

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
ÁREA DE NUTRIÇÃO EXPERIMENTAL E APLICADA À TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE SOBRE OS
LINFÓCITOS DE RATOS WISTAR

LAURA ANDRADE CAVALHEIRO
Nutricionista

PROF. DR. CELIO KENJI MIYASAKA
Orientador

CAMPINAS – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C314e Cavalheiro, Laura Andrade
O efeito da suplementação de soro de leite sobre os linfócitos de ratos Wistar / Laura Andrade Cavalheiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Celio Kenji Myasaka
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Glutathione. 2. Antioxidantes. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Suplementação. 5. Hidrolisado protéico do soro de leite. I. Myasaka, Celio Kenji . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Supplementation effects of whey proteins in lymphocytes of Wistar rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Glutathione, Antioxidants, Hydrogen peroxide, Supplementation, Whey protein hydrolysate

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Celio Kenji Miyasaka

Admar Costa de Oliveira

João Ernesto de Carvalho

Semíramis Martins Álvares Domene

Programa de Pós-Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

LAURA ANDRADE CAVALHEIRO

Nutricionista

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE SOBRE OS
LINFÓCITOS DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador:
Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka

CAMPINAS – SP

2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Profa. Dra. Semíramis Martins Alvares Domene

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Silvia e José Maurício, pelo incentivo incondicional na minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Celio Kenji Miyasaka pela orientação e amizade.

Aos membros da banca examinadora pelas sugetões.

A todos funcionários do Departamento de Alimentação e Nutrição, especialmente Maria Aparecida Osteti, Isabel de Fátima Valentino, Francisco Carraro, Eliana Motta e Célis Scavassani.

À Maria Susana Corrêa Cunha pela ajuda e momentos de alegria proporcionados no Laboratório de Ensaios Biológicos (DEPAN-FEA)

Ao Laboratório de Fontes Protéicas, DEPAN-FEA, pela oportunidade de efetuar algumas etapas de meu trabalho, especialmente à Carla de Marco Gregghi pelo apoio e esclarecimentos.

Ao Laboratório de Microestrutura de Alimentos, DEPAN-FEA, pela utilização do microscópio, especialmente à Professora Dra. Débora de Queiroz Tavares e Iara Fagnani.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugenio Vercesi e à Dra. Karina Gottardello Zecchin pela imensa ajuda no Laboratório de Bioenergética, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

À Mônica Almeida Falconi e colaboradoras Helia Aparecida Sanchez Souza e Liliane Almeida Silva, pela realização da análise de sangue, do Laboratório de Rotinas Hematológicas, Hemocentro, FCM.

A todos do Laboratório de Metabolismo, DEPAN-FEA, e Nutrição, Luciano Bruno, Janesca Roman, Fabiane LaFlor, Pablo Lollo, Cristina Rebolho, Claudia Netto e Caren Navarro, pela ajuda, apoio, companhia e amizade. Especialmente à Maria

Inês Abecia-Soria por seu acolhimento, indescritível ajuda e apoio em todas as etapas deste trabalho e à Elisvânia dos Santos por sua disposição em ajudar e colaboração indispensável no LEB.

À Ana Paula Spina pela colaboração em várias etapas e companheirismo.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Jose Maurício e Silvia, e meus irmãos Virgínia e Maurício pelo permanente incentivo.

Ao Juliano Lemos Bicas, pela ajuda incondicional, apoio constante e companheirismo.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

RESUMO

As proteínas presentes no soro de leite têm demonstrado um grande número de efeitos benéficos, como atividade anticarcinogênicas, efeito antiulcerogênica e função imunoestimulatória. Esta propriedade imunoestimulatória está sendo relacionada à possível manipulação da glutathione intracelular. Os linfócitos são importantes células do sistema de defesa celular e humoral. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da suplementação com soro de leite sobre os linfócitos de ratos Wistar. Cento e vinte animais foram divididos em 4 grupos (n = 30), sendo um grupo controle (C) e os demais suplementados com caseinato de cálcio (K), isolado protéico de soro de leite (I) e hidrolisado protéico de soro de leite (H). Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração à vontade. Aos 18 dias de suplementação amostras de sangue foram recolhidas para realização de hemograma. Dez dias depois, os animais foram sacrificados e os linfócitos mesentéricos retirados, contados em câmara de Neubauer e incubados (5×10^7 células/ml) em presença de peróxido de hidrogênio. A viabilidade celular foi avaliada antes e depois da incubação. Também foram avaliadas as atividades enzimáticas da glutathione redutase (GSH-Red) e da glutathione peroxidase (GSH-Px). Apesar de um maior consumo de ração, os animais do grupo C não foram os que apresentaram maior ganho de peso. Estatisticamente, seu ganho de peso foi maior que o do grupo K, menor que do grupo I e não diferiu significativamente do grupo H. Os animais do grupo H apresentaram número de linfócitos 134% maior quando comparado aos grupos I e K e 158% mais elevado em relação ao grupo C. Na análise de sangue o número de linfócitos ($\times 10^3$

celulas/ μ L) dos animais dos grupos H e I foram estatisticamente maiores que os demais grupos. Os linfócitos dos animais do grupo H tiveram a sua viabilidade diminuída apenas 4,08% após incubação com peróxido de hidrogênio enquanto que no grupo C a diminuição de viabilidade foi de 28,9%. A enzima GSH-Red dos animais do grupo H (38,22 pmols . min⁻¹. mg proteína⁻¹) se mostrou maior que dos animais do grupo C (17,64 pmols . min⁻¹. mg proteína⁻¹). Não houve diferenças entre os grupos na determinação de GSH-Px. Assim, verificou-se a qualidade nutricional atribuída ao soro de leite e que este pode interferir no metabolismo de linfócitos.

ABSTRACT

The whey proteins have demonstrated some beneficial effects, as anticarcinogenic activity, antiulcerogenic effect and immunostimulating function. These immunostimulating properties have been related to the possible manipulation of intracellular glutathione. The lymphocytes are important cells of the cellular and humoral defense system. The aim of this work was to study the effect of the whey proteins supplementation on lymphocytes of Wistar rats. One hundred and twenty animals were randomly distributed in 4 groups (n = 30): one control group (C) while the others were supplemented with calcium caseinate (K), whey protein isolated (I) and whey protein hydrolysate (H). The rats were maintained in individual cages with water and ration *ad libitum*. After 18 days of supplementation, blood samples were collected for hemogram accomplishment. Ten days later, the animals were killed and the mesenteric lymphocytes were counted in Neubauer's camera and incubated (5×10^7 células/ml) in the presence of hydrogen peroxide. The cellular viability was evaluated before and after the incubation. The enzymatic activities of glutathione reductase (GSH-Red) and of glutathione peroxidase (GSH-Px) were also evaluated. Animals of group C had the highest feed consumption, although its body weight gain was the same as group H, greater than group K and lesser than group I. The group H animals have presented number of lymphocytes 134% greater when compared with groups I and K and 158% more than group C animals. The blood analysis have shown that the number of lymphocytes ($\times 10^3$ cells/ μ L) of group H animals were bigger than the others groups.

The viability of group H animals' lymphocytes have reduced 4.08% after incubation with hydrogen peroxide, whereas the reduction of the viability of group C animals' lymphocytes was 28.9%. The GSH-Red enzyme of the animals of group H ($38.22 \text{ pmols. min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$) was greater than the enzyme of group C animals ($17.64 \text{ pmols. min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$). There have not been found differences between the groups in the determination of GSH-Px. Considering the results obtained it can be concluded that some nutritional qualities attributed to whey proteins were confirmed and that they can modify the metabolism of the lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Quantidade de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) em alguns alimentos protéicos.....	12
Figura 2 A Análise de sangue por basolaridade pelo equipamento ADVIA TM 120.....	39
Figura 2 B Análise de sangue por peroxidase pelo equipamento ADVIA TM 120.....	40
Figura 3 Localização dos linfonodos mesentéricos.....	41
Figura 4 Corte do cordão no qual está localizado os linfonodos mesentéricos....	42
Figura 5 Linfonodos mesentéricos mergulhados em PBS.....	42
Figura 6 Nódulos linfáticos sendo pressionados por um Becker de vidro para que ocorra a liberação dos linfócitos.....	43
Figura 7 Líquido contendo linfócitos sendo filtrado em um funil com papel filtro de fina espessura.....	43
Figura 8 Crescimento dos grupos C, K, I e H (n=30) durante os 28 dias do ensaio biológico.....	57
Figura 9 Número de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) obtidos através de hemograma (n=10)...	58
Figura 10 Número de linfócitos ($\text{ml} \times 10^8$) presente nos linfonodos mesentérico, contados em Câmara de Neubauer.....	61
Figura 11 Viabilidade celular de linfócitos antes e depois da incubação com H_2O_2 . Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste não paramétrico de Wilcoxon. A Grupo C: Recebeu água como suplemento. B Grupo K: Recebeu 20% de caseinato de cálcio como	

suplementação em relação à média de consumo protéico, proveniente da ração, dos animais deste mesmo grupo. **C** Grupo I: Recebeu 20% de isolado protéico de soro de leite como suplementação, em relação à média de consumo protéico, proveniente da ração, dos animais deste mesmo grupo. **D** Grupo H: Recebeu 20% de hidrolisado protéico de soro de leite como suplementação, em relação à média de consumo protéico, proveniente da ração, dos animais deste mesmo grupo.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição Nutricional do leite de vaca integral, por 100 gramas de produto comestível.....	6
Tabela 2 Comparação da qualidade protéica das proteínas totais do leite, caseínas e do soro.....	7
Tabela 3 Comparação da composição centesimal dos suplementos caseinato de cálcio, isolado protéico do soro de leite e hidrolisado protéico do soro de leite.....	29
Tabela 4 Valores médios $\pm$ erro padrão da média da viabilidade celular encontrada nas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio testadas no ensaio preliminar.....	50
Tabela 5. Valores médios $\pm$ erro padrão da média (n = 10) do balanço nitrogenado dos grupos controle e experimentais no ensaio biológico.....	52
Tabela 6. Valores médios $\pm$ erro padrão da média (n = 30) do quociente de eficiência protéica (PER), do consumo de proteínas contidas na ração e nos suplementos, dos grupos controle e experimentais no ensaio biológico.....	54
Tabela 7. Valores médios $\pm$ erro padrão da média (n = 30) do consumo de ração, consumo de ração e suplemento e ganho de peso dos grupos controle e experimentais no ensaio biológico.....	55
Tabela 8 Número de linfócitos em porcentagem. Dados obtidos através de hemograma (n=10).....	60
Tabela 9 Atividade de GSH-Px (valores expressos em pmols . min ⁻¹ . mg proteína ⁻¹) antes (n =4, média de 4 experimentos com 5 animais em cada experimento) e	

após (n =2, média de 2 experimentos com 5 animais em cada experimento) as células serem incubadas na presença de H₂O₂ (2.0 mM).....67

Tabela 10 Atividade de GSH-Red (valores expressos em pmols . min⁻¹. mg proteina⁻¹) antes (n =4, média de 4 experimentos com 5 animais em cada experimento) e após (n =2, média de 2 experimentos com 5 animais em cada experimento) as células serem incubadas na presença de H₂O₂ (2.0 mM).....69

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE:	enzima conversora de angiotensina
AOAC:	Association of Official Analytical Chemists
ATL –2:	Linfócitos de adulto leucêmico
BSO:	butionina sulfoximina
DEP:	desnutrição energético - protéica
DNA:	ácido desoxirribonucléico
DTNB:	-5.5'-ditio-bis(2-nitrobenzoíco)
GSH:	glutathiona reduzida
GSH-Px:	glutathiona peroxidase
GSH-Red:	glutathiona redutase
GSSG:	glutathiona oxidada
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
HEPES:	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanossulfônico]
NAC:	N-acetilcisteína
NADPH:	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS:	solução tampão de salina fosfato
PER:	Quociente de Eficiência Proteíca
PI:	iodeto de propídio
RA:	Ácido retinóico
ROS:	espécies reativas de oxigênio
SPI:	isolado protéico de soja
TNB:	(5-tio-2-nitrobenzoato)

TNBS: ácido trinitrobenzenosulfônico

WPC: concentrado protéico do soro de leite

WPH: isolado protéico do soro de leite hidrolisado

WPI: isolado protéico do soro de leite

ÍNDICE

1 Introdução.....	1
2 Revisão bibliográfica	3
2.1 Composição do leite de origem bovina	3
2.2 Caseínas	6
2.3 Soro de leite bovino.....	8
2.4 Propriedades tecnológicas do soro de leite.....	11
2.5 Propriedades fisiológicas do soro de leite	13
2.6 Glutationa.....	16
2.6.1 Funções da Glutationa.....	17
2.6.2 Glutationa Peroxidase (EC 1.11.1.9)	19
2.6.3 Glutationa Redutase (EC 1.6.4.2).....	20
2.7 Estratégias para ajustar glutathione intracelular	21
2.8 Linfócitos	23
2.8.1 Linfócitos e espécies reativas de oxigênio.....	24
2.8.2 Linfócitos e GSH.....	25
3 Material e métodos	28
3.1 Suplementos	28
3.1.1 Caracterização das Fontes Protéicas Utilizadas.....	28
3.1.2 Composição Centesimal	29
3.1.2.1 Determinação da concentração protéica pelo método de semi-micro de Kjeldahl:	30
3.1.2.2 Determinação de lipídeos pelo método de Bligh e Dyer:.....	31
3.1.2.3 Determinação da concentração de cinzas de acordo com método da AOAC.....	32
3.1.2.4 Determinação umidade de acordo com método da AOAC.....	33
3.1.2.5 Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS)	33
3.2 Ensaio Biológicos	35
3.2.1 Condições Experimentais	35
3.2.2 Ensaio preliminar	35
3.2.3 Ensaio biológico.....	36

3.2.3.1 Balanço nitrogenado	37
3.2.3.2 Quociente de Eficiência Protéica (PER)	37
3.2.4 Análise de sangue	38
3.2.5 Obtenção dos linfócitos.....	41
3.3 As células	44
3.3.1 Incubação	44
3.3.2 Agente oxidante	45
3.3.3 Determinação da viabilidade celular	45
3.3.5 Determinação das atividades enzimáticas	46
3.3.6 Quantificação de Proteína	48
3.4 Análise estatística	48
4 Resultados e Discussão	49
4.1 Ensaio Preliminar	49
4.2 Ensaio biológico	51
4.2.1 Balanço nitrogenado	51
4.2.2 Quociente de eficiência protéica (PER)	53
4.2.3 Consumo de dieta e ganho de peso dos animais	55
4.2.4 Análise de sangue	58
4.3 Incubação de Células	61
4.3.1 Numero de linfócitos adquiridos.....	61
4.3.2 Viabilidade Celular	63
4.3.3 Determinação de GSH-Px	66
4.3.4 Determinação de GSH-Red	68
5- Conclusões	70
6- Referências Bibliográficas	71
ANEXO I.....	88

1 Introdução

Na atualidade o leite e seus derivados, como manteigas, iogurtes, queijos, entre outros, são importantes componentes da dieta de todo o mundo, tendo principal ênfase na porção ocidental do globo e também em expansão na Ásia (KAZUNORI; TSUDA, 2000). A média brasileira de consumo de leite integral no ano de 2004 foi 327,25 g/*per capita* (FAO, 2006). O leite de origem bovina é o mais consumido mundialmente. Porém, de acordo com a localização geográfica, pode haver uma variação, como no Oriente Médio, onde predomina o leite de cabra, ovelha e camela, e na Ásia, onde o leite tradicional é o de búfala (KAZUNORI; TSUDA, 2000).

O leite bovino é composto de 88% de água e 12% de compostos sólidos. As proteínas representam aproximadamente de 3,2 % e destas 80% são caseínas e 20% são proteínas do soro de leite.

O soro de leite historicamente foi considerado um subproduto da fabricação do queijo (DILLARD; GERMAN; WARD, 2002).

