



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DANIELA GASPARETTO

**EFEITO DO CONSUMO DE HIDROLISADO DO SORO DE
LEITE NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NO ESTADO
REDOX DE RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS**

**Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
ORIENTADOR**

Campinas, 2011



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

DANIELA GASPARETTO

**EFEITO DO CONSUMO DE HIDROLISADO DO SORO DE
LEITE NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NO ESTADO
REDOX DE RATOS SEDENTÁRIOS E EXERCITADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, na área de Nutrição Experimental aplicada à Tecnologia de Alimentos.

**Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
ORIENTADOR**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Daniela Gasparetto, aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____ e orientada pelo Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán.

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

G213e Gasparetto, Daniela
Efeito do consumo de hidrolisado do soro de leite
no metabolismo energético e no estado redox de ratos
sedentários e exercitados / Daniela Gasparetto. --
Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Jaime Amaya-Farfán.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Proteínas do soro de leite. 2. Hidrolisados
protéicos. 3. Exercício físico. 4. Expressão
gênica. I. Amaya-Farfán, Jaime. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of the intake of hydrolyzed whey proteins on energy
metabolism and the redox state of sedentary and exercised rats

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Whey proteins

Hydrolyzed protein

Physical exercise

Gene expression

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

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Jaime Amaya-Farfán [Orientador]

Everardo Magalhães Carneiro

Mário Roberto Maróstica Junior

Data da defesa: 06/12/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP
Orientador

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Instituto de Biologia/UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior
Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP
Membro

Profa. Dra. Érika Maria Marcondes Tassi
Faculdade de Medicina/UFU
Suplente

Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho da Silva
Faculdade de Nutrição/UNIFAL
Suplente

*Só poderia ser dedicado a ela... À minha mãe,
Maria Regina Voltarelli, que tanto se esforçou
pela minha formação (não apenas profissional),
que sempre esteve me apoiando, que fez e
ainda faz de tudo pela minha felicidade.*

AGRADECIMENTOS

À minha tão amada família, Maria Regina Voltarelli, Glaucilene, Luiz Marcelo, Danilo e Zélio, que sempre foram meus grandes exemplos e que estão sempre tão presentes na minha vida (mesmo à distância), me apoiando e incentivando a buscar o meu melhor.

Ao meu companheiro Adriano Todorovic Fabro, pela troca de vivências, amor, compreensão e respeito, e por compartilhar comigo os desafios que surgem.

Ao prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, por ter me aceitado como aluna e partilhado conhecimentos tão raros.

Ao prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro, pela colaboração na execução do projeto, dispondo atenção e estrutura essenciais para a realização do trabalho.

À Flávia de Paula, por instruir e tornar possível a realização das análises de Biologia Molecular.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro ao projeto; à CAPES, pela concessão da bolsa de estudo; ao Departamento de Alimentos e Nutrição e à Faculdade de Engenharia de Alimentos, por viabilizarem a execução do projeto.

À Susana Correa, por todo o ensinamento e auxílio na manipulação dos animais.

Aos parceiros de laboratório Carla Gregghi, Carolina Moura, Éder Risso, Elisa Jackix, Liane Rocha, Pablo Lollo e Priscila Morato.

Aos estagiários André Felipe e Juliana Avallone, por auxiliarem na execução da pesquisa.

À Daniela Miotto, Fabiane La Flor Ziegler e Maria Inês Abecia-Soria, por ensinarem métodos experimentais e pela disposição em ajudar.

Às minhas queridas amigas Anne Castro, Elisa Bernardes, Nathalia Dragano, Mariana Danelon e Paula Uggioni, por dividirem experiências e conhecimentos, estarem sempre dispostas a ajudar e por tornarem o dia-a-dia da pós-graduação mais prazeroso.

À equipe do NEPA, que me “recebeu” na Unicamp e despertou em mim o interesse pela pesquisa com alimentos.

Por fim, agradeço aos que não participaram efetivamente da pesquisa, mas que estão intimamente ligados à minha vida e, portanto, tiveram contribuição neste mestrado.

RESUMO

GASPARETTO, D. Efeito do consumo de hidrolisado do soro de leite no metabolismo energético e no estado redox de ratos sedentários e exercitados. 2011. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

As proteínas do soro de leite possuem alto valor nutritivo, sendo, portanto, extensamente estudadas em diversas áreas do saber. A equipe do Laboratório de Fontes Protéicas vem estudando a associação entre o consumo do hidrolisado de proteína do soro de leite e seus efeitos biológicos e nutricionais, em vários níveis de atividade física. Seu consumo tem sido associada a diminuição do estresse metabólico, redução nos níveis de lactato, aumento das reservas de glicogênio muscular, maior estabilidade da albumina sérica e melhora nos tempos de exaustão do animal treinado. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do consumo do hidrolisado de soro de leite no estado metabólico redox do rato e na utilização de lipídeos pelo organismo como fonte de energia durante a atividade física. Ratos Wistar machos foram divididos em 3 grupos de dieta: Padrão (AIN 93-G, dieta elaborada com caseína), Controle (AIN 93-G, elaborada com concentrado de proteínas do soro de leite) e Experimental (AIN 93-G, elaborada com hidrolisado de proteínas do soro de leite). Cada dieta foi subdividida em 4 grupos ($n = 7$): sedentários, sedentários-exaustos, treinados e treinados-exaustos. O hidrolisado apresentou maior poder antioxidante *in vitro*, do que o concentrado e três frações do soro, α -lactalbumina, β -lactoglobulina e albumina sérica bovina. O consumo das proteínas do soro de leite, hidrolisadas ou não, aumentou a concentração de triptofano no sangue e de BCAAs livres no músculo, além de 10 outros aminoácidos analisados. Porém, reduziu o nível de alanina aminotransferase sérica. A enzima também teve sua concentração reduzida pelo treinamento físico enquanto que a exaustão aumentou-a. Contrariamente, o exercício contínuo aumentou os níveis de ácidos graxos livres séricos, ao passo que a exaustão os diminuiu. Ambas as variáveis, por sua vez, elevaram não somente a temperatura muscular, mas também o nível de 15 aminoácidos musculares livres e a concentração de triacilgliceróis séricos. O treinamento possibilitou que os animais treinado-exaustos apresentassem tempos até a exaustão mais longos que os sedentários-exaustos. A exaustão também aumentou a concentração de nove aminoácidos séricos (dentre eles BCAAs, Ala e Gln). O treinamento, bem como a exaustão e a dieta não interferiram na expressão dos genes PPAR α , PPAR δ , PGC 1 α , CPT 1 β e miostatina no músculo. Não foram constatadas alterações no consumo, peso do tecido adiposo, lactato sanguíneo, glutathione reduzida, além dos parâmetros séricos: creatinina, aspartato aminotransferase, albumina, corticosterona e ácido úrico. Os resultados deste trabalho sugerem haver poucas diferenças entre as dietas formuladas com proteínas do soro de leite. Porém, eles também sugerem que o nível de atividade a ser empregado em ensaios biológicos deva ser criteriosamente definido.

Palavras-chave: Proteína do soro de leite. Hidrolisado. Exercício físico. Expressão gênica.

ABSTRACT

GASPARETTO, D. Effects of the intake of hydrolyzed whey proteins on energy metabolism and the redox state of sedentary and exercised rats. 2011. Dissertation (Master on Food and Nutrition) – School of Food Engineering, University of Campinas.

There is extensive research on whey proteins because of its particularly high level of nutritive value. The Protein Sources Laboratory team has studied the relationship between the intake of hydrolyzed whey protein and its biological and nutritional effects at several levels of physical exercise. It has been observed that time to exhaustion is improved, serum lactate levels and metabolic stress are reduced, muscle glycogen stores are increased, and serum albumin levels are preserved. This work aimed at assessing the effects of consuming the hydrolyzed whey proteins on the metabolic redox state and the utilization of lipids as energy during physical exercise. Male Wistar rats consumed 3 diets: Experimental (AIN 93-G, prepared with hydrolyzed whey protein), Control (AIN 93-G, prepared with concentrate whey protein) and Standard (AIN 93-G). Each diet was further grouped into 4 cases (n = 7): sedentary, exhausted-sedentary trained and exhausted-trained. The hydrolyzed whey protein presented a greater antioxidant effect *in vitro*, than the concentrate, and its main protein components. Both the hydrolyzed and unhydrolyzed whey protein increased the tryptophan blood concentration as well as the free BCAA muscle concentration, in addition to ten other amino acids. Moreover, it reduced the serum alanine aminotransferase level. Physical training also reduced its concentration, whereas exhaustion increased it. On the other hand, continuous physical exercise increased free fatty acids levels, whereas exhaustion decreased it. Moreover, both variables increased not only the muscle temperature but also 15 muscle amino acids levels as well as the triacylglycerols levels. Training led to longer time to exhaustion of the trained-exhausted than to sedentary-exhausted. Exhaustion also increased the concentration of nine serum amino acids (among them BCAAs, Ala e Gln). Both training and exhaustion, and diet had no affect on the gene expression of PPAR α , PPAR δ , PGC 1 α , CPT 1 β and myostatin in the muscle. No effect was observed for food intake, adipose tissue mass, blood lactate, reduced glutathione as well as serum parameters: creatinine, aspartate aminotransferase, albumin, corticosterone, uric acid. These findings indicated that there are few differences between the whey-protein based diets. However, they do point out that some level of activity should also be taken into account during the biological experiments.

Key words: Whey protein. Hydrolyzed. Physical exercise. Gene expression.

SÚMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 PROTEÍNAS: DEFINIÇÃO, FUNÇÃO, CLASSIFICAÇÃO	19
1.2 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE	20
1.3 HIDROLISADOS PROTÉICOS	21
1.4 ATIVIDADE FÍSICA	22
1.5 SUBSTRATOS ENERGÉTICOS DURANTE A ATIVIDADE FÍSICA	23
1.6 AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA	25
1.7 EXERCÍCIO FÍSICO E RADICAIS LIVRES	26
1.8 AÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE NA ATIVIDADE FÍSICA	26
1.9 AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE	29
1.10 EXPRESSÃO DOS GENES PPAR α , PPAR δ , PGC 1 α , CPT 1 β E MIOSTATINA	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 GERAIS	35
2.2 ESPECÍFICOS	35
3 MÉTODOS	37
3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	37
3.2 ANIMAIS	37
3.3 DIETAS	38
3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO E DESENHO EXPERIMENTAL	38
3.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS	39
3.6 ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO PONDERAL E DA INGESTÃO ALIMENTAR	39
3.7 DOSAGEM DE LACTATO	39
3.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA MUSCULAR	40
3.9 DOSAGEM DOS PARÂMETROS SÉRICOS	40
3.10 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS MUSCULARES E SÉRICOS	40
3.11 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA	41
3.12 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ORAC	42
3.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CPT 1 β , PGC 1 α , PPAR α , PPAR δ E MIOSTATINA	43
3.13.1 Extração de mRNA	43
3.13.2 Obtenção de cDNA a partir de RNA total	44
3.13.3 Real Time RT-PCR	44
3.14 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS	47
4.2 ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO PONDERAL E DA INGESTÃO ALIMENTAR	47
4.3 TESTE DE EXAUSTÃO	51
4.4 LACTATO SANGUÍNEO	53
4.5 TEMPERATURA MUSCULAR	55
4.6 CREATININA SÉRICA	56
4.7 ALANINA AMINOTRANSFERASE SÉRICA	57
4.8 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE SÉRICA	59
4.9 PESO DOS TECIDOS ADIPOSEO EPIDIDIMAL E PERITONEAL	59

