

Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos

Influence of whey protein on liver enzymes, lipid profile and bone formation of hypercholesterolemic rats

Fabiano Kenji HARAGUCHI¹
Maria Lucia PEDROSA^{2,3}
Heberth de PAULA¹
Rinaldo Cardoso dos SANTOS⁴
Marcelo Eustáquio SILVA^{3,4}

RESUMO

Objetivo

Avaliar o efeito do consumo das proteínas do soro do leite sobre parâmetros do metabolismo lipídico, hepático e renal, a formação óssea e as defesas antioxidantes de ratos submetidos à dieta hipercolesterolemiantes.

Métodos

Trinta e dois ratos Fisher adultos foram divididos em 4 grupos, recebendo as seguintes dietas: grupo C, dieta padrão; grupo H, dieta hipercolesterolemiantes; grupo PS, dieta padrão e proteínas do soro; grupo PSH dieta hipercolesterolemiantes e proteínas do soro. A ingestão alimentar e o ganho de peso foram monitorados semanalmente. Após 8 semanas, o sangue dos animais foi coletado para dosagem bioquímica e os animais foram eutanasiados. Foram utilizados os testes estatísticos, análise de variância e o teste de Tukey.

Resultados

As proteínas do soro não reduziram o colesterol plasmático de forma significativa, e promoveram um aumento na concentração plasmática de triacilgliceróis nos animais hipercolesterolêmicos. No entanto, reduziram a atividade da aspartato aminotransferase e da fosfatase alcalina, assim como a concentração plasmática de

¹ Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Programa de Doutorado. *Campus* Universitário, 35400-000, Ouro Preto, MG, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: F.K. HARAGUCHI. E-mail: <fabianokenji@gmail.com>.

² Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas. Ouro Preto, MG, Brasil.

³ Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Ouro Preto, MG, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição, Departamento de Alimentos. Ouro Preto, MG, Brasil.

creatinina. Não se observou nenhum efeito sobre as defesas antioxidantes avaliadas. As dietas contendo as proteínas do soro geraram ossos mais pesados, com maior diâmetro e comprimento que as dietas contendo caseína.

Conclusão

As proteínas do soro não apresentaram um efeito hipocolesteremiante significativo em ratos. No entanto, impediram de forma significativa a ocorrência de alterações nos parâmetros indicadores das funções hepáticas e renais provocadas pela dieta hipercolesteremiante. Os dados sugerem também que as proteínas do soro afetam positivamente a formação óssea, quando comparados com as dietas contendo caseína como fonte protéica.

Termos de indexação: Aminoácidos. Aspartato aminotransferases. Colesterol. Fosfatase alcalina. Hipercolesterolemia. Peptídeos e proteínas.

ABSTRACT

Objective

The aim of this study was to assess the effect of whey protein consumption on the lipid, hepatic and renal metabolism, bone formation and antioxidant defense system of rats given a hypercholesterolemic diet.

Methods

A total of 32 adult Fisher rats were divided into 4 groups: C group, standard diet; H group, hypercholesterolemic diet; WP group, standard diet with whey protein; WPH group, hypercholesterolemic diet with whey protein. Food ingestion and weight gain were monitored weekly. After 8 weeks, blood was collected for biochemical analysis and the rats were killed. The statistical tests analysis of variance and Tukey's test were performed.

Results

Whey protein did not lower serum cholesterol significantly and increased serum triglycerides in hypercholesterolemic rats. However, whey protein decreased the activity of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase, as well as serum creatinine. The assessed antioxidant defenses were not affected. Diets containing whey protein generated heavier, thicker and longer bones than casein diets.

Conclusion

Whey proteins did not have a significant hypocholesterolemic effect in rats. On the other hand, they significantly prevented changes in liver and kidney functions brought about by hypercholesterolemic diets. Data also suggest that whey proteins benefit bone formation when compared with casein diets.

Indexing terms: Amino Acids. Aspartate aminotransferases. Alkaline phosphatase. Cholesterol. Hypercholesterolemia. Peptides and proteins.