As principais proteínas encontradas no soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina, que juntas representam de 70-80% das proteínas totais. Outras proteínas também encontradas são a soralbumina, imunoglobulinas, preteose-peptona, lactoferrina, transferrina e enzimas (REGESTER *et al.*, 1996; MCINTOSH *et al.*, 1998; KAZUNORI; TSUDA, 2000). Estas proteínas possuem elevado valor nutritivo e demonstram excelentes propriedades fisiológicas funcionais (BOUNOUS; GOLD, 1991; BOUNOUS *et al.*, 1993).

As melhorias nos aspectos imunológicos observadas, causadas pela ingestão do soro de leite, são atribuídas a um aumento de glutathione (GSH) intracelular, devido à grande concentração de aminoácidos sulfurados presentes neste alimento, são substratos potenciais para a síntese de GSH.

A proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo sistema glutathione vem ganhando grande destaque na pesquisas, e é citada por muitos autores, incluindo redução de peróxido de hidrogênio e formas reativas de oxigênio que são normalmente formados pelo organismo e podem danificar o DNA (SEN, 1997; ANDERSON, 1998; BRANDÃO; FONSECA; FONSECA, 1999; GRIFFITH, 1999; LU, 1999).

Além da proteção contra EROs naturalmente presentes no nosso organismo também temos diversas defesas efetivadas por células presentes em nosso corpo. Neste grupo estão presentes os linfócitos, células de grande importância ao sistema de defesa primário. Este fato pode ser facilmente comprovado por animais de laboratório que tiveram diminuído seus linfócitos, por drenagem crônica da linfa do ducto torácico, e apresentam resposta imunológica muito diminuída em relação à produção de anticorpos na resposta primária (ROITT, 1995).

Considerando os aspectos relacionados ao soro de leite que o apontam como um rico e variado composto de proteínas e a importante participação dos linfócitos no nosso sistema de defesa celular e humoral, destaca-se a importância em se estudar os efeitos da suplementação com soro de leite nos linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar saudáveis em crescimento.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Composição do leite de origem bovina

O leite bovino é composto de 88% de água e 12% de compostos sólidos, oferecendo importante aporte nutricional com proteínas de alta qualidade, cálcio, fósforo, vitamina A, vitaminas do complexo B, principalmente riboflavina e cobalamina (B12) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição Nutricional do leite integral de vaca, por 100 gramas de produto comestível.

Nutriente	Leite de vaca
Água (g)	87,99
Energia (Kcal)	61
Proteína (g)	3,29
Gordura (g)	3,34
Carboidrato total (g)	4,66
Cálcio (mg)	119
Ferro (mg)	0,05
Magnésio (mg)	13
Fósforo (mg)	93
Potássio (mg)	152
Sódio (mg)	49
Zinco (mg)	0,38
Ácido ascórbico (mg)	0,94
Tiamina (mg)	0,038
Riboflavina (mg)	0,162
Niacina (mg)	0,084
Ácido pantotênico (mg)	0,314
Vitamina B ₆ (mg)	0,042
Folato (µg)	5
Vitamina B ₁₂ (µg)	0,357
Vitamina A (µg EAR)	38
Colesterol (mg)	14

Fonte: JARVIS; MCBEAN; MILLER, 2000

De cada 100g de leite, 3,29g em média são proteínas, dentre as quais 2,63 g (aproximadamente 80%) são caseínas e 0,66g (aproximadamente 20%) são proteínas do soro.

O leite está se tornando conhecido como uma extraordinária fonte de componentes bioativos, proteínas complexas, lipídios, carboidratos e polinucleotídeos. A presença abundante destes compostos torna o leite um produto com ampla variedade de funções fisiológicas, protetoras e nutricionais (DILLARD; GERMAN; WARD, 2002). Suas proteínas têm demonstrado um grande número de efeitos benéficos, incluindo melhora na absorção de cálcio, redução da pressão sangüínea, diminuição do risco de desenvolvimento de câncer, proteção contra cáries e melhora da função imunológica (JARVIS; MCBEAN; MILLER, 2000).

A qualidade das proteínas pode ser avaliada por parâmetros como valor biológico, utilização de proteínas úteis, digestibilidade de proteína corrigida pela contagem de aminoácidos e quociente de eficiência protéica (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação da qualidade protéica das proteínas totais do leite, caseínas e do soro.

	BV *	NPU	PER	PDCAAS
Leite	91	86	3,1	1,21
Caseínas	77	76	2,9	1,23
Proteínas do soro	104	92	3,6	1,15

BV: Valor biológico

NPU: Utilização protéica líquida

PER: Quociente de eficiência protéica

PDCAAS: Digestibilidade de proteína corrigida pela contagem de aminoácidos

* No BV a proteína do ovo foi considerada como 100.

(JARVIS; MCBEAN; MILLER, 2000).

2.2 Caseínas

A caseína pode ser simplesmente definida como a proteína precipitada por acidificação do leite a um pH 4,6 a 20°C. A caseína apresenta três principais frações: α s1-caseína, (50% do total), β -caseína, (33%) e κ -caseína (15%), tendo ainda quantidades de γ -caseína. A presença de fósforo nas caseínas, incomum em proteínas, permite classificá-las como fosfoproteínas (SGARBIERI, 1996). É a composição de fosfato que diferencia as frações de caseínas, α , β , κ , que contêm 10, 5 e 1 mols de fosfato respectivamente por mol de caseína (ESKIN, 1985).

O “casecidin”, obtido pela digestão da caseína em pH neutro, foi apontado como um dos primeiros peptídeos de defesa purificados com atividade *in vitro* contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (LAHOV; REGELSO, 1996). Os derivados da caseína, a β -caseína e a κ -caseína foram apontados como peptídeos anti-hipertensivos com capacidade de inibirem a enzima conversora de angiotensina (ACE) (ARIYOSHI; KOHMURA; NIO, 1990; KOHMURA *et al.*, 1989). Além das propriedades acima o tripeptídeo κ -caseína elevou de forma significativa a proliferação de linfócitos periféricos sangüíneo humano (KAYSER; MEISEL, 1996).

Os fosfopeptídeos da caseína são freqüentemente encontrados em complexo com fosfato de cálcio (ADAMSON; REYNOLDS; RILEY, 1994). Este complexo formado resulta no aumento da solubilidade, aumentando a absorção de cálcio na porção distal do intestino grosso, de acordo com estudos que compararam animais alimentados com dieta com caseínas e animais alimentados

com dietas com soja (KITTS; YUAN, 1994; KITTS *et al.*, 1992; KITTS; YUAN, 1991).

Caseína também exibe ação antioxidante demonstrando propriedade inibitória contra peroxidação induzida por ferro, podendo aumentar a fase de latência do processo de peroxidação do ácido araquidônico lipossomal. Todas as unidades de caseína se mostraram ativas, mas a α -caseína demonstrou melhor efeito (CAZZOLA; CERVATO; CESTARO, 1999).

Peptídeos obtidos de caseinato de cálcio exibiram atividade antioxidante em todos os métodos *in vitro* utilizados: método branqueamento do β -caroteno, atividade sequestrante do superóxido ânion, atividade sequestrante do radical de 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) e atividade sequestrante do radical hidroxil. Estes resultados sugerem que estes peptídeos são uma boa fonte de antioxidantes naturais (SAKANAKA *et al.*, 2005). Além disto os peptídeos de caseinato de cálcio também foram testados usando um modelo de carne contendo 15,8% de lipídeos. Neste caso os peptídeos também se mostraram efetivos como antioxidantes sugerindo sua utilização no processamento de carnes, promovendo a prevenção da formação de sabor desagradável e ainda aumentando a vida de prateleira (SAKANAKA *et al.*, 2005).

2.3 Soro de leite bovino

O soro de leite pode ser definido como o líquido que permanece após a coagulação ácida ou enzimática da caseína, processo que ocorre durante a fabricação do queijo (EIGEL *et al.*, 1984; SGARBIERI, 1996; MCINTOSH *et al.*, 1998), historicamente considerado como subproduto indesejado (MCINTOSH *et al.*, 1998). Nos dias atuais, o soro de leite é visto com um rico e variado composto de proteínas com funções químicas, físicas, nutricionais e funcionais (SMITHERS *et al.*, 1996; BOUNOUS, 2000).

As proteínas do soro representam 20% do total de proteínas presentes no leite bovino (SMITHERS *et al.*, 1996; MCINTOSHI, 1998; BRANDÃO; FONSECA; FONSECA, 1999). As principais proteínas encontradas no soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina, que juntas representam de 70-80% das proteínas totais. Outras proteínas também encontradas são a soralbumina, imunoglobulinas, preteose-peptona, lactoferrina, transferrina e enzimas (SMIHERS *et al.*, 1996; MCINTOSHI *et al.*, 1998; KAZUNORI; TSUDA, 2000). Estas proteínas apresentam elevado valor nutritivo e excelentes propriedades funcionais tanto no aspecto tecnológico quanto fisiológico (BOUNOUS; GOLD, 1991; BOUNOUS *et al.*, 1993; SGARBIERI, 1996).

Representando cerca de 50% das proteínas do soro, a β -lactoglobulina é uma proteína globular, com estrutura primária de 162 resíduos de aminoácidos (SGARBIERI, 1996). O interior da sua molécula é hidrofóbico e a parte externa

hidrofílica, sua desnaturação ocorre à temperatura de 75°C e pH 2.5 (HARPER; MARSHALL, 1988).

A α -lactalbumina é a segunda proteína mais importante do soro, é a mais termoestável e de menor peso molecular. Duas variantes genéticas da α -lactalbumina já foram identificadas (A, B), porém, apenas a variante B, que contém 123 resíduos de aminoácidos e três pontes dissulfeto intramoleculares, foi encontrada no leite bovino das raças ocidentais (HARPER; MARSHALL, 1988; SGARBIERI, 1996).

A soralbumina bovina parece ser idêntica à encontrada no soro sangüíneo, apresenta um grupo sulfidrilo e 17 pontes dissulfeto intramoleculares (RENNER, 1989). Ela é sintetizada no fígado e secretada no leite, representando 1-2% do total das proteínas do leite (HORNE, 1990).

As imunoglobulinas são uma família de proteínas com propriedades físicas, químicas e imunológicas semelhantes (IgG, IgA e IgM) (SGARBIERI, 1996). Em estudos com ratos C3H/HeJ alimentados com dietas de diferentes composições de proteínas do soro de leite, a dieta que continha maior quantidade de imunoglobulinas e soralbumina foi a que mais causou elevação da concentração de glutathione (BOUNOUS, GOLD, 1991).

A lactoferrina é uma metaloproteína que possui a capacidade de fixar o ferro na forma de quelato, exercendo no leite uma ação bacteriostática contra microorganismos patógenos que dependem do ferro livre (DILLARD; GERMAN; WARD, 2002).

A proteína do soro possui a maior quantidade de aminoácidos essenciais quando comparada com outras fontes protéicas como ovos, caseína, carnes e principalmente quando comparada com a soja (REGESTER *et al.*, 1996).

Outros aminoácidos importantes que se destacam na composição do soro de leite são os sulfurados (metionina e cisteína), que possuem grande importância por estarem relacionados com a manutenção dos níveis de antioxidantes naturais (REGESTER *et al.*, 1996). Na Figura 1 estão representadas as quantidades destes aminoácidos presentes em alguns alimentos.

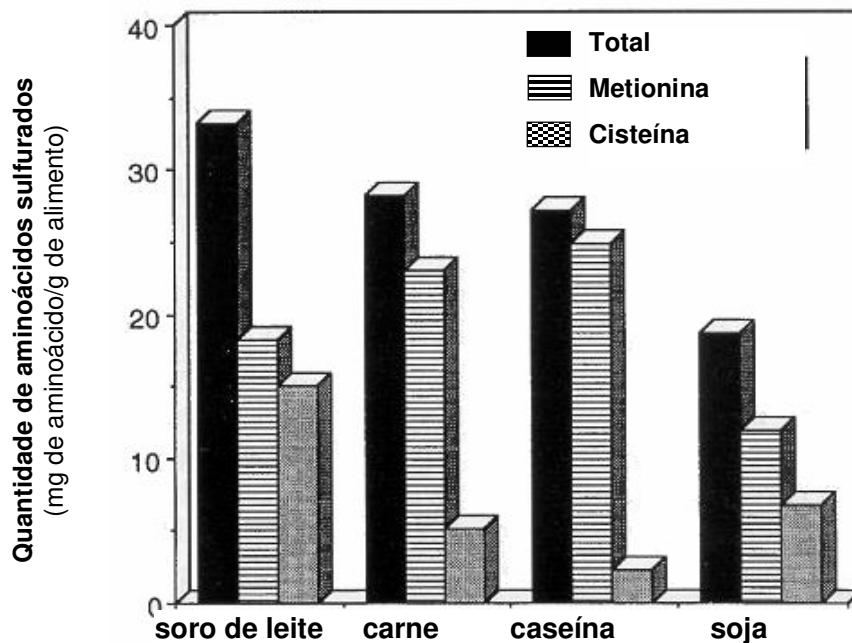


Figura 1 Quantidade de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) em alguns alimentos protéicos (REGESTER *et al.*, 1996).

2.4 Propriedades tecnológicas do soro de leite

As proteínas do leite possuem diversas propriedades tecnológicas de aplicabilidade em escala industrial, como espumantes, emulsificantes, geleificantes e formação de fibras de proteínas (SGARBIERI, 1996).

O soro de leite atualmente está presente em grande quantidade de produtos alimentícios, como chocolates, bombons, recheios e coberturas e sorvetes. A grande vantagem de sua utilização é a flexibilidade que este produto oferece em relação a seus componentes, concentração de proteínas, minerais, lactose e gorduras, que podem ser alterados em função da necessidade do produto no qual ele será adicionado. Devido a seu ótimo valor nutritivo sua presença em alimentos como confeitos e guloseimas, consumidos principalmente por crianças, vem sendo incentivada (DALLAS, 1999).

Além de todas essas vantagens, o soro ainda é eficiente na redução de custos, quando comparado com as outras alternativas existentes. Ao utilizar o soro é possível substituir em até 15-20% o uso de sólidos do leite desnatado na produção de sorvetes, por exemplo (USDEC, 1997).

2.5 Propriedades fisiológicas do soro de leite

Na literatura italiana do início do século 17 já havia registros dos efeitos benéficos do soro de leite à saúde. Por muitos séculos o soro de leite fez parte da cultura popular de várias sociedades e era utilizado na prevenção e no tratamento de doenças (BARICELLUS, 1603, apud MCINTOSH *et al.*, 1998).

Em estudos com humanos e ratos Wistar, as proteínas do soro apresentam diversos efeitos biológicos, como, por exemplo, anticarcinogênicos e digestivo, como atividade antiulcerogênica (MCINTOSH *et al.*, 1998; ROSANELI, 2002).

Bounous e Gold (1991) realizaram um experimento no qual os ratos C3H/HeJ alimentados com diversos produtos comerciais de proteínas do soro tiveram resposta imunológica humoral mais alta, de acordo com o método “Plaque Forming Cell” (PFC) e maior nível de GSH no baço, quando comparados com os alimentados com a caseína. Outros trabalhos, como de Wong e Watson (1995), também mostraram atividade imunomodulatória elevada quando a proteína do soro de leite concentrado (WPC) foi utilizada. Ratas BALB apresentaram significativa elevação da atividade imunomodulatória em relação ao controle suplementado com isolado protéico de soja (SPI), com aumento do número de leucócitos e da resposta secundária, que foi medida através das concentrações séricas de anti-ovalbumina.

Em estudo com ratos com câncer de cólon induzido por azoximetano, os animais que foram alimentados com proteínas do soro apresentaram incidência de câncer 32-42% menor quando comparados com os animais alimentados com caseína (HAKKAK *et al.*, 2001). No estudo de McIntosh (1994) em ratos com

câncer de cólon induzido, o soro de leite foi comparado com diferentes fontes protéicas como caseína, soja e carne vermelha, e demonstrou um papel protetor contra o desenvolvimento de tumores no trato gastrintestinal.