4.10 TRIACILGLICERÓIS	61
4.11 ÁCIDOS GRAXOS LIVRES NÃO-ESTERIFICADOS	62
4.12 ALBUMINA SÉRICA	65
4.13 PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES SÉRICOS.....	66
4.14 PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES MUSCULARES	72
4.15 CORTICOSTERONA SÉRICA.....	76
4.16 ÁCIDO ÚRICO SÉRICO.....	77
4.17 GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS.....	79
4.18 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ORAC	81
4.19 EXPRESSÃO GÊNICA	84
4.19.1 Avaliação da expressão do gene PPAR α	84
4.19.2 Avaliação da expressão do gene PPAR δ.....	86
4.19.3 Avaliação da expressão do gene PGC 1α.....	88
4.19.4 Avaliação da expressão do gene CPT 1β	90
4.19.5 Avaliação da expressão do gene miostatina	92
5 CONCLUSÕES.....	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
REFERÊNCIAS	101
ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética	119
APÊNDICE A - Planilha de análise estatística sobre o efeito da dieta.....	121
APÊNDICE B - Planilha de análise estatística sobre o efeito de exercício/exaustão..	125
APÊNDICE C – Valores individuais de aminoácidos séricos livres	133
APÊNDICE D – Valores individuais de aminoácidos musculares livres	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do efeito d de dieta formulada com isolado, hidrolisado e caseína	27
Tabela 2. Desenho experimental	38
Tabela 3. Código de acesso e sequência dos primers para os genes estudados.....	45
Tabela 4. Composição centesimal das dietas elaboradas	47
Tabela 5. Consumo de dieta e ganho de peso diários.....	48
Tabela 6. Níveis de lactato sanguíneo	53
Tabela 7. Níveis séricos de creatinina e AST.....	56
Tabela 8. Peso do tecido adiposo e concentração de TAG séricos	60
Tabela 9. Concentração dos aminoácidos livres séricos	67
Cont. Tabela 9. Concentração dos aminoácidos livres séricos.....	68
Tabela 10. Agrupamento dos aminoácidos livres séricos conforme efeito do exercício/exaustão ...	69
Tabela 11. Concentração dos aminoácidos livres musculares.....	73
Cont. Tabela 11. Concentração dos aminoácidos livres musculares.....	74
Tabela 12. Agrupamento dos aminoácidos musculares conforme efeito da dieta.....	75
Tabela 13. Agrupamento dos aminoácidos musculares conforme efeito do exercício/exaustão	75
Tabela 14. Níveis de corticosterona sérica.....	76
Tabela 15. Níveis de ácido úrico sérico e glutathiona reduzida em eritrócitos.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de ativação do gene PPAR δ	32
Figura 2. Esquema de divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física.	37
Figura 3. Médias dos pesos durante o período experimental	49
Figura 4. Médias dos tempos de exaustão.....	51
Figura 5. Médias das temperaturas do músculo <i>gastrocnemius</i>	55
Figura 6. Médias dos níveis de ALT.	58
Figura 7. Médias dos níveis de ácido graxo não-esterificado.	62
Figura 8. Médias dos níveis de albumina.....	65
Figura 9. Médias dos níveis séricos de triptofano.....	69
Figura 10. Efeito antioxidante avaliado pelo método ORAC.....	81
Figura 11. Comparativo da expressão do gene PPAR α	85
Figura 12. Comparativo da expressão do gene PPAR δ	87
Figura 13. Comparativo da expressão do gene PGC 1 α	88
Figura 14. Comparativo da expressão do gene CPT 1 β	90
Figura 15. Comparativo da expressão do gene miostatina.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

$\cdot\text{OH}$: radical (livre) hidroxila
ADP: adenina difosfato
Ala: alanina
ALT: alanina aminotransferase
Arg: arginina
Asn: asparagina
Asp: ácido aspártico
AST: aspartato aminotransferase
ATP: adenina trifosfato
CAS: caseína
CPT 1 β : carnitina palmitoil transferase 1 beta
Cys: cisteína
Gln: glutamina
Glu: ácido glutâmico
Gly: glicina
H: hidrogênio
His: histidina
Hpro: hidroxiprolina
Ile: isoleucina
Leu: leucina
Lys: lisina
Met: metionina
 $\text{O}_2^{\cdot-}$: radical (livre) superóxido
PGC 1 α : coativador 1 alfa dos receptores ativados por proliferadores do peroxissoma
Phe: fenilalanina
PPAR α : receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa
PPAR δ : receptores ativados por proliferadores de peroxissoma delta
Pro: prolina
S: sedentário(s)
Ser: serina
SX: sedentário(s)-exausto(s)
T: treinado(s)
Tau: taurina
Thr: treonina
Trp: triptofano
TX: treinado(s)-exausto(s)
Tyr: tirosina
Val: valina
WPC: concentrado de proteínas do soro
WPH: hidrolisado de proteínas do soro
WPI: isolado de proteínas do soro

INTRODUÇÃO

O Guia Alimentar da População Brasileira recomenda três porções diárias de leite e destaca este alimento como sendo a melhor fonte de cálcio na alimentação (BRASIL, 2006), além de boa fonte de vitaminas (especialmente riboflavina) e proteínas. Estas últimas são consideradas de alto valor biológico por apresentarem boas quantidades de aminoácidos essenciais. As proteínas do leite se dividem em duas classes: insolúveis (caseína) e solúveis (proteínas do soro de leite). A caseína compõe 80% das proteínas do leite (MADUREIRA et al., 2007), sendo o restante composto pelas proteínas do soro de leite, também conhecidas por *whey protein*.

O soro de leite é o líquido translúcido formado a partir da precipitação da caseína, seja por redução do pH ou por ação enzimática, como por exemplo, durante a produção de queijos. A descoberta das suas propriedades nutricionais elevou seu conceito de subproduto a co-produto na fabricação de queijos, inclusive na melhora de qualidade de outros produtos (HOFFMAN, FALVO, 2004; MARSHALL, 2004).

No soro estão presentes vários tipos de proteínas: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, imunoglobulinas, albumina sérica bovina, lactoferrina bovina e lactoperoxidases (MADUREIRA et al., 2007; SGARBIERI, 2004). A β -lactoglobulina é a proteína mais abundante no soro de leite bovino, representando cerca de 58%, seguida pela α -lactalbumina, compondo 20%.

No mercado atual, já dispomos as proteínas do soro de leite como ingredientes de alguns gêneros alimentícios (por exemplo, bebidas lácteas e leites achocolatados), onde são amplamente usadas como agente de textura (formação e estabilidade de espuma, emulsificação, geleificação) e antioxidante. Na forma de suplemento (forma purificada em pó) estão sob várias apresentações (produtos instantâneos, sem lactose, enriquecido com α -lactalbumina). Neste caso, conforme o grau de purificação da proteína do soro, é possível obter o concentrado (WPC) – com teor de proteínas entre 35 e 80% – e o isolado protéico (WPI) – teor de proteínas > 90% (MADUREIRA et al., 2007; MARSHALL, 2004). Pode ser encontrado também na forma de hidrolisado (WPH), no qual as proteínas do WPC estão degradadas a peptídeos de diversos tamanhos, conforme o grau de hidrólise.

As proteínas do soro de leite excedem às recomendações para quase todos os aminoácidos essenciais (SGARBIERI, 2004). Essa característica torna o produto atrativo

para esportistas e atletas, além dos já documentados benefícios à atividade física (PIMENTA et al., 2006; MORIFUJI et al., 2005a; MORIFUJI, SAKAI, SUGIURA, 2005). Sabe-se que em academias de ginásticas, o consumo de suplementos nutricionais é relatado por 24% a 60% dos frequentadores (GOSTON; CORREIA, 2010; HIRSCHBRUCH; FISBERG; MOCHIZUKI, 2008; PEREIRA; LAJOLO; HIRSCHBRUCH, 2003), sendo que as proteínas do soro de leite se destacam entre os produtos hiperprotéicos.

Diante desses atributos, as proteínas do soro de leite têm sido exaustivamente estudadas em várias aplicações, seja em atividade imunomoduladora, ação antimicrobiana e antiviral, atividade anticarcinogênica, efeito protetor do sistema cardiovascular, ação contra úlceras, além de atividade antioxidante (MADUREIRA et al., 2007; SGARBIERI, 2004). Já na Grécia antiga, Hipócrates conhecia os benefícios à saúde trazidos pelo soro de leite e este era usado como ingrediente de poções revitalizantes e para curar doenças, além de afrodisíacos, durante a Idade Média (KOSIKOWSKI, 1982).

Tais atividades biológicas das proteínas do soro e seus peptídeos derivados, a rápida expansão do mercado de alimentos funcionais e a demanda crescente pelos consumidores de proteínas de alta qualidade, combinados, tornam atrativo o desenvolvimento de produtos funcionais a partir de das proteínas do soro de leite e suas frações (McINTOSH et al., 1998). Para tanto, pesquisas devem ser realizadas para formular e respaldar evidências científicas para a alegação de propriedades funcionais, conforme solicitado nas resoluções 18 e 19, pela legislação vigente (BRASIL, 1999).

Cabe ressaltar que, embora este trabalho trate do consumo das proteínas do soro de leite hidrolisadas, aliado à atividade física, a exaustão é aqui utilizada como um exemplo de situação catabólica. No entanto, não devemos extrapolar os conhecimentos gerados em outras situações catabólicas, como caquexia/câncer, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), sepse, envelhecimento, queimaduras, doenças inflamatórias. Contudo, o conhecimento a respeito do consumo das proteínas do soro de leite hidrolisadas associado ao exercício físico, sobre o aumento da taxa de utilização dos lipídeos como fonte energética, pode originar interesse no estudo do controle dos níveis corporais de lipídeos, a exemplo da obesidade e dislipidemias.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PROTEÍNAS: DEFINIÇÃO, FUNÇÃO, CLASSIFICAÇÃO

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes em nosso organismo, sendo o principal componente estrutural e funcional das células. São moléculas complexas, compostas em grande parte por nitrogênio, carbono, oxigênio e hidrogênio, e que possuem os aminoácidos como unidade funcional. Esses aminoácidos se unem covalentemente por ligações denominadas peptídicas (ou aminoacídicas), formando pequenas moléculas (< 100 aminoácidos) chamadas peptídeos, ou estruturas maiores (>100 aminoácidos), as chamadas proteínas (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

No organismo e nos alimentos, as proteínas e aminoácidos desempenham numerosas e variadas funções. Agem na função estrutural e contrátil, nas proteínas de transporte; e como catalisadores biológicos (enzimas), hormônios e antígenos/anticorpos, além da função nutricional (SGARBIERI, 1996). Sendo assim, são fundamentais no crescimento e renovação de tecidos, na sustentação, permitem a movimentação e a contração, são moléculas de transporte de nutrientes, compõem o sistema imune, e são fontes de energia, embora esta não seja sua principal função.