INTRODUÇÃO

As proteínas do soro do leite são extraídas da porção aquosa do leite gerada durante o processo de fabricação de alguns tipos de queijo. A produção do soro ocorre por etapas das quais fazem parte a coagulação da caseína do leite, a produção de ácidos, a dessoragem, a salga e, para alguns tipos, a maturação. O soro obtido após a dessoragem pode ser processado por diferentes técnicas de separação de proteínas, com o intuito de obter um concentrado, *Whey Protein*

Concentrate (WPC), ou um isolado, *Whey Protein Isolate* (WPI), com alta fração protéica. Essas proteínas caracterizam-se por possuírem alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada, e pela presença de seqüências de peptídeos bioativos, que apresentam diferentes propriedades fisiológicas funcionais¹⁻⁴.

As proteínas do soro são extensamente utilizadas pela indústria de alimentos, como na produção de fórmulas infantis, na panificação, na produção de embutidos e na sorveteria⁵. Atualmente, os WPC e WPI têm sido bastante consu-

midos por atletas e praticantes de atividade física, com o objetivo de obter benefícios como o ganho de massa muscular e a redução da gordura corporal^{4,6}. Estudos recentes têm atribuído diferentes propriedades funcionais às proteínas do soro, modulando respostas orgânicas em diferentes situações metabólicas, por exemplo, no estresse oxidativo⁷, como também em condições mórbidas como câncer⁸, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)⁹ e nas dislipidemias¹⁰. Seus efeitos sobre os parâmetros do metabolismo de lipídios de ratos trazem resultados conflitantes. Sautier *et al.*¹¹ observaram que dietas sem a adição de colesterol contendo as proteínas do soro apresentaram um efeito hipocolesterolemiantes em ratos adultos. Choi *et al.*¹² observaram que quando as dietas não eram acrescidas de colesterol, nenhum efeito sobre o perfil lipídico de ratos adultos era observado. Entretanto, com a adição dietética de colesterol, as proteínas do soro apresentaram efeito hipocolesterolemiantes tanto em animais adultos como jovens. Zhang & Beyner¹³ observaram que somente dietas com 30% de proteínas reduziram o colesterol plasmático e hepático, como também a concentração de triacilgliceróis. Jacobucci *et al.*¹⁴ observaram efeito hipocolesterolemiantes das proteínas do soro, quando comparadas à caseína, sendo este efeito, no entanto, acompanhado por um aumento na concentração de triacilgliceróis. A quantidade de proteína na dieta oferecida parece ser um fator essencial para observar o efeito hipocolesterolemiantes. Nesse sentido, dados sobre o efeito de dietas de manutenção (AIN-93M) modificadas na fonte protéica (proteínas do soro ao invés de caseína comercial) são escassos, ou inconclusivos¹³. Além disso, a comparação do efeito das proteínas do soro e da caseína sobre outros parâmetros bioquímicos, como, por exemplo, parâmetros da atividade hepática e renal, não foram avaliados e raramente são encontrados na literatura¹⁴. Estudos *in vitro* e com animais revelam também que as proteínas do soro contêm um componente conhecido como proteína básica do

leite (*milk basic protein* - MBP), que possui a habilidade de estimular a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas, assim como de suprimir a reabsorção óssea^{15,16}. O MBP é preparado a partir do fracionamento das proteínas do soro, a partir de uma resina de troca catiônica. Contém mais de 98% de proteína, e peptídeos como a lactoferrina, lactoperoxidase e outros componentes menores¹⁷. Yamamura *et al.*¹⁸ conduziram um estudo duplo cego com 30 mulheres durante um período de 6 meses. Resultados indicaram que uma dose diária de 40mg de MBP aumentou significativamente a densidade mineral óssea. Aoe *et al.*¹⁹ observaram que a suplementação de 40mg de MBP em um grupo de 33 mulheres adultas resultou em um aumento na densidade mineral óssea das mulheres suplementadas, em comparação ao grupo placebo. Marcadores bioquímicos indicaram também uma inibição da reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Apesar desses resultados, estudos utilizando somente concentrados e isolados protéicos do soro (WPC e WPI) existentes no mercado sobre a formação óssea não são conhecidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das proteínas do soro sobre parâmetros do metabolismo lipídico, hepático e renal, além do seu efeito na formação óssea e nas defesas antioxidantes de ratos submetidos à dieta hipercolesterolemiantes.

