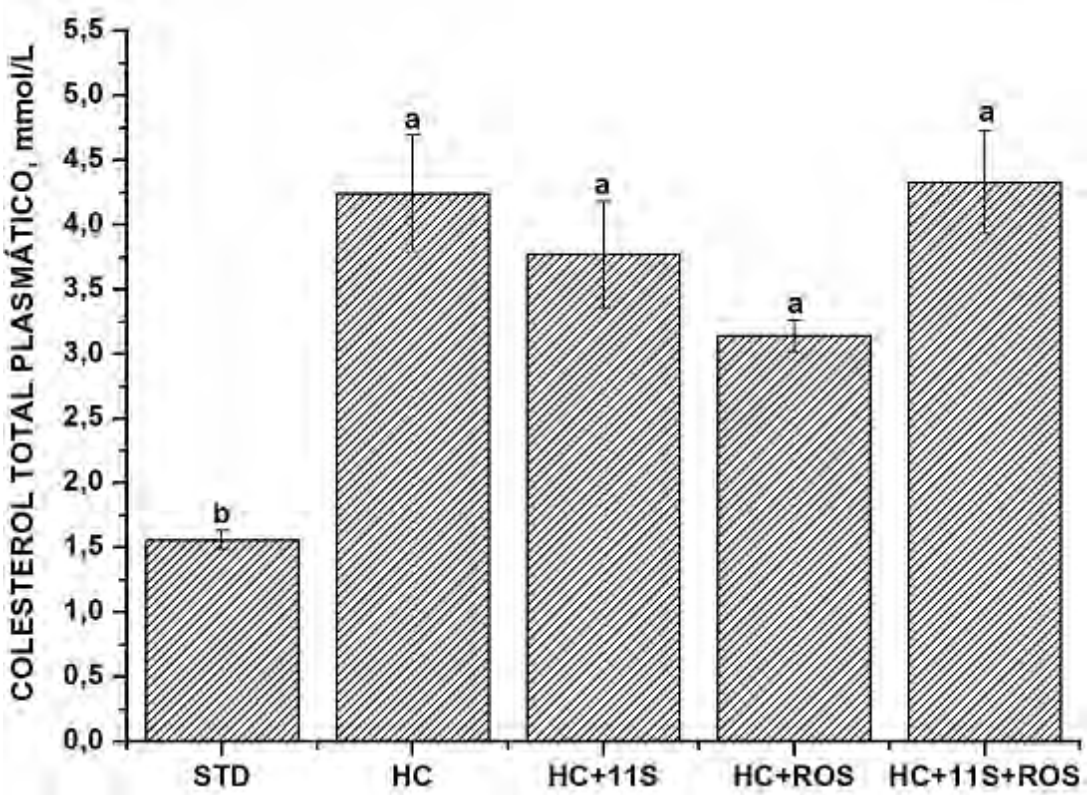

Figura 3 – Concentração sérica de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

A figura 3 apresenta os resultados da variável colesterol total plasmático nos grupos estudados. Observa-se um aumento significativo de 171,79% do colesterol total sérico no grupo hipercolesterolêmico HC (4,24 mmol/L) em relação ao grupo STD (1,56 mmol/L). Entendendo que a homeostase do colesterol é mantida pelo balanço entre a absorção do colesterol proveniente da dieta, a síntese endógena de colesterol e a excreção de ácidos biliares e colesterol, os resultados desta variável no grupo HC sugerem, conforme indica a literatura, que o aumento dos níveis de colesterol na dieta eleva o colesterol plasmático (MURRAY et al., 2002; DEVLIN, 2007).

Os grupos HC+11S (3,77 mmol/L), HC+ROS (3,14 mmol/L) e HC+11S+ROS (4,33 mmol/L) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo HC. No entanto, a administração da glicinina no grupo HC+11S promoveu redução de 11,08% em comparação ao grupo HC, o que representa um resultado expressivo em termos biológicos e corrobora os dados da literatura (FRIEDMAN e BRANDON, 2001), uma vez que é constatado que uma redução de 10% no colesterol plasmático se traduz numa diminuição de 15% no risco de mortalidade por doença coronariana (GOULD et al., 1998).

Lovati et al. (1992) investigaram o efeito das globulinas da soja *in vitro* e *in vivo* e constataram que ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta hipercolesterolêmica (1,2% de colesterol e 0,1% de ácido cólico) e caseína, como fonte protéica, apresentaram, ao final de 14 dias de tratamento, uma redução da concentração de colesterol plasmático de 34,84% e 32,70%, após a administração por gavagem da globulina 7S e 11S, respectivamente, na dose de 30mg de proteína por dia. As análises sugerem que as globulinas da soja podem estimular a atividade dos receptores de LDL-C em diferentes sistemas celulares. A fração 7S estimulou tanto a captação quanto a degradação de LDL-C em células do tecido hepático humano, todavia, em fibroblastos de pele humana (representando o tecido extra-hepático), a fração 11S foi mais efetiva do que a 7S na captação de LDL-C, enquanto a degradação da lipoproteína não foi afetada pelas globulinas neste sistema celular. Deste modo, a β-conglicinina mostrou-se mais efetiva em relação à glicinina, induzindo maior expressão de receptores de LDL-C no fígado.

Por outro lado, Adams et al. (2008) não observaram melhora nos perfis de lipoproteínas plasmáticas ou biomarcadores cardiovasculares quando a proteína isolada de soja foi substituída por concentrados com globulina 7S ou 11S na dieta de macacos.

O efeito hipocolesterolêmico foi atribuído à globulina 11S através do peptídeo (Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg) derivado da glicinina da soja, que reduziu o colesterol total plasmático em 25,4% e o LDL-C em 30,6% em camundongos, após a administração

de uma dose oral de 50mg/kg por dois dias, sem aumentar a excreção fecal de colesterol e ácidos biliares (YOSHIKAWA et al., 2000).

Peptídeos derivados da hidrólise *in vitro* da glicinina apresentam atividade hipocolesterolêmica por meio da ligação com ácidos biliares e inibição da atividade da HMG-CoA redutase, enzima chave do processo de biossíntese de colesterol (KWON, et al., 2002; PAK et al., 2005a). Outro estudo também identificou que fragmentos peptídicos derivados da subunidade A1aB1b da glicinina da soja apresentam capacidade de ligação com ácidos biliares (CHOI et al., 2002).

A maioria dos trabalhos evidencia que a proteína de soja isolada, portanto, com o somatório das frações 7S e 11S, tem efeito hipocolesterolêmico demonstrado em casos de hiperlipidemia moderada ou grave (SIRTORI et al., 1979; ANDERSON et al., 1995; CARROLL e KUROWSKA, 1995). Entretanto, Aoyama et al. (2000) observaram que ratos Sprague-Dawley alimentados com isolado protéico de soja não apresentaram redução do colesterol total plasmático, porém, no grupo em que foi administrado o isolado protéico hidrolisado, o nível sérico de colesterol total foi 29,08% menor em relação ao grupo que recebeu dieta com caseína.

Da mesma forma, camundongos que receberam peptídeo obtido da hidrólise da proteína de soja apresentaram redução significativa dos níveis séricos de colesterol total de 23,61% e 31,55% com doses de 0,5 ou 2,5g/kg de peso corporal, respectivamente, em comparação àqueles tratados apenas com a dieta hipercolesterolêmica, após 30 dias de experimento (ZHONG et al., 2007).

Os mecanismos moleculares responsáveis por estas respostas estão ainda indefinidos. Numerosas tentativas têm sido feitas para explicar o mecanismo pelo qual a proteína da soja exerce este efeito hipocolesterolêmico (NAGATA et al., 1982; POTTER, 1995; LOVATI et al., 1987; LOVATI et al., 1992; LOVATI et al., 1996; BAUM et al., 1998). Uma análise crítica do papel da suplementação da proteína de soja no controle das concentrações de colesterol plasmático observa que os dados clínicos disponíveis não são quantitativamente expressivos e levanta questões sobre a importância clínica do efeito hipocolesterolêmico observado (DEWELL et al., 2006),

reforçando a dúvida quanto ao mecanismo e ao componente da proteína de soja responsável por este efeito.

Os resultados do grupo HC+ROS+11S sugerem que a separação temporal da administração da glicinina e da rosuvastatina não preveniu a interação entre o fármaco e a proteína. Uma vez que no grupo HC+ROS foi verificada diminuição de 25,94% do colesterol total plasmático em relação ao grupo HC, a adição da proteína 11S sugere inibição deste efeito.

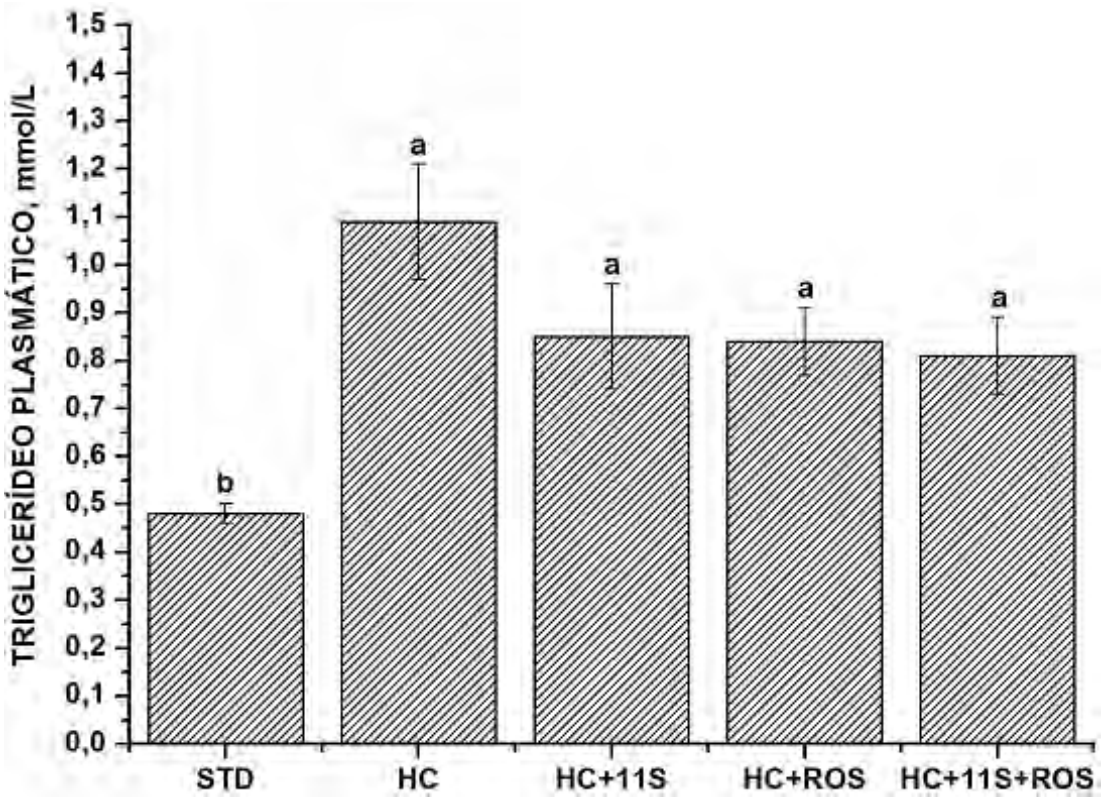

Figura 4 – Concentração sérica de triglicerídeo dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

A figura 4 representa os níveis de triglicerídeo plasmático entre os grupos experimentais estudados. O grupo HC (1,09 mmol/L) diferiu do grupo STD (0,48

mmol/L) com aumento de 127,08% nesta variável. Os grupos HC+11S (0,85 mmol/L), HC+ROS (0,84 mmol/L) e HC+11S+ROS (0,81 mmol/L) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo HC.