Como o organismo é incapaz de sintetizar alguns aminoácidos, esses devem ser fornecidos pela dieta e, portanto, são chamados essenciais. A quantidade desse tipo de aminoácido é um dos parâmetros utilizados para classificar as proteínas em alto (carnes, leites, ovos) ou baixo valor nutricional (feijão, soja, ervilhas, cereais) dos alimentos. Várias técnicas são utilizadas para analisar a qualidade nutricional das proteínas, diferenciando-se por: a) métodos químicos e/ou bioquímicos, como escore químico e lisina e metionina parcialmente biodisponível; b) métodos biológicos, como Balanço de nitrogênio, Quociente de Eficiência Protéica (PER), digestibilidade e biodisponibilidade; c) métodos microbiológicos, como a elaboração de curvas de crescimento em função da concentração do aminoácido essencial (SGARBIERI, 1996).

1.2 PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

As proteínas do soro de leite excedem às recomendações para quase todos os aminoácidos essenciais, exceto aromáticos, como fenilalanina e tirosina, os quais apenas atendem as recomendações. Apresenta, também, altas concentrações de triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004). Ha e Zemel (2003) destacam, ainda, que a proteína do soro de leite é rica em glutamina.

A β -lactoglobulina, fração mais abundante das proteínas do soro de leite bovino, tem peso molecular de 18 kDa e duas pontes dissulfeto internas e um grupo tiol livre (UNIVERSITY OF GUELPH), o que lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago, sendo, portanto, absorvida no intestino delgado. É a fração que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (DE WIT, 1998).

A α -lactoalbumina, outra fração de destaque na composição do soro de leite bovino, tem peso molecular de 14,2 kDa, contém 8 grupos cisteína, todos envolvidos por ligações dissulfeto, e quatro resíduos de triptofano (UNIVERSITY OF GUELPH). É de fácil e rápida digestão e contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares (MARKUS; OLIVIER; DE HAAN, 2002).

Cerca de 10% das proteínas do soro de leite são representadas pela albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) um peptídeo de alto peso molecular (66 kDa), rico em cisteína (aproximadamente 6%) e relevante precursor da síntese da glutatona (DE WIT, 1998).

As imunoglobulinas constituem de 10 a 15% das proteínas do soro de leite. Essas glicoproteínas destacando-se na função imunomoduladora, sendo a principal componente a IgG (SGARBIERI, 2004; LONNERDAL, 2003).

Outras frações, já em quantidades bem menores, são de lactoferrina, lactoperoxidases, glicomacropéptídeos.

Uma característica que distingue as proteínas do soro de leite é sua capacidade de elevar rapidamente os níveis de aminoácidos no sangue (BOIRIE et al., 1997), em comparação às caseínas, o que lhes rendeu a denominação de proteínas rápidas (ou *fast metabolizing proteins*). Isso se deve à rápida digestão dessas proteínas no estômago. Como resultado da aminoacidemia, também ocorre mais prontamente a absorção desses aminoácidos pelo músculo, o que possibilita o estímulo a síntese protéica. Este quadro é

muito adequado em situações de estresse metabólico, no qual a reposição de proteínas pelo organismo se torna emergencial (SGARBIERI, 2004).

1.3 HIDROLISADOS PROTÉICOS

A hidrólise de uma substância pode ser realizada por uso de ácidos e bases, porém o emprego de enzima é preferido para obtenção de hidrolisados protéicos com aplicação nutricional, pois além de produzir hidrolisados com perfil peptídico mais bem definido, preservando a forma L-aminoácidos, não produz substâncias tóxicas e D-aminoácidos (LAHL; BRAUN, 1994).

O grau de hidrólise, definido como a porcentagem de ligações peptídicas rompidas durante a reação de hidrólise, é um fator fundamental que irá definir as características do produto hidrolisado. Esse, por sua vez, é dependente das condições de reação, como a concentração de substrato, a relação enzima/substrato, o tipo de enzima, o tempo de reação, temperatura, pH e outras condições físico-químicas (BENÍTEZ; IBARTZ; PAGAN; 2008). Outros fatores são a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional da proteína, que alteram a sensibilidade ao ataque proteolítico e, portanto o tipo de peptídeos formados. As proteínas do soro, tendo estrutura globular, são de difícil acesso para as enzimas, porém a desnaturação prévia (por aquecimento, por exemplo), pode melhorar a digestibilidade das proteínas do soro (BENÍTEZ, IBARTZ, PAGAN, 2008).

Hidrolisados protéicos apresentam uma vasta aplicação, como fortificação protéica em bebidas especiais, ingrediente pré-digerido para nutrição enteral ou parenteral, composto peptídico para benefícios fisiológicos, ingrediente de meio de cultura celular e componente de cosméticos e produtos para cuidados pessoais (FITZGERALD; O'CUINN, 2006). Outra razão é que em hidrolisados protéicos apresentam diversas características funcionais potencializadas, como baixa viscosidade, maior capacidade de agitação e alta solubilidade.

A elaboração de produtos hidrolisados permite a produção de um alimento capaz de ser absorvido pelo intestino, sem depender de digestão prévia no estômago. A quantidade de peptídeos bioativos gerados durante a digestão em adultos é provavelmente muito baixo para induzir efeitos significantes, especialmente para fins terapêuticos. Entretanto, peptídeos bioativos concentrados podem ser produzidos em escala comercial, por meio do uso de hidrólise enzimática e tecnologias de separação (GAUTHIER;

POULIOT; SAINT-SAUVEUR, 2006). A absorção de proteínas hidrolisadas, compostas principalmente por di e tripeptídeos, ocorre mais rapidamente que absorção de aminoácidos livres (SILK; CHUNG; BERGER, 1979), devido a um sistema específico de transporte.

Nos hidrolisados protéicos, as principais proteínas usadas são as do leite (CLEMENTE, 2000). Embora os hidrolisados sejam muito usados na nutrição clínica, como no tratamento de fenilcetonúria, alergia alimentar, doenças hepáticas (CLEMENTE, 2000), eles possuem características desejáveis para atletas que desejam maximizar o fornecimento de aminoácidos para o músculo (MANNINEN, 2004).

1.4 ATIVIDADE FÍSICA

As atividades físicas, em sua maioria, englobam elementos de força, velocidade, duração e amplitude de movimentos (BOMPA, 2001). No entanto, elas diferem em intensidade e duração, embora essas variáveis sejam inversamente dependentes (SIFF; VERKHOSHANSKY, 2004). Exercícios de alta intensidade não se prolongam por períodos longos (apenas alguns minutos) sem que haja fadiga, enquanto exercícios de baixa intensidade podem ser mantidos por horas.

Diferenças também são observadas nas vias metabólicas usadas predominantemente na geração de energia para a realização de distintos exercícios. Algumas atividades requerem o metabolismo aeróbio, outras a via anaeróbia. Existem ainda os exercícios que alternam entre ambas as vias (BOMPA, 2001). Praticada por longo período e de forma contínua, a corrida é caracterizada como atividade de resistência aeróbica. Todavia, quando a velocidade é oscilante, o metabolismo aeróbio e o anaeróbio se alternam para suprir a exigência muscular (O'BRIEN et al., 2008). A adaptação à atividade física também influencia o substrato energético a ser utilizado. Por isso um exercício de resistência, em indivíduos não treinados, causa alto consumo de glicogênio e menor oxidação dos ácidos graxos, diferente da resposta metabólica em pessoas treinadas (SPRIET, 2002).

Segundo Maughan, Gleeson e Greenhalf (2000), o corpo humano desenvolve mecanismos celulares e moleculares de adaptação aos estímulos do durante o exercício físico. Em atletas, devido à prática diária e constante de exercício físico, estes mecanismos de adaptação estão aumentados. Mudanças nos níveis de glicose plasmática, insulina e lactato muscular são algumas das alterações metabólicas geradas pelo treinamento, devido à

indução de respostas bioquímicas e fisiológicas acima dos níveis de repouso que ele causa (MANNINEN, 2004).

1.5 SUBSTRATOS ENERGÉTICOS DURANTE A ATIVIDADE FÍSICA

A atividade física impõe maior demanda de energia que o repouso. Embora o ATP (adenosina trifosfato) não seja a única molécula de transportadora de energia, ela é a mais importante (POWERS; HOWLEY, 2005). Contudo, as células musculares armazenam quantidade limitada de ATP. A contribuição relativa dos distintos sistemas de transferência de energia (vias metabólicas) difere acentuadamente na dependência da intensidade e da duração do exercício, bem como do estado específico de aptidão do organismo (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

O exercício de alta intensidade e curta duração requer um fornecimento imediato de energia, que provém quase exclusivamente dos fosfatos intramusculares de alta energia metabolizados anaerobicamente, ou fosfagênicos, ATP e fosfocreatina (PC) (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008). O sistema ATP~PC fornece uma reação simples com uma única enzima para produzir o ATP (PC e ADP, sob ação da creatina quinase, originam ATP e carbono) (POWERS; HOWLEY, 2005). No entanto, a continuidade de um exercício além de um curto período e a recuperação de um esforço máximo exigem uma fonte adicional de energia para o reabastecimento do ATP (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

A energia necessária para fosforilar o ADP durante o exercício intenso provém principalmente do glicogênio muscular (e/ou glicose), oriundo da glicólise anaeróbica, com a consequente formação de lactato. Este, todavia, é oxidado rapidamente pelas fibras musculares com uma alta capacidade oxidativa. No entanto, quando há um acúmulo do lactato sanguíneo durante o exercício, pressupõe-se que houve uma hipoxia tecidual, uma vez que a quantidade insuficiente de oxigênio que chega à cadeia respiratória leva a um excesso de íons hidrogênio, que serão acoplados ao piruvato ($\text{piruvato} + 2\text{H}^+ = \text{lactato}$) (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

As duas vias metabólicas mencionadas suprem cerca de metade da energia para o exercício intenso com duração de 2 minutos (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008). O restante da energia solicitada é fornecido pela fosforilação oxidativa, uma reação aeróbica, na qual ocorre a oxidação dos carboidratos, gorduras e proteínas (POWERS; HOWLEY, 2005).

Em exercício moderado, a energia fornecida é aproximadamente igual entre carboidratos e gorduras e, ao passar de uma hora em atividade, o catabolismo das gorduras fornece gradualmente um maior percentual de energia, que coincide com a depleção de glicogênio. Com o treinamento, a oxidação dos triacilgliceróis dentro do músculo é aprimorada, conservando assim as reservas de glicogênio (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008).

Sendo assim, o organismo utiliza três principais sistemas de geração de energia, necessária para o exercício. O primeiro é o sistema do fosfagênio que armazena a energia das ligações de alta energia do ATP e da fosfocreatina, ambos encontrados no interior das fibras musculares, sendo que esse sistema permite surtos muito intensos de energia por períodos de 10 a 15 segundos. O segundo é o sistema glicogênio-ácido láctico, que libera energia pela conversão do glicogênio em ácido láctico e pode suprir energia para a contração muscular máxima por períodos de 30 a 40 segundos. Por último, há o sistema aeróbico, em que energia é liberada pela metabolização dos carboidratos, gorduras e proteínas, com o oxigênio (GUYTON; HALL, 2006).

Embora os carboidratos e as gorduras sejam os principais geradores de energia durante o exercício, as proteínas contribuem com menos de 2% do substrato utilizado no exercício com menos de uma hora de duração (POWERS; HOWLEY, 2005). Este percentual pode atingir 5 a 15% com a prolongação do tempo de exercício (POWERS; HOWLEY, 2005).