Uma dieta rica em concentrado protéico do soro (WPC), quando comparado com a carne vermelha, reduziu o ganho de peso de ratos Wistar em 4%, reduzindo também a concentração insulínica do plasma em 40% e aumentando a sensibilidade à insulina (BELOBRAJDIC; McINTOSH; OWENS, 2004).

A administração do WPC para ratos Wistar em uma única dose resultou em uma redução de 41% da taxa de lesão ulcerativa induzida por etanol e redução de 73% quando administrada em doses repetidas. Essa proteção parece estar relacionada aos compostos sulfidrilos, que estimulam a síntese de glutathione intracelular (ROSANELI *et al.*, 2002).

Algumas proteínas do leite como a soralbumina, α -lactalbumina e a lactoferrina são fontes do dipeptídeo γ -glutamylcisteína, que é uma fonte biológica para a síntese de glutathione celular. Elas demonstraram exercer individualmente inibição das células tumorais (BRANDÃO; FONSECA; FONSECA, 1999; BOUNOUS, 2000).

Células epiteliais de próstata humana (RWPE-1) cultivadas com hidrolisado protéico do soro de leite (WPH - 500 μ g/mL) por 48 horas aumentaram a GHS em 64%, em comparação ao controle, ao mesmo tempo em que a presença de t-butil hidroperóxido (TBHP - 64 μ M) diminuiu a viabilidade dessas células em 95%, enquanto que na presença do WPH, a redução da viabilidade celular foi de apenas 40% (BOMSER; HARPER; KENT, 2003).

Bounous *et al.*, (1993) e Micke *et al.*, (2001) mostraram resultados positivos do aumento de GSH intracelular, em pacientes portadores de HIV, após suplementação com soro de leite bovino. No primeiro estudo foram testados dois produtos comerciais à base de soro de leite ingeridos pelos pacientes por 14 dias ininterruptos. Em ambos tratamentos houve um aumento de cerca de 32% na concentração plasmática de GSH (1,97 μM para 2,65 μM), em relação à concentração antes da suplementação. No segundo estudo os pacientes ingeriram um produto comercial à base de soro de leite diariamente por 3 meses e, além de apresentarem um aumento progressivo de ganho de peso (de 2 a 7 Kg), tiveram aumento do nível de glutathione, sendo que um paciente o aumento foi de 70% (10,22 $\eta\text{mol} - 10^7$ células para 17, 04 $\eta\text{mol} - 10^7$ células) alcançando a normalidade (MICKE *et al.*, 2001).

Assim o aumento da glutathione intracelular (GSH) tem sido apontado como o responsável pelas ações benéficas encontradas em estudos com soro de leite bovino. Este fato é atribuído à elevada concentração de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) que parecem ser os responsáveis pela síntese da glutathione, tripeptídeo com função antioxidante e desintoxicante que possui a capacidade de proteger o organismo de determinadas doenças, como câncer e processos infecciosos (BOUNOUS; GOLD, 1991; PACHECO; SGARBIERI, 1999).

2.6 Glutathiona

A glutathiona foi descoberta em 1888 por De Rey-Pailhade, que a nomeou de “philothion”, palavra grega que significa amor e sulfurado. Este primeiro nome foi escolhido depois de realizados os primeiros experimentos que mostraram que o novo composto reagia espontaneamente com um elemento sulfurado. Posteriormente foi descoberto que a própria molécula do composto continha sulfurados e o nome glutathiona foi proposto por Hopkins (1921), que imaginava que a então nomeada glutathiona era um dipeptídeo e somente em 1930 o mesmo pesquisador e colaboradores reconheceram-na como um tripeptídeo (HOPKINS, 1921; DE REY-PAILHADE, 1888 apud MEISTER, 1991).

Glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado de L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina. Este peptídeo, com uma ligação gama, apresenta função protetora do tripeptídeo de degradação pelas aminopeptidases (ANDERSON, 1998; SIES, 1999). Este tripeptídeo é encontrado na maioria dos mamíferos e em muitas células procarióticas, é o tiol intracelular mais abundante (ANDERSON, 1998). As células procarióticas possuem os três maiores reservatórios de GSH: quase 90% se encontra no citosol, 10% na mitocôndria e uma pequena porcentagem no retículo endoplasmático (MEREDITH; REED, 1982; HWANG; LODISH; SINSKEY, 1992).

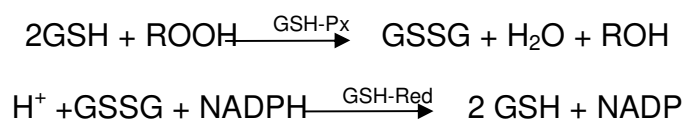
Após ser sintetizada no fígado, a GSH pode ser transportada através de membranas biológicas, principalmente o plasma, e através deste é distribuída aos outros tecidos (BARTOLI; SIES, 1978; KAPLOWITZ *et al.*, 1996).

A glutathione também é essencial na manutenção do balanço redox intracelular e dos grupos sulfidrilas das proteínas (HWANG; LODISH; SINSKEY, 1992). O equilíbrio da ligação dissulfeto com a célula é conhecido como regulador de diversos processos metabólicos também relacionados às funções da glutathione, como atividade enzimática e atividade de transporte de aminoácidos (DeLEVE; KAPLOWITZ, 1991; GREENE; HUTTER; TILL, 1997).

A proteção da glutathione contra EROs, que são normalmente formados pelo metabolismo vem ganhando grande destaque na pesquisas e é citada por muitos autores (SEN, 1997; ANDERSON, 1998; GRIFFITH, 1999; LU, 1999)

As propriedades de proteção da glutathione podem estar relacionadas à redução de peróxidos de hidrogênio, radicais livres e formas reativas de oxigênio, que podem danificar o DNA (BRANDÃO; FONSECA; FONSECA, 1999).

O esquema representado abaixo mostra a forma de ação da glutathione para neutralizar os hidroperóxidos:



Esta proteção ocorre quando duas moléculas de GSH reagem com hidroperóxidos, com a catálise da glutathione peroxidase (GSH-Px), formando uma ponte dissulfeto entre as duas moléculas e gerando glutathione oxidada (GSSG). A glutathione reduzida deve ser regenerada para continuar reagindo e defendendo a célula. Esta reação, catalisada pela glutathione redutase, resgata duas moléculas de GSH (BODANSZKY; WIELAND, 1991; BOMSER; HARPER; KENT, 2003).

É importante para a defesa celular contra o estresse oxidativo a manutenção da relação GSH:GSSG, na qual uma alta concentração intracelular de GSH deve ser mantida para que se tenha ótima proteção antioxidante. A concentração desejável de GSH pode variar de 90 a 99%, dependendo do tecido e do estado de saúde do indivíduo (ANDERSON, 1985; BOMSER; HARPER; KENT, 2003).

Há dois principais mecanismos envolvidos para manter a concentração de GSH nos níveis considerados ideais: a redução de GSSG para a forma ativa reduzida GSH e a síntese de GSH reduzido usando γ -glutamilcisteína sintetase e glutathione sintetase (SEN, 1997; ANDERSON, 1998; GRIFFITH, 1999; LU, 1999).

2.6.2 Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9)

A glutathione peroxidase (GSH-Px) é uma enzima celular selênio-dependente que catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio e lipoperóxidos usando GSH como fornecedor de elétrons (BALBOA; MIRANDA; PREGO, 1997; VEGA *et al.*, 2003). A GSH-Px plasmática parece ser sintetizada pelos néfrons, sendo os rins seu principal produtor (VEGA *et al.*, 2003).

Existem 3 formas de GSH-Px: 1) intracelular (GSH-Px-c); 2) extracelular, plasmática (GSH-Px-p); 3) com atividade específica para fosfolipoperóxidos (GSH-Px-PH) (AVISSAR *et al.*, 1992). A GSH-Px-c e GSH-Px-p são enzimas tetraméricas, contendo cada uma um átomo de selênio em ligação covalente à uma molécula de cisteína (BALBOA; MIRANDA; PREGO, 1997). A GSH-Px-PH é

monomérica, também possui um átomo de selênio e apresenta atividade catalítica (TAKAHASHI *et al.*, 1990).

Alterações da GSH-Px poderão aumentar os níveis de H_2O_2 e de lipoperóxidos, situação que pode ser prejudicial para as células e para o organismo. Estas alterações podem ser encontradas em inúmeras enfermidades como câncer, isquemia, diabetes *mellitus* tipo 1 e catarata, e processos fisiológicos, tais como gravidez e transplantes (BALBOA; MIRANDA; PREGO, 1997).

2.6.3 Glutathione Redutase (EC 1.6.4.2)

A glutathione redutase (GSH-Red) é uma enzima que catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) para GSH consumindo NADPH (VEGA *et al.*, 2003). É uma enzima sensível ao estresse oxidativo, como demonstrou o experimento de Barker *et al.* (1996), que após depleção de GSH, como consequência de tratamento L-butionina sulfoximina (L-BSO) houve diminuição da atividade da glutathione redutase, enquanto que a glutathione peroxidase e transferase se mantiveram iguais ao grupo controle.

2.7 Estratégias para ajustar glutathione intracelular

O aumento de GSH intracelular pode ser benéfico em condições nas quais esta esteja presente em baixas concentrações. Isto é muito significativo quando relacionado a doenças como câncer e AIDS. Vários estudos demonstram que a ingestão de soro de leite ou a adição deste em células cultivadas é capaz de elevar de forma eficiente a glutathione celular (BOUNOUS *et al.*, 1993; MICKE *et al.*, 2001; BOMSER; HARPER; KENT, 2003).

A diminuição da glutathione intracelular é uma das primeiras conseqüências da infecção por HIV (BUHL *et al.*, 1989), sendo o aumento de GSH um importante alvo para uma terapia complementar em pacientes infectados.

Para que a síntese de GSH ocorra, seus aminoácidos formadores devem estar presentes, sendo a cisteína o aminoácido limitante (NISHIUCH *et al.*, 1976; SEN, 1997; ANDERSON, 1998; GRIFFITH, 1999; LU, 1999). Administrar cisteína poderia ser um das maneiras mais simples de aumentar este composto. Entretanto cisteína foi relatada como tóxica em cultura de células (NISHIUCH *et al.*, 1976), e em ratos recém nascidos (HO; OLNEY; RHEE, 1971). Por enquanto os mecanismos de toxicidade ainda não foram explicadas e, portanto outras possibilidades devem ser exploradas (ANDERSON, 1998).

Derivados da cisteína que sejam facilmente transportados e efetivamente convertidos em cisteína no organismo, que não sejam tóxicos e facilmente metabolizados são ideais para substituir a cisteína. O composto n-acetil-cisteína (NAC) é um precursor da biosíntese da glutathione e vem sendo largamente utilizado. Ele é transportado para dentro das células, onde deve ser diacetilado

para cisteína, podendo então ser utilizado na biosíntese da GSH (MEISTER, 1991). Em estudo de Bomser, Harper e Kent (2003) o tratamento de células epiteliais da próstata humana com NAC (500 μ M) aumentou em 88% a concentração de GSH.

Uma outra opção seria a metionina, que pode ser convertida em cisteína através da via de transsulfuração que ocorre exclusivamente no fígado. Porém esta via pode não estar ativa em pacientes com doenças do fígado e em recém nascidos (ANDERSON, 1998).

Dietas ricas em cistina também podem elevar GSH tecidual (BOUNOUS, 2000), pois a cistina é a forma dissulfeto da cisteína, podendo ser reduzida – resultando em dois mols de cisteína - e posteriormente usada na síntese de GSH (COOPER; HABER; MEISTER, 1982; ANDERSON; MEISTER, 1987). Desta maneira o soro de leite fornece cisteína para a síntese de GSH. A maioria das proteínas encontradas no soro de leite são ricas em cistina: β -lactoglobulina possui 2 cistinas por molécula, α -lactalbumina possui 4 cistinas por molécula e a soralbumina bovina possui 17 cistinas por molécula (HÁ; MORR, 1993).

2.8 Linfócitos

Os leucócitos (células brancas do sangue) são agentes imunes formadores do sistema de defesa, que se diferenciam em seis tipos, sendo os neutrófilos polimorfonucleares responsáveis por 62% e os linfócitos 30% (GUYTON, 1981). O adulto humano normal possui cerca de 10^{12} de células linfóides e os tecidos linfóides representam aproximadamente 2% do peso corporal total (BROSTOFF; MALE; ROITT, 1999).

Os linfócitos são uma população circulante, produzidos em grandes quantidades nos órgãos linfóides primários (timo e medula óssea). Algumas células migram através da circulação para os tecidos linfóides secundários (linfonodos, baço, amídalas e tecido linfóide associado às mucosas) (ROITT, 1995). Sua distribuição pelo corpo permite uma defesa eficaz contra microorganismos invasores e toxinas antes que se espalhem extensivamente.

Os linfócitos são diferenciados em 2 tipos: linfócito B, originário da medula óssea e linfócito T, originário também da medula óssea, porém sofre maturação no timo. Eles promovem dois sistemas de defesa complementares, imunidade humoral, mediada pelas células B e imunidade celular, mediada pelas células T (GUYTON, 1981). Os linfócitos B se desenvolvem para formar a linhagem de células plasmáticas, que quando maduras sintetizam e secretam ativamente anticorpos direcionados para atuar contra infecções bacterianas e vírus extracelulares (ROITT, 1995). Os linfócitos T, após serem estimulados, se proliferam e se diferenciam, ampliando a resposta celular que depende de dois principais mecanismos: geração de células citotóxicas e a liberação de fatores

solúveis biologicamente ativos, chamados de linfocinas, que modulam o comportamento de outras células como monócitos e macrófagos (ROITT, 1995). O sistema celular destrói as células dos hospedeiros infectadas por vírus, parasitas e tecidos transplantados, formando linfócitos sensibilizados (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

2.8.1 Linfócitos e espécies reativas de oxigênio

As ROS são metabólitos de oxigênio altamente ativos que incluem superóxido ânion, radical hidroxil e H_2O_2 . Eles possuem a capacidade de reagir com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e assim predispor as células para morte (BREEN; MURPHY, 1995; DAVIES, 1987; KAGAN, 1988). Porém células aeróbicas desenvolveram sistemas moleculares nos quais podem assegurar sua própria sobrevivência e também proteger suas funções fisiológicas. Deste modo as células do sistema imunológico aprenderam a usar ROS como armas contra microorganismos patógenos. As ROS são principalmente formadas nos fagócitos, neutrófilos, macrófagos ativos e por linfócitos T através de estimulação de seus receptores de antígenos (DEVADAS *et al.*, 2002) e utilizados para formar oxicianetos que prejudicam bactérias ingeridas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Neutrófilos e macrófagos são conhecidos por formar a primeira linha de defesa contra patógenos intrusos, essas células produzem grandes quantidades

de H_2O_2 durante o metabolismo oxidativo. Até agora o papel do metabolismo oxidativo é de eliminar bactérias com a geração de ROS (RETH, 2002).

Estas espécies de oxigênio microbicidas não distinguem as células próprias e a dos microorganismos. Assim quando esses produtos passam para o meio extracelular eles podem causar danos aos tecidos e provocar respostas inflamatórias. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando os neutrófilos e macrófagos estiverem fortemente ativos e grandes quantidades de ROS são libertadas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

2.8.2 Linfócitos e GSH

Estudos realizados *in vitro* das funções dos linfócitos têm direcionado para descobertas empíricas de que estas funções sejam potencializadas por tióis (ANDERSON; MEISTER, 1983; BANNAI; ISHII; SUGITA, 1987; DRÖGE; ROTH, 1987).