MÉTODOS

Foram utilizados 32 ratos Fisher adultos com peso médio de 209g. Os animais foram divididos em 4 grupos, com 8 animais cada, de acordo com o tipo de dieta recebida: o grupo C recebeu dieta padrão, AIN-93M²⁰; o grupo H recebeu dieta hipercolesterolemiantes; o grupo PS recebeu dieta AIN-93M modificada, com as proteínas do soro em substituição à caseína; e o grupo PSH recebeu dieta hipercolesterolemiantes com substituição da caseína pelas proteínas do soro.

A dieta padrão foi composta de (g/kg): caseína 140, mistura vitamínica 10⁽⁵⁾, mistura salina 35⁽⁶⁾, óleo de soja 40, colina 2, celulose 50 e amido de milho 723. A dieta H possuiu as mesmas características da dieta padrão, exceto para o óleo de soja (250g/kg), o colesterol (10g/kg) e o amido de milho (503g/kg). A dieta PS teve a mesma composição da AIN-93M, exceto pela substituição da fonte protéica, e a dieta PSH teve as mesmas características químicas da dieta H, exceto na fonte protéica. Foi utilizado como fonte de proteínas do soro o produto comercial 100% *Whey Protein (Optimum Nutrition®)*, contendo 81% de proteína. A composição centesimal das dietas encontra-se na Tabela 1. Os teores de proteínas, umidade, extrato etéreo e cinzas foram determinados segundo a metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists*²¹, e o de fibras, segundo a metodologia descrita por Lee et al.²². A diferença percentual restante correspondeu ao teor de carboidratos.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em condições padrão de temperatura, umidade, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Receberam as respectivas dieta e água *ad libitum* por 8 semanas. A ingestão alimentar e o ganho de peso foram monitorados semanalmente. Após 8 semanas, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas

e, posteriormente, pré-anestesiados com éter. O sangue foi então coletado por ensangüinação e centrifugado a 3000 x g por 10 minutos. Todos os procedimentos foram cuidadosamente realizados seguindo as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2007/108).

Colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL colesterol), triacilgliceróis, proteínas totais, albumina, uréia, creatinina, a atividade da aspartato aminotransferase (ASP) e alanina aminotransferase (ALT) foram dosados por métodos colorimétricos e enzimáticos usando-se *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). A atividade enzimática da paraoxonase (PON) foi medida com base na velocidade de hidrólise do fenilacetato, segundo a metodologia descrita por Beltowski et al.²³. Os níveis de sulfidrilas foram determinados usando o reagente de Ellman, como descrito por Sedlak²⁴.

Após serem sacrificados, os animais tiveram o osso fêmur direito retirado. O osso foi pesado com posterior aferição do comprimento e diâmetro, utilizando um paquímetro com precisão de 0,1mm.

Foi utilizada a análise de variância bivariada (*two-way ANOVA*) para testar diferença entre os

Tabela 1. Composição centesimal: teores de proteína, umidade, extrato etéreo, cinzas, fibras e carboidratos das dietas utilizadas no experimento. Ouro Preto (MG), 2006.

Grupos	Proteína	Umidade	Extrato etéreo	%	Cinzas	Fibras	Carboidratos
C	12,2	4,3	3,8		3,7	4,3	71,7
H	12,1	4,2	25,6		3,6	4,5	50,0
PS	12,0	4,5	3,5		3,7	4,4	71,9
PSH	11,9	4,3	25,3		3,8	4,4	50,3

C: grupo controle; H: grupo hipercolesterolêmico; PS: grupo controle com substituição da caseína pelas proteínas do soro; PSH: grupo hipercolesterolêmico com substituição da caseína pelas proteínas do soro.