As gorduras são substrato energético preferencial em exercícios de baixa intensidade. Com o maior tempo de exercício, o gasto energético é elevado e aumenta a mobilização lipídica, que estoca pelo menos 10 vezes mais energia que os estoques de glicogênio (este possui massa e densidade energética menor que os lipídeos) (BENEKE e BÖNING, 2008). O aumento dos níveis de adrenalina ativa lipases que degradam triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol, em um processo chamado lipólise. Como consequência, os níveis de ácidos graxos livres aumentam tanto no sangue como no músculo, o que estimula o metabolismo das gorduras. A lipólise é um processo lento, que acontece após vários minutos de exercício (POWERS; HOWLEY, 2005). O metabolismo dos ácidos graxos a partir do tecido adiposo também depende de ação hormonal, como da adrenalina, noradrenalina, glucagon e hormônio do crescimento (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008). Os estoques de gordura utilizados como fonte de combustível variam em função da intensidade e duração do exercício. Os ácidos graxos livres plasmáticos

(oriundos dos adipócitos) são a principal fonte de gordura durante o exercício de baixa intensidade. Quando a taxa de trabalho é maior, o metabolismo dos triacilgliceróis musculares também aumenta (POWERS; HOWLEY, 2005).

À medida que a intensidade do exercício aumenta, há um nível (denominado ponto de cruzamento) no qual a energia derivada dos carboidratos ultrapassa a das gorduras, fazendo com que os carboidratos sejam a fonte predominante de energia no exercício de alta intensidade. O ponto de cruzamento sinaliza que houve o recrutamento de fibras rápidas (glicolíticas) e o aumento ainda mais expressivo do nível sanguíneo de adrenalina (POWERS; HOWLEY, 2005).

1.6 AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Os aminoácidos leucina, isoleucina e valina são designados como aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, da sigla inglesa *branched-chain amino acids*). Eles compõem de 15 a 20% dos aminoácidos das proteínas do músculo e fornecem até 20% de energia para o mesmo. Esses aminoácidos são oxidados diretamente nos músculos periféricos, enquanto os demais são metabolizados no fígado. Os BCAAs atuam no ciclo da alanina-glicose, como substratos para a produção de glicose quando os estoques de glicogênio estão escassos (UCHIDA et al., 2008) e reduzem o tempo de recuperação das microlesões resultantes do esforço físico. Tanto *in vitro* como *in vivo*, o fornecimento de BCAAs para o músculo esquelético mimetiza o efeito de uma mistura completa de aminoácidos na estimulação da síntese protéica (KIMBALL; JEFFERSON, 2006). Esse estímulo, *in vivo*, ocorre por meio da ativação da etapa de ligação do mRNA, na fase de iniciação da tradução (YOSHIZAWA, 2004). O requerimento desses aminoácidos é aumentado pelo exercício (SHIMOMURA et al., 2004), e a sua suplementação é capaz de aumentar a fosforilação da p70^{S6K} no músculo, um componente da via da mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos; *mammalian target of rapamycin*), em repouso e com exercício de força (APRÓ; BLOMSTRAND, 2010). A mTOR age como regulador-chave no balanço entre a síntese e a degradação de proteínas (RAUGHT; GINGRAS; SONENBERG, 2001).

1.7 EXERCÍCIO FÍSICO E RADICAIS LIVRES

É bastante documentado na literatura que o metabolismo acelerado pelo exercício físico eleva o estresse oxidativo (URSO; CLARKSON, 2003). De dois a 5% do oxigênio que entra na mitocôndria para o metabolismo do ATP pode escapar da cadeia de transporte de elétrons, gerando intermediários instáveis, como $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$ (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). Como o exercício aumenta a frequência da fosforilação oxidativa, espera-se um aumento dos radicais livres. Outras etapas produtoras de radicais são o metabolismo da xantina oxidase e da NAD(P)H oxidase, além de vazamento de elétrons pela alteração do fluxo sanguíneo e no suprimento de oxigênio (perfusão inadequada durante o exercício) (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008). Esse aumento poderia sobrecarregar os sistemas e enzimas antioxidantes do nosso organismo. No entanto, há visões divergentes que afirmam que, durante o exercício, as defesas antioxidantes normais do organismo são adequadas ou aumentam concomitantemente (McARDLE; KATCH; KATCH, 2008). Dessa forma, não há um consenso sobre a orientação de consumo de suplementos com efeito antioxidante para praticantes de atividade física ou atletas.

1.8 AÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE NA ATIVIDADE FÍSICA

Por serem fontes dos BCAAs, as proteínas do soro de leite são bastante estudadas em relação ao seu benefício para a atividade física. Outro motivo é a possível melhora da capacidade antioxidante, como já mencionado.

A equipe do Laboratório de Fontes Protéicas vem estudando a associação entre o consumo das proteínas do soro de leite, especialmente na forma hidrolisada, e atividade física, com ou sem exaustão, em diversos parâmetros bioquímicos. A tabela 1 resume os resultados encontrados em alguns desses estudos.

Há ainda os trabalhos de Nery-Diez et al. (2010) em que também foi encontrado maior tempo até a exaustão nos animais alimentados com WPH, concordante, portanto, com Pimenta et al. (2006), e parcialmente coerente com os resultados obtidos por Bensabath (2009), uma vez que esta autora encontrou resultado positivo para o consumo de WPH apenas no primeiro teste de exaustão.

É pertinente destacar que estes estudos diferiram em alguns quesitos que podem ter acarretado em distintos resultados, como o grau de hidrólise do produto; a duração, o

período de início e a modalidade de atividade física utilizada; o tempo entre exaustão e sacrifício dos animais; e o teor protéico da dieta.

Tabela 1. Comparação do efeito do consumo de dieta formulada com isolado de proteínas de soro de leite (I), hidrolisado das proteínas do soro de leite (H) e caseína (C), com relação aos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, segundo estudos anteriores da equipe do Laboratório de Fontes Protéicas*

<i>Parâmetros</i>	<i>Tassi et al. (1998)</i>	<i>Ramos (2001)</i>	<i>Abecia-Soria (2003)</i>	<i>Pimenta et al. (2006)</i>	<i>Bensabath (2009)</i>
Tempo de exaustão	≡			H	H ¹
Insulina sérica		≡	≡		≡
Glicose sérica	H	≡		≡	≡
Glicogênio hepático	≡	≡	H		≡
Glicogênio muscular	H	IC		≡	IH
Glicogênio do miocárdio			≡		H
Ácidos graxos livres	≡	≡	≡		≡
Triacilgliceróis		≡	I		IH
Colesterol total		≡	≡		
LDL/HDL					≡
Albumina sérica	H	≡		H	≡
Proteína muscular				≡ ³	≡
Proteínas séricas totais		≡		H	≡
Lactato	C			H ³	≡ ⁴

≡ representa que não houve diferença significativa entre os grupos.

Lacuna em branco representa que não foi realizada tal análise no experimento correspondente

H, I, C: cada letra é usada para denotar a fonte protéica que apresentou o resultado considerado mais benéfico

* Abecia-Soria (2003) e Pimenta et al. (2006) não apresentaram grupo controle caseína, mas diferiram grupo treinado e grupo treinado-exausto

¹ na quarta semana, sendo igualados os tempos entre os grupos nas 8ª e 9ª semanas

² para grupo treinado (análise não foi feita no grupo treinado-exausto)

³ ao contrário do restante das análises, esse parâmetro foi medido logo após a exaustão

⁴ esse parâmetro foi medido antes da exaustão

A partir dos resultados apresentados na tabela 1, vemos que os ratos alimentados com o hidrolisado das proteínas do soro de leite apresentaram melhora no desempenho físico, como a maior resistência até chegar à exaustão, sem, no entanto, reduzir proteínas séricas e musculares e aumentar concentrações de lactato, o que lança a hipótese de que dietas elaboradas com o hidrolisado do soro de leite podem poupar a utilização das

proteínas endógenas como fonte energética, ao passo que promovem o gasto de ácidos graxos para este fim.

Ainda não está claro se há e quais são as alterações no metabolismo energético que permitem aos animais permanecerem mais tempo em exercício, porém estes dados em conjunto com os de outros pesquisadores (apresentados a frente) nos levam a testar a possibilidade de que o consumo de WPH aumente a mobilização lipídica como fonte energética e poupando a utilização das proteínas endógenas.

Alguns autores já têm procurado compreender as vias metabólicas pelas quais a proteína do soro de leite exerce benefícios junto ao exercício físico. Os autores Morifuji et al. (2005a) encontraram que a proteína do soro de leite reduziu a atividade de enzimas hepáticas lipogênicas, como glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima málica, ATP-citrato liase, acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase e diminuiu os níveis de RNAm dessas mesmas enzimas, com exceção da ácido graxo sintetase. No músculo, a proteína do soro de leite aumentou significativamente a atividade e a expressão da enzima ácido graxo sintetase. Foi sugerido pelos autores que essas mudanças podem estar relacionadas à composição aminoacídica da proteína do soro de leite, que pode estimular o acúmulo de triacilgliceróis no músculo para ser usado como fonte de energia, conservando a utilização de glicogênio muscular.

O mesmo grupo de pesquisadores (2005b) observou que a proteína do soro de leite propiciou a menor atividade das enzimas hepáticas glicose 6-fosfatase (enzima responsável pela produção de glicose livre) e a maior atividade da frutose 1,6-bifosfatase (enzima capaz de formar frutose 6-fosfato, em direção oposta à produção de energia), o que pareceu nortear o metabolismo para a síntese de glicogênio e é condizente com a maior concentração deste no tecido hepático, obtida neste estudo. Encontraram, ainda, que a proteína do soro de leite aumentou atividade e conteúdo da ALT e manteve atividade e quantidade equivalente da AST, bem como elevou os níveis de aminoácidos livres, como alanina, arginina e glicina. Estes resultados sugerem uma possível degradação de proteínas musculares visto que a alanina poderia ser desaminada para fornecer esqueletos de carbono a ser usada por via gliconeogênica.

Morifuji, Sakai e Sugiura (2005), encontraram que o consumo de proteína do soro de leite associado à atividade física aumentou as concentrações de glicogênio hepático e muscular em ratos. Observaram, também, que a atividade da enzima hepática glicoquinase foi significativamente elevada, ao contrário da atividade da piruvato quinase e da 6-

fosfofrutoquinase que foram reduzidas pela dieta contendo proteína do soro de leite, o que poderia ter conservado a utilização da glicose pela glicogenólise. Quanto às enzimas musculares, a proteína do soro de leite aumentou a atividade total da enzima glicogênio sintetase e diminuiu a atividade da 6-fosfofrutoquinase, podendo, alguma dessas vias, ter resultado no aumento do glicogênio no músculo.

Recentemente, Morifuji et al. (2009) isolaram dipeptídeos da WPH que continham aminoácidos de cadeia ramificada (Ile-Val, Leu-Val, Val-Leu, Ile-Ile, Leu-Ile, Ile-Leu ou Leu-Leu), capazes de aumentar a absorção de glicose dos músculos de ratos Wistar. Os autores concluíram que os músculos incubados com os dipeptídeos selecionados tiveram aumento no conteúdo de glicogênio e também que o WPH possui peptídeos bioativos, com capacidade de elevar os estoques de glicogênio muscular. Porém os autores não testaram os efeitos do consumo de WPH na utilização do glicogênio, seja em repouso ou exercício.