Células T leucêmicas foram pré-incubadas com compostos tiols seguido de adição de ácido retinóico (RA), que inibe o crescimento dessas células levando-as a apoptose. A taxa de redução foi diminuída significativamente pela pré-incubação com compostos tiols, especialmente com a GSH, resultando na completa restauração do crescimento apesar do efeito inibitório do RA. Nenhuma restauração de crescimento foi obtida nas células não tratadas, sugerindo que a GSH cooperou para manter a regulação do estado redox contra oxidantes, e,

portanto, promovendo o crescimento e a viabilidade dos linfócitos (MIYATAKE *et al.*, 2000)

As funções dos linfócitos T podem ser potencializadas *in vivo* pela administração de glutathione (DROGE *et al.*, 1986). Fato que também foi demonstrado em estudos de depleção do “pool” de glutathione por BSO, situação na qual ocorreram dramáticas conseqüências em várias funções de linfócitos (DROGE; GMÜNDER, 1991).

Linfócitos T e B de ratos se comportam de forma diferente em relação a GSH. Após exposição de 30 minutos a um agente oxidante (diamida 100 μ M), ambos tiveram queda de 100 para cerca de 11% na concentração de GSH. Após 75 minutos sem o agente oxidante e em meio de cultura adequado, os linfócitos T recuperaram 63 % enquanto que os linfócitos B apenas 32 % da GSH inicial (LAWRENCE; NOELLE, 1981).

Considerando os aspectos relacionados ao soro de leite que o apontam como um rico e variado composto de proteínas, cujo elevado valor nutritivo e propriedade funcional regulam a atividade imunomodulatória e a participação dos linfócitos no nosso sistema de defesa celular e humoral, resolveu-se estudar os efeitos de sua suplementação nos linfócitos de linfonodos mesentéricos de ratos Wistar saudáveis em crescimento.

Assim, nosso objetivo geral foi estudar os efeitos da suplementação com proteínas de soro de leite bovino sobre os linfócitos de ratos Wistar. Com relação aos objetivos específicos, destacam-se:

- Estudar os efeitos das proteínas isolada e hidrolisada de soro de leite em linfócitos de ratos Wistar;

- Verificar a influência das proteínas de soro de leite sobre a viabilidade celular dos linfócitos;
- Verificar os efeitos das proteínas do soro de leite bovino sobre a atividade enzimática da glutathione peroxidase e glutathione reductase;
- Estudar os efeitos da oxidação induzida por peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade celular dos linfócitos.

3 Material e métodos

3.1 Suplementos

3.1.1 Caracterização das Fontes Protéicas Utilizadas

O caseinato de cálcio (Tabela 3), DMV International, é um produto de boas propriedades emulsificantes e estabilizantes, possui gosto e aroma neutro. Apresenta uma proteína com alto valor biológico e alta digestibilidade. Optou-se por esta proteína controle já que ela é mais solúvel que a caseína, o que facilita a administração do composto por gavagem. Este produto foi gentilmente doado pela empresa Nuteral, Indústria de Formulações Nutricionais, Fortaleza.

A proteína isolada do soro de leite (ALACENTM 895), New Zealand Milk Products, é recuperada por troca iônica e ultrafiltração e, devido a esses processos, possui baixos teores de lactose e gordura. Apresenta cor amarelo claro, um sabor suave, boas propriedades nutricionais, excelente capacidade gelificante e de aeração além de ser solúvel em diversas faixas de pH.

A proteína hidrolisada do soro de leite (ALACENTM817), New Zealand Milk Products, é produzida através de tratamento enzimático controlado do concentrado protéico do soro de leite, resultando em aminoácidos, peptídeos e polipeptídeos. Uma vez que a hidrólise enzimática é um processo brando, os aminoácidos essenciais permanecem intactos e as proteínas mantêm seus valores nutricionais. Este produto apresenta excelentes características nutricionais (PER =

2,8), ótimas propriedades emulsificantes, boa solubilidade e suporta altas temperaturas. Sua cor é amarelo claro e seu sabor é suave.

Os dois últimos suplementos (isolado e hidrolisado protéico) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fontes Protéicas, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, coordenado pelo Professor Dr. Jaime Amaya-Farfan.

Tabela 3 – Composição centesimal e grau de hidrólise dos suplementos caseinato de cálcio (K), isolado protéico do soro de leite (I) e hidrolisado protéico do soro de leite (H).

Grupo ^a	Proteínas (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)	GH ^b (%)
K	90,1	0,8	3,5	5,4	-
I	90,2	0,3	2,1	6,8	-
H	85,2	3,1	3,2	7,2	10

^a K: caseinato de cálcio; I: isolado protéico do soro de leite; H: hidrolisado protéico do soro de leite.

^b GH: grau de hidrólise.

3.1.2 Composição Centesimal

As análises de proteínas e cinzas foram realizadas segundo o método descrito pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Os lipídeos foram determinados conforme metodologia de Bligh e Dyer (1959) e o grau de hidrólise pelo método de Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (NISSEN, 1979).

3.1.2.1 Determinação da concentração protéica pelo método de semi-micro de Kjeldahl:

O método de Kjeldahl determina o nitrogênio orgânico total, isto é, o nitrogênio protéico e não protéico orgânico. A razão entre o nitrogênio medido e a proteína estimada depende, entre outros fatores, da amostra avaliada. Para converter o nitrogênio medido em proteína devemos multiplicar o valor encontrado por um fator específico para cada tipo de proteína, que é dependente da quantidade média de nitrogênio dela. Quando este fator não é conhecido utiliza-se 6,25 como fator de conversão de nitrogênio total, uma vez que a maioria das proteínas possuem em média 16% de nitrogênio ($100/16 = 6,25$). Para determinação da proteína da dieta empregou-se o fator 6,25 enquanto que para os produtos lácteos foi utilizado o fator específico para este grupo de alimento, 6,38.

Este método baseia-se na transformação em sulfato de amônio do nitrogênio contido nas substâncias nitrogenadas da amostra quando esta é digerida com ácido sulfúrico concentrado na presença dos catalisadores sulfato de potássio anidro (K_2SO_4) 95% e sulfato de cobre anidro ($CuSO_4$) 5%. Quando a mistura atingir 100°C sua temperatura deve ser elevada em 50°C a cada 30 minutos até atingir 350°C. A digestão se completa quando a solução em aquecimento se tornar translúcida, levemente azulada. Após esfriamento ocorre a destilação em um destilador de nitrogênio. Assim, após a neutralização da solução com adição de 20mL de hidróxido de sódio (NaOH) 50%, esta é levada a ebulição e recolhida em um Erlemeyer de 250 mL, contendo 10 mL de ácido bórico 2%

(H₃BO₃) e 3 gotas do indicador de Andersen, para a destilação da amônia. Depois de recolhidos cerca de 100 mL do destilado, faz-se a titulação do borato de amônia formado (coloração verde) com ácido clorídrico (HCl) 0,02 N padronizado até transformação para cor rosa. A porcentagem de nitrogênio é obtida pela seguinte equação:

$$\%N = \frac{(v_{HCl\ amostra} - v_{HCl\ branco}) \times fator \times 100 \times N_{HCl}}{peso\ da\ amostra\ (g)}$$

Onde:

$V_{HCl\ amostra}$ = volume do HCl utilizado para titulação da amostra;

$V_{HCl\ branco}$ = volume de HCl utilizado para titular os componentes do método sem amostra;

N_{HCl} = normalidade exata do HCl utilizado.

3.1.2.2 Determinação de lipídeos pelo método de Bligh e Dyer:

Este é um método de extração de gordura a frio que utiliza uma mistura de três solventes: clorofórmio, metanol e água.

Após pesagem da amostra adiciona-se lentamente 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8mL de água destilada. O clorofórmio irá solubilizar os lipídeos, enquanto o metanol irá romper as associações lipídeos-proteínas liberando-os, em proporção tal que um sistema miscível (monofásico) é formado com água. Em seguida o tubo é fechado, vedado e agitado (agitador rotativo) por 30 minutos. Posteriormente, outros 10 mL de clorofórmio são adicionados com

mais 10 mL de sulfato de sódio 1,5% e a solução é agitada vigorosamente por 2 minutos e deixada em repouso para que as fases se separem naturalmente. Neste momento o sistema monofásico se separa formando um sistema bifásico, sendo uma camada clorofórmica, mais pesada, contendo os lipídeos e uma metanólica contendo água e os compostos não lipídicos, a qual deve ser aspirada e descartada. Posteriormente, 1g de sulfato de sódio é adicionado à fase lipídica e o conteúdo é filtrado para um tubo de 30 mL. Parte do filtrado (5 mL) é transferido para um Becker previamente tarado e colocado em estufa a 100°C para evaporar o solvente. Após o esfriamento do Becker, a amostra é novamente pesada e a quantidade de lipídios é determinada por gravimetria (BLIGH; DYER, 1959).

3.1.2.3 Determinação da concentração de cinzas de acordo com método da AOAC

A determinação de cinzas fornece uma indicação do teor de elementos minerais contidos na amostra. Para tal, a amostra deve ser pesada em um cadinho de porcelana e carbonizada de forma suave em um bico de Bunsen até cessar o desprendimento de fumaça. Após a carbonização a amostra é colocada no forno de mufla a temperatura de 550°C e calcinada até a obtenção de cinzas claras. Após o esfriamento do cadinho a amostra é novamente pesada e a quantidade de cinzas é determinada por gravimetria (AOAC, 1995).

$$\%cinzas = \frac{\text{peso}_{\text{amostra+cadinho final}}(g) - \text{peso}_{\text{cadinho}}(g) * 100}{\text{peso}_{\text{amostra inicial}}(g)}$$

3.1.2.4 Determinação umidade de acordo com método da AOAC

A umidade é obtida por diferença, levando-se em consideração a porcentagem de sólidos totais, segundo a fórmula (AOAC, 1995):

$$\%umidade = 100 - \%sólidos\ totais$$

A porcentagem de sólidos totais, por sua vez, é determinada depois que a amostra é seca em estufa (105°C por 6 horas) e pesada após resfriar em dessecador. O cálculo para a obtenção da porcentagem de sólidos totais é efetuado inserindo-se os valores obtidos na equação de porcentagem de cinzas.

3.1.2.5 Ácido Trinitrobenzenosulfônico (TNBS)

O grau de hidrólise é definido como a porcentagem de ligações peptídicas clivadas, que está relacionada à concentração de grupos aminas primários. Basicamente este método é um ensaio espectrométrico que forma um cromóforo pela reação do TNBS com aminas primárias. Esta reação ocorre sob condições alcalinas e é interrompida abaixando-se o pH.

Para realização do método as amostras devem ser previamente preparadas diluindo-as em dodecil sulfato de sódio (SDS), um agente desnaturante, e posteriormente 0,250 mL de uma solução contendo entre $0,25 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^3$ de amino equivalente/L deve ser adicionada. Na sequência, a mistura é transferida para um tubo com 2 mL de tampão fosfato a pH 8,2 e 2 mL de solução de TNBS 0,10%, que é agitado e levado ao banho-maria no escuro por 60 minutos a 50°C. Para finalizar a reação 4 mL de HCl 0,1 N é acrescentada. Após o resfriamento até a temperatura ambiente por 30 minutos faz-se a leitura a 340 nm em espectrômetro utilizando água como branco. Uma solução de 1500 mM L-leucina é utilizada como padrão. Para se obter a porcentagem do grau de hidrólise aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{Grau de hidrólise} = \frac{h * 100\%}{h_{hot}}$$

Onde:

h = quantidade de aminas livres

h hot = fator específico para cada tipo de proteína

3.2 Ensaio Biológicos

3.2.1 Condições Experimentais

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Ensaio Biológicos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Os animais foram acomodados em gaiola de aço inox individual para crescimento. Água e alimentação, ração comercial Labina (Purina), foram oferecidas sob o sistema de livre acesso durante todo o experimento. A temperatura permaneceu a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, a umidade relativa entre 60-70% e o ciclo claro-escuro de 12 horas, acendendo as luzes às 7:00 e apagando às 19:00.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB/UNICAMP) – Protocolo nº 805-1 (06/04/2005) (Anexo 1).

3.2.2 Ensaio preliminar

Este ensaio teve como objetivo determinar a concentração de peróxido de hidrogênio a ser utilizada no ensaio biológico. Foram utilizados 16 ratos Wistar adquiridos no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica, UNICAMP, com idade de 21 dias, peso médio de $48,96\text{g} \pm 4,53\text{g}$. Os animais ficaram em período de crescimento por cerca de 40 dias, atingindo peso médio de $281,8\text{g} \pm 14,58\text{g}$.

Após este período eles foram sacrificados e seus linfócitos mesentéricos foram utilizados para o estudo de concentração de peróxido de hidrogênio.

3.2.3 Ensaio biológico

O experimento teve duração de 38 dias, sendo 10 dias para adaptação e crescimento dos animais e divisão dos grupos. Durante 28 dias os animais foram suplementados com as diferentes proteínas por gavagem. A quantidade suplementada foi calculada como 20% da média protéica ingerida através da dieta comercial. O volume de água seguiu o mesmo raciocínio.

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos de 30 dias com peso médio de $92,73\text{g} \pm 7,91\text{g}$ adquiridos no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica, UNICAMP. Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 30 animais cada, e nomeados conforme o suplemento administrado:

- **GRUPO C (Controle):** Sem suplementação. Este grupo recebeu água.
- **GRUPO K:** Suplementação com caseinato de cálcio;
- **GRUPO I:** Suplementação com isolado protéico do soro de leite;
- **GRUPO H:** Suplementação com hidrolisado protéico do soro de leite.

3.2.3.1 Balanço nitrogenado

O balanço de nitrogênio foi determinado para avaliar a qualidade das proteínas consumidas pelos animais, que inclui a dieta comercial em conjunto com a suplementação. Este índice também é importante para verificar a utilização destas proteínas em uma dieta hiperprotéica.

Para esta determinação, os animais foram transferidos no quinto dia depois de iniciada a suplementação para gaiolas metabólicas individuais, que permitem a coleta de fezes e urina, separadamente, isentas de partículas de alimentos. Durante 4 dias foram coletadas fezes e urinas para quantificação do nitrogênio excretado. A quantidade de nitrogênio ingerido foi determinada pelo consumo alimentar. Assim, o balanço nitrogenado (BN) é calculado pela diferença entre o nitrogênio ingerido (NI) e a soma do nitrogênio excretado nas fezes (NF) e urina (NU):

$$BN = NI - (NF + NU)$$

Para esta análise foi utilizada amostra de 10 animais por grupo.

3.2.3.2 Quociente de Eficiência Protéica (PER)

O PER é o quociente de eficiência protéica, calculado a partir da divisão do ganho de peso, em gramas, pela quantidade de proteína ingerida. Este método

encontra-se descrito no AOAC e foi padronizado para o uso em animais recém desmamados, que devem ser alimentados durante 28 dias e mantidos em gaiola individual. É recomendado que o consumo de proteína fique por volta de 10%. Após a coleta de dados de ganho de peso e consumo de proteínas faz-se o seguinte cálculo:

$$PER = \frac{\text{ganho de peso}(g)}{\text{proteína consumida}(g)}$$

3.2.4 Análise de sangue

O sangue de 40 animais (n = 10 para cada grupo) foi coletado por punção retro-ocular para realização de um hemograma. A análise foi gentilmente realizada pelo Laboratório de Rotinas Hematológicas, Hemocentro, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, coordenado pela Professora Dra. Márcia Torresan Belamain sob a responsabilidade da bióloga Mônica Almeida Falconi. O equipamento utilizado para esta análise foi o ADVIA™ 120, Bayer (Irlanda).

O equipamento funciona através de laser e utiliza dois métodos de análise, basolaridade e peroxidase:

A) As reações citoquímicas do método de basolaridade (Figura 2A) ocorrem em dois passos:

1. Células vermelhas e plaquetas são rompidas utilizando o reagente ADVIA™120 BASO.

2. O citoplasma de todas as células brancas, exceto basófilos, é lisado utilizando o reagente ADVIA™ 120 BASO e a temperatura na câmara de reação sofre aumento.