É reconhecido que altos níveis de triglicerídeo plasmático relacionados à dieta estão associados a desordens metabólicas, dentre elas, obesidade, diabetes mellitus, uso de betabloqueadores e imunossupressores e riscos aumentados de eventos cardiovasculares (KRAEGEN et al., 2001). O grupo HC foi o único que sofreu alterações nesse parâmetro, sendo que os demais grupos estudados apresentaram uma redução de aproximadamente 23% em comparação ao grupo HC. Resultado semelhante foi observado por Aoyama et al. (2000) em ratos Sprague-Dawley, que receberam isolado protéico de soja ou seu hidrolisado, e ambos apresentaram uma redução de 24,81% e 33,33%, respectivamente, do triglicerídeo plasmático em comparação ao grupo controle caseína.

Outros trabalhos também evidenciaram redução dos níveis de triglicerídeo plasmático em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta enriquecida com colesterol e tratados com isolado protéico de soja em comparação com o grupo que recebeu caseína, variando na ordem de 18,18% e 37,65% (FUKUI et al., 2002; FUKUI et al., 2004).

Lovati et al. (1992) verificaram que a administração das globulinas 7S e 11S, na dose de 30mg de proteína por dia, não reduziu a concentração de triglicerídeo plasmático em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta hipercolesterolêmica, após 14 dias de tratamento.

Já em humanos, estudo com indivíduos hipercolesterolêmicos comparou a ingestão de dietas contendo proteína animal ou isolado protéico de soja (25g/1000kcal, ou uma média de 107g/dia para mulheres e 140g/dia para homens) como fonte protéica e demonstrou que a proteína de soja proporcionou uma redução de 12,4% do triglicerídeo plasmático, enquanto o colesterol e LDL-C plasmáticos foram reduzidos em 4,4% e 5,7%, respectivamente, em comparação à proteína animal. As conclusões do estudo demonstraram que o efeito de redução no

triglicerídeo plasmático parece ser atribuído, em parte, à supressão da biossíntese de ácido graxo que compõe o triglicerídeo (WANG et al., 2004).

A redução do triglicerídeo através da ingestão de proteína de soja na dieta parece ocorrer independente da alteração no nível de colesterol, e é observada naqueles indivíduos com hipertrigliceridemia inicial (KINGMAN, 1991).

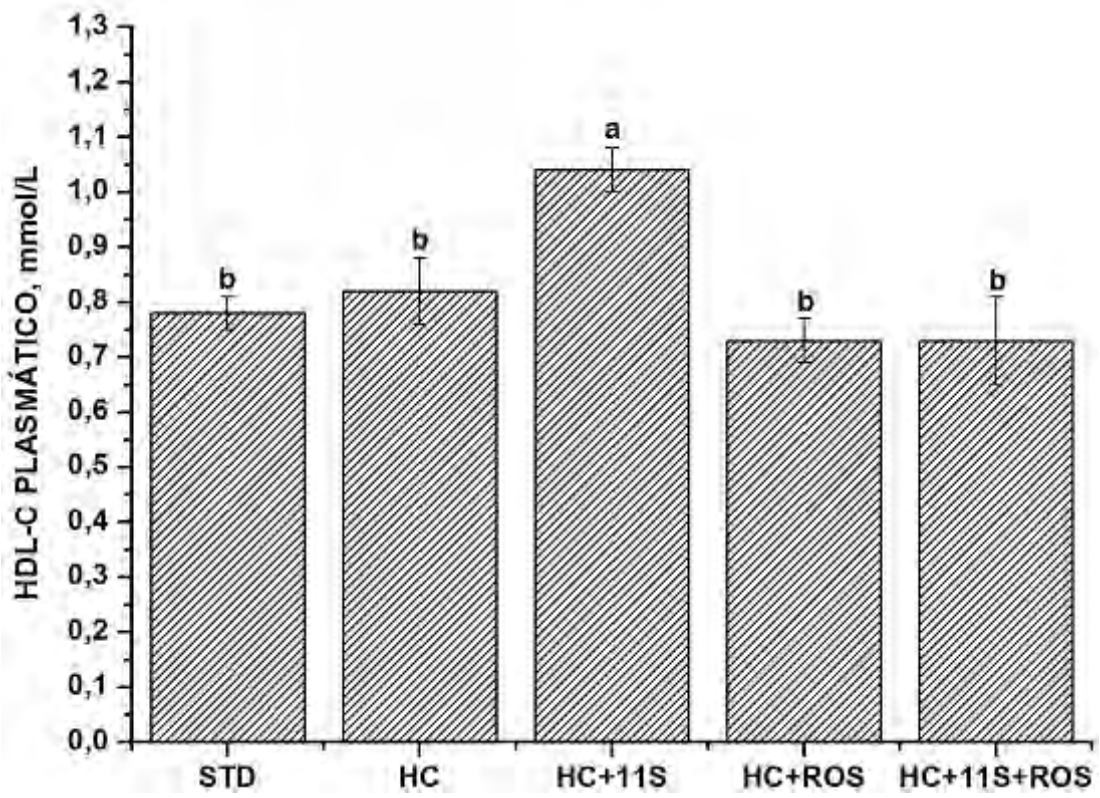

Figura 5 – Concentração sérica da lipoproteína HDL-C dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

A figura 5 mostra os dados plasmáticos da lipoproteína HDL-C. Os grupos STD (0,78 mmol/L) e HC (0,82 mmol/L) não apresentaram diferença estatística entre si. No entanto, a administração da glicinina promoveu aumento de 26,83% desta variável no

grupo HC+11S (1,04 mmol/L) em relação ao grupo HC, diferindo, em média, deste grupo e dos demais grupos experimentais.

Os resultados do trabalho evidenciam o papel positivo da globulina 11S em elevar os níveis séricos de HDL-C. Esta variável forma uma classe de proteínas de alta densidade que desempenha um papel antiaterogênico, por carregar o colesterol dos tecidos corporais ao fígado para ser metabolizado, ao contrário do LDL-C, que reflete a fração considerada como um importante fator de risco cardiovascular (VON ECKARDSTEIN et al., 2001; MURRAY et al., 2002). Estudos epidemiológicos têm mostrado uma forte correlação negativa entre o nível plasmático do HDL-colesterol e o risco de doença arterial coronariana, sendo descrito na literatura que mais de 40% dos pacientes com infarto do miocárdio apresentam um nível baixo do HDL-C (FREDENRICH e BAYER, 2003). Desta forma, sugere-se, a partir dos resultados do grupo HC+11S, um efeito protetor desta fração protéica contra possíveis danos ocasionados pelo excesso de colesterol no organismo. Conclui-se que a fração isolada 11S foi determinante para o aumento do HDL-colesterol, uma vez que, nos grupos experimentais, todos os demais componentes da dieta mantiveram-se em iguais proporções. A fração protéica glicinina estaria se comportando, portanto, como um composto funcional.

Estudos em humanos demonstram que, geralmente, o HDL-C não é afetado pela dieta contendo proteína de soja, sendo que a principal alteração apontada é a capacidade de reduzir os níveis de LDL-C plasmático, particularmente quando há uma elevação desta lipoproteína por razão genética ou alimentar (KINGMAN, 1991). Da mesma forma, Sacks et al. (2006) relatam que nenhum benefício é evidente no HDL-C, triglicérides, lipoproteína (a) ou pressão arterial.

A meta-análise publicada por Anderson et al. (1995) descreve um pequeno aumento de 2,4% nas concentrações plasmáticas do HDL-C pelo consumo de proteína de soja dos indivíduos, assim como constatado na meta-análise publicada por Reynolds el al. (2006), que verifica um ligeiro aumento do HDL-C em 25 dos 38

estudos analisados, tendo sido significativa a elevação desta lipoproteína em apenas 2 destes ensaios.

Por outro lado, estudos clínicos com indivíduos normolipidêmicos, recebendo dieta rica em colesterol, mostram aumento da lipoproteína HDL-C. Van Raaij et al. (1981) observaram um declínio do LDL-C (6,6 mg/dl ou 0,17 mmol/l) e um aumento significativo do HDL-C (5,8 mg/dl ou 0,15 mmol/l), assim como Meinertz et al. (1989), que notaram uma redução de 16% do LDL-C e elevação de 16% do HDL-C em indivíduos que receberam isolado protéico de soja em comparação à caseína como fonte protéica.

Da mesma forma, há evidências de trabalhos com animais experimentais que mostram o efeito da proteína de soja na elevação da lipoproteína HDL-C. Rho et al. (2007) notaram aumento de 29,28%, 41% e 122,62% da concentração plasmática do HDL-C em ratos Sprague-Dawley tratados com peptídeos derivados de soja preta, numa concentração de 2%, 6% e 10% do valor calórico da dieta, respectivamente, em comparação ao grupo controle caseína, após 28 dias de experimento.

Adams et al. (2008) observaram melhor resultado da lipoproteína HDL-C quando a proteína de soja isolada foi introduzida como fonte protéica na dieta de macacos, com elevação de 41% desta lipoproteína em comparação com caseína e lactoalbumina, e menor redução do colesterol total e VLDL-C + LDL-C, representando 8% e 14%, respectivamente. De Meester et al. (2010) descrevem que a proteína da soja reduz o VLDL-C e triglicérides e aumenta o HDL-C, sem efeito no LDL-C.

Os grupos HC+ROS (0,73 mmol/L) e HC+11S+ROS (0,73 mmol/L) não apresentaram diferença em comparação ao grupo HC. Logo, o efeito da rosuvastatina em aumentar os níveis de HDL-C em 7,7 a 9,6% com doses variando de 10 a 40mg, conforme descrito por Brewer (2003), não foi observado neste estudo.

Maron et al. (2000) afirmam que as estatinas são altamente eficazes na redução da concentração do LDL-C, mas apresentam efeito modesto em elevar os níveis do HDL-C.

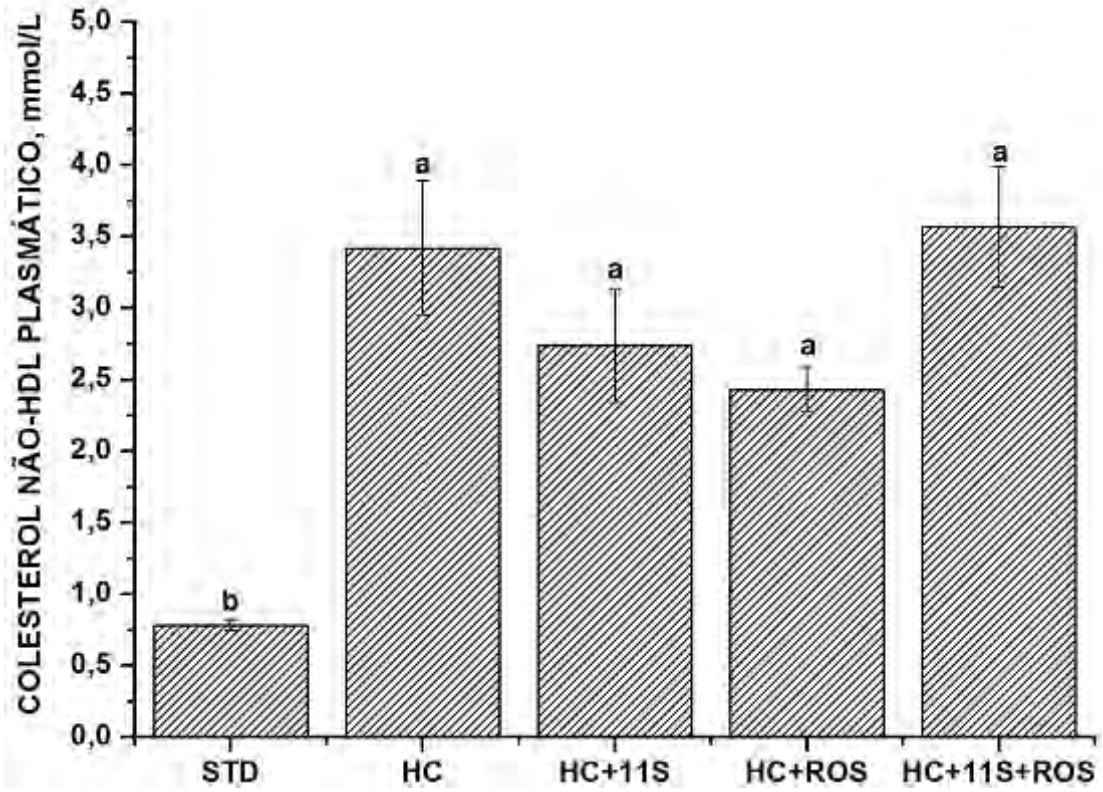

Figura 6 – Concentração sérica da fração não-HDL (VLDL-C + LDL-C) dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

Na figura 6 observam-se os dados da variável colesterol não-HDL plasmático. O colesterol não-HDL plasmático é formado pelas lipoproteínas LDL-C e VLDL-C, calculadas pela diferença entre o colesterol total e a lipoproteína HDL-C.

