

## **EFEITO PROTETOR DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE SORO DE LEITE NA MUTAGÊNESE E ASPECTOS MOLECULARES IN VIVO**

JULIANA P. **MORALES**<sup>1</sup>; MARIA TERESA B. **PACHECO**<sup>2</sup>; LUCIANO B. **CARVALHO-SILVA**<sup>3</sup>; PABLO CHRISTIANO B. **LOLLO**<sup>4</sup>; VERA S. N. **SILVA**<sup>5</sup>

**Nº 12228**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades mutagênicas/antimutagênicas e expressão gênica da HSP-70 em camundongos com dietas a base de hidrolisados proteicos de soro de leite. Os hidrolisados foram produzidos a partir do concentrado protéico do soro de leite submetido à hidrólise com diferentes sistemas enzimáticos (alcalase, flavourzyme e pancreatina), em grau de hidrólise de aproximadamente 20%. A composição centesimal foi realizada pelos métodos descritos pela AOAC e o perfil aminoacídico, em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com derivatização pré-coluna. Os animais receberam a dieta testes (12% proteína) por 15 dias e no 15º dia foram induzidos a lesão mutagênica por ciclofosfamida e sacrificados no 16º dia. A atividade mutagênica/antimutagênica dos hidrolisados foi determinada pelo teste do micronúcleo em medula óssea. A expressão da proteína HSP70 foi mensurada no fígado dos animais por imunodeteção através de “western blot”. Foram obtidos hidrolisados com concentração proteica de  $89.64 \pm 0.56$ ,  $89.31 \pm 0.64$  e  $88.36 \pm 0.65$ , a partir da hidrólise com alcalase, pancreatina e flavourzyme, respectivamente. Em nenhum dos produtos testados foi verificada atividade mutagênica. A atividade antimutagênica foi detectada nos animais que receberam os hidrolisados obtidos por flavourzyme e alcalase (28.54% e 27.57%, respectivamente). A partir da expressão da HSP-70, confirmou-se estresse nos animais submetidos a injeção intraperitoneal, sendo observada redução da expressão da HSP70 em todas as fontes proteicas utilizadas. A partir dos dados obtidos pode-se concluir que a hidrólise enzimática por alcalase e flavourzyme resultou em efeito antimutagênico e, todas as fontes proteicas foram eficientes no controle da expressão da HSP.

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Farmácia, UNIFAL, Alfenas-MG,  
ju.pm@hotmail.com

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, UNIFAL, ALFENAS-MG.

<sup>4</sup> Colaborador: Pesquisador, Unicamp, Campinas-SP.

<sup>5</sup> Colaboradora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the mutagenic/antimutagenic properties and gene expression of HSP-70 in mice with diets based on whey protein hydrolysates. The hydrolysates were produced from the concentrate of whey protein subjected to enzymatic hydrolysis with different systems (alcalase, flavourzyme and pancreatin), degree of hydrolysis about 20%. The percentage composition was performed by methods described by the AOAC and the amino acids profile in high-performance liquid chromatography (HPLC). The animals received the est diet for 15 days (protein 12%) and in 15<sup>th</sup> day were induced to mutagenic lesion by cyclophosphamide and sacrificed in 16<sup>th</sup> day. The mutagenic / antimutagenic activity of the hydrolysates was determined by the micronucleus test in bone marrow. The expression of HSP70 protein was measured in the liver of animals by immunodetection by western blot. Were obtained hydrolysed with protein concentration of  $89.64 \pm 0.56$ ,  $89.31 \pm 0.64$  and  $88.36 \pm 0.65$ , by hydrolysis with alcalase, flavourzyme and pancreatin, respectively. From the expression of HSP-70, stress in animals subjected to intraperitoneal injection was confirmed and in all the protein sources used there was reduced expression of HSP70. From the data obtained it can be concluded that the enzymatic hydrolysis by alcalase and flavourzyme resulted in antimutagenic effect (28,54% and 27,57%, respectively), and all protein sources were effective in controlling HSP expression.

## INTRODUÇÃO

A hidrólise enzimática de concentrado ou isolado proteico do soro de leite bovino tem sido utilizada como ferramenta para obtenção de novos ingredientes alimentícios com alegação de propriedade de saúde. Dependendo do grau de hidrólise, os hidrolisados protéicos resultam em peptídeos de composição e tamanhos variados, o que pode resultar em efeitos fisiológicos benéficos (PACHECO et al., 2008). A partir desses efeitos, alguns peptídeos são utilizados no desenvolvimento de suplementos alimentares para uso em algumas condições clínicas como alergias alimentares, doenças degenerativas e câncer.