⁵ Mistura vitamínica (expressa em mg/kg da mistura): acetato de retinol, 690; colecalciferol, 5; ácido p-aminobenzócio 10000; inositol 10000; niacina, 4000; pantotenato de cálcio, 4000; riboflavina, 800; tiamina HCl, 500; piridoxina, 500; ácido fólico, 200; biotina, 40; cianocobalamina, dl- α -tocoferol, 6700; sacarose q.s.p. 1kg

⁶ Mistura salina (expresso em g/kg da mistura): NaCl, 139,3; KI, 0,79; MgSO₄.7H₂O, 57,3; CaCO₃, 381,4; MnSO₄.H₂O, 4,01; FeSO₄.7H₂O, 27; ZnSO₄.7 H₂O, 0,548; CuSO₄.5 H₂O, 0,477; CoCl₂.6 H₂O, 0,023; KH₂PO₄, 389

efeitos da dieta (controle ou hiper) e os efeitos do tratamento (proteínas do soro) sobre os parâmetros bioquímicos e nutricionais realizados. Para determinar as diferenças entre as médias foi utilizado o teste de Turkey. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os dados relacionados ao perfil alimentar, nutricional, lipídico e as defesas antioxidantes dos animais estão mostrados na Tabela 2. As dietas causaram efeito sobre o consumo alimentar e o peso dos animais. Os animais que receberam dieta hipercolesterolemiantes (H e PSH) consumiram menor quantidade de alimento, apresentando, no entanto, maior ganho de peso. O perfil lipídico mostra que as dietas hipercolesterolemiantes promoveram um aumento nas concentrações de colesterol total e das frações aterogênicas, assim como uma redução na concentração do colesterol HDL. Observa-se a presença de uma interação entre a dieta e o tratamento sobre a concentração do colesterol HDL e de triacilgliceróis, sendo esta última afetada também pelo tratamento. As proteínas do soro, quando adicionadas à dieta hipercolesterolemiantes, promoveram um aumento

significante da concentração de triacilgliceróis. Não foi observada nenhuma diferença nas concentrações de sulfidrilas protéicas e livres entre os grupos. As dietas hipercolesterolemiantes promoveram redução na atividade da paraoxonase (PON).

Na Tabela 3 observa-se que as dietas hipercolesterolemiantes promoveram aumento no peso do fígado, na atividade da alanina aminotransferase (ALT), asparato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, concentração de proteínas totais e redução na concentração de albumina. Entretanto, as proteínas do soro impediram de forma significativa um aumento na atividade da AST provocada pela dieta hipercolesterolemiantes. A atividade da fosfatase alcalina foi afetada também pelo tratamento. Os animais dos grupos PS e PSH apresentaram menor atividade da fosfatase alcalina que os animais dos grupos controle (C) e hipercolesterolêmico (H). O peso dos rins foi semelhante entre os grupos, assim como a concentração de uréia. A concentração de creatinina foi aumentada pela dieta hipercolesterolemiantes, ocorrendo também uma interação com o tratamento. Quando a dieta hipercolesterolemiantes foi associada às proteínas do soro este efeito não foi observado.

Tabela 2. Consumo alimentar, ganho de peso, perfil lipídico de ratos submetidos à dieta controle ou hipercolesterolemiantes, após 8 semanas de experimento. Ouro Preto (MG), 2006.

Itens	Grupos							
	C		H		PS		PSH	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Ganho de peso (g)*	31,50	17,83	58,00	14,43	28,38	3,81	46,63	14,55
Consumo alimentar (g)*	584,15	35,52	456,43	43,83	565,92	43,31	449,56	37,27
Colesterol total (mg/dL)*	81,57	7,21	438,54	230,35	80,10	10,06	344,82	188,77
Colesterol HDL (mg/dL) ⁱ	57,84	10,10 ^a	9,33	1,90 ^b	48,61	9,10 ^a	15,96	16,20 ^b
Outras frações (mg/dL)*	23,73	7,64	429,21	229,50	31,50	5,84	328,86	191,53
Triacilgliceróis (mg/dL) ^{#i}	92,23	53,94 ^{b,c}	47,48	30,23 ^c	128,78	38,78 ^b	196,22	30,32 ^a
Sulfidrilas protéicas	329,26	46,33	315,82	20,24	310,72	30,38	335,51	29,84
Sulfidrias livres	74,17	4,08	71,85	7,06	74,40	5,24	79,27	6,25
Paraoxonase (U/mL) ⁱ	48,92	6,29 ^a	21,41	1,80 ^b	39,31	5,87 ^a	28,75	11,26 ^b

Valores expressos em média (M) e desvio-padrão (DP); n=8 por grupo. * Efeito da dieta $p < 0,05$. # Efeito do tratamento, $p < 0,05$; ⁱ indica ocorrência de interação entre a dieta e o tratamento. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença para $p < 0,05$.