O grupo controle HC (3,42 mmol/L) apresentou aumento significativo de 338,46% em relação ao grupo STD (0,78 mmol/L). Os grupos HC+11S (2,74 mmol/L) e HC+ROS (2,43 mmol/L) não diferiram estatisticamente em comparação ao grupo HC.

Embora não tenha sido observada diferença entre os grupos HC+11S e HC, a diminuição de 19,88% foi semelhante ao descrito por LOVATI et al. (1987), que compararam a ingestão de diferentes fontes protéicas (animal ou soja) na dieta de indivíduos com hipercolesterolemia e verificaram uma redução de 15,9% do colesterol total e 16,4% do LDL-colesterol, sugerindo que algum fator, provavelmente

de natureza protéica, pode regular a expressão de receptores de lipoproteínas nas células periféricas, principalmente quando a atividade do receptor é suprimida por dietas experimentais e/ou por hipercolesterolemia espontânea.

Outras evidências, associadas à proteína da soja hidrolisada, foram demonstradas por Rho et al. (2007), apontando redução de 16,04% da concentração plasmática do LDL-C em ratos Sprague-Dawley tratados com peptídeos derivados de soja preta numa concentração de 2% do valor calórico da dieta. No entanto, quando esta concentração foi alterada para 6% e 10%, a redução desta lipoproteína representou 26,12% e 60,15%, respectivamente, em comparação ao grupo controle caseína, o que indica uma relação entre a concentração protéica e a resposta das lipoproteínas plasmáticas.

Zhong et al. (2007) evidenciaram que camundongos que receberam peptídeo obtido da hidrólise da proteína de soja apresentaram uma redução da concentração da fração não-HDL-C de 34,46% e 44,59%, respectivamente, com doses de 0,5 ou 2,5g/kg de peso corporal, em comparação àqueles tratados apenas com dieta hipercolesterolêmica, após 30 dias de experimento.

A redução de 28,95% da fração não-HDL-C demonstrada no grupo HC+ROS é semelhante aos valores encontrados na literatura para LDL-C, em que a dose usual necessária (5 a 10mg) de rosuvastatina reduz o LDL-C em 30 a 40% (SCIRICA e CANNON, 2005).

O grupo HC+11S+ROS (3,57 mmol/L) não diferiu dos demais tratamentos, porém, o resultado desta variável foi 46,91% maior quando comparado ao grupo HC+ROS. Desta forma, quando a glicinina e a rosuvastatina foram administradas no grupo HC+11S+ROS os efeitos se anularam, indicando que a adição da 11S neste grupo inibiu a redução da fração colesterol não-HDL plasmático promovida pelo fármaco no grupo HC+ROS.

A maioria dos estudos em humanos não observou alteração na concentração plasmática da lipoproteína VLDL-C, embora alguns estudos isolados tenham

identificado pequenas mudanças na composição ou "turnover" desta fração quando indivíduos consomem preparações contendo proteína de soja (KINGMAN, 1991).

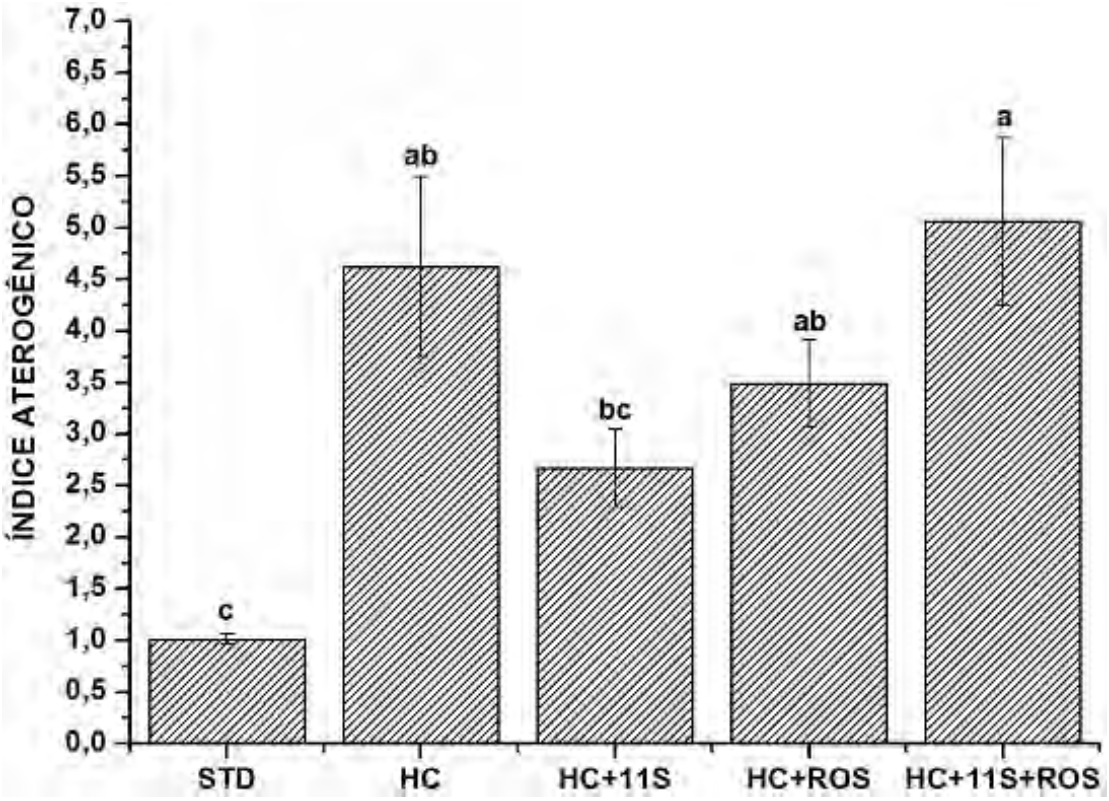

Figura 7 – Índice aterogênico dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

A figura 7 ilustra o resultado da variável índice aterogênico, representado pela razão não-HDL-C/HDL-C e definido como indicador da pré-disposição da incidência de doenças cardiovasculares, que, no grupo controle HC (4,62 mmol/L), foi intensamente aumentado em 357,43% quando comparado ao grupo STD (1,01 mmol/L). Os grupos HC+11S (2,67 mmol/L) e HC+ROS (3,49 mmol/L) proporcionaram diminuição deste índice de 42,21% e 24,46%, respectivamente, em relação ao grupo controle HC. O grupo HC+11S+ROS (5,06 mmol/L) não diferiu dos

grupos HC e HC+ROS, todavia apresentou diferença em relação ao grupo HC+11S, com aumento de 89,51% nesta variável.

Dentre os grupos estudados, apenas o grupo HC+11S não se diferiu do grupo STD, mostrando, em termos biológicos, um expressivo resultado da globulina 11S como um fator protetor para melhora do índice aterogênico em animais expostos a uma dieta hipercolesterolêmica, já que uma baixa razão LDL/HDL e baixos níveis de triglicerídeos plasmáticos são reconhecidos por diminuir o risco de doença cardiovascular (GOULD et al., 1998; ERDMAN, 2000; FRIEDMAN e BRANDON, 2001; SIRTORI et al, 2009).

Estudos com peptídeos derivados da soja e com a fração 7S também demonstram resultados semelhantes para esta variável, conforme evidenciado por Rho et al. (2007) em ratos Sprague-Dawley, tratados com peptídeos derivados de soja preta numa concentração de 2%, 6% e 10% do valor calórico da dieta contendo colesterol. Os autores observaram redução significativa do índice aterogênico em 30,78%, 48,88% e 80,04%, respectivamente, em comparação ao grupo controle caseína, após 28 dias de experimento. Aoyama et al. (2001) avaliaram, por 10 dias, a administração da fração 7S (β-conglicinina) como fonte protéica da dieta rica em colesterol de ratos Wistar jovens e verificaram uma redução de 27,43% do índice aterogênico em comparação aos animais que receberam caseína.

Wang et al. (2004) constataram uma redução significativa da relação LDL-C/HDL-C em indivíduos com hipercolesterolemia moderada, que receberam dieta com isolado protéico de soja (25g/1000kcal, ou uma média de 107g/dia para mulheres e 140g/dia para homens) em comparação a dietas contendo proteína animal como fonte protéica, após 42 dias de experimento.

Não há dados publicados sobre a influência das frações 7S ou 11S da soja sobre marcadores de risco coronariano. Os dados disponíveis indicam que a proteína de soja isolada, concentrados de isoflavona e as frações 7S e 11S não apresentam influência sobre biomarcadores de risco coronariano (ADAMS et al., 2008).

A substituição de alimentos de origem animal, ricos em gordura saturada e colesterol, por produtos à base de soja, como tofu, grãos de soja, dentre outros, pode ser benéfica para a saúde cardiovascular, devido ao alto conteúdo de gorduras poliinsaturadas, fibras, vitaminas, minerais e baixo teor de gordura saturada presente nestes produtos. No entanto, uma mudança dietética mais abrangente pode ser necessária para induzir a uma redução clinicamente significativa dos fatores de risco de doença arterial coronariana (DEWELL et al., 2006; SACKS et al., 2006).

É de interesse para políticas públicas, na área de prevenção, atentar-se que a abordagem populacional para prevenção de doença coronariana baseada em dietas hipocolesterolêmicas, tais como à base de proteína de soja. Algumas evidências apontam que a redução da doença cardiovascular pela intervenção dietética pode chegar a 30%, sendo tão elevada quanto à terapia com o fármaco, cuja redução corresponde 15 a 20% (SUGANO, 2005). Esta informação corrobora os resultados observados neste estudo ao se analisar a variável índice aterogênico.