Estudos com animais mostraram que essas proteínas apresentam atividades anticarcinogênicas e antimutagênica. Elas apresentam essas propriedades por aumentarem a concentração de GSH em tecidos relevantes, já que a geração de radicais livres representa frequentemente um fator crítico na carcinogênese (HONGSPRABHAS et al., 2011; BOUNOUS, 2000).

As “heat shock proteins” (HSPs) são conhecidas como proteínas do estresse. Trata-se de um sistema natural de defesa endógena que é capaz de proteger e reparar danos. Esse sistema é ativado no momento em que ocorre qualquer alteração na homeostase orgânica, incluindo aumentos na temperatura, produção de espécies reativas de oxigênio, isquemia, hipóxia e privação de glicose, entre outros tipos de estresse fisiológico (SILVER & NOBLE, 2011; MORIMOTO, 1998). Elas auxiliam a síntese de novas proteínas, conservando e mantendo sua forma estrutural (BURG et al., 2007), sendo consideradas essenciais no processo de recuperação celular. Evidências experimentais indicam que o aumento da disponibilidade de glutamina às células pode aumentar a expressão das HSPs e a capacidade da célula em resistir a lesões (SANDRES & KON, 1991). Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades mutagênicas/antimutagênicas e expressão gênica da HSP-70 em animais alimentados com dieta a base de hidrolisados de proteínas soro de leite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O isolado proteico de soro de leite (IPS- PROVON®Protein/Glanbia Nutritionals Inc.) foi utilizado como matéria-prima para hidrólise. Enzimas utilizadas: 1) alcalase (*Bacilluslicheniformis*, atividade  $2,4 \mu\text{g}^{-1}$  proteína), 2) flavourzyme 1000L (*Aspergillusoryzae*, atividade  $500 \mu\text{g}^{-1}$  proteína), 3) pancreatina (pâncreas porcine, atividade 4xUSP). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico. Ciclofosfamida (CPA/ Sigma, St. Louis, MO-US).

### **Caracterização do isolado protéico de soro de leite (IPS)**

#### **Determinação de Umidade, Proteína Total, Cinzas, Lipídeos e Açúcares.**

Segundo metodologia descrita por Horwitz (2010), sendo utilizado o fator para conversão do N para a proteína de 6,38. A determinação do teor de açúcares da amostra foi realizada por HPLC, segundo metodologia descrita por Burgner & Feinberg (1992).

#### **Determinação de aminoácidos totais e Triptofano**

Os aminoácidos após a hidrólise ácida (HCl 6N/  $110^{\circ}\text{C}$ , 22h) das amostras foram derivativados com fenil isotiocianato e analisados por cromatografia líquida utilizando: coluna de fase reversa Shimadzu HPLC e detecção a 240nm (HAGEN et al., 1989). A quantificação foi baseada numa mistura padrão de aminoácidos (standard H/Pierce/P/N 20088). A determinação de triptofano foi feita segundo metodologia descrita por Spies (1967).

### Hidrólise enzimática

Foi utilizado o método do pHstat (volume de base consumida) descrito por Adler-Nissen (1986)

A Tabela 1 apresenta as condições de ensaio utilizadas no pH-stat, para a hidrólise do IPS, sendo as condições foram otimizadas previamente. Em seguida, os hidrolisados foram liofilizados.

**Tabela 1.** Condições utilizadas para hidrólise do isolado protéico de soro de leite.

Enzima	pH	Relação E/S*	Temperatura (°C)
Alcalase	8,0	1%	60
Pancreatina	8,0	4%	40
Flavourzyme	6,7	2,6%	55

\*E/S= relação enzima/substrato, quantidade de enzima (%) utilizada em relação ao substrato

### Ensaio Biológico

#### Animais

Para análises *in vivo*, foram utilizados camundongos machos Swiss, com 6-7 semanas de idade e 25±5g escolhidos de forma randômica, provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG, onde permaneceram durante todo o período experimental. Os animais foram mantidos sob condições controladas (fotoperíodo de 12h e temperatura de 22±2° C), recebendo ração e água *ad libitum*.

#### Preparo da Dieta

As dietas foram elaboradas conforme o “American Institute of Nutrition” (REEVES et al., 1993). Os animais foram mantidos em dietas AIN-93G modificadas, formuladas com uma única fonte de proteína, sendo os hidrolisados, a caseína ou o IPS, com concentração de proteína bruta de 12 %.