C: ratos alimentados com dieta padrão; H: ratos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes; PS: ratos alimentados com dieta composta pelas proteínas do soro em substituição à caseína; PSH: ratos alimentados com dieta hipercolesterolemiantes, composta pelas proteínas do soro em substituição à caseína.

Tabela 3. Peso do fígado, rins, função hepática (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais e albumina) e renal (uréia e creatinina) de ratos adultos submetidos à dieta controle ou hipercolesterolemia, após 8 semanas de experimento. Ouro Preto (MG), 2006.

Itens	Grupos							
	C		H		PS		PSH	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Peso do fígado (g)*	6,13	0,58	10,98	1,09	5,79	0,34	9,69	2,07
Alanina aminotransferase (UI)*	17,68	5,66	32,33	10,8	15,75	4,29	29,16	12,43
Aspartato aminotransferase (UI) ⁱ	51,08	7,15 ^c	112,62	19,8 ^a	55,04	19,79 ^c	85,69	15,76 ^b
Fosfatase alcalina (U/L)* #	21,38	4,81	54,19	17,56	18,21	3,41	36,91	12,65
Proteínas totais (g/dL)*	7,17	0,69	8,29	0,82	7,53	0,29	7,84	0,60
Albumina (g/dL)*	3,59	0,32	3,35	0,30	3,72	0,29	3,46	0,23
Peso dos rins (g)	1,21	0,06	1,25	0,13	1,23	0,07	1,28	0,15
Uréia (mg/dL)	29,29	7,88	26,92	2,57	26,73	5,70	27,2	4,58
Creatinina (mg/dL) ⁱ	1,16	0,14 ^c	1,65	0,25 ^a	1,23	0,12 ^{b,c}	1,42	0,12 ^b

Valores expressos em média (M) e desvio-padrão (DP), n=8 por grupo. * Efeito da dieta $p<0,05$. # Efeito do tratamento, $p<0,05$; ⁱ indica ocorrência de interação entre a dieta e tratamento. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença para $p<0,05$.

C: ratos alimentados com dieta padrão; H: ratos alimentados com dieta hipercolesterolemia; PS: ratos alimentados com dieta composta pelas proteínas do soro em substituição a caseína; PSH: ratos alimentados com dieta hipercolesterolemia, composta pelas proteínas do soro em substituição a caseína.

Tabela 4. Peso, diâmetro e comprimento do fêmur de ratos adultos submetidos à dieta controle ou hipercolesterolemia. Ouro Preto (MG), 2006.

	Grupos							
	C		H		PS		PSH	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Peso do fêmur (g) [#]	0,85	0,04	0,88	0,07	0,91	0,06	0,92	0,06
Comprimento do fêmur (cm) [#]	3,84	0,04	3,83	0,07	3,89	0,09	3,90	0,08
Diâmetro do fêmur (mm) [#]	3,20	0,19	3,16	0,15	3,4	0,24	3,40	0,24

Valores expressos em média (M) e desvio-padrão (DP); n=8 por grupo. # Efeito do tratamento, $p<0,05$.

C: ratos alimentados com dieta padrão; H: ratos alimentados com dieta hipercolesterolemia; PS: ratos alimentados com dieta composta pelas proteínas do soro em substituição a caseína; PSH: ratos alimentados com dieta hipercolesterolemia, composta pelas proteínas do soro em substituição a caseína.

As características dos ossos dos animais alimentados com as diferentes dietas estão mostradas na Tabela 4. O tratamento afetou todos os parâmetros estudados. As dietas PS e PSH geraram fêmures maiores, mais pesados e com maior diâmetro que as dietas C e H.