4.7 Lipídeos hepáticos

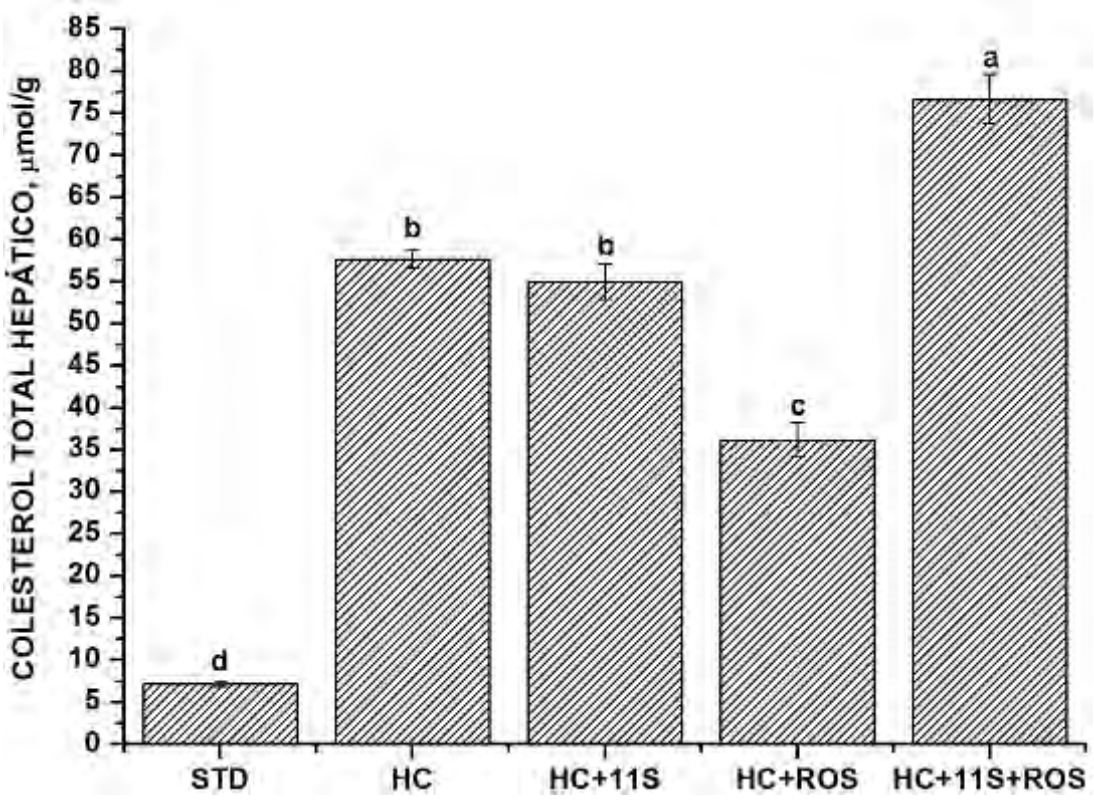

Figura 8 – Concentração hepática de colesterol total dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

A figura 8 representa os resultados da variável colesterol total hepático. O grupo HC (57,66 µmol/g) apresentou aumento significativo de 706,43% em comparação ao grupo STD (7,15 µmol/g). O grupo HC+11S (54,97 µmol/g) não apresentou diferença em relação ao grupo HC, sendo este resultado semelhante ao observado por LOVATI et al. (1992), em que a dieta hipercolesterolêmica elevou a concentração de colesterol no fígado. Esta concentração, porém, não foi alterada pela administração das globulinas 11S ou 7S da soja. Portanto, a redução do colesterol plasmático em ratos ocorreu sem qualquer modificação de colesterol hepático.

Conclusões a este respeito são também demonstradas por Chen et al. (2003), que observaram redução significativa dos níveis plasmáticos de colesterol total, triglicérides e LDL-colesterol em ratos hipercolesterolêmicos, após a substituição de caseína por 5% e 10% da fração não-hidrolisada derivada da proteína de soja como fonte protéica, sem apresentar diferença na concentração de colesterol total hepático. Verificaram, também, maior excreção fecal de esteróides nestes grupos, concluindo que os diferentes tipos e conteúdo de proteína não tiveram nenhum efeito sobre o metabolismo lipídico no fígado. Da mesma forma, Rho et al. (2007) igualmente não observaram diferença estatística neste parâmetro em ratos Sprague-Dawley tratados com peptídeos derivados de soja preta.

Por outro lado, os dados contrastam com os resultados observados por Terpstra et al. (1982) e Shukla et al. (2007), nos quais o colesterol total hepático foi significativamente menor em ratos alimentados com proteína da soja comparados àqueles alimentados com caseína.

No grupo HC+ROS (36,15 µmol/g), a redução no colesterol total hepático representou 37,30% comparado ao grupo HC, apresentando diferença estatística em relação aos demais grupos experimentais estudados. Mas, quando a rosuvastatina foi administrada juntamente com a glicinina no grupo HC+11S+ROS (76,66 µmol/g), observou-se um aumento significativo desta variável de 32,95% em comparação ao grupo HC, tendo este aumento representado 112,06% em comparação ao grupo que recebeu apenas a rosuvastatina (HC+ROS). Este resultado diferiu, em média, dos demais grupos experimentais mostrando que, da mesma forma como verificado no resultado da variável colesterol total plasmático, um possível efeito entre o fármaco e a proteína levou a um expressivo aumento do colesterol no fígado.

As estatinas inibem competitivamente a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a etapa limitante da biossíntese do colesterol. A resultante redução da concentração de colesterol nos hepatócitos provoca aumento da expressão de receptores hepáticos de LDL-C, que remove LDL-C e seus precursores da circulação. Estatinas podem, também, inibir a síntese hepática da apolipoproteína B-100 e

diminuir a síntese e secreção de lipoproteínas ricas em triglicérides. Embora o mecanismo primário de ação para redução de LDL-C seja o aumento da sua remoção através de seus receptores, a diminuição da produção hepática e secreção de lipoproteínas pode explicar como as estatinas são capazes de reduzir o LDL-C em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigóticas que não possuem nenhum receptor funcional de LDL-C (MARON et al., 2000).

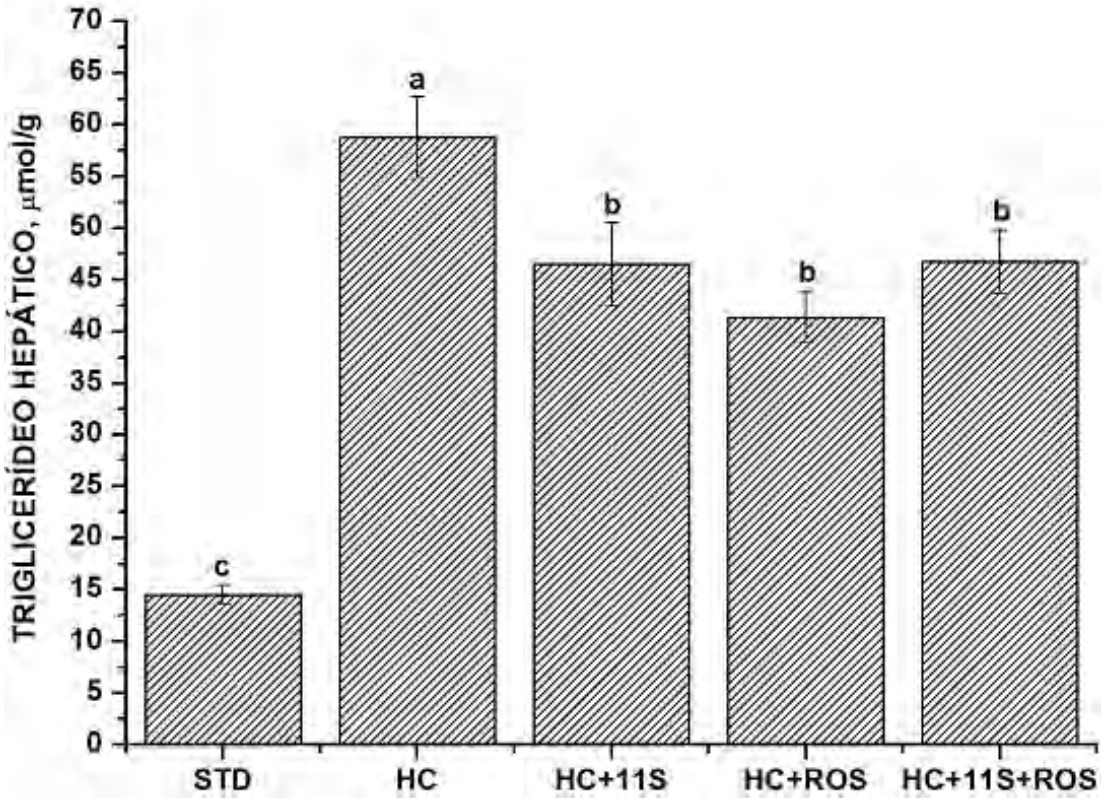

Figura 9 – Concentração hepática de triglicerídeo dos grupos experimentais com diferentes tratamentos após 28 dias. Valores representados em média ± erro padrão. Resultados sobrescritos com letras distintas comparadas entre colunas indicam diferença estatística significativa ($p<0,05$). STD = padrão; HC = hipercolesterolêmico; HC+11S = glicinina 300mg/kg/dia; HC+ROS = rosuvastatina 10mg/kg/dia e HC+11S+ROS = glicinina 300mg/kg/dia e rosuvastatina 10mg/kg/dia.

Na figura 9 estão representados os resultados do triglicerídeo hepático. O grupo HC (58,77 µmol/g) apresentou aumento significativo de 304,75% em relação ao grupo STD (14,52 µmol/g). Ambos os grupos HC+11S (46,48 µmol/g), HC+ROS

(41,35 µmol/g) e HC+11S+ROS (46,74 µmol/g) apresentaram redução significativa deste parâmetro de 20,91%, 29,64% e 20,47%, respectivamente, em comparação ao grupo HC.

Ao contrário do resultado observado neste estudo, Chen et al. (2003) não constataram diferença significativa do triglicerídeo hepático em ratos hipercolesterolêmicos após a substituição de caseína por diferentes quantidades de fração não-hidrolisada derivada da proteína de soja na dieta.

No entanto, Rho et al. (2007) evidenciaram uma redução de 11,21% do triglicerídeo hepático em ratos tratados por 28 dias com peptídeos derivados de soja preta, na concentração de 10% do valor calórico da dieta, contudo, os grupos com menor concentração (2% e 6%) não apresentaram redução em comparação ao grupo caseína.

Shukla et al. (2007) confirmaram uma redução significativa do triglicerídeo hepático em ratos *Sprague-Dawley,* que receberam isolado protéico de soja em comparação à caseína como fonte protéica na dieta, sugerindo que este efeito poderia resultar da regulação de SREBP-1c e seus genes-alvo envolvidos na síntese de ácidos graxos.

5. CONCLUSÃO

A composição da dieta em que foi adicionado 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico permitiu o estudo de um quadro hipercolesterolêmico, conforme evidenciado pela resposta do grupo HC aos parâmetros colesterol total plasmático, não-HDL colesterol e colesterol total hepático.

A oferta da proteína glicinina através de gavagem (300 mg/kg de peso corporal), representando uma adição de aproximadamente 2,75% do consumo protéico, evidencia que os resultados alcançados estariam ligados à eficiência da proteína como um suplemento.

A dose única da proteína isolada oferecida aos animais foi capaz de simular de forma eficiente a comparação com o fármaco rosuvastatina.

Os resultados sugerem a participação da glicinina na elevação da lipoproteína HDL-C plasmático e na redução do triglicerídeo hepático em comparação ao grupo que recebeu apenas a dieta hipercolesterolêmica, indicando que a mesma pode ser considerada como um composto funcional.

O tratamento com a proteína 11S resultou em um decréscimo de um número de fatores pró-aterogênicos, como triglicérides, LDL-C e o índice aterogênico representado pela relação razão não-HDL-C/HDL-C.

Considerando a possível interação fármaco-proteína glicinina, o resultado do grupo HC+11S+ROS estabeleceu uma relação negativa, cujos mecanismos deverão ser avaliados em estudos posteriores.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; ANTHONY, M. S.; CHEN, H.; CLARKSON, T. B. Replacement of dietary soy protein isolate with concentrates of soy 7S or 11S globulin has minimal or no effects on plasma lipoprotein profiles and biomarkers of coronary risk monkeys. **Atherosclerosis**, v.196, n.1, p.76-80, 2008.

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

ANTHONY, M. S; CLARKSON, T. B.; HUGHES JR, C. L.; MORGAN, T. M.; BURKE, G. L. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. **J. Nutr.**, v.126, p.43-50, 1996.