#### Teste do micronúcleo

Para delineamento experimental, os grupos 1 (controle positivo), 2 (controle negativo) receberam dieta contendo isolado protéico do soro de leite (IPS) e os grupos 9 (controle positivo) e 10 (controle negativo) receberam dieta como fonte protéica a caseína (12%). No 15º dia do experimento, 24 horas antes da eutanásia, o controle negativo e positivo receberam dose única de NaCl 0,9% e a substância mutagênica, a ciclofosfamida (CPA) 50 mg/kg pc, respectivamente. Os grupos 3, 4 e 5 receberam dietas contendo hidrolisados IPS com alcalase, pancreatina e flavourzyme, respectivamente, e ao final do experimento (15º dia) aplicação de CPA 50 mg/kg pc. Esses grupos permitiram a avaliação do efeito protetor da proteína teste, enquanto os

grupos 6, 7 e 8 receberam dieta contendo hidrolisados a partir de alcalase, pancreatina e flavourzyme respectivamente, e ao final do experimento aplicação de NaCl 0,9%, a avaliação do seu efeito mutagênico. Após 24 horas da aplicação de CPA e NaCl os animais foram sacrificados. O método utilizado para o sacrifício foi o que induz a perda rápida da consciência e morte sem dor e estresse. Logo em seguida do sacrifício, a medula óssea dos animais foram coletadas utilizando soro fetal bovino e os dois fêmures de cada indivíduo. O material da medula óssea re-suspendido em soro fetal bovino foi centrifugado, por 5 minutos, a 1000rpm, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi re-suspendido em 0,5ml de soro fetal bovino. Foram preparadas duas lâminas (esfregaços) de cada animal, seguindo o protocolo de coloração de acordo com a metodologia descrita por McGregor et al. (1987)

#### **Avaliação da expressão gênica da proteína HSP 70**

A quantificação das “Heat Shock Proteins” (HSP 70), responsivas frente a situações de estresse, foi realizada por imunodeteção por western blot segundo MacPhee (2010). Fragmentos de fígado dos camundongos foram utilizados para doseamento dessas proteínas.

#### **Análises Estatísticas**

Para a elaboração dos modelos, foi utilizado *software* “Statistica: Basic Statistics and Tables”, com a finalidade de assegurar a validade dos coeficientes dentro de um nível de confiança de 95%, através de análises estatísticas apropriadas. Após a análise estatística dos coeficientes, foi realizada análise de variância (ANOVA), que consiste na avaliação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e do Teste F, verificando se o modelo apresenta um ajuste adequado dos dados experimentais.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Caracterização da matéria-prima**

O teor (g/100g) de proteína do isolado proteico de soro de leite foi de aproximadamente 84,90% (base seca, 90,20%). A umidade de  $5,86 \pm 0,11$ , cinzas de  $1,66 \pm 0,09$ , lipídios  $0,9 \pm 0,0$  e lactose  $9,72 \pm 0,00$ . Conforme a Tabela 2, a concentração de umidade, cinzas, lipídios e lactose está de acordo com a literatura (CARVALHO-SILVA et al, 2012).

#### **Caracterização dos hidrolisados protéicos**

A composição centesimal dos hidrolisados podem ser visualizadas na tabela 2:

**Tabela 2.** Caracterização física e química parcial dos hidrolisados e isolado proteico de soro de leite (IPS) em base seca.

Determinações	Hidrolisado			
(g/100g)*	Alcalase	Pancreatina	Flavourzyme	IPS
Umidade	4,90 ± 0,22	9,68 ± 0,17	5,26 ± 0,13	5,86 ± 0,11
Cinzas**	11,44 ± 0,13	11,84 ± 0,12	15,22 ± 0,07	1,76 ± 0,09
Proteínas**	79,75 ± 0,56	76,80 ± 0,65	72,09 ± 0,64	90,18 ± 0,22
<b>Aminoácidos (g/100 g proteína)</b>				
Ác. Aspártico	7,99	7,83	7,51	11,09
Ác. Glutâmico	18,82	18,73	20,87	18,18
Serina	3,67	3,59	4,01	4,69
Glicina	1,19	1,19	1,15	1,48
Histidina	1,12	1,14	1,09	1,95
Arginina	1,73	1,86	1,55	1,83
Treonina	5,54	5,26	6,41	7,09
Alanina	4,40	4,50	4,31	4,77
Prolina	4,89	4,89	5,42	6,03
Tirosina	2,45	2,28	1,92	2,64
Valina	4,31	4,43	4,66	5,77
Metionina	2,09	1,98	2,00	2,05
Cistina	2,20	2,79	2,79	2,30
Isoleucina	6,28	6,31	7,13	5,84
Leucina	9,49	9,57	8,40	9,54
Fenilalanina	2,58	2,44	2,06	2,78
Triptofano	1,63	1,68	1,36	2,08
Lisina	9,07	8,42	7,47	7,27