1.9 AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

Vários são os trabalhos que tratam da relação entre ação antioxidante e o consumo de proteínas do soro de leite, especialmente estudos *in vitro*. As proteínas do soro de leite estimularam a síntese de glutathione em células PC 12 (TSENG et al., 2006) e em pacientes infectados com o vírus HIV em estado avançado (MICKE, BEEH BUHL, 2002). Chitapanarux et al. (2009) demonstraram que suplementação com isolado de proteínas de soro de leite rico em cisteína reduziu a atividade da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), enquanto a glutathione plasmática e a capacidade antioxidante total foi aumentada em pacientes com esteatohepatite não-alcoólica.

Peña-Ramos, Xiong e Arteaga (2004) encontraram que o poder antioxidante de peptídeos pode ser bastante variável, dependendo da sua forma de obtenção. Em amostras de isolado da proteína do soro de leite e de seu correspondente hidrolisado, obtido em laboratório experimental, obteve-se maior diminuição de TBARS por peptídeos de maior peso molecular (> 45 kDa), enquanto em hidrolisado comercial obteve-se melhores resultados para as frações de menor peso molecular ($1.5 - 0,35$ kDa).

Peng, Xiong e Kong (2009) encontraram que os peptídeos pequenos ($0,1 - 2,8$ kDa) de um hidrolisado das proteínas do soro de leite mostraram maior ação antioxidante, quando determinado pelo método de ressonância de spin eletrônico. Hidrólises realizadas

com várias enzimas mostraram que a corolase-PP resultou em peptídeos de α -lactalbumina e β -lactoglobulina de melhor ação antioxidante (HERNANDEZ-LEDESMA et al., 2005).

Além de ricas em cisteína (HOFFMAN; FALVO, 2004), as proteínas do soro de leite podem ainda fornecer dipeptídeo γ -glutamilcisteína, que é uma fonte biológica para a síntese de glutathione celular (BOUNOUS, 2000; BOUNOUS; MOLSON, 2003), um potente agente antioxidante endógeno.

1.10 EXPRESSÃO DOS GENES PPAR α , PPAR δ , PGC 1 α , CPT 1 β E MIOSTATINA

O músculo é um sistema dinâmico que responde ao estímulo ambiental e tem a notável capacidade de se adaptar rapidamente às mudanças na demanda funcional (KOULMANN; BIGARD, 2006). A massa muscular é fortemente regulada pelo balanço entre processos catabólicos e anabólicos (AMIROUCHE et al., 2009). O músculo desempenha função essencial no metabolismo corporal, interrompendo o que precede e/ou exacerba várias doenças crônicas, como doença coronariana, hipertensão, obesidade, diabetes tipo 2, câncer, depressão, osteoporose e sarcopenia. Desse modo, exercício regular promove efeitos positivos sobre todas essas enfermidades (YAN; LI; AKIMOTO, 2007).

O treinamento *endurance* regula a expressão de vários genes por meio de vias de sinalização e regulação de metabólitos (KOULMANN; BIGARD, 2006). Além de aumentar a capacidade metabólica de oxidação de ácidos graxos e carboidratos (TUNSTALL et al., 2002), este tipo de exercício proporciona outras adaptações no músculo esquelético, como mudança de fibras rápidas para fibras lentas e aumento na biogênese de mitocôndrias, mais provável por meio de orquestrados sinais de transdução da atividade neuromuscular do maquinário gênico regulatório (YAN; LI; AKIMOTO, 2007). A expressão de gene específico para o tipo de fibra e a biogênese mitocondrial são moduladas por contração muscular acoplada por regulação de gene para garantir adequadas mudanças fenotípicas que vão de encontro à carga aumentada de trabalho. A atividade de contração aumentada elucida múltiplos sinais traduzidos por meio de vias de sinalização específicas para ativar um grande número de genes no mionúcleo. Sabendo que alterações ocorridas no metabolismo de lipídeos estão, na maior parte das vezes, relacionadas a alterações na expressão gênica das enzimas regulatórias (YAMASHITA et al., 2008), logo torna-se bastante interessante o estudo sobre o metabolismo lipídico em nível de expressão gênica associado ao exercício físico.

Os PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) são fatores de transcrição ativados por ligantes, membros de uma superfamília de receptores nucleares, que controlam o metabolismo de ácidos graxos e o *turnover* de substrato para todo o organismo (FÜRNSINN; WILLSON; BRUNMAIR, 2007). Eles atuam junto com receptores X retinóide (RXRs, do inglês *retinoid X receptor*), formando um heterodímero que se liga a elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma (PPRE, Peroxisome Proliferator Response Elements), que estão localizados nos domínios regulatórios dos genes (BERGER; AKIYAMA; MEINKE, 2005). A conformação do receptor é, então, alterada, de modo que forme interações de alta afinidade com co-ativadores, que remodelam cromatina celular e ativam o maquinário transcricional (DESERGNE; WAHL, 1999).

Primeiramente, o PPAR foi identificado em camundongos (ISSEMAN; GREEN 1990), porém, logo após, foram identificados três tipos, em sapos do gênero *Xenopus* (DREYER et al., 1992), e denominados por PPAR α (NR1C1), PPAR β (NR1C2), e PPAR γ (NR1C3). Os PPARs α e γ foram facilmente identificados em mamíferos, enquanto o PPAR β não apresentou clareza na homologia, sendo, portanto, nomeado PPAR δ , PPAR β/δ , FAAR ou NUCI. Evidências, tais como padrão de expressão e perfil de ligação farmacológica, demonstraram que as isoformas de sapos e mamíferos são homólogas (DESERGNE; WAHL, 1999). Neste trabalho, portanto, foi utilizada a designação PPAR δ , pois este foi o termo obtido na busca para as sequências de primers, em base de dados apropriada (para a realização da análise RT-PCR em tempo real).

As isoformas α e δ são relacionadas com o aumento a expressão de genes envolvidos no consumo de lipídeos, transporte lipídico entre os órgãos e metabolismo de ácidos graxos, enquanto a isoforma PPAR γ é principalmente associada como ao controle de genes envolvidos no metabolismo da glicose (KOULMANN; BIGARD, 2006). De forma semelhante, os PPARs α e δ , mas não o PPAR γ , tem papel proeminente na regulação do metabolismo lipídico cardíaco (GILDE et al., 2003). Assim, os PPARs estão envolvidos nas vias metabólicas de glicose e ácido graxo e, por esta razão, envolvidos indiretamente na razão de utilização de substrato (KOULMANN; BIGARD, 2006).

A ativação da isoforma PPAR α está associada com elevada expressão de genes envolvidos em todos os níveis de utilização de ácidos graxos, incluindo a quebra das partículas de triacilgliceróis (TAG) para ácidos graxos livres pela lipase lipoprotéica (LPL), o transporte de ácidos graxos livres para dentro da célula pelas proteínas transportadoras de

ácido graxo (FATPs) e a β -oxidação peroxissomal e mitocondrial pela ativação de acil CoA oxidase (ACO) e a acil CoA descarboxilase de cadeia média (MCAD) (PERREAULT; ERBE; TOBIN, 2008). Nesse contexto, os fibratos, ácidos carboxílicos anfipáticos agonistas PPAR α , são usados no tratamento de hipertrigliceridemia (BERGER; MOLLER, 2002), pois diminuem os níveis de TAG em roedores e humanos pela depleção do *pool* de ácidos graxos livres por meio da β -oxidação peroxissomal e mitocondrial.

Em miócitos e adipócitos, PPAR δ estimula a β -oxidação (Figura 1) e utilização de triacilgliceróis, por meio de duas vias: oxidação de ácidos graxos e desacoplamento energético (WANG et al., 2003), sem estar envolvido em lipogênese e estoque, função dos genes controlados por PPAR γ . Wang et al. (2004) propuseram que o gene PPAR δ é o primeiro fator de transcrição capaz de orientar a formação de fibras para o tipo 1 (também conhecida como oxidativa, vermelha ou lenta) e sua ativação pode estar relacionada a melhora da performance física e resistência à obesidade. Estes autores também mostraram que a expressão deste gene produz profunda e coordenada aumento nas enzimas de oxidação e na biogênese mitocondrial. Esse gene pode participar na regulação de mudanças pós-exercício no metabolismo lipídico, bem como no aumento pós-treino da capacidade mitocondrial e dependência de oxidação de gordura durante o exercício (MAHONEY et al., 2005).

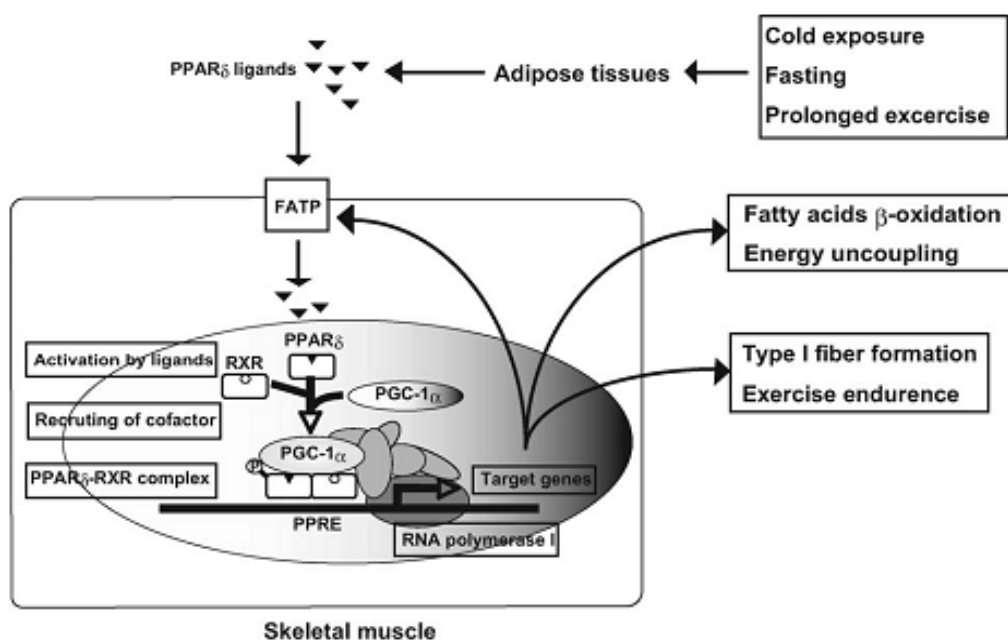


Figura 1. Modelo de ativação do gene PPAR δ (TAKAHASHI et al., 2006)

A expressão do gene PGC 1 α (coativador 1 alfa dos receptores ativados por proliferadores do peroxissoma, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α*) é considerado como uma medida da capacidade oxidativa, uma vez que este gene constitui parte de uma família central dos co-ativadores transcricionais e apresenta ligação direta com PPAR α e PPAR δ , pois estes possuem em sua estrutura conformacional um sítio de ligação ativo para a ação coadjuvante de PGC 1 α (CARNEVALI JUNIOR; LIMA, 2009). Este gene foi primeiramente descoberto como um co-ativador transcricional induzido pela exposição ao frio (PUIGSERVER et al., 2001) que se liga ao PPAR γ . Ele não se liga diretamente ao DNA, mas interage com fatores de transcrição específicos, os quais já estão ligados à região promotora dos genes alvo (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003). O PGC 1 α está envolvido com funções fisiológicas múltiplas, como termogênese adaptativa, oxidação de ácidos graxos, gliconeogênese e biogênese mitocondrial, sendo pivô na adaptação muscular (YAN; LI; AKIMOTO, 2007) e sua expressão aumentada é crítica para a ativação de genes relacionados ao metabolismo oxidativo do músculo esquelético (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003). Goto et al. (2000) demonstraram que este gene também tem sua expressão aumentada pelo treinamento físico de baixa intensidade.