AOYAMA, T.; FUKUI, K.; TAKAMATSU, K.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). **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.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis.** 16th ed. Arlington, 1998. v.2, 99p.

BASU, A.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Dietary factors that promote or retard inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.26, p.995-1001, 2006.

BAUM, J. A.; TENG, H.; ERDMAN JR, J. W.; WEIGEL, R. M.; KLEIN, B. P.; PERSKY, V. W.; FREELS, S.; SURYA, P.; BAKHIT, R. M.; RAMOS, E.; SHAY, N. F.; POTTER, S. M. Long-term

intake of soy protein improves blood profile lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.545-551, 1998.

BAZZANO, L. A.; HE, J.; OGDEN, L. G.; LORIA, C.; VUPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P. K. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. **Arch. Intern. Med.**, v.161, p.2573-2578, 2001.

BEILINSON, V.; CHEN, Z.; SHOEMAKER, R. C.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; NIELSEN, N. C. Genomic organization of glycinin genes in soybean. **Theor. Appl. Genet.**, v.104, p.1132-1140, 2002.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v.37, p.911-917, 1959.

BLOCH, K. J.; WRIGHT, J. A.; BISHARA, S. M.; BLOCH, M. B. Uptake of polypeptide fragmentes of proteins by rat intestine in vitro and in vivo. **Gastroenterology**, v.95, p.1272-1278, 1988.

BREWER JR, H. B. Benefit-risk assessment of rosuvastatin 10 to 40 milligrams. **Am. J. Cardiol.**, v.92, p.23K-29K, 2003.

CARROLL, K. K.; KUROWSKA, E. M. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. **J. Nutr.**, v.125, p.594S-597S, 1995.

CHAN, L. N. Drug-nutrient interaction in clinical nutrition. **Curr. Opin. Clin. Nut. Metab. Care.**, v.5, p.327-332, 2002.

CHAN, L. N. Drug-nutrient interactions. In: SHILS, M. E.; SHIKE, M-, ROSS, A. C.; CABALLERO, B.; COUSINS, R. J. (Ed.) **Modern nutrition in health and disease**. 10th ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins, 2006. p.1540-1553.

CHAPMAN, M. J.; McTAGGART, F. Optimizing the pharmacology of statins: characteristics of rosuvastatin. **Atheroscler. Suppl.**, v.2, p.33-37, 2002.

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.

CHO, S-J.; JUILLERAT, M. A.; LEE, C-H. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.4372-4376, 2008.

CHOI, S. K.; ADACHI, M.; UTSUMI, S. Identification of the bile acid-binding region in the soy glycinin A1aB1b subunit. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.66, n.1, p.2395-2401, 2002.

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, p.887-891, 2010.

DAHAN, A.; ALTMAN, H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability-mechanism, extent and relevance. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.58, p.1-9, 2004.

DE ANDRÉS, S.; LUCENA, A.; DE JUANA, P. Interacciones entre los alimentos y las estatinas. **Nutr. Hosp.**, v.19, p.195-201, 2004.

DE MEESTER, F; ZIBADI, S.; WATSON, R. R. **Modern dietary fat intakes in disease promotion**. New York: Humana, 2010. 470p. (Nutrition and Health Series)

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas.** 6.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2007. 1216p.

DEWELL, A.; HOLLENBECK, P. L. W.; HOLLENBECK, C. B. Clinical review: a critical evaluation of the role of soy protein and isoflavone supplementation in the control of plasma cholesterol concentrations. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.91, p.772-780, 2006.

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

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

DURANTI, M.; LOVATI, M. R.; DANI, V. ; BARBIROLI, A. ; SCARAFONI, A. ; CASTIGLIONI, S. ; PONZONE, C. ; MORAZZONI, P. The α' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma lipids and upregulates liver β-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J. Nutr.**, v.134, p.1334-1339, 2004.

ERDMAN JR, J. W. Soy protein and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the AHA. **Circulation**, v.102, p.2555-2559, 2000.

FERREIRA, E. S.; SILVA, M. A.; DEMONTE, A.; NEVES, V. A. β-Conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. **J. Funct. Foods**, v.2, n.4, p.275-283, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food labeling: health claims: soy protein and coronary heart disease. HHS: final rule. **Fed. Regist.**, v.64, n.206, p.57700-57733, 1999.

FREDENRICH, A.; BAYER, P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoprotein and HDL cholesterol: recent data. **Diabetes Metab.**, v.29, n. 3, p.201-205, 2003.

FRIEDMAN, M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n.3, p.1069-1086, 2001.

FUKUI, K.; TACHIBANA, N.; FUKUDA, Y.; TAKAMATSU, K; SUGANO, M. Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein. **Nutrition**, v.20, p.984-990, 2004.

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.**, v.50, p.5717-5721, 2002.

GOULD, A. L.; ROSSOUW, J. E.; SANTANELLO, N. C.; HEYSE, J. F.; FURBERG, C. D. Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. **Circulation**, v.97, p.946-952, 1998.

GREAVES, K. A.; PARKS, J. S.; WILLIAMS, J. K.; WAGNER, J. D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. **J. Nutr.**, v.129, p.1585-1592, 1999.

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

HECKER, K. D. Effects of dietary animal and soy protein on cardiovascular disease risk factors. **Curr. Atheroscler. Rep.**, v.3, p.471-478, 2001.

HODGES, R.E; KREHL, W. A.; STONE, D. B.; LOPEZ, A. Dietary carbohydrates and low cholesterol diets: effects on serum lipids on man. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.20, n.2, p.198-208, 1967.

HORI, G.; WANG, M. F.; CHAN, Y. C.; KOMATSU, T.; WONG, Y.; CHEN, T. H.; YAMAMOTO, K.; NAGAOKA, S.; YAMAMOTO, S. Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.65, n.1, p.72-78, 2001.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE (ILSI Europe). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **Brit. J. Nutr.**, v.81, p.S1-S27, 1999.

IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; KHAN, M. S. Nutritional quality of important food legumes. **Food Chem.**, v.97, p.331-335, 2006.

KINGMAN, S. M. The influence of legume seeds on human plasma lipid concentrations. **Nutr. Res. Rev.**, v.4, p.97-123, 1991.

KRAEGEN, E. W.; COONEY, G. I.; TOMPSON, A. L. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance - hyperinsulinemia. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, Heildelberg, v.109, p. S516-S526, 2001.

KWON, D. Y.; OH, S. W.; LEE, J. S.; YANG, H. J.; LEE, S. H.; LEE, J. H.; LEE, Y. B.; SOHN, H. S. Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolysate. **Food Sci. Biotechnol.**, v.11, n.1, p.55-61, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAW, M. R.; WALD, N. J.; THOMPSON, S. G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? **BMJ**, v.308, n.6925, p.367-372, 1994.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade: Structure and physiologic functions of high-density lipoproteins. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.3, p.169-178, 2006.

LIU, K. **Soybeans, chemistry, technology, and utilization**. Gaithersburg: Aspen Publ. 1999. 532p.

LOURENÇO, E. J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: Funep, 2000. 344p.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; GIANAZZA, E.; SIRTORI, C. R. Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active β-conglycinin subunits. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, n.7, p.2474-2480, 1998.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; PIZZAGALLI, A.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M. M. 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; CORSINI, A.; GRANATA, A.; FUMAGALI, R.; SIRTORI, C. R. 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; CORSINI, A.; GRANATA, A.; FRATTINI, R. FUMAGALLI, R; SIRTORI, C. R. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. **J. Nutr.**, v.122, p.1971-1978, 1992.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C; GIANAZZA, E.; ARNOLDI, A.; KUROWSKA, E.; CARROL, K. K.; SIRTORI, C. R. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. **J. Nutr.**, v.130, p.2543-2549, 2000.

LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CANAVESI, A.; SIRTORI, M; VACCARINO, V.; MARCHI, M; GADDI, G.; SIRTORI, C. R. Soybean protein diet increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. **J. Clin. Invest.**, v.80, p.1498-1502, 1987.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAKINO, S.; NAKASHIMA, H.; MINAMI, K.; MORIYAMA, R.; TAKAO, S. Bile acid-binding protein from soybean seed: isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity. **Agric. Biol. Chem.**, v.52, n.3, p.803-809, 1988.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v.101, p.207-213, 2000.

MEEKER, D. R.; KESTEN, H. D. Experimental atherosclerosis and high protein diets. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.45, p.543-545, 1940.

MEINERTZ, H.; NILAUSEN, K.; FAERGEMAN, O. Soy protein and casein in cholesterol-enriched diets: effects on plasma lipoproteins in normolipidemic subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.50, p.786-793, 1989.

McTAGGART, F. Comparative pharmacology of rosuvastatin. **Atheroscler. Suppl.**, v.4, p.9-14, 2003.

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.**, v.57, p.1473-1480, 2009.

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Rev. Nutr.**,Campinas, v.15, n.2, p.223-238, 2002.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper:** bioquímica. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 920p.

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.**, v.40, p.941-944, 1992.

NAGATA, Y.; ISHIWAKI, N.; SUGANO, M. Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats. **J. Nutr.**, v.112, p.1614-1625, 1982.

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

NATH, N.; WIENER, R.; HARPER, A. E.; ELVEHJEM, C. A. Diet and cholesterolemia. I. Development of a diet for the study of nutritional factors affecting cholesterolemia in the rat. **J. Nutr.**, v.67, n.2, p.289-307, 1959.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Revised ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1985. (NIH Publication nº 85-23)

NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. Lipid lowering activity of drugs affecting cholesterol absorption. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.13, p.42-51, 2004.

PAK, V. V.; KOO, M. S.; KASYMOVA, T. D.; KWON, D. Y. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. **Chem. Nat. Compd.**, v.41, n.6, p.710-714, 2005a.

PAK, V. V.; KOO, M.; LEE, N.; KIM, M. S.; KWON, D. Y. Structure-activity relationships of the peptide Ile-Ala-Val-Pro and its derivatives revealed using the semi-empirical AM1 method. **Chem. Nat. Compd**, v.41, n.4, p.454-460, 2005b.

POTTER, S. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. **J. Nutr.**, v.125, p.606S – 611S, 1995.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, 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.

RENDIC, S.; DICARLO, F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. **Drug Metab. Rev.**, v.29, n.1-2, p.413-580, 1997.

REYNOLDS, K; CHIN, A.; LEES, K. A.; NGUYEN, A.; BUJNOWSKI, D.; HE, J. 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.; 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.**, v.87, p.908-913, 2007.

SACKS, F. M.; LICHTENSTEIN, A.; VAN HORN, L.; HARRIS, W.; KRIS-ETHERTON, P.; WINSTON, M. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. **Circulation**, v.113, p.1034-1044, 2006.

SCARAFONI, A.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Molecular nutraceutics as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v.18, p.454-463, 2007.

SCHWEIGERT, I. D.; PLETSCH, M. U.; DALLEPIANNE, L. B. Interação medicamento-nutriente na prática clínica. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v.23, n.1, p.72-77, 2008.

SCIRICA, B. M.; CANNON, C. P. Treatment of elevated cholesterol. **Circulation**, v.111, p.e360-e363, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos:** propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SHUKLA, A.; BRANDSCH, C.; BETTZIECHE, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G. L.; EDER, K. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. **J. Nutr. Biochem.**, v.18, n.5, p.313-321, 2007.

SIRTORI, C. R.; ARNOLDI, A.; JOHNSON, S. K. Phytoestrogens: end of a tale? **Ann. Med.**, v.37, p.423-438, 2005.

SIRTORI, C. R.; GALLI, C.; ANDERSON, J. W.; ARNOLDI, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. **Atherosclerosis**, v.203, p.8-17, 2009.