As células brancas são retiradas e categorizadas como mononucleares ou polimorfonucleares, baseado na forma e complexidade de seus núcleos. Os basófilos intactos podem ser facilmente distinguidos de pequenos núcleos celulares.

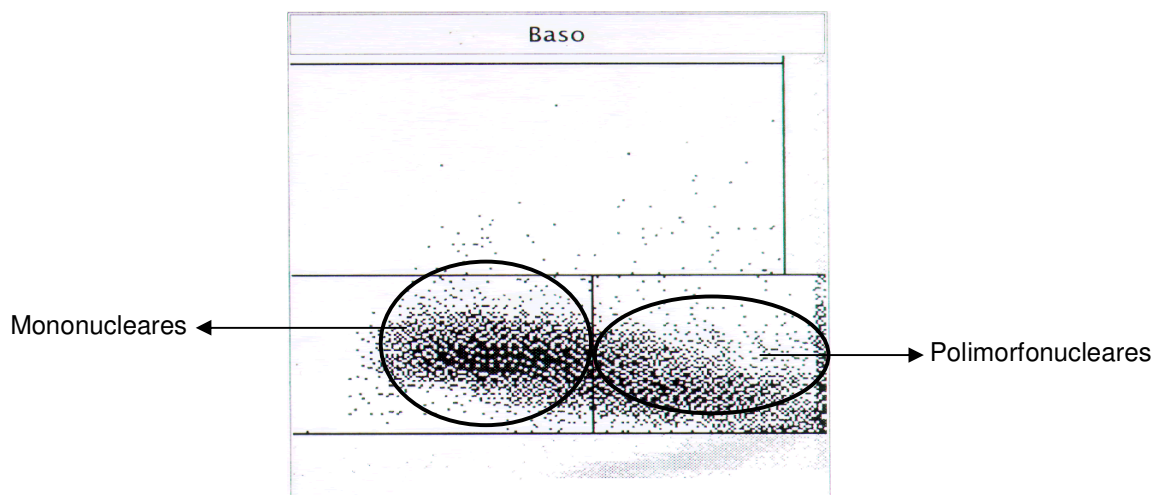


Figura 2 A - Análise de sangue por basofilia pelo equipamento ADVIA TM 120.

B) As reações citoquímicas das análises pelo método de peroxidase (Figura 2B) ocorrem em 3 passos:

1. Células vermelhas são rompidas utilizando o reagente ADVIA™120 PEROX 1 e alta temperatura na câmara de reação.
2. Células brancas são fixadas utilizando o reagente ADVIA™120 PEROX 1.

3. Células brancas são coradas utilizando os reagentes ADVIA™120 PEROX 2 e ADVIA™120 PEROX 3.

Assim, as células brancas são identificadas baseadas no tamanho e nas diferentes intensidades das reações de peroxidase. Neutrófilos, eosinófilos, e monócitos são marcados de acordo com seus níveis de atividade de peroxidase. Como linfócitos, basófilos e algumas células grandes não apresentam peroxidase, estas células permanecem não coradas.

Também foi realizada uma análise microscópica da amostra de sangue para confirmar os valores percentuais e absolutos dos linfócitos (dados não mostrados).

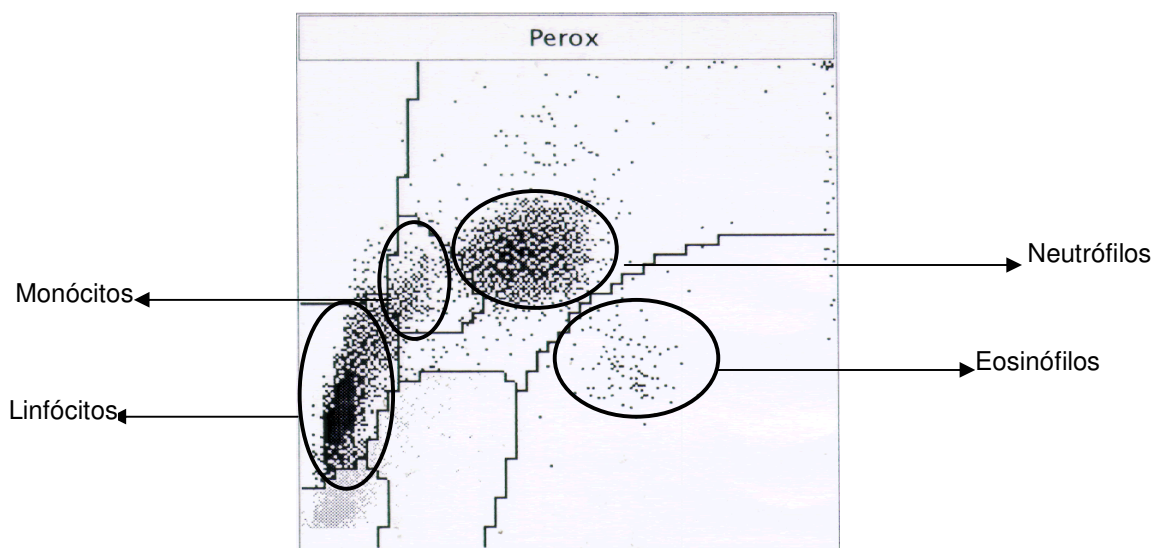


Figura 2 B - Análise de sangue por peroxidase pelo equipamento ADVIA TM 120.

3.2.5 Obtenção dos linfócitos

Após 28 dias de suplementação os animais foram sacrificados e os linfócitos obtidos a partir dos nódulos linfáticos mesentéricos dos roedores.

Após o deslocamento cervical, os animais sofreram laparotomia e os nódulos linfáticos mesentéricos foram retirados (Figuras 3 e 4) e após serem isolados do tecido adiposo, foram imersos em solução tamponada com salina-fosfato gelada (PBS) (Figura 5). Em seguida, os linfonodos foram colocados em uma peneira e sutilmente pressionados contra o fundo de um Becker de vidro, liberando os linfócitos para solução tampão (Figura 6). A preparação formada de linfócitos foi então filtrada através de um filtro de papel (papel para limpeza de lentes, Mekko) (Figura 7). Esta preparação de linfócitos foi centrifugada a 2000 RPM a 4°C por 15 minutos, duas vezes, para eliminar as contaminações dos linfócitos com tecidos íntegros (VIEIRA *et al.*, 1990). As células foram então suspensas em meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, BR30255-01), contadas em Câmara de Neubauer com a utilização do corante Azul de Tripan, e utilizadas para a incubação de peróxido e para análises enzimáticas (GSH-Px e GSH-red).

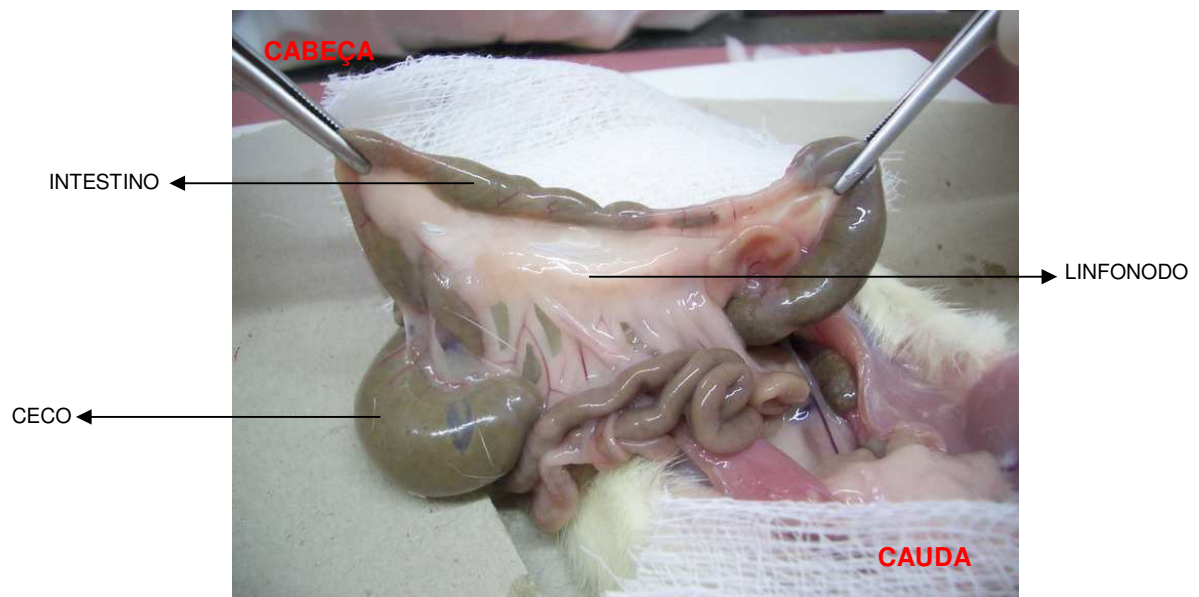


Figura 3 - Localização dos linfonodos mesentéricos



Figura 4 - Corte do cordão no qual estão localizado os linfonodos mesentéricos



Figura 5 - Linfonodos mesentéricos mergulhados em PBS.



Figura 6 - Nódulos linfáticos sendo pressionados por um Becker de vidro para que ocorra a liberação dos linfócitos.



Figura 7 - Líquido contendo linfócitos sendo filtrado em um funil com papel filtro de fina espessura.

3.3 As células

3.3.1 Incubação

Os linfócitos (5×10^7 células.mL⁻¹) foram incubados em meio RPMI-1640, e soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, 10-bio200) a 10%, que contém 3,11g de proteínas totais e 15,27 mg de hemoglobina, totalizando um volume final de 5 mL. Eles foram mantidas por 1 hora a temperatura de 37°C na presença, ou não, de um agente oxidante.

3.3.2 Agente oxidante

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (Merck, 1.07210.1000) foi o agente oxidante utilizado. A concentração empregada foi determinada através do ensaio preliminar. Neste ensaio preliminar a viabilidade celular foi calculada pela diferença entre as contagens no tempo inicial e após incubação (item 3.3.3). As células foram incubadas a 37°C durante uma hora. Seis concentrações foram testadas em triplicata: 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 e 3,0 mM.

3.3.3 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi avaliada pela contagem das células coradas com azul de Tripán. As células viáveis não se coram, pois não permitem a penetração do composto devido à integridade de sua membrana.

Para a contagem em tempo inicial foi utilizada a diluição de 40 vezes, sendo 10 µL de meio RPMI 1640 contendo linfócitos (conforme descrição no item 3.2.5), 190 µL de meio RPMI 1640 e 200 µL de azul de Tripán. Após a incubação, a diluição de contagem foi reduzida para 20 vezes, sendo 10 µL de meio RPMI 1640 contendo as células (item 3.2.5) e 190 µL de azul de Tripán.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Microestrutura de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Para a contagem foi utilizado o microscópio óptico JENAVAL, Carl

Zeiss (Alemanha) no aumento de 40 vezes. A porcentagem foi calculada de acordo com a equação:

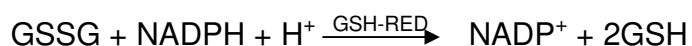
$$\%células\ viáveis = \frac{n^{\circ}células\ viáveis}{n^{\circ}total\ de\ células}$$

3.3.5 Determinação das atividades enzimáticas

Cerca de 1×10^8 células/mL foram homogeneizadas em 1 mL de tampão de extração e sonicadas (Vibra Cell™ Soniese Materials Inc. Danbury, (Laboratório de Biomembranas, Instituto de Biologia, UNICAMP) por 30 segundos. Em seguida, as células foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm e 4°C. A quantificação da proteína e a dosagem enzimática (GSH-Px e GSH-Red) foram feitas com alíquotas do sobrenadante.

3.3.5.1 Glutathiona redutase

Para determinação da glutathiona redutase utilizou-se o método de Calberg e Mannervik (1985), que tem como princípio mensurar a oxidação de NADPH espectrofotometricamente.



Foram adicionados à amostra NADPH (Sigma N-1630) e GSSG em quantidade suficiente para atingir concentrações finais de 0,24 mM e 20 mM, respectivamente. A absorbância da amostra foi monitorada a 340 nm a 37°C por 20 minutos, realizando a leitura a cada 30 segundos.

3.3.5.2 Glutathione Peroxidase

A técnica de determinação da glutathione peroxidase foi também baseada no consumo de NADPH e monitorada espectrofotometricamente, conforme a técnica descrita por Wendel (1981). Foram adicionadas à amostra NADPH (0,24mM) (Sigma N-1630), GSH (20mM), GSSG redutase (25 unidades) (Sigma G-6004) e azida sódica (0,25M). Depois de agitada, a amostra foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm a 37°C por 5 minutos para ativar a GSH-Px. Posteriormente, adicionou-se TBHP e a absorbância foi monitorada por mais 10 minutos, realizando a leitura a cada 30 segundos.

Para as duas últimas determinações (itens 3.3.5.1 e 3.3.5.2) foi utilizado o Espectrofotometro DU®-70 (Beckman), localizado no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

3.3.6 Quantificação de Proteína

A quantificação de proteína realizada para complementar a determinação das atividades enzimáticas foi realizada de acordo com método de Bradford (1976). Neste método, as proteínas da amostra são complexadas com o corante azul de Coomassie. A reação é colorimétrica e a absorbância é medida a 595 nm. Os resultados de absorbância obtidos foram lançados na equação da reta, obtida a partir de uma curva padrão de albumina bovina sérica. Para esta quantificação foram utilizadas alíquotas das mesmas amostras usadas para determinação de atividade enzimática.

3.4 Análise estatística

Para avaliar se existiam diferenças significativas entre os diferentes grupos utilizamos a análise de variância (ANOVA). Caso haja diferença estatisticamente significativa entre grupos como um todo, o método de comparação múltipla LSD foi utilizado para procurar diferenças específicas em pares de grupos. Para as amostras de tamanho pequeno utilizamos testes estatísticos não-paramétricos, em que não se faz nenhuma suposição da distribuição de dados. Nas nossas análises utilizamos os teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e Wilcoxon.

O nível de significância considerado é de 5%. Valores menores que 5% indicam que existem diferenças significativas.

4 Resultados e Discussão

4.1 Ensaio Preliminar

O ensaio preliminar foi realizado para determinar a concentração de H_2O_2 ideal para ser utilizada no experimento. Na literatura, diversas concentrações de H_2O_2 foram encontradas entre diversos tipos de cultura de células, como as linhagens permanentes Jurkat e U937, e células primárias, como linfócitos humanos. A maior parte dos estudos utilizam de 10 μM a 1 mM de H_2O_2 (SANÉ *et al.*, 2004; SPECTOR *et al.*, 2002; COLUSSI, *et al.*, 2000; GHIBELLI *et al.*, 1995).

A fim de tornar este ensaio mais abrangente foram testadas as seguintes concentrações: 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 1,5mM, 2mM e 3mM (Tabela 4). Foi determinado o tempo de incubação de 1 hora, que não variou durante o ensaio.

Tabela 4 – Valores médios $\pm$ erro padrão da média da viabilidade celular encontrada nas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio testadas no ensaio preliminar.

Concentrações	Viabilidade relativa * (%)
Tempo inicial	100,00 $\pm$ 0,71 ^a
Controle	97,80 $\pm$ 1,44 ^a
0,1 mM	97,17 $\pm$ 1,30 ^a
0,5 mM	96,94 $\pm$ 0,64 ^a
1,0 mM	94,29 $\pm$ 0,68 ^{ab}
1,5 mM	88,92 $\pm$ 2,23 ^b
2,0 mM	72,27 $\pm$ 2,04 ^c
3,0 mM	59,79 $\pm$ 1,12 ^d

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tempo inicial: Primeira contagem após a obtenção dos linfócitos.

Controle: Células sofreram incubação de 1 hora, como as concentrações, porém não foi adicionado o peróxido de hidrogênio.