DISCUSSÃO

Os animais que receberam dietas hipercolesterolemiantes (H e PSH) apresentaram maior ganho de peso que os demais, apesar de terem consumido uma quantidade significativamente

menor de alimento. Esse comportamento é comumente observado em ratos, nos quais a ingestão alimentar é inversamente proporcional à densidade energética do mesmo. Dietas hipercolesterolemiantes caracterizam-se pelo alto percentual de gordura (25%), tornando-as altamente mais energéticas. Há de destacar também o fato de os animais utilizados serem adultos, diferentemente de ratos jovens, cuja necessidade e utilização de lipídios para o crescimento são maiores. Assim, essas dietas tendem a promover, em animais adultos, maior acúmulo de gordura subcutânea e visceral, contribuindo para o maior ganho de peso. Ao analisar o perfil sérico de lipídios, observou-se

que a dieta PSH não foi capaz de reduzir o colesterol plasmático de forma significativa. Apesar de o efeito hipocolesterolemiantes das proteínas do soro já ter sido demonstrado em outros modelos animais²⁵, em ratos a literatura mostra ainda dados conflitantes. Trabalhando com dietas contendo 23% de proteínas do soro e sem adição de colesterol, Sautier *et al.*¹¹ observaram que as proteínas do soro reduziram o colesterol total de ratos adultos quando comparadas à caseína. No entanto, observaram que esse efeito era resultante de uma diminuição da fração HDL. Zhang & Beynen¹³ observaram que somente dietas com alto teor de proteínas do soro (30%) foram capazes de reduzir a concentração de colesterol total de ratos. Dietas contendo 15% de proteína não afetaram a concentração plasmática de colesterol total, mas reduziram a concentração de colesterol hepático. Esses dados sugerem que as proteínas do soro estariam interferindo na síntese endógena de colesterol. Assim como observado por Zhang & Beynen¹³, verificou-se que dietas com 14% de proteínas do soro não foram suficientes para promover uma redução significativa do colesterol plasmático, apesar de uma tendência ter sido apontada. Quanto às frações aterogênicas do colesterol Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL), não foi identificado nenhum efeito significativo das proteínas do soro. Entretanto, observou-se que as dietas PS e PSH aumentaram significativamente a concentração de triacilgliceróis. Choi *et al.*¹² e Jacobucci *et al.*¹⁴ constataram que as proteínas do soro reduziram o colesterol plasmático de ratos alimentados com dietas hipercolesterolemiantes, mas observaram, assim como no presente estudo, que as proteínas do soro promoveram um aumento na concentração de triacilgliceróis. Entre os fatores que parecem influenciar os efeitos das proteínas do soro sobre o perfil lipídico de ratos, a quantidade de proteína na dieta parece ser um fator essencial. Portanto, os dados do presente estudo mostram que dietas de manutenção para ratos adultos, como a descrita por Reeves *et al.*²⁰, (AIN-93M) modificadas na fonte protéica (proteínas do soro pela caseína), não apresentam efeito hipocolesterolemiantes. A análise destes

dados, assim como de outros trabalhos existentes na literatura, sugere que o efeito das proteínas do soro sobre o metabolismo lipídico de ratos é dependente de uma complexa interação entre a fonte e a quantidade protéica, o colesterol dietético e a idade dos animais.

A paraoxonase (PON) é uma proteína que se encontra associada ao HDL de mamíferos. Esta enzima apresenta ação antioxidante, destruindo biologicamente lipídios peroxidados em lipoproteínas e nas células arteriais. Sua atividade pode ser afetada por fatores fisiológicos, patológicos e mesmo dietéticos²⁶. Em modelos animais, as dietas hiperlipídicas reduzem a atividade enzimática da PON²⁷. Os resultados corroboram esta observação. Além disso, observou-se que as proteínas do soro apresentaram uma tendência em impedir a redução de sua atividade ocasionada pela dieta hipercolesterolemiantes.