SIRTORI, C. R.; GIANAZZA, E.; MANZONI, C.; LOVATI, M. R. Role of isoflavones in the cholesterol reduction by soy proteins in the clinic. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.65, p.166-167, 1997.

SIRTORI, C. R.; GALLI, G.; LOVATI, M. R.; CARRARA, P.; BOSISIO, E; KIENLE, M. G. Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. **J. Nutr.**, v.114, p.1493-1500, 1984.

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

SIRTORI, C. R.; GATTI, E.; MANTERO, O.; CONTI, F.; AGRADI, E.; TREMOLI, E.; SIRTORI, M.; FRATERRIGO, L.; TAVAZZI, L.; KRITCHEVSKY D. Clinical experience with the soybean protein diet in the treatment of hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.32, p.1645-1658, 1979.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMANN, M. **Marks' Basic medical biochemistry**: a clinical approach. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 900p.

SUGANO, M. **Soy in health and disease prevention**. New York, CRC, 2005. 313p.

SUGANO, M.; COTO, S.; YAMADA, Y.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUO, T.; KIMOTO, M. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. **J. Nutr.**, v.120, p.977-985, 1990.

TERPSTRA, A. H. M.; VAN TINTELEN G.; WEST C. E. The hypocholesterolemic effect of dietary soy protein in rats. **J. Nutr.**, v.112, p.810-817, 1982.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. **J. Agric. Food Chem.**, v.24, n.6, p.1117-1121, 1976.

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

VAN RAAIJ, J. M. A.; KATAN, M. B.; HAUTVAST, J. G. A. J.; HERMUS, R. J. J. Effects of casein versus soy protein diets on serum cholesterol and lipoproteins in young healthy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.34, p.1261-1271, 1981.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High-density lipoprotein and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, n.1, p.13-27, 2001.

WAKAI, K., EGAMI I, KATO, K.; KAWAMURA, T.; TAMAKOSHI, A.; LIN, Y.; NAKAYAMA, T.; WADA, M.; OHNO, Y. Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. **Nutr. Cancer**, v.33, n.2, p.139-145, 1999.

WANG, M. F.; YAMAMOTO, S.; CHUNG, H. M., CHUN, S. Y.; MIYATANI, S.; MORI, M. OKITA, T.; SUGANO, M. Antihypercholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in young female volunteers. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.41, n.2, p.187-195, 1995.

WANG, Y.; JONES, P. J. H.; AUSMAN, L. M.; LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein reduces triglyceride levels and triglyceride fatty acid fractional synthesis rate in hypercholesterolemic subjects. **Atherosclerosis**, v.173, p.269-275, 2004.

WANG, W.; MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, v.4, p.63-78, 2005.

WOLF, W. J. Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. **J. Agr. Food Chem.**, v.18, n.6, p.969-976, 1970.

WONG, W. W.; SMITH, E. O.; STUFF, J E.; HACHEY, D. L.; HEIRD, W. C.; POWNELL, H. J. Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.68, p.1385S-1389S, 1998.

XIAO, C. W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. **J. Nutr.**, v.138, p.1244S-1249S, 2008.

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, n.1-4, p.143-146, 2000.

YOUNG, C. E.; KARAS, R. H.; KUVIN, J. T. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. **Cardiol. Rev.**, v.12, n.2, p.107-119, 2004.

ZHANG, G. Y.; HAYASHI, Y.; MATSUMOTO, S.; MATSUMURA, Y.; MORI, T. Molecular species of glycinin in some soybean cultivars. **Phytochemistry**, v.60, p.675-681, 2002.

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

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 32/2008
Interessado: PRISCILA GIÁCOMO FASSINI
Orientador: Profa. Dra. Aureluce Demonte
Projeto: Relação entre dieta hipercolesterolêmica e a proteína glicinina da soja (Glycine Max L.) no metabolismo do colesterol

Parecer nº 41/2008 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, em sessão de 12 de dezembro de 2008, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Relação entre dieta hipercolesterolêmica e a proteína glicinina da soja (Glycine Max L.) no metabolismo do colesterol", 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 março de 2009.

Araraquara, 17 de dezembro de 2008.

Profª. Drª. ROSANGELA GONÇALVES PECCININI
Vice-Coordenadora do CEP

CAPÍTULO 2

Soybean glycinin (11S) increases HDL-cholesterol in hypercholesterolemic rats

Abstract

Purpose - The purpose of this paper is to determine the effects of isolated soy glycinin on lipid metabolism in animals subjected to a hypercholesterolemic diet.

Design/methodology/approach - Male Wistar rats were kept in individual cages under appropriate conditions of temperature, light and humidity. The animals were divided into three groups (n = 9): 1) normal diet (STD) given a diet containing casein as protein source, recommended in AIN-93M; 2) hypercholesterolemic (HC) fed a normal diet with 1% cholesterol and 0.5% cholic acid; 3) hypercholesterolemic + glycinin (HC + 11S), fed a hypercholesterolemic diet, plus 11S soy protein (300 mg/kg/day), dissolved in saline and administered by gavage. After 28 days, the animals were sacrificed and blood and liver removed for biochemical analysis of total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG) in the plasma, hepatic TC and TG.

Findings - The results indicated that the addition of 1% cholesterol and 0.5% cholic acid induced hypercholesterolemia in the animals without interfering with their weight gain. A single daily dose of glycinin given to hypercholesterolemic group demonstrated its functional role, particularly in raising HDL-C and reducing triglycerides in the liver.

Originality/value – This study demonstrates the action of the 11S globulin in soybean as a serum lipid lowering agent, in addition to its nutritional properties, especially in raising the HDL-C.

Keywords cholesterol, soybean glycinin, experimental model, hypercholesterolemia

Paper type Research paper

Introduction

The proteins of soybeans have high protein contents (35-40%), compared to other legumes, and 7S (β-conglycinin) and 11S (glycinin) globulins are its main constituents (Duranti and Gius, 1997; Duranti, 2006; Scarafoni et al., 2007). Besides their nutrition properties, a variety of studies in animal models and humans indicate the positive influence of these proteins in cholesterol metabolism (Carrol and Kurowska, 1995; Friedman and Brandon, 2001).

In humans, numerous studies suggest that the relatively low risk of heart disease in Asian countries is related to the use of soy protein as a food source (Wakai et al., 1999). However, the ingestion of soy proteins, a variety of compounds in soy, including amino acids and peptides, saponins, phytic acid, trypsin inhibitors, fiber and isoflavones, are described individually or in combination as affecting cholesterol metabolism (Potter et al.,1995)

Although a lot of research has been done on the mechanisms by which soy components reduce blood cholesterol levels, they are not yet fully understood. The actual method of extraction of the compounds may suggest the action of this or that component on the physiological response. For instance, Anthony et al. (1996), after extracting isoflavones from soy protein concentrate and administering them to Rhesus monkeys, attributed the hypocholesterolemic effect to isoflavones. However, in rats treated with isolated soy protein free of isoflavones, Fukui et al. (2002) found a significant reduction in serum total cholesterol, compared to those treated with casein. The subsequent addition of concentrated isoflavones to the diet of animals fed the soy protein isolate did not affect the response. To prove the fact that soy proteins are responsible for the hypocholesterolemic effect, Fukui et al. (2004) compared the results of feeding the rats the soy protein isolate before and after a treatment with ethanol to remove the isoflavones and saponins, concluding that the hypocholesterolemic effect may be assigned exclusively to the protein components.

Despite the evidence regarding the effectiveness of total protein, consecutive studies have indicated that the reducing of cholesterol is greater and the binding to

bile acids is more effective with the hydrophobic fractions of hydrolyzed 11S and 7S globulin than with the total protein of the grain (Kwon et al., 2002; Pak et al., 2005a; Pak et al., 2005b; Mochizuki et al., 2009).

Except in monkey, studies in animal species show a positive influence on lipoprotein metabolism and cardiovascular health after the isolated 7S fraction is ingested (Adams et al., 2008; Lovati et al., 1992; Aoyama et al., 2001). Peptides derived from digestion of this protein are responsible for these actions, according to Lovati el al. (2000) and Lovati et al., (2008).

By isolating the α' subunit of 7S globulin and giving it to hypercholesterolemic rats, Duranti et al. (2004) demonstrated the participation of this subunit in reducing serum cholesterol and triglycerides in liver tissue and in the regulation of receptors for β-VLDL. Consonni et al. (2010) found evidence that the α' subunit of the 7S fraction increased the expression of receptors for LDL-cholesterol, in experiments with a cell culture of Hep G2. Although it is the major globulin fraction in the seed, there are fewer publications on the 11S fraction (glycinin) in this context. Little evidence has been reported, suggesting a field of investigation to be explored (Lovati et al., 1992; Lovati et al., 1998). Studies in vitro have shown some evidence of peptides derived from the 11S fraction that contribute to lowering serum cholesterol levels and influence the concentrations of lipoproteins (Kwon et al., 2002; Pak et al., 2005a). Such findings are corroborated by Sirtori et al. (2009), who suggest that the effects on cholesterol reduction may be related to peptides with a small number of amino acids and thus greater potential for absorption.

In this study, we assessed the effect of oral administration of a single daily dose of 11S protein isolate on levels of total cholesterol, lipoproteins and triglycerides in the plasma and liver tissue of rats subjected to a hypercholesterolemic diet.

Material and Methods

Chemical composition of soy flour

The chemical composition of defatted soy flour was determined by AOAC methods (1998).

Isolation of 11S globulin

Commercial soy flour (grain size 60 mesh) was defatted with hexane (ratio 1:8 w/v), stirred for a period of 4 hours at room temperature. This procedure was repeated (ratio 1:4 w/v). Subsequently, the flour was filtered and dried at room temperature for 24 hours. The 11S globulin was isolated by the procedure reported in Nagano et al. (1992), adapted as described below. The defatted soy flour was homogenized in distilled water (ratio 1:15 w/v) and the pH adjusted to 7.5. This mixture was cooled to 4°C and centrifuged at 17696 x g for 30 minutes. The supernatant was added to sodium metabisulfite (0.98 g/L) and the pH adjusted to 6.4. This mixture remained on ice overnight and was then subjected to centrifugation at 7477 x g for 20 minutes at 4°C. The supernatant, containing the globulin 7S, was discarded and the precipitate was taken up in distilled water. The pH was adjusted to 6.4 to precipitate the 11S globulin, which underwent a further centrifugation at 7477 x g for 20 minutes at 4°C. The precipitate (11S) was dissolved in distilled water, dialyzed overnight, and stored at -24ºC. The protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951), with bovine serum albumin as standard protein. The number and molecular mass of the 11S protein subunits were estimated by electrophoresis in polyacrylamide gel-sodium dodecyl sulfate, in a discontinuous pH system, as described by Laemmli (1970), in the presence of the reducing agent 2-mercaptoethanol. The gel was calibrated with a mixture of proteins of known molecular mass, containing phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66

kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor soybean (21.5 kDa) and lactalbumin (14.4 kDa).

Biological evaluation

Twenty-seven male Wistar rats (Rattus norvegicus var. albinus) from the Central Animal House at the São Paulo State University (UNESP) at Botucatu were kept in a controlled environment (12:12h photoperiod, temperature 23 ± 2ºC and humidity 60 ± 5%) in individual metabolic cages, with free access to standard Purina® chow and water, for approximately 14 days, to adapt and reach an average weight of 180 to 200 grams. They were then separated into three dietary groups (n = 9) (Table I): 1) normal group (STD), given a diet containing casein as protein source, as recommended by the American Institute of Nutrition (AIN-93M), 2) hypercholesterolemic group (HC), given the standard diet plus 1% cholesterol and 0.5% cholic acid, as described by Nath et al. (1959), 3) HC+11S group, given the hypercholesterolemic diet plus 11S soy protein (300 mg/kg/day). The experimental period was 28 days. The glycinin soy protein was dissolved in saline and administered by gavage. The procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1985). The experimental procedure was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences UNESP (Protocol No. 32/2008).