\*média e estimativa de desvio padrão

\*\*valores em base seca

O perfil dos aminoácidos do isolado protéico do soro de leite apresentou predominância dos aminoácidos (g/100g de proteína) de cadeia ramificada (21,15%) e ácido glutâmico (23,18%). Com relação ao perfil aminoacídico dos hidrolisados, pequenas reduções foram detectadas após a hidrólise, dentre elas o ácido aspártico, histidina e valina. Contudo, essas alterações não afetaram a qualidade nutricional dos hidrolisados e ainda atestaram que as condições utilizadas no processo de hidrólise

foram adequadas para manter a qualidade dos aminoácidos. (Tabela 2). Os aminoácidos sulfurados superaram a recomendação da FAO/WHO (1989) de 2,5 g/100g, para crianças de 1 a 5 anos.

### Avaliação Antimutagênica

Durante o experimento os animais foram pesados e o consumo de ração controlado. Não houve variação do peso corpóreo e do consumo de ração entre os grupos experimentais, durante o período de estudo. Tais resultados indicam que o consumo das dietas, em diferentes concentrações, não interferiu no desenvolvimento dos animais. A % de redução, % MNPCE (eritrócitos policromáticos micronucleados) e o número de células analisadas de medula óssea de camundongos, após a administração das dietas experimentais, estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) de medula óssea de camundongos Swiss e % de redução dos grupos tratados com dietas contendo isolado protéico de soro de leite (IPSL), caseína e hidrolisados obtidos a partir de diferentes sistemas enzimáticos.

Tratamento	Número de células analisadas	% MNPCE	% Redução
IPSL+CPA	12000	0,13	-
IPSL+NaCl	10000	0,01	
Alcalase+CPA	12000	0,09	27,57
Alcalase+NaCl	10000	0,01	
Pancreatina+CPA	12000	0,17	-
Pancreatina+NaCl	10000	0,02	
Flavorzyme+CPA	12000	0,09	28,57
Flavorzyme+NaCl	12000	0,03	
Caseína+CPA	6000	0,20	0
Caseína+NaCl	8000	0,01	

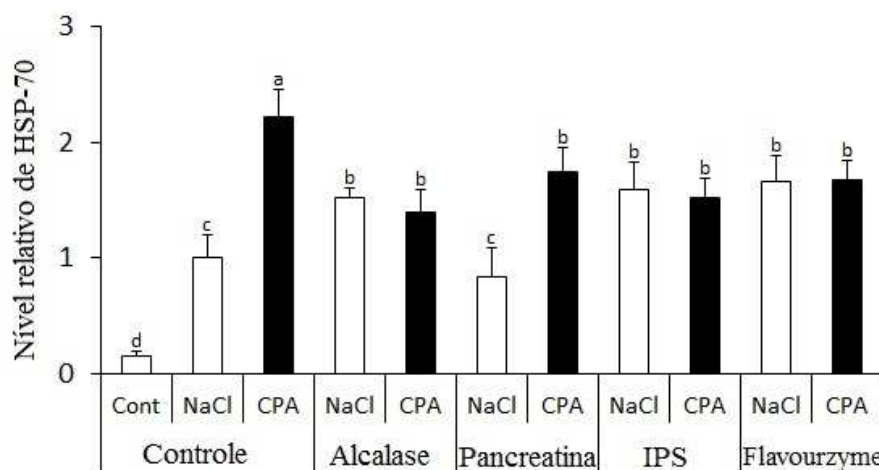
CPA= ciclofosfamida

Considerando os valores de redução encontrados, pode-se destacar efeitos protetores dos hidrolisados de Flavourzyme e Alcalase, uma vez que os valores encontrados foram de 28,54% e 27,57%, respectivamente. O hidrolisado proveniente da hidrólise por Pancreatina não apresentou redução do número de micronúcleos. .



### Avaliação da expressão da proteína HSP 70

Os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 1) mostram que a injeção intraperitoneal de NaCl 0,9% e/ou de CPA provocaram aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) na expressão de HSP70 no fígado, quando comparadas ao controle - animais que não receberam injeção intraperitoneal de NaCl 0,9% e/ou CPA - sugerindo que o procedimento elevou o estresse nos animais (Figura 2). Esse resultado é coerente com os apontamentos da literatura de que a HSP é responsiva à lesões (WISCHMEYER et al., 2001). Observa-se também que a injeção intraperitoneal com CPA elevou os níveis de HSP70 em cerca de 2 vezes além dos níveis provocados pela injeção de NaCl. Possivelmente as células hepáticas foram afetadas pela CPA, e a elevação de HSP70 é um recurso para manter a homeostase (GABAI E SHERMAN, 2002).