* Fixou-se o valor de 100% para a viabilidade no tempo inicial. Os demais valores foram calculados como porcentagem da viabilidade em relação ao tempo inicial.

A diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, em relação ao tempo inicial (2,83%, 3,06% e 5,71%, respectivamente) e em relação ao controle (0,63%, 0,86% e 2,88%, respectivamente) não apresentaram diferença estatística significativa. Mesmo a concentração de 1,0 mM apresentando maior número de citações na literatura, no nosso ensaio a redução de viabilidade causada por ela não mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo inicial e ao controle.

A concentração de 2,0 mM, que causou uma queda na viabilidade celular de 27,73% em relação ao tempo inicial, foi julgada a mais adequada para ser utilizada no experimento, uma vez que a viabilidade deveria ter uma queda perceptível, mas não muito grande devido à necessidade de guardar grande quantidade de células sobreviventes para análises posteriores.

Células endoteliais de ratos Wistar foram incubadas com H₂O₂ (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 e 2mM) por 1,5h. O nível de DPC (DNA protein cross-links), importante forma de medir danos causados ao DNA, foi avaliado. As concentrações de 1 e 2mM de H₂O₂ aumentaram significativamente a DEC, enquanto que as concentrações de 0,001, 0,005 e 0,1 não provocaram nenhuma alteração(LIN *et al.*, 2005).

4.2 Ensaio biológico

4.2.1 Balanço nitrogenado

O BN positivo, como encontramos no nosso ensaio biológico, é característico de indivíduos em crescimento, ou seja, em anabolismo, demonstrando que há retenção de nitrogênio para formação de novos tecidos pelo organismo (SGARBIERI, 1996).

Além de demonstrar estado de saúde o BN também pode fornecer dados sobre o valor nutritivo das proteínas tanto em indivíduos adultos como em crescimento. A ingestão de uma dieta desbalanceada contendo proteínas que não

possuam todos os aminoácidos essenciais pode levar a um BN negativo (SGARBIERI, 1996). Neste caso a quantidade de nitrogênio excretado é menor do que a quantidade de nitrogênio ingerido. Analisamos assim a boa qualidade das proteínas ingeridas pelos animais, tanto dos animais do grupo C que consumiram apenas ração comercial quanto dos animais suplementados, visto que todos apresentaram BN positivo. Embora todos tenham apresentado BN positivo, os animais do grupo I e H tiveram o maior BN, diferindo estatisticamente dos grupos C e K. Este fato pode ser atribuído ao maior ganho de peso destes animais, fato que está diretamente relacionado com o BN.

Tabela 5 – Valores médios $\pm$ erro padrão da média ($n = 10$) do balanço nitrogenado dos grupos controle e experimentais no ensaio biológico.

Grupos	BN
C	$2,866 \pm 0,02^b$
K	$2,662 \pm 0,01^b$
I	$3,406 \pm 0,01^a$
H	$3,037 \pm 0,01^{ab}$

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de LSD

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

4.2.2 Quociente de eficiência protéica (PER)

O fator mais importante que pode interferir no PER é a concentração de proteínas na dieta. A alteração do PER em função da concentração foi demonstrada por Sgarbieri (1987), em estudo no qual diferentes concentrações de lactalbumina foram testadas. Foi demonstrado que em determinada concentração protéica o PER encontra seu pico máximo, a partir do qual ele diminui com o aumento de proteína. Em geral, os valores de PER diminuem à medida que se aumenta a concentração de proteínas muito acima de 10% (SGARBIERI, 1987). Neste estudo, as proteínas foram responsáveis por 24% da dieta no caso do grupo C e os grupos que receberam suplementos protéicos as proteínas representam cerca de 28,8%. A variação do PER em função da concentração da proteína também depende da natureza da proteína.

A concentração de 10% é utilizada como padronização para comparações, porém este valor pode não fornecer o maior do PER da proteína em questão. No caso do nosso trabalho padronizamos nossa concentração em 28,8%, que é a porcentagem de proteínas da dieta dos animais suplementados. Assim, para uniformizar esta análise, os animais do grupo C foram excluídos e os animais que receberam os suplementos foram comparados considerado o caseínato como proteína controle.

Este resultado condiz com o estudo de Dael *et al.*, 2005 que comparou duas dietas a base de caseína (caseína / β -caseína) com duas dietas contendo proteínas do soro de leite (caseína com soro de leite isolado / β -caseína com α -

lactalbumina) em animais Sprague-Dawley. As dietas que continham proteínas do soro de leite apresentaram PER maior ($131,4\% \pm 2,4\%$ / $127,9\% \pm 3,2\%$) quando comparadas com as duas dietas com proteínas provenientes da caseína ($100,00\% \pm 5,7\%$ / $97,5\% \pm 2,4\%$).

Tabela 6 – Valores médios $\pm$ erro padrão da média ($n = 30$) do quociente de eficiência protéica (PER), do consumo de proteínas contidas na ração e nos suplementos, dos grupos controle e experimentais no ensaio biológico.

Grupos	PER
C	$1,435 \pm 0,02^a$
K	$0,929 \pm 0,01^b$
I	$0,959 \pm 0,01^{bc}$
H	$0,972 \pm 0,01^c$

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de LSD

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

4.2.3 Consumo de dieta e ganho de peso dos animais

Durante os 28 dias de ensaio biológico o consumo de dieta dos animais do grupo C, sem suplemento, e do grupo I foi maior quando comparado ao dos demais animais que receberam caseinato (Grupo K) e WPH (H) (Tabela 7). O maior consumo do grupo C já era esperado em função do fato de que este era o único grupo que não recebia suplementação protéica, tendo menos saciedade que os outros animais e necessitando ingerir mais ração.

Tabela 7 – Valores médios $\pm$ erro padrão da média (n = 30) do consumo de ração, consumo de ração e suplemento e ganho de peso dos grupos controle e experimentais no ensaio biológico.

Grupos	Consumo de Ração (g)	Ganho de peso (g)
C	599,68 $\pm$ 5,86 ^a	209,72 $\pm$ 3,54 ^b
K	512,93 $\pm$ 9,57 ^c	192,48 $\pm$ 4,21 ^c
I	589,78 $\pm$ 8,11 ^a	224,26 $\pm$ 3,51 ^a
H	558,54 $\pm$ 9,21 ^b	218,77 $\pm$ 3,20 ^{ab}

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de LSD

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

O consumo de ração dos animais do grupo I foi estatisticamente igual aos animais do grupo C, maior que o grupo H (5,29%) e superior ao do grupo K (13,03%). Os animais do grupo K tiveram o menor consumo de ração quando o comparamos aos três demais grupos, isso demonstra a boa digestibilidade das proteínas do soro de leite, tanto do isolado quanto do hidrolisado, pois mesmo ingerindo grande quantidade de suplemento o consumo de ração destes animais ficou igual (no caso do grupo I) ou próximo ao do controle. Assim, a menor digestibilidade da caseína pode explicar o menor consumo dos animais grupo K.

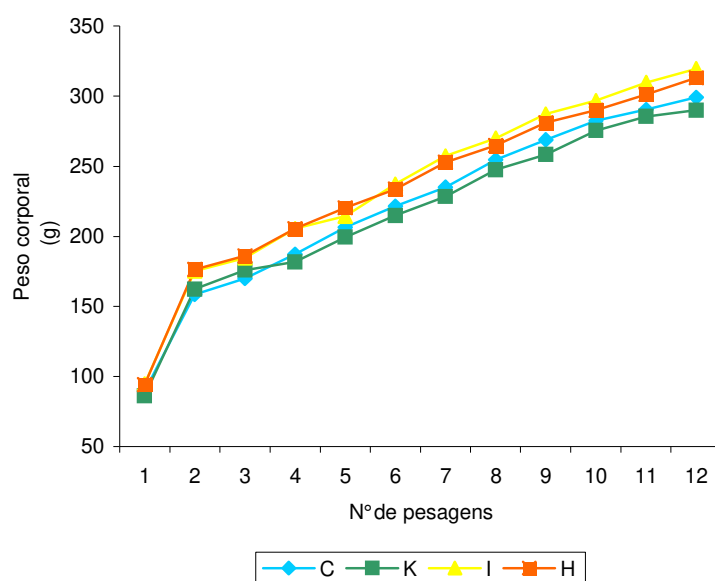
Apesar de um maior consumo de ração, os animais do grupo C não foram os que apresentaram maior ganho de peso. Estatisticamente, seu ganho de peso foi maior que dos animais do grupo K, menor que dos animais do grupo I e não diferiu significativamente do grupo H (Tabela 7).

O menor ganho de peso do grupo K dentre todos os grupos pode ser explicado pelo fato de a caseína ser uma proteína que forma coágulos em pH baixos, situação encontrada no estômago (FRÜHBECK, 1998). Esta característica pode retardar o processo digestivo e de absorção, levando a uma diminuição no consumo de ração, como acima observado. Neste caso a suplementação pode ter uma interferência negativa, uma vez que ao deixar de comer a ração em função da suplementação proteica, a dieta dos animais pode ficar desequilibrada em outros macronutrientes.

As proteínas do soro de leite possuem alto valor biológico e provavelmente a suplementação desta foi a responsável para que os animais dos grupos I e H ganhassem mais peso que os animais controle, apesar da diferença para último não ser estatisticamente significativa.

Apesar das diferenças pontuadas, a curva de crescimento (Figura 8) apresentou o mesmo perfil para todos os grupos.

Figura 8 Crescimento dos grupos C, K, I e H (n=30) durante os 28 dias do ensaio biológico.



Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

4.2.4 Análise de sangue

Após 18 dias de suplementação uma amostra de sangue dos animais dos 4 grupos (n = 10) foi retirada para realização de um hemograma. Esta análise teve como objetivo avaliar possíveis alterações nos valores dos linfócitos.

O aparelho ADVIA™ 120, no qual foi realizada esta análise, apresenta como valores de referência para ratos Wistar a faixa de normalidade de células brancas totais de 3,3 a 8,7 x10³/μl e para linfócitos totais de 2,6 a 7,1 x10³/μl. Na literatura, os valores de normalidades encontrados para células brancas totais de ratos Wistar são 6,806 ± 0,175 x10³/μl (WRONA *et al.*, 2005) e 7,61± 1,61 x10³/μl (ROMAM *et al.*, 2004).

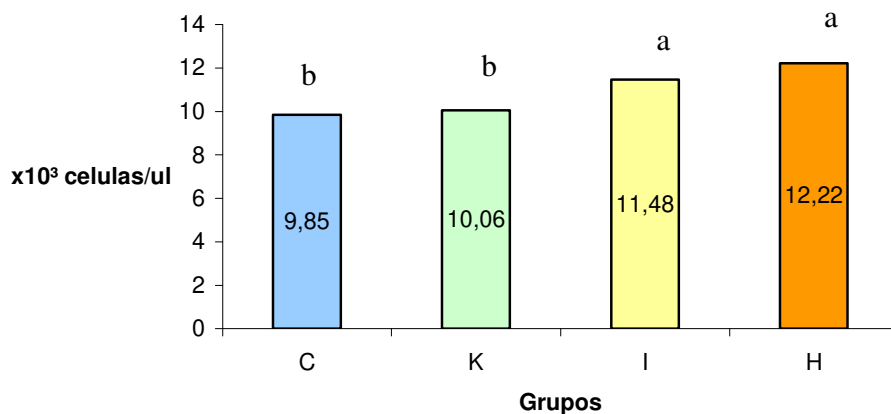


Figura 9 Número de linfócitos (x10³/μl) obtidos através de hemograma (n=10)

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) ao teste de LSD.

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Os valores encontrados por nossas análises se mostram levemente elevados em relação aos encontrados nas referências. Portanto, os animais que não receberam nenhum tipo de tratamento (grupo C) será nossa principal referência de comparação.

A análise de sangue realizada apontou diferença estatística entre o número de linfócitos (10^3 células/ μ l) presentes no sangue dos animais dos grupos I e H em relação aos animais dos grupos C e K (Figura 9). O número de linfócitos dos animais do grupo H é aproximadamente 20% maior que a quantidade de linfócitos encontrada nos animais do grupo C. Os animais do grupo I apresentaram número de linfócitos estatisticamente iguais aos animais do grupo H e cerca de 15% a mais em relação aos animais do grupo C.

Os animais dos grupos I e H também devem ser comparados com os animais do grupo K, por esta ser nossa proteína controle. Neste caso, podemos notar o bom desempenho das proteínas provenientes do soro de leite sobre os linfócitos, já que elas se mostraram estatisticamente superiores ao resultado obtido pela proteína padrão.

Em pesquisa com portadoras de HIV, 18 crianças foram suplementadas com WPC associado à terapia antiretroviral, o que provocou aumento no nível de GSH nos eritrócitos e sugeriu um melhoramento na razão TCD4/CD8 além de fazer regredir a ocorrência de infecções agudas associadas (MORENO *et al.*, 2005).

Já a suplementação com glutamina não alterou a quantidade de linfócitos humanos. A comparação foi realizada entre o mesmo grupo antes e após a

suplementação ($1,78 \pm 0,097$; $1,80 \pm 0,117 \times 10^9/L$) e entre este grupo e um grupo placebo, também antes e após suplementação ($1,76 \pm 0,0098$; $1,76 \pm 0,119$) (QUADRILATERO, 2001).

A porcentagem de linfócitos dos animais dos quatro grupos se apresentou dentro da normalidade referida pelo aparelho ADVIA TM 120, que é de 68,6 a 94,5% (Tabela 8). Isso pode indicar o aumento de outras células brancas, pois a proporção entre as células se manteve mesmo quando os linfócitos se mostraram significativamente maiores.

Tabela 8 – Número de linfócitos em porcentagem. Dados obtidos através de hemograma (n=10).

Grupos	Linfócitos (%)
C	$89,70 \pm 1,03$
K	$80,90 \pm 2,58$
I	$90,30 \pm 0,68$
H	$88,20 \pm 1,58$

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

4.3 Incubação de Células

4.3.1 Numero de linfócitos adquiridos

Confirmando os resultados encontrados no hemograma, o número de linfócitos presentes no linfonodo mesentérico dos animais do grupo H foi maior em relação aos demais. Os animais do grupo H apresentaram aproximadamente 60% mais células nos nódulos linfáticos quando comparados ao grupo C e cerca de 40% mais células do que os animais grupo K e I (Figura 10).

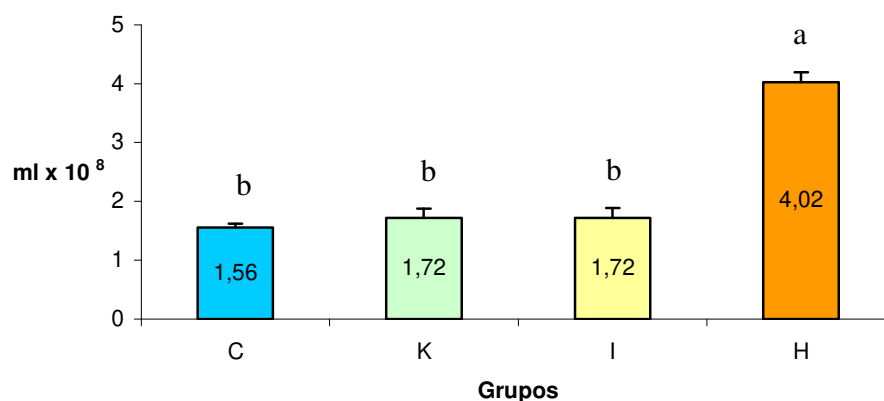


Figura 10 – Número de linfócitos (mL x 10⁸) presente nos linfonodos mesentérico, contados em Câmara de Neubauer.

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Poucos são os estudos que relacionam o aumento da concentração protéica na dieta e o sistema imune. Por outro lado, a desnutrição energético-protéica (DEP) é uma situação muito estudada.