The variations in body weight and food intake were checked daily during the 28-day period. At the end of the experiment and after 12 hours of fasting, animals were sacrificed by decapitation. Blood was collected into tubes containing SST gel separator II (BD Vacutainer®) and then centrifuged at 1900 x g for 15 minutes at 4ºC. Serum was collected and stored at -20ºC for subsequent biochemical analysis. The liver was removed, washed in saline (9g NaCl/L), weighed and immediately stored frozen at -20°C.

Table I. Composition (percent) of the diets and treatment of experimental group.

	Experimental groups[a]		
Ingredients	**STD**	**HC**	**HC + 11S**
Casein[1]	14.74	14.74	14.74
Starch	45.83	44.33	44.33
Starch dextrinated	15.5	15.5	15.5
Sucrose	10	10	10
Soybean oil	4	4	4
Cellulose	5	5	5
Mineral mix[2]	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture[2]	1	1	1
L-Cystine	0.18	0.18	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
Cholesterol[3]	0	1	1
Cholic acid[1]	0	0,5	0.5
Treatment			
Glycinin (mg/kg/dia)	-	-	300

Notes: [a]STD = standard diet , AIN-93 Composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93 plus 1 g/100 g cholesterol and 0.5g/100 g cholic acid; HC+11S = HC diet + glycinin (300mg/kg/day). [1]Sigma-Aldrich, Co., USA. [2]PragSoluções®, Co., Brazil. [3]Reagen, Co., USA.

Analysis of plasma and liver

Total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG) levels were analyzed in triplicate with Labtest® enzymatic kits. The fraction of non-HDL-C (LDL-C + VLDL-C) was calculated from the difference between total cholesterol and HDL-C and the atherogenic index was calculated as (TC - HDL-C)/HDL-C.

The TC and TG levels in the liver were determined as described by Haug and Hostmark (1987) and the biochemical tests were performed as in the plasma analysis. The hepatosomatic index (HSI) was calculated as (liver weight / body weight) x 100.

Statistical analysis

Data were analyzed with the program SigmaStat® 3.5 (Dundas Software, Germany, 1999), using analysis of variance (ANOVA) and the Student-Newman-Keuls (SNK) test for multiple comparison between treatments. Significance was accepted when $p<0.05$. All results were presented as mean ± standard error (SEM).

Results and Discussion

Chemical analysis showed that the soybean meal had 51.02% protein, while the glycinin fraction represented 14.4% of total solubilized protein. The SDS-PAGE gel showed bands in the range 22.07 to 58.14 kDa and a purity of glycinin sufficient to conduct in vivo studies, as described by Nagano et al. (1992) (Figure 1).

As observed in other studies (Fukui et al., 2002; Fukui et al., 2004; Duranti et al., 2004; Lovati et al., 1992; Neves et al., 2010), the addition of 1% cholesterol and 0.5% cholic acid to the diet caused the rats to develop hypercholesterolemia after 28 days, without interfering with weight gain or intake, as shown in Table II.

Table II. Body weight and food intake in experimental groups.

	Experimental groups[a]		
	STD	**HC**	**HC + 11S**
Initial weight (g)	195.23 ± 5.03[a]	196.55 ± 4.63[a]	194.55 ± 3.92[a]
Final weight (g)	287.77 ± 7.07[a]	295.01 ± 5.43[a]	298.53 ± 5.26[a]
Weight gain (g/day)	3.31 ± 0.24[a]	3.51 ± 0.32[a]	3.71 ± 0.22[a]
Food Consumption (g/day)	15.47 ± 0.27[b]	16.74 ± 0.33[a]	17.27 ± 0.29[a]

Notes: [a]STD = standard diet , AIN-93 Composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93 plus 1 g/100 g cholesterol and 0.5g/100 g cholic acid; HC+11S = HC diet + glycinin (300mg/kg/day).Values represented as mean ± SM. Different superscript letters in same row indicate a significant difference ($p<0.05$) between experimental groups.

Given its important role in metabolism, the weight of liver tissue is cited as a benchmark in many studies of cholesterol metabolism. As reported by Sirtori et al. (1984) in the HC group the liver weight was significantly higher than in group STD (Table III). The result for the HC+11S group indicated that hepatic weight was even higher than that in the HC group, contrasting with the results of Lovati et al. (1992), who found a reduction in the liver weight of rats fed a hypercholesterolemic diet, after administration of 11S or 7S globulins, and with those of Chen et al. (2003) and Fukui et al. (2002), who found no change after replacing the casein diet by different quantities of the fraction of non-hydrolyzed soy proteins. Thus, we consider that although the results are still conflicting, the hepatosomatic indices (HCI) in groups HC and HC +11S point to possible differences in the lipid profile of these two groups.

Table III. The liver weight and hepatosomatic index (HSI) of experimental groups.

	Experimental groups[a]		
	STD	**HC**	**HC + 11S**
Liver (g)	10.90 ± 0.45^{c}	13.54 ± 0.36^{b}	17.63 ± 0.28^{a}
HSI (wt %)	3.79 ± 0.12^{c}	4.59 ± 0.14^{b}	5.91 ± 0.12^{a}

Notes: [a]STD = standard diet , AIN-93 Composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93 plus 1 g/100 g cholesterol and 0.5g/100 g cholic acid; HC+11S = HC diet + glycinin (300mg/kg/day).Values represented as mean ± SM. Different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) between experimental groups.

The supply of glycinin (300 mg/kg body weight) represented an addition of only 2.75% to the dietary protein intake, indicating that the present results show its action as a functional compound rather than a source of protein.

Table IV presents the results of plasma total cholesterol measurements. The HC group showed significantly (171.79%) more TC than the STD group, indicating that the increased level of cholesterol in the diet increased the plasma cholesterol, disrupting the normal homeostatic balance maintained between the absorption of

cholesterol from the diet, endogenous synthesis and excretion of bile acids (Devlin, 2007). HC+11S group showed a decrease of 11.08% in plasma TC, compared to the HC group, a significant result in biological terms that confirms the data reported by Friedman and Brandon (2001).

Similar effects were also demonstrated by Yoshikawa et al. (2000), who attributed to glycinin, and more specifically to the peptide (Leu-Pro-Tyr-Pro-Arg), a reduction in total cholesterol of 25.4% and LDL-C of 30.6%, after an oral dose of 50mg/kg was fed to mice for two days. Lovati et al. (1992) investigated the effect of soy globulins in vitro and in vivo and found that Sprague-Dawley rats, fed a hypercholesterolemic diet and casein as protein source, showed reductions in plasma cholesterol of 34.84% and 32.70% after administration by gavage for 14 days of 7S and 11S globulins, respectively, at a dose of 30mg of protein isolate per day. Analysis suggested that soy globulin can stimulate the activity of LDL-C receptors in various cellular systems. The 7S fraction stimulated both the uptake and degradation of LDL-C in human liver cells. Moreover, in human skin fibroblasts, the 11S fraction was more effective than 7S in increasing the uptake of LDL-C, while the degradation of lipoproteins was not affected by either fraction in this cellular system. The authors concluded that β-conglycinin was more effective than glycinin, inducing higher expression of LDL-C receptors in the liver.

Table IV. Effect of diets on plasma lipid profile and hepatic lipid content in rats fed a hypercholesterolemic diet with and without glycinin.

	Experimental groups[a]		
	STD	**HC**	**HC + 11S**
Plasma			
TC (mmol/L)	1.56 ± 0.07[b]	4.24 ± 0.45[a]	3.77 ± 0.41[a]
HDL-C (mmol/L)	0.78 ± 0.03[b]	0.82 ± 0.06[b]	1.04 ± 0.04[a]
non-HDL-C (mmol/L)	0.78 ± 0.04[b]	3.42 ± 0.47[a]	2.74 ± 0.4[a]
TG (mmol/L)	0.48 ± 0.02[b]	1.09 ± 0.12[a]	0.85 ± 0.11[a]
Liver			
TC (µmol/g)	7.15 ± 0.34[b]	57.66 ± 1.06[a]	54.97 ± 2.12[a]
TG (µmol/g)	14.52 ± 0.91[c]	58.77 ± 3.97[a]	46.48 ± 4.06[b]
Atherogenic index	1.01 ± 0.05[b]	4.62 ± 0.87[a]	2.67 ± 0.38[b]

Notes: [a]STD = standard diet , AIN-93 Composition; HC = hypercholesterolemic diet: AIN-93 plus 1 g/100 g cholesterol and 0.5g/100 g cholic acid; HC+11S = HC diet + glycinin (300mg/kg/day). Values are represented as mean ± SM. TC = total cholesterol; HDL-C = high density lipoprotein; non-HDL-C = difference between TC and HDL-C; TG = triglycerides; Atherogenic index = non-HDL-C/HDL-C. Different superscript letters in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) between experimental groups.

In relation to plasma triglyceride levels, the groups HC and HC+11S differed from group STD, but there was no significant difference between them, although there was a 22% reduction in the HC+11S group, compared to the HC group (Table IV). As observed by Kingman (1991), the reduction of triglycerides due to ingestion of soy protein occur independently of changes in the cholesterol level.

There are several lines of evidence showing the negative correlation between the plasma level of HDL-cholesterol and the risk of coronary weast disease (Young et al., 2004; Scirica and Cannon, 2005; Lima e Couto, 2006). The results in Table IV show the positive role of 11S globulin in raising serum HDL-cholesterol, suggesting the protein has a protective effect, as HDL-C is known to play an important part in carrying cholesterol from the tissues to the liver, where it is metabolized (Von

Eckardstein et al., 2001; Fredenrich and Bayer, 2003). In this context, a study on peptides derived from soybean was reported by Rho et al. (2007) who showed that as higher concentrations of these peptides were offered to Sprague-Dawley rats, greater concentrations of plasma HDL-C were found. Adams et al. (2008) observed increases of 21% and 41% in HDL-C when the 11S fraction of soy protein isolate was added as a protein source to the diets of monkeys, compared to casein and lactalbumin, respectively. Meester48 found that soy protein reduced VLDL-C and triglycerides and increased HDL-C, without any effect on LDL-C.

The non-HDL-C plasma levels (Table IV) were several times higher in the HC group than in the STD group and 19.88% lower in group HC +11S than in the HC group. Similar data, associated with the hydrolyzed soy protein, were obtained by Zhong et al. (2007), who gave a hypercholesterolemic diet together with hydrolyzed soy protein at concentrations of 0.5 or 2.5g/kg in mice and observed significantly less non-HDL-C than in those treated only with the hypercholesterolemic diet, for a period of 30 days. Likewise, Neves et al. (2010) indicate the influence of 7S globulin in reducing the concentration of this fraction by 8% and 24.8%, when administered in concentrations of 200mg/kg/day and 300mg/kg/day, respectively, to rats fed a hypercholesterolemic diet, after a period of 28 days of treatment.

Regarding the cholesterol in liver tissue, the results shown in Table IV demonstrate that the HC group showed a significant increase of this variable, compared to STD. In group HC+11S, no significant difference from the HC group was observed. These results are similar to those obtained by Lovati et al. (1992), Chen et al. (2003) and Rho et al. (2007).

In relation to liver triglyceride, the levels observed in the HC+11S group showed a significant reduction of 20.91%, compared to the HC group. In contrast, Chen et al. (2003) found no difference in liver triglyceride in hypercholesterolemic rats after replacement of casein by various amounts of non-hydrolyzed fraction of soy protein in the diet. The study by Rho et al. (2007) showed a reduction of 11.21% of

this parameter in rats treated for 28 days with peptides derived from black soya, at a concentration of 10% of dietary calories. Shukla et al. (2007) demonstrated a significant reduction of hepatic triglyceride in Sprague-Dawley rats that received soy protein isolate, compared with casein as protein source, suggesting that this effect could result from the regulation of SREBP-1c and their target genes involved in the synthesis of fatty acids.