A enzima carnitina palmitoil transferase I (CPT 1) é responsável por uma etapa considerada limitante no transporte de ácidos graxos para mitocôndria, portanto, para a realização da β -oxidação. Ela está localizada na membrana externa da mitocôndria e catalisa a conversão de acil-CoA para acilcarnitina, que é, então, transportada através da membrana interna (BERTHON et al., 1998).

A miostatina, também conhecida por fator de crescimento e diferenciação 8, é um membro da família TGF (*transforming growth factor*) que atua como regulador negativo da massa muscular (AMIROUCHE et al., 2009) e é essencial na regulação do crescimento muscular (McPHERRON; LAWLER; LEE, 1997). Ela inibe tanto a proliferação como a diferenciação das células satélites (RENNIE; WACKERHAGE; SPANGENBU, 2004). A expressão aumentada *in vivo* desse gene induz à diminuição da massa muscular e conteúdo protéico (DURIEUX et al., 2007). Camundongos *knockout* no gene de miostatina apresentam grande aumento na massa muscular, podendo elevar o peso muscular em duas vezes ou mais, devido à combinação de hipertrofia e hiperplasia muscular (LEE; MCPHERRON, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o resultado do consumo das proteínas do soro de leite hidrolisadas é capaz de promover a maior utilização de lipídeos como fonte energética durante a atividade física, poupando as proteínas endógenas e alterando o estado redox.

2.2 ESPECÍFICOS

- Aferir parâmetros do metabolismo lipídico:
 - Expressão dos genes PPAR α , PPAR δ ; PGC 1 α e CPT 1 β ;
 - Concentrações séricas de NEFA e TAG;
 - Aferir a massa do tecido adiposo intraperitoneal e epididimal;
- Dosar parâmetros do metabolismo protéico:
 - Concentrações séricas de creatinina, albumina, ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase);
 - Níveis de aminoácidos livres séricos e musculares;
 - Expressão gênica de miostatina;
- Determinar parâmetros de ação antioxidante:
 - Níveis de glutathione reduzida em eritrócitos e de ácido úrico sérico
 - *In vitro* (ORAC) dos produtos de soro de leite (fontes protéicas);
- Avaliar parâmetros complementares:
 - Determinar a composição centesimal da dieta;
 - Acompanhar a ingestão alimentar e o crescimento dos ratos;
 - Determinar o tempo de exaustão;
 - Dosar lactato plasmático pós-exaustão;
 - Determinar a temperatura muscular;
 - Dosar a concentração de corticosterona.

3 MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo de experimentação animal foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Instituto de Biologia/Unicamp), sob o nº 2079-1 (Anexo 1).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 84 ratos machos da linhagem Wistar *specific pathogen free* (SPF) (Figura 2), recém-desmamados (21 dias), procedentes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em condições padrão de experimentação, com controle de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade do ar (50-60%), ciclo claro/escuro invertido (12 horas), gaiolas individuais e água e ração *ad libitum*.

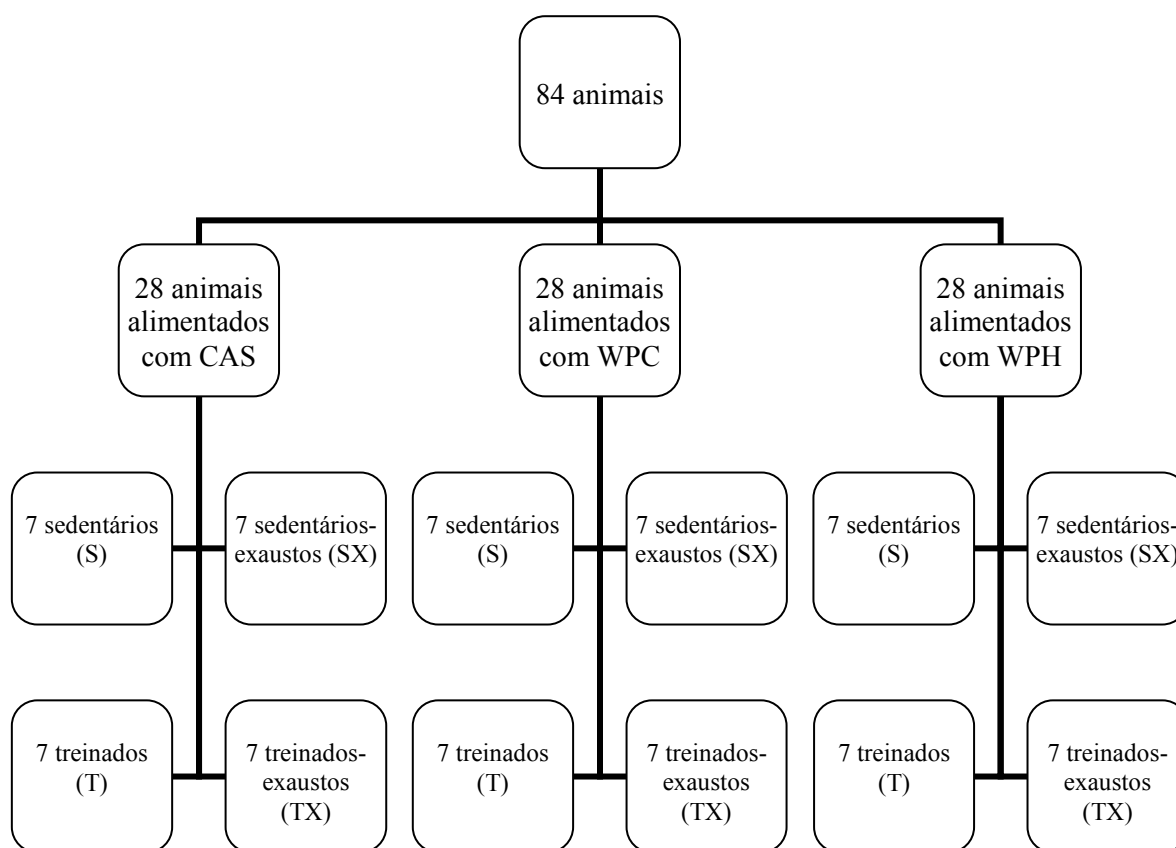


Figura 2. Esquema de divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física. CAS: caseína; WPC: concentrado do soro de leite; WPH: hidrolisado do soro de leite.

3.3 DIETAS

Durante a etapa de crescimento (Tabela 2), os animais foram alimentados com dieta comercial para roedores (Labina, Purina, Brasil). A dieta experimental foi formulada a partir da AIN 93-G (*American Institute of Nutrition*; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) modificada em sua fonte protéica para o hidrolisado do soro de leite (Hilmar™ 8350, Hilmar Ingredients, EUA), sendo seu controle a dieta contendo concentrado do soro de leite (Hilmar™ 8000, Hilmar Ingredients, EUA), e tendo a dieta AIN 93-G como dieta padrão de referência (caseína, *mesh* 30, Conaprole, Uruguai). Todas as dietas tiveram seu teor protéico igual a 12 % (GOENA et al., 1989).

3.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO E DESENHO EXPERIMENTAL

O treinamento escolhido foi corrida em esteira sem inclinação, sendo seguido o protocolo de treinamento sugerido por Hohl et al. (2009), por duas semanas. Este tipo de exercício foi escolhido por ser o mais comumente usado em experimentos (NIKOLAIDIS; JAMURTAS, 2009), o que possibilita a comparação com abrangente literatura. O desenho experimental é mostrado na tabela 2. Os animais passaram por dois testes de aptidão para a seleção dos animais treinados (corrida voluntária). Os animais sedentários foram sujeitos a atividade física duas vezes por semana, a $12 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$, durante 10 min, para evitar possíveis alterações das respostas metabólicas, oriundas de situações de estresse, como na manipulação do animal e na exposição à esteira.

Tabela 2. Desenho experimental

Semanas	Fases do experimento	Dieta	Velocidade (m/min)	Tempo (min)
1 ^a à 3 ^a	Crescimento	Comercial	-	-
4 ^a	Teste de aptidão e adaptação ao exercício	Comercial	-	-
5 ^a	Adaptação ao exercício e à dieta	Experimental/ Controle/Padrão	-	-
6 ^a	Treinamento experimental	Experimental/ Controle/Padrão	15	20
7 ^a	Treinamento experimental	Experimental/ Controle/Padrão	20	30

O treinamento experimental foi realizado 5 vezes \cdot semana⁻¹ (dias de recuperação intercalados), no período vespertino e em sala adaptada para o escuro.

Um dia depois de finalizado o protocolo experimental dos animais sedentários e treinados, os ratos destinados à exaustão iniciaram a corrida à $12 \cdot \text{min}^{-1}$. A velocidade foi aumentada $1 \cdot \text{min}^{-1}$ a cada 2 min, até atingir $20 \cdot \text{min}^{-1}$. Após, a velocidade foi elevada em $2 \cdot \text{min}^{-1}$ a cada 3 min até a exaustão, definida como momento no qual os animais tocassem no choque 5 vezes em 1 min (HOHL et al., 2009). Os tempos foram anotados para posterior comparação.

Os animais treinados e os levados à exaustão foram sacrificados por decapitação, em seguida ao último treinamento ou à exaustão. Os animais sedentários foram sacrificados 48 horas após a última prática física. Foram coletados sangue, músculos *gastrocnemius* (direito e esquerdo), tecido adiposo epididimal e peritoneal, o qual foi determinada a massa.

3.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS

Amostras da ração tiveram sua composição determinada por análises de sólidos totais e umidade, proteína pelo método de Kjeldahl (WILLIAMS, 1973), lipídeos pelo método de Bligh e Dyer (1959), cinzas pela AOAC (1995), e carboidratos por diferença.

3.6 ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO PONDERAL E DA INGESTÃO ALIMENTAR

Os animais foram pesados no 4º e 7º dias de cada semana, durante a alimentação com dieta comercial. Após a inserção da dieta experimental, os animais foram pesados três vezes por semana, para o acompanhamento do ganho de peso. O mesmo ocorreu com o controle da ingestão alimentar, realizado por meio pesagem da dieta exposta, sua sobra e subseqüentes reposições. Para o cálculo do consumo e ganho de peso diários, fez-se o ajuste para um dia a mais para os animais exauridos, uma vez que a exaustão foi uma etapa adicional ao final do protocolo experimental.

3.7 DOSAGEM DE LACTATO

Na determinação do lactato sanguíneo foram utilizados as tiras BM-Lactate (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e o lactímetro Accusport (Böehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Alemanha).

3.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA MUSCULAR

A medição da temperatura muscular foi realizada do músculo *gastrocnemius* esquerdo, por meio da utilização de um termômetro modelo DT-650 (Dellt, - 50°C a 280°C, Brasil), diretamente em contato com o músculo até alcançar estabilidade (aprox. 5 segundos).