Alterações na atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são importantes marcadores de doenças ou lesão tecidual, especificamente no fígado²⁸. Dietas ricas em colesterol promovem um aumento no estresse oxidativo no fígado²⁹, resultando em um aumento na atividade dessas enzimas. Verificou-se que as proteínas do soro, quando adicionadas à dieta rica em colesterol (PSH), impediram o aumento da AST de forma significativa, sugerindo um efeito protetor ao estresse oxidativo provocado pela dieta hipercolesterolemiantes. Esse efeito protetor pode ser corroborado também por ter sido observada uma redução na atividade da fosfatase alcalina nos animais que receberam as proteínas do soro. A determinação da atividade da fosfatase alcalina é bastante útil no diagnóstico de doenças hepatobiliares³⁰. Sua concentração permanece elevada em diversas condições mórbidas, como na obstrução biliar extra e intra-hepática, colestases e hepatite. Dietas ricas em gordura favorecem a formação de cálculos biliares, podendo gerar danos hepáticos por obstrução dos canais biliares no fígado³¹. Assim, os dados deste estudo sugerem que as proteínas do soro apresentaram um efeito protetor para o fígado contra os efeitos deletérios da dieta hipercolesterolemiantes. Os parâmetros

da função renal revelam que a concentração de creatinina foi afetada pela dieta hipercolesterolemiantes, indicando um possível comprometimento da função do órgão. Observou-se que as proteínas do soro impediram de forma significativa o aumento na concentração de creatinina, sugerindo também um efeito protetor do comprometimento da função renal gerado pela dieta hipercolesterolemiantes.

Os resultados mostram também que as dietas PS e PSH geraram animais com fêmures maiores, mais pesados e com maior diâmetro. Parâmetros morfométricos, como comprimento, peso e diâmetro, podem ser usados com indicadores do desenvolvimento ósseo em ratos³². Recentemente, estudos têm sugerido que o *Milk Basic Protein*, possui a habilidade de estimular células osteoblásticas e osteoclásticas. Toba *et al.*³³ verificaram que a administração de 300mg de *Milk Basic Protein* em 30 homens adultos saudáveis aumentou a concentração de hormônios indicadores da formação óssea, osteocalcina e do pró-peptídeo pró-colágeno I (PICP) após 16 dias de estudo. Aumento da densidade mineral óssea com a suplementação do MBP tem sido observado por diferentes autores¹⁷⁻¹⁹. Entretanto, trabalhos utilizando concentrados e isolados protéicos do soro do leite existentes no mercado, como o utilizado no presente trabalho, não são conhecidos. Possivelmente, a presença de peptídeos bioativos das proteínas do soro foi determinante para esses efeitos. Takada *et al.*¹⁵ sugerem que esses componentes bioativos são importantes para a formação óssea via ativação dos osteoblastos. Assim, estes resultados indicam que a utilização desses concentrados e isolados protéico do soro (WPC e WPI) parece exercer os mesmos efeitos observados com a administração do MBP.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados deste estudo sugerem que as proteínas do soro não apresentaram um efeito hipocolesterolemiantes significativo em ratos, apesar de essa tendência ter sido observada. Assim como em outros trabalhos, acredita-

-se que esse efeito possa interagir e ser regulado por fatores como a idade dos animais, o colesterol e a quantidade de proteína dietética. No entanto, foi observado que as proteínas do soro impediram de forma significativa a ocorrência de alterações nos parâmetros indicadores das funções hepáticas e renais provocadas pela dieta hipercolesterolemiantes. Os dados sugerem também que as dietas contendo as proteínas do soro afetaram positivamente a formação óssea, quando comparadas às dietas contendo caseína, hipercolesterolemiantes, ou não.

COLABORADORES

F.K. HARAGUCHI responsável pela idealização do ensaio, pela coleta dos dados, pela revisão da literatura e pela redação do manuscrito. M.L. PEDROSA, H. PAULA e R.C. SANTOS responsáveis pela análise dos dados, pela redação e pela revisão crítica do manuscrito. M.E. SILVA responsável pela captação de recursos, pela idealização do ensaio, pela análise dos dados, pela redação e pela revisão crítica do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro do leite. *Rev Nutr.* 2004; 17(4):397-409.
2. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77(6):1537s-43s.
3. De Wit JN. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J Dairy Sci.* 1998; 81(3):597-608.
4. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J Nutr Biol.* 2003; 14(5):251-8.
5. Kinsella JE, Whitehead DM. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Adv Foods Nutr Res.* 1989; 33(1):343-438.
6. Haraguchi FK, Abreu WC, De Paula H. Proteínas do soro: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr.* 2006; 19(4):479-88.
7. Lands LC, Grey VL, Smoutas AA. Effect of supplementation with cysteine donor on muscular performance. *J Appl Physiol.* 1999; 87(4):1381-5.