A ingestão protéica sempre foi observada em estudos relacionados ao sistema imune, principalmente sobre sua possível capacidade de aumentar a resistência à infecção. Este fato está relacionado aos mecanismos de imunidade que são dependentes da replicação da célula ou da produção de compostos protéicos ativos (SANGIOVANNI; SCRIMSHAN, 1997).

Já é conhecido que na DEP, situação oposta à que ocorreu em nosso estudo, muitos dos mecanismos de defesa são prejudicados, sendo alguns deles: redução do tamanho e do peso do timo, diminuição das células linfóides e depleção de linfócitos nos linfonodos, e redução da proliferação de linfócitos, resultado este que pode estar ligado à deficiência de nutrientes essenciais no plasma (CHANDRA, 1997; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005). Inversamente, Hoffer, Hum e Koski (1992), estudaram a influência do consumo de proteínas em ratos Sprague-Dawley e constataram que a concentração plasmática de alguns aminoácidos essenciais como leucina, isoleucina, valina, metionina e treonina se elevaram com o aumento da ingestão protéica (HOFFER; HUM; KOSKI, 1992).

Boirie e colaboradores (2004) concluíram em seu trabalho que diversas fontes protéicas modulam de forma e em tempos diferentes a deposição de aminoácidos no sangue após a refeição, classificando-as em rápidas e lentas. As proteínas do soro de leite demonstraram ser do primeiro tipo, uma vez que após consumidas por adultos um rápido e transiente pico plasmático de aminoácidos foi

observado. Em contrapartida, após a ingestão da caseína, o perfil dos aminoácidos plasmáticos era baixo, lento e prolongado. No nosso estudo, além da proteína do soro de leite em sua forma isolada também a utilizamos previamente hidrolisada, fato que aumenta ainda mais a eficiência da absorção destes aminoácidos. Portanto, a grande eficiência do soro de leite hidrolisado em atingir o sistema sanguíneo em conjunto com a influencia das proteínas no sistema imune nos leva a acreditar que estas podem ser razões para provocar um aumento no número de linfócitos apresentado pelos animais do grupo H.

4.3.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular dos linfócitos, avaliada antes e após da incubação destes com H_2O_2 , nos mostra a reação das células frente a um agente oxidante.

A viabilidade celular dos linfócitos foi determinada em duas etapas do trabalho. A primeira determinação ocorreu logo após a retirada das células (t0) e a segunda (t1) uma hora após as células serem incubadas com 2,0 mM de H_2O_2 . Comparando primeiramente os resultados entre os próprios grupos temos que os animais do grupo C, K, I e H apresentaram uma diferença de 28,9%, 25,6%, 20,6% e 4,1%, respectivamente, entre a viabilidade celular em t0 e t. Apesar dos animais do grupo H mostrarem uma diferença muito pequena entre t0 e t1, todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa (Figura 11 A, B, C, D).

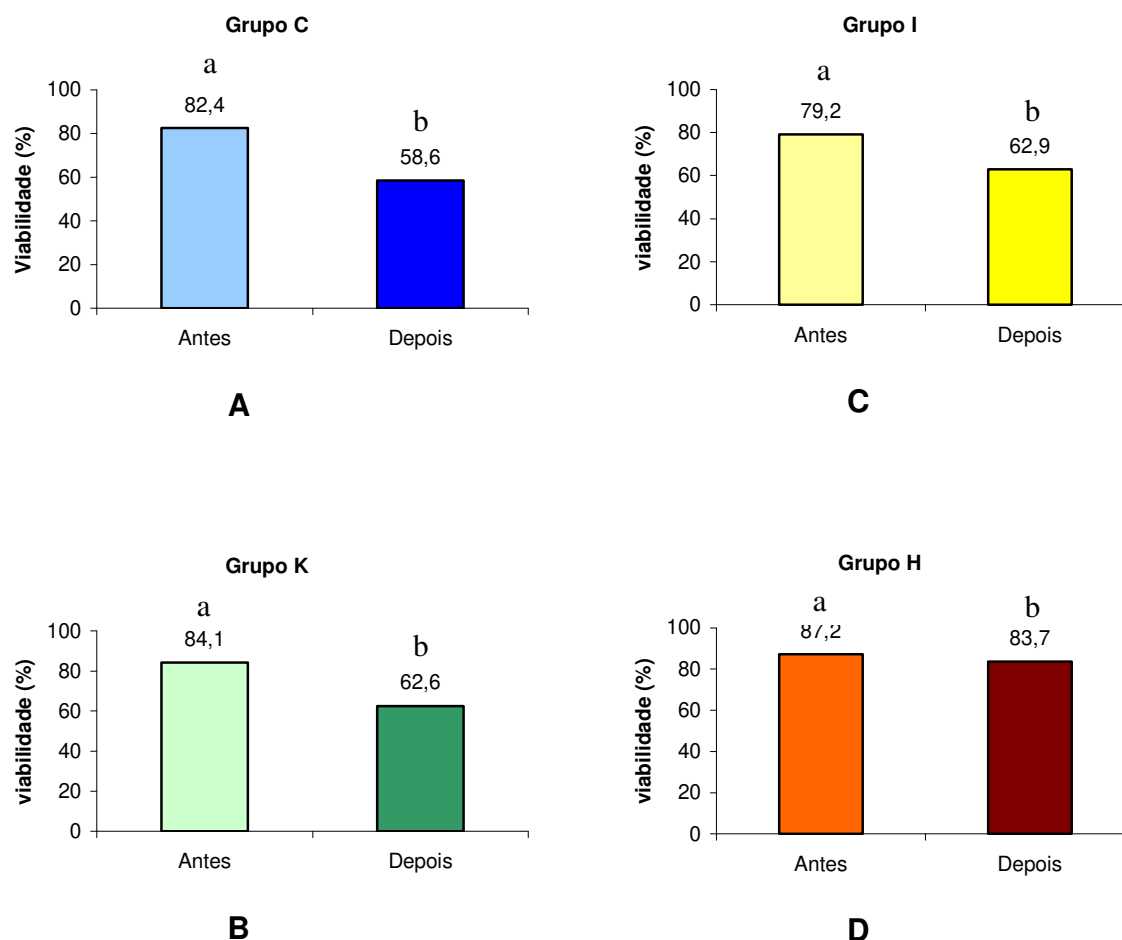


Figura 11 Viabilidade celular de linfócitos, contados em câmara de Neubauer com azul de Tripan, antes e depois da incubação com 2.0mM H_2O_2 , por 1 hora. Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste não paramétrico de Wilcoxon.

Figura 11 A Grupo C: Recebeu água como suplemento.

Figura 11 B Grupo K: Recebeu 20% de caseinato de cálcio como suplementação em relação à média de consumo protéico, proveniente da ração, dos animais deste mesmo grupo.

Figura 11 C Grupo I: Recebeu 20% de isolado protéico de soro de leite como suplementação, em relação à média de consumo protéico, proveniente da ração, dos animais deste mesmo grupo.

Figura 11 D Grupo H: Recebeu 20% de hidrolisado protéico de soro de leite como suplementação, em relação à média de consumo protéico, proveniente da ração, dos animais deste mesmo grupo.

No estudo de Miyatake (2000) linfócitos T de adulto leucêmico (ATL-2) foram incubados com ácido retinóico (RA), e sofreram inibição de crescimento significativa, podendo resultar em apoptose. A pré-incubação destas células com GSH ou L-cistina resultou em completa restauração do crescimento em contraposição aos efeitos inibitórios de crescimento causados pelo RA (MIYATAKE *et al.*, 2000). Este resultado nos mostra que a L-cistina intracelular é convertida em L-cisteína, que é um composto tiol ativo utilizado para a síntese de GSH (BANNAI, 1984). Como nenhuma restauração de crescimento foi observada nas células ATL-2 que não receberam o pré-tratamento com compostos tiols, os autores concluíram que a L-cistina e a GSH cooperam na manutenção do estado redox contra vários antioxidantes e ainda promove o crescimento e a viabilidade celular em linfócitos (MIYATAKE *et al.*, 2000).

No nosso estudo, a administração de suplementos ricos em cistina, principalmente o WPH, que possui mais aminoácidos livres em comparação ao WPI, também se mostrou capaz de proteger as células frente a um agente oxidante. Este resultado indica que o WPH pode ser utilizado para um aumento da concentração de glutathione.

Porém, o fornecimento de cistina proveniente do soro de leite para a formação de GSH se depara com a circunstância de que os linfócitos possuem um transporte ativo de membranas relativamente forte para cisteína, mas um fraco transporte ativo para cistina (BANNAI; ISHII; SUGITA, 1987). Esta afirmação sugere a possibilidade de que a cisteína extracelular possa ser um fator limitante

para respostas imunes, mesmo na presença de uma quantidade 10 vezes maior de cistina, situação que ocorre no plasma sangüíneo (GMÜNDER *et al.*, 1990).

Ao contrário dos linfócitos, os macrófagos possuem um transporte ativo de membrana relativamente forte para cistina e também libera compostos tiols no espaço extracelular (BANNAI; WATANABE, 1987). O estudo realizado por Gmünder e colaboradores (1990) revelou que o principal composto tiol solúvel em ácido liberados por macrófagos estimulados era de fato cisteína. Assim, pode existir uma importante interação entre macrófagos e células linfóides no que diz respeito à captação de cistina e ao fornecimento de cisteína, o que, por sua vez, pode ser determinante para que a suplementação com soro de leite interfira no metabolismo de glutathione.

Os resultados encontrados neste teste de viabilidade celular mais uma vez nos apontam o possível caráter antioxidante do soro de leite hidrolisado, e nos leva a questionar a capacidade deste em aumentar a GSH intracelular.

4.3.3 Determinação de GSH-Px

Os valores de atividade de GSH-Px encontrados, antes das células serem incubadas com H_2O_2 , se aproximam do valor de referência, $2,2 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/min}$ (WENDEL, 1981), especialmente os animais do grupo H. Porém, estatisticamente não foram observados diferenças entre os animais dos quatro grupos (Tabela 9).

Tabela 9 – Atividade de GSH-Px (valores expressos em $\mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$), $n = 4$ (m\u00e9dia de 4 experimentos com 5 animais em cada experimento).

Grupos	Antes
C	$1,21 \pm 0,05^a$
K	$2,01 \pm 0,25^a$
I	$1,89 \pm 0,51^a$
H	$2,25 \pm 0,36^a$

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferen\u00e7a significativa ($p < 0,05$) ao teste n\u00e3o-param\u00e9trico de Wilcoxon.

Grupo C (Controle): Recebeu \u00e1gua como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em rela\u00e7\u00e3o ao consumo prot\u00e9ico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em rela\u00e7\u00e3o ao consumo prot\u00e9ico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em rela\u00e7\u00e3o ao consumo prot\u00e9ico dos animais do mesmo grupo

As concentra\u00e7\u00f5es de GSH podem ser alteradas em fun\u00e7\u00e3o da quantidade de prote\u00ednas presentes na dieta. No trabalho de Hoffer, Hum e Koski (1992) a concentra\u00e7\u00e3o de GSH hep\u00e1tica e o total de GSH presente no f\u00edgado de ratos Sprague-Dawley aumentaram ($1,4 \pm 0,13 \mu\text{mol/g}$ para $6,03 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$ e $12,3 \pm 1,11 \text{ mmol/f\u00edgado}$ para $78,8 \pm 3,59 \text{ mmol/f\u00edgado}$) quando o consumo prot\u00e9ico da dieta passou de 0 para 20% (case\u00edna). Por\u00e9m, a concentra\u00e7\u00e3o de GSH n\u00e3o aumenta indefinidamente com o aumento da prote\u00edna, h\u00e1 uma quantidade \u00f3tima de prote\u00edna. A concentra\u00e7\u00e3o hep\u00e1tica de GSH no grupo que recebeu 40% de

proteína ($4,86 \pm 0,33 \mu\text{mol/g}$) era 19% menor que o encontrado no grupo que ingeriu 20% ($6,03 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$) (HOFFER; HUM; KOSKI, 1992).

Embora nossa suplementação com WPH tenha demonstrado uma proteção antioxidante no teste de viabilidade celular, nenhuma diferença foi encontrada em relação a atividade de GSH-Px.

4.3.4 Determinação de GSH-Red

Todos os grupos apresentaram atividade de GSH-Red maior que o referido pela literatura $10,4 \pm 1,4 \mu\text{mol}$ (CALBERG; MANNERNVIK, 1985), sendo que aqueles que receberam maior quantidade de proteína mostraram as atividades mais elevadas. Porém, estatisticamente, os animais dos grupos K e I se mostraram iguais aos animais controle e todos eles diferiram dos animais do grupo H, que apresentaram os maiores valores para a atividade enzimática de GSH-Red (Tabela 10).

A GSH-Red possui a importante função de catalisar a reação para regenerar a GSH para esta continuar reagindo e defendendo a célula contra ROS. O maior potencial enzimático apresentado pelos animais do grupo H aponta a um melhor funcionamento do ciclo da GSH e, portanto melhor proteção antioxidante.

Tabela 10 – Atividade de GSH-Red (valores expressos em $\mu\text{mols. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) $n = 4$ (média de 4 experimentos com 5 animais em cada experimento).

Grupos	Antes
C	$17,64 \pm 5,70^b$
K	$25,22 \pm 3,86^b$
I	$27,09 \pm 2,52^b$
H	$38,22 \pm 1,68^a$

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Grupo C (Controle): Recebeu água como suplemento

Grupo K (Caseinato): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo I (WPI): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

Grupo H (WPH): Recebeu 20% em relação ao consumo protéico dos animais do mesmo grupo

5- Conclusões

- A suplementação com proteínas do soro de leite não interferiu no crescimento e desenvolvimentos dos animais;
- A suplementação com proteínas do soro de leite isoladas e hidrolisadas promoveu o aumento do número de células de linfócitos como observado na análise de sangue e na contagem em câmara de Neubauer
- A suplementação com proteínas do soro de leite hidrolisadas demonstrou proteção antioxidante ao promover a diminuição de linfócitos mortos por oxidação de H_2O_2 ;
- A suplementação com proteínas do soro de leite não demonstraram alterar a atividade enzimática de GSH-Px;
- A atividade enzimática de GSH-Red demonstrou maior potencial nos animais suplementados com proteínas do soro de leite hidrolisadas.

6- Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**
Tradução Raymundo M. Gesteira, 4 ed, Rio de Janeiro: Revinter, 2003, 544
páginas.

ANDERSON, M.E.; MEISTER A. Determination of glutathione and glutathione
disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, New York v. 113, p. 548-
555, nov, 1985.

ANDERSON, M.E.; MEISTER A. Intracellular delivery of cysteine. **Methods in
Enzymology**, New York, v. 143, p. 313-325, dez.,1987.

ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation.
Chemio-Biological Interactions, Memphis, v. 111-112, p.1-14, abr., 1998.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC** 16 ed. International CUNNIF, P.
ed., Virginia: AOAC International, 1995, v. 1.

AVISSAR, N.; SLEMMON, J.R.; PALMER, I.S. Partial sequence of human plasma
GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme. **Journal of
Nutrition**, SI, v.12, p. 77-85, 1992.

BANNAL, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 779, n.3, p. 289-293, set., 1984.

BARKER, J.E; SIMON J.R.; CASSIDY, A.; BOLÁÑOS J.P.; LAND, J.M.; CLARK, J.B. Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. **Brain Research**, v. 716, n.2, p.118-122, abr., 1996.

BARTOLI, M.; SIES, H. Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. **Febs Letters**, v. 86, n. 1, p. 89-91, fev. 1978.

BELOBRAJDIC, D.P; MCINTOSHI, G.H.; OWENS, J.A. A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in wistar rats. **Journal of Nutrition**, SI, v.134, n.6, p.1454-1458, jun., 2004.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** , v. 37, n. 8, p. 911-17. 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio,1976.