3.9 DOSAGEM DOS PARÂMETROS SÉRICOS

Kits comerciais (Laborlab Ltda, Brasil) foram utilizados na determinação dos níveis séricos de ácido úrico (CAT nº 00100), creatinina (CAT nº 01600), AST (aspartato aminotransferase, CAT nº 00300), ALT (alanina aminotransferase, CAT nº 00200), triacilgliceróis (CAT nº 02700) e albumina (CAT nº 03900). Os ácidos graxos livres foram dosados pelo kit comercial da Wako Chemicals (Neuss, Alemanha). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (DU® 640, Beckman Coulter, USA). A dosagem de corticosterona sérica foi realizada usando kit de imunoensaio competitivo (nº 900-097, Assay Designs, USA). A leitura foi realizada em leitor de placas Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, EUA).

3.10 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS MUSCULARES E SÉRICOS

As determinações de aminoácidos livres séricos e musculares seguiram o método proposto por White, Hart e Fry (1986) adaptado. O equipamento utilizado foi um HPLC da Thermo Fisher Scientific Inc. com os módulos: degassificador SPECTRA SYSTEM (Thermo Separation Products), módulo de bomba quaternária SPECTRA SYSTEM P4000 (Thermo Separation Products), válvula de injeção Rheodyne, Forno THERMASPHERE TS-130 HPLC (PHENOMENEX - USA Torrance, CA.), módulo de detecção UV SPECTRA SYSTEM UV 2000 (Thermo Separation Products), coluna LUNA C18 100 Å 5u, 250 x 4.6mm 00G-4252-EQ (PHENOMENEX - USA Torrance, CA.), todos módulos são Thermo Fisher Scientific Inc. 81 Wyman Street Waltham, MA 02454.

Para amostras de soro, foram pesados 100 µL de soro em um tubo tipo eppendorf de 1,5mL e adicionado 100 µL do padrão B1 com micro-seringa. Adicionou-se, também, 800 µL de metanol 99% e agitou-se em vortex por 30 segundos. Para amostras de músculo

(*gastrocnemius* direito), foram pesados 100 µg das amostras e, após adição do padrão B1 (mesma quantidade), adicionou-se 800 µL de TCA a 5%, seguido de agitação em vórtex (mesma duração).

Com as amostras devidamente dissolvidas/diluídas, estas foram centrifugadas a 19000 g por 15min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm. Alíquotas de 40 µL do filtrado foram transferidas para um tubo de vidro de 8 X 50 mm, a fim de proceder a derivatização.

O tubo foi colocado no vial de secagem e secado na estação de vácuo, até 70 militorr. Após a retirada do tubo do vial de secagem, 20 µL de solução de ressecagem foram adicionados e, então, homogeneizados em vortex por 15 segundos. A etapa de secagem foi repetida. Depois da retirada do tubo do vial de secagem, 20 µL de solução derivatizante com PITC foram adicionados, seguida de agitação em vortex. As amostras foram mantidas em repouso por 20 minutos e, em seguida, novamente sujeitas à secagem.

Após a amostra seca e derivatizada, 500 µL do diluente foi transferido para o tubo, este que foi vedado com três camadas de teflon e deixado no ultra-som por 10 min. Prosseguiu-se com homogeneização do conteúdo em vortex por 30 segundos. O conteúdo foi, então, transferido para um eppendorf de 0,5 mL e centrifugado por 2 min a 13000 rpm, sendo, após, injetado no cromatógrafo equipado com coluna Luna C18 Phenomenex (100Å 5u 250x4.6mm 00G-4252-EQ; EUA).

3.11 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA

Foi dosada a concentração de glutathiona reduzida em eritrócitos pelo método de Beutler (1986), modificado por Penna (1995). Para a realização da análise, foi coletado 1 mL de sangue em tubo contendo o anticoagulante EDTA e, com a mesma amostra, foi determinado o microhematócrito (centrifugação em tubos capilares) (VALLADA, 1998). O sangue (0,2 mL) foi adicionado de 1,8 mL de água ultra pura gelada. Em seguida, 2 mL de ácido metafosfórico foram adicionados e fez-se homogeneização por inversão. Após cinco minutos em temperatura ambiente, a amostra precipitada foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1. Alíquotas de 1 mL do filtrado tiveram 4 mL de Na₂HPO₄ acrescidas. Após, 2 alíquotas de 1 mL deste preparado foram colocadas em cuveta, sendo uma delas adicionada de 100 µL de DTNB. O branco, utilizado para zerar o equipamento, foi preparado com 0,5 mL de solução de ácido metafosfórico e 1,25mL de água ultra pura. Da

mesma maneira que as amostras, 1 mL desta solução foi adicionada de 4 mL de Na_2HPO_4 e uma das alíquotas de 1 mL recebeu 100 μL de DTNB. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (DU® 640, Beckman Coulter, USA) em comprimento de onda de 412 nm.

3.12 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* ORAC

Utilizou-se o método ORAC proposto por Wong, Cao e Prior (1996), para a medição da capacidade antioxidante hidrofílica das proteínas do soro de leite hidrolisada *in vitro*. Foi seguido o protocolo sugerido por Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), modificado por Dávalos, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2004). O padrão Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma-Alcrich Co®, St. Louis, MO, USA) foi diluído em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7.4 (Synth, Diadema, Brasil) a 100 μM e em diferentes concentrações, para a curva padrão do ensaio. A solução de fluoresceína (Synth, Diadema, Brasil) foi preparada com o mesmo tampão fosfato, na concentração de 0,00378 mg/mL e foi mantida em frasco âmbar e ao abrigo da luz até o momento de uso. O AAPH (2,2'- azobis (2'-amidinopropano) dihidrocloreto) (Sigma-Alcrich Co®, St. Louis, MO, USA), foi ressuspendido em água estéril momentos antes do início da leitura da microplaca. A amostra foi elaborada com tampão fosfato 75 mM (pH 7.4), em concentração 1 mg/mL. Os padrões utilizados foram a proteína do soro de leite concentrada, α -lactalbumina, β -lactoglobulina, albumina sérica bovina (BSA), todos estes nas mesmas condições que a amostra. Utilizou-se também como padrão uma solução de ácido ascórbico a 25 μM . O branco foi elaborado com a adição de tampão. A leitura de uma solução de ácido gálico a 10 μM foi usada para controle de qualidade da reação. Amostras/padrões foram preparadas com tampão fosfato 75 mM, pH 7.4 e em triplicatas. Amostras/padrões (20 μL), fluoresceína (120 μL , 70 nM) e AAPH (60 μL , 12mM), em volume final de reação foi 200 μL , foram colocados rapidamente na microplacas de poliestireno, específicas para reações de fluorescência (Corning Co®, NC, USA) e, em seguida, iniciada a verificação da intensidade da fluorescência (485nm_{Ex}/ 520nm_{Em}) a cada um minuto, durante 80 minutos. As leituras foram feitas em leitor de microplacas NOVOstar (BMG Labtech®, Offenburg, Germany), acompanhado com o Software de análise de dados *MARS Data Analysis* versão 1.3 (BMG Labtech®, Offenburg, Germany), sendo os resultados exportados para programa Excel, para a efetuação dos cálculos. O

cálculo da curva de decaimento da fluorescência ou área sob a curva (AUC) foi realizada com o auxílio da seguinte fórmula:

$$AUC = 1 + f_i/f_0 + \dots f_i/f_0 + \dots f_{80}/f_0$$

onde, o f_0 é representado pela fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida nos tempos intermediários entre 0 e 80 minutos. Em seguida, as curvas foram normalizadas com o valor de branco.

Os resultados são expressos em μ moles equivalentes de Trolox, utilizando-se a curva padrão de Trolox, realizada em cada ensaio, nas condições apropriadas de ensaio. As leituras serão realizadas em triplicata e os valores expressos em μ M equivalentes de Trolox/mg de amostra, em base seca.

3.13 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES CPT 1 β , PGC 1 α , PPAR α , PPAR δ E MIOSTATINA

A expressão de genes foi avaliada por Real Time RT-PCR quantitativo (HEID et al., 1996; GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996), no músculo *gastrocnemius* esquerdo.

3.13.1 Extração de mRNA

O RNA total foi extraído do músculo *gastrocnemius* esquerdo, por meio da adição de 1,0 ml de reagente TRIzol (Invitrogen, SP, Brasil). As células foram homogenizadas em vortex e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em cada amostra, 300 μ L de clorofórmio foram adicionados e as amostras vigorosamente homogeneizadas durante 15 s. Após incubação de 5 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g \times 15 min a 4 °C. O volume correspondente à fase aquosa foi transferido para outro tubo e o RNA precipitado através da adição de 500 μ L de isopropanol, seguido de 10 min de incubação à temperatura ambiente. Nova centrifugação a 12.000 g \times 10 min a 4 °C foi realizada e os pellets obtidos foram lavados em seguida com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 7500 g \times 10 min a 4 °C e, posteriormente, lavados com 1 mL de etanol 100%, seguida de nova centrifugação (mesmas condições). O etanol foi descartado e o *pellet* parcialmente seco à temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em água previamente tratada com DEPC. A integridade do RNA obtido foi verificada por eletroforese em gel de agarose desnaturante, para visualização das unidades ribossomais 28,

19 e 5S após coloração com brometo de etídeo, e a quantificação realizada através de leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm em aparelho Genequant (Pharmacia Biotech).

3.13.2 Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada a 25 °C durante 10 min, seguida de 120 min a 37 °C, 5s a 85 °C e resfriamento, em 20 µL de uma mistura contendo 3 µg de RNA total + 10mM de dNTP mix + 40 U/µl de inibidor de Rnase + 0,1M de DTT + 5X first-strand buffer + 0,5 µg/ml de oligo dT + 200 U da enzima MultiScribe™ Reverse transcriptase (Applied Biosystems).

3.13.3 Real Time RT-PCR

Foi realizado pelo método Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sendo o SYBR Green um fluoróforo capaz de se ligar na dupla fita do DNA. As reações foram realizadas no termociclador StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o sistema de detecção DNA Engine Opticon™ (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf, Germany).

O volume total a ser utilizado nas reações foi de 15 µL. Primeiramente as amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos e em seguida passaram por 40 ciclos de PCR. Cada ciclo compreendeu as seguintes etapas em sequência: *melting* a 94°C por 30 s, anelamento a 57°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s. Os parâmetros ideais para cada reação foram definidos empiricamente, e a pureza dos produtos de amplificação foi determinada pelas *melting curves*. A expressão gênica foi normalizada pelos valores do gene controle GAPDH. Primers disponíveis na literatura científica foram testados e as melhores sequências foram pré-selecionadas. Análises das sequências e adaptações foram realizadas por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para identificação de sequência genômica no GenBank da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI/USA). A sequência utilizada para cada gene é listada na tabela 3.