The atherogenic index shown in Table IV, which is the ratio non-HDL-C/HDL-C, is an indicator of predisposition to cardiovascular disease, and the HC group showed a significantly increased ratio (357.42%), compared to the STD group, while the HC+11S group was reduced by 42.21% relative to the HC group. We consider that this result is significant in biological terms, pointing to the 11S globulin as a protective factor for improvement of the atherogenic index in animals exposed to a hypercholesterolemic diet, since a low LDL/HDL ratio and low levels of plasma triglycerides are known to decrease cardiovascular disease risk (Friedman and Brandon, 2001; Sirtori et al., 2009; Erdman, 2000). Therefore, compounds that lower the level of cholesterol, and improve the profile of plasma lipoproteins, as noted in this study of glycinin, play an important role in helping to reduce the risk of heart disease. The peptides derived from soy and the 7S fraction also have similar effects on the atherogenic index, as found by Rho et al. (2007) after giving peptides derived from black soya at concentrations of 2%, 6% and 10% calories, in a diet containing cholesterol, to Sprague-Dawley rats. There were significant reductions of 30.78%, 48.88% and 80.04% in the index, respectively, relative to casein, in 28 days of experiment. A study by Aoyama et al. (2001) evaluated the administration of 7S globulin (β-conglycinin) as the protein source in a high-cholesterol diet of young rats for 10 days and observed a reduction of 27.43% in the atherogenic index, compared to animals receiving casein. Neves et al. (2010) showed a reduction of 56.4% when the 7S globulin was administered to hypercholesterolemic rats at a dose of

300mg/kg/day, compared to animals that received the hypercholesterolemic diet alone.

In this study, a daily dose of glycinin was given to a hypercholesterolemic group of rats, demonstrating a functional role for this fraction, particularly in raising HDL-C and reducing triglyceride liver. However, although numerous studies indicate the hypocholesterolemic effect of soy, the components of the globulin and the molecular mechanisms involved remain inconclusive (Lovati et al., 1992; Nagata et al., 1982; Potter, 1995, Torres et al., 2006).

References

Adams, M.R., Anthony, M.S., Chen, H. and Clarkson, T.B. (2008), "Replacement of dietary soy protein isolate with concentrates of soy 7S or 11S globulin has minimal or no effects on plasma lipoprotein profiles and biomarkers of coronary risk monkeys", Atherosclerosis, Vol. 196 No. 1, pp. 76-80.

Anthony, M.S, Clarkson, T.B., Hughes Jr, C.L., Morgan, T.M. and Burke, G.L. (1996), "Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys", Journal of Nutrition, Vol. 126, pp. 43-50.

Aoyama, T., Kohno, M., Saito, T., Fukui, K., Takamatsu, K., Yamamoto, T., Hashimoto, Y. Hirotsuka, M. and Kito, M. (2001), "Reduction by phytat-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats", Bioscience, Biotechnology. and Biochemistry, Vol. 65, pp. 1071-1075.

AOAC (1998), Official Methods of Analysis, 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

Carroll, K.K. and Kurowska, E.M. (1995), "Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies", Journal of Nutrition, Vol. 125, pp. 594S-597S.

Chen, J.R., Chiou, S.F., Suetsuna, K., Yang, H.Y. and Yang, S.C. (2003), "Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction", Nutrition, Vol. 19, pp. 676-680.

Consonni, A., Lovati, M.R., Manzoni, C., Pizzagalli, A., Morazzoni, P. and Duranti, M. (2010), "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", The Journal of Nutritional Biochemistry, Vol. 21, pp. 887-891.

Devlin, T.M. (2007), Manual de bioquímica com correlações clínicas, 6.ed., Edgard Blücher, São Paulo, SP.

De Meester, F, Zibadi, S. and Watson, R.R. (2010), Modern dietary fat intakes in disease promotion., Nutrition and Health Series, Humana, New York, NY.

Duranti, M. (2006), "Grain legume proteins and nutraceutical properties", Fitoterapia, Vol.77, pp. 67-82.

Duranti, M. and Gius, C. (1997), "Legume seeds: protein content and nutritional value", Field Crops Research, Vol. 53, pp. 31-45.

Duranti, M., Lovati, M.R., Dani, V., Barbiroli, A., Scarafoni, A., Castiglioni, S., Ponzone, C. and Morazzoni, P. (2004), "The α' subunit from soybean 7S globulin lowers plasma

lipids and upregulates liver β-VLDL receptors in rats fed a hypercholesterolemic diet", Journal of Nutrition, Vol. 134, pp. 1334-1339.

Erdman Jr, J.W. (2000), "Soy protein and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the AHA", Circulation, Vol. 102, pp. 2555-2559.

Fredenrich, A. and Bayer, P. (2003), "Reverse cholesterol transport, high-density lipoprotein and HDL cholesterol: recent data", Diabetes & Metabolim, Vol. 29 No. 3, pp. 201-205.

Friedman, M. and Brandon, D.L. (2001), "Nutritional and health benefits of soy proteins", Jounal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 49 No. 3, pp. 1069-1086.

Fukui, K., Tachibana, N., Fukuda, Y., Takamatsu, K and Sugano, M. (2004), "Ethanol washing does not attenuate the hypocholesterolemic potential of soy protein", Nutrition, Vol. 20, pp. 984-990.

Fukui, K., Tachibana, N., Wanezaki, S., Tsuzaki, S., Takamatsu, K, Yamamoto, T., Hashimoto, Y. and Shimoda, T. (2002), "Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, pp. 5717-5721.

Haug, A. and Hostmark, A.T. (1987), "Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil", Journal of Nutrition, Vol. 117, pp. 1011-1017.

Kingman, S.M. (1991), "The influence of legume seeds on human plasma lipid concentrations", Nutrition Research Reviews, Vol. 4, pp. 97-123.

Kwon, D.Y., Oh, S.W., Lee, J.S., Yang, H.J., Lee, S.H., Lee, J.H., Lee, Y.B. and Sohn, H.S. (2002), "Amino acid substitution of hypocholesterolemic peptide originated from glycinin hydrolysate", Food Science and Biotechnology, Vol. 11 No. 1, pp. 55-61.

Laemmli, U.K. (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, Vol. 227, pp. 680-685.

Lima, E.S. and Couto, R.D. (2006), "Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade: Structure and physiologic functions of high-density lipoproteins", Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Vol. 42 No 3, pp. 169-178.

Lovati, M.R., Manzoni, C., Gianazza, E. and Sirtori, C.R. (1998), "Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active β-conglycinin subunits", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 46 No. 7, pp. 2474-2480.

Lovati, M.R., Manzoni, C., Pizzagalli, A., Castiglioni, S. and Duranti, M.M. (2008), "Polypeptide from 7S soy globulin alfa' subunit up-regulates ldl-receptors in Hep-G2 cells", The FASEB Journal, Vol. 22, pp. 303-307.

Lovati, M.R., Manzoni, C., Corsini, A., Granata, A., Frattini, R., Fumagalli, R. and Sirtori, C.R. (1992), "Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture", Journal of Nutrition, Vol. 122, pp. 1971-1978.

Lovati, M.R., Manzoni, C., Gianazza, E., Arnoldi, A., Kurowska, E., Carrol, K.K. and Sirtori, C.R. (2000), "Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells", Jounal of Nutrition, Vol. 130, pp. 2543-2549.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951), "Protein measurement with the folin phenol reagent", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, pp. 265-275.

Mochizuki, Y, Maebuchi, M., Kohno, M., Hirotsuka, M., Wadahama, H., Moriyama, T., Kawada, T. and Urade, R. (2009), "Changes in lipid metabolism by soy β-conglycinin-derived peptides in HepG2 cells", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 57, pp. 1473-1480.

Nagano, T., Hirotsuka, M., Mori, H., Kohyama, K. and Nishinari, K. (1992), "Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 40, pp. 941-944.

Nagata, Y., Ishiwaki, N. and Sugano, M. (1982), "Studies on the mechanism of antihypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixtures in relation to the casein counterparts in rats", Journal of Nutrition, Vol. 112, pp. 1614-1625.

Nath, N., Wiener, R., Harper, A.E. and Elvehjem, C.A. (1959), "Diet and cholesterolemia. I. Development of a diet for the study of nutritional factors affecting cholesterolemia in the rat", Journal of Nutrition, Vol. 67 No. 2, p. 289-307.

National Research Council (1985), Guide for the care and use of laboratory animals. Revised ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, (NIH Publication nº 85-23)

Neves, V.A., Ferreira, E.S., Silva, M.A. and Demonte, A. (2010), "Soy β-conclycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet", Journal of Medicinal Food, In Press.

Pak, V.V., Koo, M.S., Kasymova, T.D. and Kwon, D.Y. (2005a), "Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity", Chemistry of Natural Compounds, Vol. 41 No. 6, pp. 710-714.

Pak, V.V., Koo, M., Lee, N., Kim, M.S. and Kwon, D.Y. (2005b), "Structure-activity relationships of the peptide Ile-Ala-Val-Pro and its derivatives revealed using the semi-empirical AM1 method", Chemistry of Natural Compounds, Vol. 41 No. 4, pp. 454-460.

Potter, S. (1995), "Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy", Journal of Nutrition, Vol. 125, pp. 606S – 611S.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey Jr, G.C. (1993), "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", Journal of Nutrition, Vol. 123, pp. 1939-1951.

Rho, S.J., Park, S., Ahn, C.W., Shin, J.K. and Lee, H.G. (2007), "Dietetic and hypocholesterolemic action of black soy peptide in dietary obese rats", Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 87, pp. 908-913.

Scarafoni, A., Magni, C. and Duranti, M. (2007), "Molecular nutraceutics as a mean to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health", Trends in Food Science & Technology, Vol. 18, pp. 454-463.

Scirica, B.M. and Cannon, C.P. (2005), "Treatment of elevated cholesterol", Circulation, Vol. 111, pp. e360-e363.

Shukla, A., Brandsch, C., Bettzieche, A., Hirche, F., Stangl, G.L. and Eder, K. (2007), "Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes", The Journal of Nutrition Biochemistry, Vol. 18 No. 5, pp.313-321.

Sirtori, C.R., Galli, C., Anderson, J.W. and Arnoldi, A. (2009), "Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins", Atherosclerosis, Vol. 203, pp. 8-17.

Sirtori, C.R., Galli, C., Lovati, M.R., Carrara, P., Bosisio, E and Kienle, M.G. (1984), "Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats", Journal of Nutrition, Vol. 114, pp. 1493-1500.

Torres, N., Torre-Villalvazo, I. and Tovar, A.R. (2006), "Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders", The Journal of Nutrition Biochemistry, Vol. 17, pp. 365-373.

Von Eckardstein, A., Nofer, J.R. and Assmann, G. (2001), "High-density lipoprotein and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport", Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Vol. 21 No. 1, pp. 13-27.

Wakai, K., Egami I, Kato, K., Kawamura, T., Tamakoshi, A., Lin, Y., Nakayama, T., Wada, M. and Ohno, Y. (1999), "Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese", Nutrition and Cancer, Vol. 33 No. 2, pp. 139-145.

Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R., Tsuruki, H. and Takahata, K. (2000), "Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases", Biofactors, Vol. 12 No. 1-4, pp. 143-146.

Young, C.E., Karas, R.H. and Kuvin, J.T. (2004), "High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease", Cardiology in Review, Vol. 12 No. 2, pp. 107-119.

Zhong, F., Liu, J., MA, J. and Shoemaker, C. (2007), "Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice", Food Research International, Vol. 40, pp. 661-667.