Referências Bibliográficas

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v.14, n.4, p. 296-309, 1991.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.;GOLD, P. Whey proteins as a food supplement in HIV- seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 3, p. 204-209, 1993.

BOUNOUS, G. Whey Protein Concentrate (WPC) and Glutathione Modulation in Cancer Treatment. **Anticancer Reserch**, v. 20, p. 4785-4792, nov-dez, 2000.

BOIRIE, Y. Slow and fast proteins. **Nutrition Clinique et Metabolisme** v.18, n.1, p. 25-27, 2004.

BREEN, A.P.; MURPHY, J.A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radical Biology Medicine**, v.18, p.1033-1077, 1995.

BUHL, R.; JAFFE, H.A.; HOLROYD, K.J.;MASTRANGELI, A.; SANTINI, C. *et al.* Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV seropositive individuals. **Lancet**, v. 2, p. 1294-1298, 1989.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. **Methods in Enzymology**, New York, v. 113, p. 484-490, 1985.

CERVATO, G.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p. 291-296, 1999.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal Clinical Nutrition**, v.66, p. 460S-463S, 1997.

COLUSSI, C.; ALBERTINI, M.C.; COPPOLA, S.; ROVIDATO, S.; GALLI, F.; GHIBELLI, L. H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. The **Faseb Journal**, v.14, n. 14, p. 2266-2276, nov., 2000.

COOPER, A. J. L.; HABER, M.T.; MEISTER, A. On the chemistry and biochemistry of 3-mercaptopyruvate acid the α -keto acid analog of cysteine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 816-826, janeiro, 1982.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. – Mechanisms of Nutrient Modulation of the Immune Response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 115, n. 6 ,p. 1119-1128, 2005.

DAEL, V.P. *et al.*, Substitution of Casein by β -Casein or of Whey Protein Isolate by α -Lactalbumin Does Not Affect Mineral Balance in Growing Rats. The **Journal of Nutrition**, SI, v.135, n 6, p. 1438-1443, jun. 2005.

DALLAS, P. O uso de derivados de soro de leite em aplicações em produtos de consumo. **Indústria de Laticínio**, p. 60-61, maio/junho, 1999.

DAVIES, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals(part I). **Journal Biological Chemistry**, v. 262, p. 9895-9901, 1987.

DELEVE, L.;KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology Therapy**, v.52, p.287-305, 1991.

DE REY-PAILHADE, J. Sur um corps d'origine organique hydrogenant lê soufre a froid. Compte rendus hebdomadaire séances de l'Académie dês sciences v. 106, p. 1683-1684. 1888, apud MEISTER, 1991.

DEVADAS, S.; ZARITSKAYA, L.; RHEE, S.G., OBERLEY, L.; WILLIAMS, M.S. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 59-70, 2002.

DRÖGE, W.; POTTMEYER-GERBER, C.; SCHMIDT, H.; NICK, S. Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. **Immunobiological**, v.172, p. 151-156, 1986.

Referências Bibliográficas

EIGEL, W.N.; BUTLER J.E; ERNSTROM C.A; FARRELL, H.M. *et al.* Nomenclature of proteins of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p.1599-1631, 1984.

ESKIN, N.A.M. **Biochemical changes in raw foods**: milk. Biochemistry of Foods, p205-236. New York: Academic Press, 1985.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em <<http://apps.fao.org/>> Acesso em 20, novembro de 2006.

FONSECA, L.M.; FONSECA, C.S.P.; BRANDÃO, S.C.C.. Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite. **Industria de Laticínios**, v 21., p. 50-56, maio/junho, 1999.

FRUHBECK, G. Protein metabolism: slow and fast dietary proteins. **Nature**, v. 391, n. 6670 p. 843, 845, 1998.

GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J.; WARD, .E. Bioactive components in milk. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, p. 653-658, 2002.

GHIBELLI, L.; NOSSERI, C.; COPPOLA, S.; MARESCA, V.; DINI, L. The increase in H₂O₂-induced apoptosis by ADP-Ribosylation Inhibitors is related to cell bledding. **Experimental Cell Research**, v.221, p. 470-477, 1995.

Referências Bibliográficas

GMÜNDER, H.; DRÖGE, W. Differential effects of glutathione depletion on T cell subsets. **Cellular Immunology**, v. 138, p. 229-237, 1991.

GRIFFITH, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, v.27, n.9-10, p.922-935, 1999.

GUYTON, A.C. Tradução. Alcyr Kraemer *et al.* **Tratado de fisiologia médica** 6^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

GUMNDER, H.; ECK, H.P; BENNINGHOFF, B.; ROTH, S.; DROGE, W. Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine. **Cellular Immunology**, v. 129, p. 32-46, 1990.

HAKKAK, R.; KOROURIAN S.; RONIS, M.J.J.; JOHNSTON, J.M.; BADGER, T.M. Dietary Whey Protein Protects against Azoxymethane-induced Colon Tumors in Male Rats. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.10, p. 555-558, maio, 2001.

HOPKINS, F.G. On a autoxidisable constituent of the cell. **Biochemistry Journal**, v.15, p. 286-305, 1921, apud MEISTER, 1991.

HORNE, D.S. whey proteins. **Journal of the society of Dairy Technology**, v.53, n.1, p. 3-4, 1990.

HUM, S.; KOSK, K.G.; HOFFER, L.J. Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. The **Journal of Nutrition**, SI, v.122, n. 10, p. 2010-2018, 1992.

HUTTER, D.E.; TILL, B.G.; GREENE, J.J. Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. **Experimental Cell Research**, v. 232, p.435-438, 1997.

HWANG, C; SINSKEY, A.J.; LODISH, H.F. Oxidized Redox State of glutathione in the Endoplasmic Reticulum. **Science**, v.257, p.1496-1502, setembro, 1992.

ISHII, T.; SUGITA, Y.; BANNAI, S. Regulation of glutathione levels in mouse spleen lymphocytes by transport of cysteine. **Journal of Cellular Physiology**, v.133, p.330, 1987.

KAGAN, V.E. **Lipid peroxidation in biomembranes**. CRC Press, Boca Raton, 1988.

KAYSER, H. MEISEL, H., Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk protein. **Febs Letter**, v. 383, n. 1-2, p.18-20, mar., 1996.

KAPLOWITZ, N.; FERNANDEZ-CHECA J.C.; KANNAN R.; GARCIA-RUIZ,C.; OOKHTENS, M.; YI, J. R. -GSH transporters: molecular characterization and role

in GSH homeostasis. **Biological Chemistry Hoppe- Seyler**, v. 377, n.5, p. 267-273, 1996.

KENT, K.D; HARPER, W.J.; BOMSER, J.A. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induce cell death in human prostate epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 27-33,out., 2003.

KITTS, D.D.; YUAN, Y.; NAGASAWA, T.; MORIYAMA, Y. Effect of casein, casein phosphopeptides, and calcium intake on ileal ⁴⁵Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Nutrition**, SI, v. 68, n 3, p. 765-781,nov., 1992.

KOJMURA,M.; NIO, N.; ARIYOSHI, Y. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. **Agriculture Biology Chemistry**, v.54, n. 3, p. 835-836, 1990.

KOJMURA,M.; NIO, N; KUBO, K.; MINOSHIMA, Y.; MUNEKATA, E.; ARIYOSHI, Y. Inhibition of Angiotensin-converting Enzyme by Synthetic Peptides of Human β -Casein. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2107-2114, 1989.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein- derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. **Food Chemistry Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 131-145, jan.,1996.

LIN, Z.; LUO, W.; LI, H.; ZHANG, Y. The effect of endogenous formaldehyde in the rat aorta endothelial cells. **Toxicology Letters**, v. 159, n. 2, p. 134-143, nov., 2005.

LU, S. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **Faseb Journal**, v. 13, n. 10, p.1169-1183, jul, 1999.

MARSHALL, K.R.; HARPER, W.J. Whey protein concentrates. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 233, p. 21-32, 1988.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of synthesis, and its reversal: applications in research and therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, p.155-194, 1991.

MEREDITH, M.J.; REED, D.J. Status of the mitochondria pool of glutathione in the isolated hepatocyte. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. .3747-3753, 1982.

MICKE, P.; BEEH, K.M; SCHLAAK, J.F.; BUHL, R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, p.171-178, 2001.

Referências Bibliográficas

MCINTOSH GH; REGESTER, G.O; LEU, RKL; ROYLE, PJ; SMITHERS, GW. Dairy Proteins Protect against Dimethylhydrazine- Induce Intestinal Cancers in Rats. **Americam Institute of Nutrition**, p. 809-816, 1994.

MCINTOSH GH,; ROYLE, P.J.; LE LEU, R.K.; REGESTER, G.O.; JOHNSON, M.A. *et al.* Whey Proteins as Functional Food Ingredients? **International Dairy Journal**, v. 8, p. 4225-434, 1998.

MIYATAKE, *et al.*, Important role of thiol compounds to protect oxidative stress on HTLV-I(+) T lymphocytes. **Leukemia Research**, v.24, p. 265 –266, 2000.

MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; MCBEAN, L.D. **Handbook of: Dairy Foods and Nutrition**. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2000.

MORENO, Y. F.; SGARBIERI, V. C.; SILVA, M. N.; TORO, A. A. D. C.; VILELA, M. M. S. Features of whey Protein Concentrate Supplementation in Children with Rapidly Progressive HIV Infection. **Journal of Tropical Pediatrics**. v. 52, n. 1, p. 34-38, 2005.

MORR,C.V.; HA,E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v33, n.6, p 431-476, 1993.

Referências Bibliográficas

NISHIUCH, Y.; SASAKI, M.; NAKAYASU, M.; OIKAWA, A. Cytotoxicity of cysteine in culture media. **In vitro**, v. 112, p. 635, 1976.

NISSEN, J.A. Determination of Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **American Chemical Society**, v.27, p1256-1262, 1979.

NOELLE, R.J.; LAWRENCE, D.A. Determination of glutathione in lymphocytes and possible association of redox state and proliferative capacity of lymphocytes. **Biochemistry Journal**, v.198, p. 571-579, 1981.

OLNEY, J.W.; HO, O.L.; RHEE, V. Cytotoxic effect of acid and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. **Brain Research**, v. 14, p.61-76, 1971.

PREGO, E.C.; BALBOA, J.P.; MIRANDA E.C. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicals libres: III. Glutati n peroxidasa . **Rev. Cubana Invest Biomed**, v.16, n. 1, p. 10-15, 1997.

REGESTER G.O.; McINTOSH, G.H; LEE, V.K.; SMITHERS, G.W. Whey proteins as nutritional and functional food ingredients. **Food Australia**, v.48, n.3, p.123-127, mar o, 1996.

Referências Bibliográficas

REYNOLDS, E.C.; RILEY, P.F.; ADAMSON, N.J. A selective purification precipitation procedure for multiple phosphoserine –containing peptides and methods for their identification. **Analytical Biochemistry**, v. 217, n. 2, p. 277-284, mar., 1994.

RENNER, E. **Micronutrients in Milk and Milk-based Food Products**. London: Elsevier Applied Science, 1989.

RETH, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p.1129-1134, 2002.

ROITT, I.M. **Imunologia**. Tradução Moyses A. Fuks. 5 ed, São Paulo: Atheneu, 1995, 294 páginas.

ROITT, I.M; BROSTOFF, J.; MALE, D.K. **Imunologia**. Tradução Ida Cristina Gubert, 5 ed, São Paulo: Manole, 1999, 423 páginas.

ROMAN, D. ULRICH, P.; PAUL, G.; COURT, M.; VIT, P.; KEHREN J.; MAHL A. Determination of the effect of calcineurin inhibitors on the rat's immune system after KLH immunisation. **Toxicology Letters**. v. 149, n. 1-3, p. 133-140, Apr. 2004.

ROSANELI, C.F. **Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos**. 2002. Faculdade de

Referências Bibliográficas

Engenharia de Alimentos, UNICAMP. (Dissertação Mestre em Alimentos e Nutrição).

ROTH S; DROGE W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cellular immunology*, v. 108, n.2, p. 417-24, 1987.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant Properties of Casein Calcium Peptides and Their Effects on Lipid Oxidation in Beef Homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 2, p. 464-468, 2005.

SANÉ, A. T.; CANTIN, A. M.; PAQUETTE, B.; AGNER, J. R. Ascorbate modulation of H₂O₂ and camptothecin-induced cell death in Jurkat cells. **Cancer Chemother Pharmacology**. v.54, n. 4, p. 315-321, Oct. 2004.

SCRIMSHAN, N. S.; SANGIOVANNI, J. P. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. **American Journal Clinical Nutrition**. v. 66, p. 464S-477S, 1997.

SEN, C. K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutritional Biochemistry*. v. 8, n. 12, p. 660-672, dec. 1997.

Referências Bibliográficas

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 27, n. 9-10 p. 916-921, nov. 1999.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1987.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em Alimentos Protéicos**: Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SMITHERS, SMITHERS G. W.; BALLARD F. J.; COPELAND A. D.; DE SILVA K. J.; DIONYSIUS D. A.; FRANCIS G. L.; GODDARD C.; GRIEVE P. A.; MCINTOSH G. H.; MITCHELL I. R.; PEARCE R. J.; REGESTER G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**. v.79, n. 8, 1454-1459, 1996.

SPECTOR, A. ; MA, W.; SUN, F.; LI, D.; KLEIMAN, N.J The effect of H₂O₂ and tertiary butyl hydroperoxide upon a murine immortal lens epithelial cell line, α TN41. **Experimental Eye Research**. v. 75, n. 5, p. 573-582, nov. 2002.

TAKAHASHI, K.; AKASAKA, M.; YAMAMOTO C.; KOBAYASHI C.; MIZOGUCHI, J.; KOYAMA J. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA. **Journal Biochemistry**. v.108 , n.2, p. 145-148, Aug. 1990.

Referências Bibliográficas

TSUDA H, KAZUNORI S. Milk Components as Cancer Chemopreventive Agents. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.1, p. 277-282, 2000.

USDEC. **Unites States Dairy Export Council**. Disponível em <www.usdec.org>. Acesso em 23, novembro, 2005.

VEGA, L.; FERNANDEZ, R.P.; MARTIN MATEO, M.C.; BUSTAMANTE, J.; BUSTAMANTE, A.; MENDIL HERRERO, A.; MUNGUIRA, E. B. Study of the Activity of Glutathione-Peroxidase, Glutathione- Transferase, and Glutathione-Reductase in Renal Transplants. **Transplantation Proceedings**, v. 35, p. 1346-1350, 2003.

VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S.; CURI, R. Desenvolvimento de equipamentos para isolamento e cultivo de linfócitos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v.33, n. 4, p.819-829, 1990.

WATANABE, H.; BANNAI, S. Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages **Journal of Experimental Medicine**. v.165, n.3, p. 628-640, mar. 1987.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods in Enzymology**, New York v.77, p.325-332, 1981.

Referências Bibliográficas

WIELAND,T.; BODANSZKY,M. **The world of peptides**. Berlin, Germany: Spring-Verlag, 1991.

WRONA, D.; SUKIENNIK, L.; JURKOWSKI, M. K; JURKOWLANIEC, E.; GLAC, W.; TOKARSKI, J. Effects of amphetamine on NK-related cytotoxicity in rats differing in locomotor reactivity and social position. **Brain, Behavior and Immunity**, v.19, n.1, p. 69-77, jan. 2005.

WONG C.W.; WATSON D.L. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *Journal of Dairy Reserch*, v. 62, n. 2, p.359-368, 1995.

YUAN, Y.V.; KITTS, D. D. Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat denature casein and soy bean protein. **British Journal of Nutrition**, SI, v. 71, n. 4, p. 583-603, abr., 1994.

YUAN, Y.V.; KITTS, D. D. Conformation of calcium absorption and femoral utilization in spontaneously hypertensive rats fed casein phosphopeptide supplemented diet. **Nutrition Research**. v. 11, n. 11, p. 1257-1272, nov. 1991.

ANEXO I