8. McIntosh GH, Le Leu RK. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. *Nutr Res.* 2001; 21(7): 1053-66.
9. Micke P, Beeh KM, Buhl R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur J Nutr.* 2002; 41(1):12-8.
10. Nagaoka S, Kanamuru Y, Kuzuya Y, Kojima T, Tomotsu K. Comparative studies on the serum cholesterol lowering action of whey protein and soybean protein in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992; 56(9):1484-5.
11. Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Suquet JP, Lemonnier D. Effects of whey protein, casein, soya-bean and sunflower proteins on the serum, tissue and faecal steroids in rats. *Br J Nutr.* 1983; 49(3):13-9.
12. Choi YS, Ikeda I, Sugano M. The combined effects of dietary proteins and fish oil on cholesterol metabolism in rats of different ages. *Lipids.* 1989; 24(6):506-10.
13. Zhang X, Beynen A. Lowering effect of dietary milk-whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Br J Nutr.* 1993; 70(1):139-46.
14. Jacobucci HB, Dias NGP, Sgarbieri VC, Borges PZ, Tanikawa C. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein, and liver cholesterol. *Nutr Res.* 2001; 21(6):905-15.
15. Takada Y, Aoe S, Kumegawa M. Whey protein stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 223(2):445-9.
16. Toba Y, Takada Y, Yamamura J, Tanaka M, Matsuoka Y, Kawakami H, *et al.* Milk basic protein: a novel protective function of milk against osteoporosis. *Bone.* 2000; 27(3):403-8.
17. Marshall K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev.* 2004; 9(2):136-56.
18. Yamamura J, Aoe S, Toba Y, Motouri M, Kawakami H, Kumegawa M, *et al.* Milk basic protein (MBP) increases radial bone mineral density in healthy adult women. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002; 66(3):702-4.
19. Aoe S, Toba Y, Yamamura J, Kawakami H, Yahiro M, Kumegawa M, *et al.* Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(4):913-8.
20. Reeves FG, Nielsen FH, Fahey Jr JC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition *Ad Hoc* Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr.* 1993; 123(11):1939-51.
21. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC. 15th ed. Arlington: AOAC;1990.
22. Lee SC, Prosky L, Devries JW. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. *J Assoc Off Chem Int.* 1992; 75:395-416.
23. Beltowski J, Wójcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON 1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis.* 2003; 170(1):21-9.
24. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25(1): 192-205.
25. Lovati, MR, West CE, Sirtori CR, Beynen AC. Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rabbits. *Br J Nutr.* 1990; 64(2):473-85.
26. Aviram M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radical Biol Med.* 2004; 37(9): 1301-3.
27. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, *et al.* Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Investig.* 1996; 97(7): 1630-9.
28. Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoda S, Ota K. The *in vivo* cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reoxygenation injury of rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 318(2):439-45.
29. Kanhal MA, Ahmad F, Othman AA, Arif Z, Orf S, Murshed KS. Effect of pure and oxidized cholesterol-rich diet on some biochemical parameters in rats. *Int J Food Sci Nutr.* 2002; 53(5): 381-8.
30. Fukatsu T. Alkaline phosphatase. *Rinsho Byori.* 2001; Suppl 116:27-35.
31. Muriel P. High fat diet and liver damage induced by biliary obstruction in the rat. *J Appl Toxicol.* 1995; 15(2):125-8.
32. Souza DM, Rocha D, Kantorski KZ, Rocha RF. Influência do consumo crônico de álcool etílico na morfologia de ossos longos em ratas adultas jovens. *Ciênc Odontol Bras.* 2007; 10(1):19-25.
33. Toba Y, Takada Y, Itabashi A, Morita Y, Hirai T, Suguri T, *et al.* Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(6):1353-7.

Recebido em: 8/10/2007
 Versão final reapresentada em: 30/9/2008
 Aprovado em: 13/4/2009