**Figura 1:** Expressão da “Heat Shock Proteins” (HSP70) em animais alimentados com dietas contendo isolado protéico de soro de leite (IPSL), caseína e hidrolisados obtidos a partir de diferentes sistemas enzimáticos. (alcalase, pancreatina e flavourzyme). \*Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são indicadas por letras diferentes. (Cont.= controle; CPA=ciclofosfamida)

Após a injeção intraperitoneal de NaCl 0,9% ou CPA, foi evidenciado aumento nos níveis de HSP em todos os grupos. No entanto, nos grupos que receberam fontes proteicas do soro de leite (isolado e hidrolisados) foi verificado controle da expressão da HSP, quando comparados ao grupo controle positivo, o que caracteriza um efeito protetor.



## CONCLUSÃO

Foram obtidos hidrolisados com alta concentração de proteínas e com pouca variação no perfil aminoacídico. Em todas as fontes protéicas não foi verificada atividade mutagênica. A atividade antimutagênica foi evidenciada nos animais que receberam os hidrolisados obtidos por flavorzyme e alcalase. A expressão da HSP-70 confirmou estresse nos animais submetidos a injeção intraperitoneal de NaCl 0,9% e CPA, quando comparados ao grupo que não sofreu os procedimentos experimentais. No entanto, os maiores níveis de HSP foram detectados nos animais que receberam CPA. Sugere-se para estudos futuros a investigação dos mecanismos de controle da expressão da HSP por ação das proteínas do soro de leite.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/PIBIC, pela bolsa concedida e CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. Enzyme hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science Publishers**, p.116-126, 1986.
- BOUNOUS, G. Whey Protein concentrate (WPC) and Glutathione Modulation in Cancer Treatment. **Anticancer Research**, v. 20, p. 4785-4792, 2000.
- BURG M. B.; FERRARIS J. D.; DMITRIEVA N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiol Res.**, v.87, p.1441-74, 2007.
- BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono and disaccharides in food by interlaboratory study: Quantitation of bias component for liquid chromatography. **J AOAC Int.**, v. 75, p. 443-474, 1992.
- CARVALHO-SILVA, L. B.; PACHECO, M. T. B.; BERTOLDO, R.; VELOSO, C. C.; TEODORO, L. C.; GIUST-PAIVA, A.; LOLLO, P. C. B.; SONCINI, R. Anti-inflammatory activities of enzymatic (alcalase) hydrolysate of a whey protein concentrate. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.2993-2999, 2012.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Protein quality evaluation: preliminar report of a joint. Washington, D.C., FAO/WHO. 1989.
- GABAI V. L.; SHERMAN M. Y. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **J Appl Physiol**, v.92, p.1743-8, 2002.
- HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, n. 912-916, 1989.

HONGSPRABHAS, P.; KERDCHOUAY, P.; SAKULSOM, P. Lowering the Maillard reaction products (MRPs) in heated whey protein products and their cytotoxicity in human cell models by whey protein hydrolysate. **Food Research International**, v. 44 p.748–754, 2011.

HORWITZ, W. (Ed.) Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. 2005. Current through Revision 3, 2010. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TIA, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v.189, p.103-112, 1987.

MACPHEE, D.J. Methodological considerations for improving Western blot analysis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, V.61, p. 171–177, 2010.

MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, v.12, p. 3788 – 3796, 1998.

PACHECO, M. T. B.; ANTUNES, A. E. C.; SGARBIERI, V. C. New Technologies and Physiological Functional Properties of Milk Proteins. In: **Protein Research Progress**. Eds: Boscoe, A.B. & Listow, C. R., Nova Science Publishers, Hauppauge, p: 117-168, 2008. ISBN: 1-60021-663-3.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**.v. 11, p.1939-1951, 1993.

SANDRES M. M.; KON C. Glutamine is a powerfull effector of heat shock protein expression in drosophila Kc cells. **Am J Cell Physiol.**, v.146, p.180-90, 1991.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, v. 517, p.139-157, 1996.

SILVER, J. T.; NOBLE, E. G. Regulation of survival gene hsp70. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 1, p. 1 – 9, 2012.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v.39 n.10, p.1412-15, 1967.

WISCHMEYER P. E.; KAHANA M.; WOLFSON R.; REN H.; MUSCH M. M.; Chang E.B. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in rat. **J Appl Physiol.**, v.90, p.2403-10, 2001b.