Tabela 3. Código de acesso e sequência dos primers para os genes estudados

Genes	Acesso GenBank	Sequência (5' - 3')
PPAR α	NM_013196.1	Fw: TCCGTGGAGACCGTCACCGA Rv: TGAAGCCATTGCCGTACGCGA
PPAR δ	NM_013141.2	Fw: CGGGGTTATGCGTGTGGGACTC Rv: TGGAAGGAAGGGTGTGCTCTGGT
PGC 1 α	NM_031347.1	Fw: ACCGCAGTCGCAACATGCTCA Rv: AGTCGTGGGAGGAGTTAGGCCT
CPT 1 β	NM_013200.1	Fw: TGGTGCTGAAGTCATGGTGGGC Rv: CGTGCTGCTTGTTGGCTCGT
Miostatina	NM_019151.1	Fw: ACAGACACACCCAAGAGGTCCCCG Rv: GACAGCACCGCGATTCCGT
GAPDH	XR_009170.1	Fw: GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG Rv: AACCTGGTCCTCAGTGTAGCCC

PPAR α - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (*peroxisome proliferator-activated receptors alpha*); PPAR δ receptores ativados por proliferadores de peroxissoma delta (*peroxisome proliferator-activated receptors delta*); PGC 1 α ou P γ C1 - coativador do PPAR gama (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator*); CPT 1 β – carnitina palmitoil transferase 1 beta (*Carnitine palmitoyltransferase 1 beta*); GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Fw, *forward* (sense) primer; Rv, *reverse* (antisense) primer.

3.14 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Foi utilizado o software SPSS 11.0 *for Windows* para análise de variância – ANOVA multivariada de duas vias, considerando-se a interação entre a dieta e o condicionamento físico, e utilizando 5% para significância ($p < 0,05$) com teste *post hoc* de Duncan.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS

Os resultados da determinação da composição centesimal das dietas são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Composição centesimal das dietas elaboradas (%)

	Dietas		
	CAS	WPC	WPH
Proteína	12,6 ± 0,1	12,5 ± 0,3	12,5 ± 0,2
Lípídeos	6,0 ± 0,3	7,6 ± 0,5	7,6 ± 0,1
Umidade	7,7 ± 0,0	7,4 ± 0,0	7,4 ± 0,1
Cinzas	2,2 ± 0,0	2,5 ± 0,0	3,2 ± 0,0
Carboidratos	71,4 ± 0,2	70,0 ± 0,2	69,3 ± 0,2

Os dados são apresentados em porcentagem ± erro padrão.

As dietas continham equivalentes teores de proteínas, sendo, portanto, consideradas isoprotéicas por alcançarem igualmente os 12% propostos por Goena et al. (1989). Os demais nutrientes apresentaram pequenas variações em suas porcentagens. A análise da composição centesimal das fontes de proteínas do soro de leite também foi realizada, sendo obtidos teores de 77% e 75% de proteína para os produtos concentrado (WPC) e o hidrolisado (WPH), respectivamente.

4.2 ACOMPANHAMENTO DA EVOLUÇÃO PONDERAL E DA INGESTÃO ALIMENTAR

O consumo diário dessas dietas não diferiu estatisticamente, seja em relação à diferente fonte protéica ou ao condicionamento físico, conforme dados apresentados na tabela 5. Esse resultado corrobora com o encontrado por Pimenta et al. (2006) que estudaram o efeito do consumo de proteínas do soro de leite na forma isolada (WPI) e WPH, em animais treinados ou não. O mesmo resultado foi encontrado por Tassi, Amaya-Farfán e

Azevedo (1998), em experimento fornecendo α -lactalbumina hidrolisada a animais exercitados com natação ou sedentários. Morifuji et al. (2005a) e Morifuji et al. (2005b) também não observaram diferenças oriundas do exercício ou das dietas, embora não detalhem o tipo de proteínas do soro utilizado. Resultado idêntico foi observado por Haraguchi et al. (2011).

Tabela 5. Consumo de dieta e ganho de peso diários

	Grupos de atividade física			
	S	SX	T	TX
Consumo diário (g)				
CAS	22,0 \pm 0,5	21,6 \pm 0,4	22,5 \pm 0,7	21,8 \pm 0,5
WPC	21,0 \pm 0,5	22,1 \pm 0,7	19,3 \pm 0,3	21,2 \pm 1,0
WPH	22,3 \pm 0,6	21,2 \pm 0,5	21,6 \pm 0,8	22,6 \pm 0,3
Ganho de peso diário (g)				
CAS	4,8 \pm 0,2 ^a	4,1 \pm 0,2 ^{ab}	4,7 \pm 0,1 ^{ab}	4,1 \pm 0,3 ^b
WPC	4,5 \pm 0,2 ^a	4,6 \pm 0,4 ^{ab}	3,9 \pm 0,2 ^{ab}	3,7 \pm 0,4 ^b
WPH	4,5 \pm 0,4 ^a	4,0 \pm 0,2 ^{ab}	3,9 \pm 0,3 ^{ab}	3,9 \pm 0,2 ^b

Valores médios \pm erro padrão (n = 6-7). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Abecia-Soria (2010) encontrou consumo significativamente maior para os animais alimentados com caseína nos grupos sedentários, sedentários-exaustos e treinados. No entanto, não houve diferença entre os grupos alimentados com WPI ou WPH. Apenas na dieta com WPH foi obtida diferença estatística entre as distintas condições físicas, sendo que os grupos sedentários-exaustos e treinados apresentaram um consumo menor que os demais.

Resultado similar foi encontrado por Costa (2010), em trabalho no qual o consumo foi significativamente maior para o grupo sedentário, alimentado com caseína. Morifuji, Sakai e Sugiura (2005) obtiveram resultados semelhantes, comparando animais sedentários alimentados com caseína e animais treinados alimentados com caseína, proteínas do soro de leite e soja.

Tratando-se das proteínas do soro de leite, Hall et al. (2003) mostrou que elas são capazes de aumentar o tempo de saciedade, em relação à caseína. Os autores justificam seus resultados pela elevação dos aminoácidos plasmáticos pós-prandial, juntamente com o aumento da colescistoquinina e GLP-1 séricas proporcionados pelo consumo desse tipo de

proteína. Zhou et al. (2011) também encontrou menor ingestão de dieta para animais alimentados com proteínas do soro de leite, em comparação dieta com base em albumina, além de um GLP-1 significativamente maior.

Quanto ao ganho de peso diário dos animais, não houve diferença estatística entre as distintas dietas, conforme dados apresentados na tabela 5. Esse resultado confirma os dados de Pimenta et al. (2006), Costa (2010), e Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998). Morifuji, Sakai e Sugiura (2005) encontraram ganhos de peso idênticos quando compararam animais sedentários alimentados com dieta elaborada com caseína e animais treinados consumindo dietas com caseína, proteínas do soro de leite e soja.

O treinamento físico foi capaz de reduzir o peso corporal dos animais. Esse resultado é coerente com Morifuji et al. (2005a e 2005b), além de que já é bastante documentado em literatura a capacidade do treinamento físico em prevenir o ganho de peso pelo aumento do gasto calórico oriundo do exercício.

Considerando-se o fato de que o teste de exaustão foi uma etapa adicional ao final do protocolo experimental (um dia a mais para os animais levados à exaustão), foi possível reorganizar os dados unindo animais sedentários com sedentários-exaustos e treinados com treinados-exaustos de cada dieta. Estes dados são apresentados na forma evolução ponderal, na figura 3.

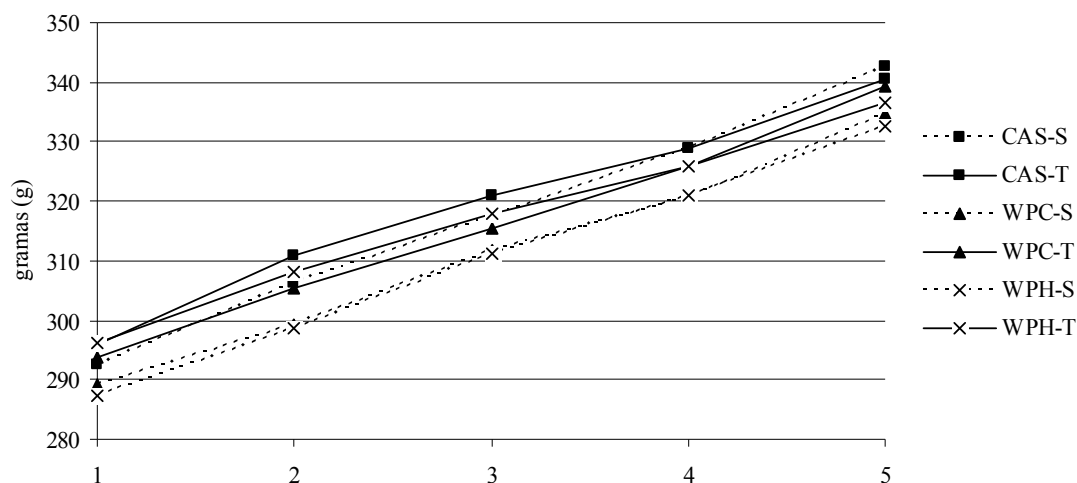


Figura 3. Médias dos pesos (em gramas) durante o período experimental (n = 6-7). S = sedentários; T = treinados; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada uma via com post hoc Duncan

Observa-se que os animais alimentados com proteínas do soro de leite, hidrolisada ou não, apresentam pesos mais baixos desde o início até o fim da etapa experimental,

embora não estatisticamente significativo. Já os animais treinados alimentados com essas mesmas fontes protéicas iniciam o período experimental com peso similar ao dos animais alimentados com caseína (S e T), mas, ao final do experimento, encontram-se em pesos menores que os alimentados com caseína. Sendo assim, retoma-se novamente o argumento de que um período experimental mais longo pode resultar em diferenças expressivas, como no trabalho de Abecia-Soria (2010), em que a caseína proporcionou maior ganho de peso que as dietas com WPI e WPH. No mesmo trabalho, os animais alimentados com WPI apresentaram menores pesos, com significância estatística, também em relação aos animais alimentados com WPH. A suplementação de proteínas do soro de leite associada à dieta rica em lipídeos propiciou menor ganho de peso em camundongos fêmeas C57BL/6J (SHERTZER et al., 2011). Esse resultado é similar ao de Elia et al. (2006), quando a suplementação de proteína do soro de leite foi associada com a de proteína da soja. Zhou et al. (2011) também encontraram menor ganho de peso e menor acúmulo de gordura abdominal em ratos alimentados com proteínas do soro de leite.

Pilvi et al. (2009) testaram diferentes frações das proteínas do soro de leite, como α -lactalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina, além do produto na forma de WPI, na perda de peso em camundongos modelos em obesidade com dieta rica em gordura. Os animais alimentados com lactoferrina e α -lactalbumina apresentaram significativamente menor gordura corporal do que animais com o WPI, além de que o primeiro grupo perdeu mais peso que o último, de forma significativa. No entanto, após a restrição alimentar, apenas α -lactalbumina reduziu significativamente o acúmulo de gordura. É sabido que a leucina apresenta efeito sacietógeno (LAVIANO et al., 2006). No entanto, os autores do trabalho mencionado questionam a justificativa de que os efeitos saudáveis das proteínas do soro de leite sejam oriundos da leucina ou outro aminoácido de cadeia ramificada, uma vez que as maiores quantidades de leucina estavam presentes no WPI e na β -lactoglobulina, e propõem que a glicina possa ser um aminoácido de importância no processo de menor ganho de peso. Royle et al. (2008) também encontraram menor ganho de peso para animais alimentados com WPI, em comparação à caseína, e acrescentam que os glicomacropéptídeos presentes nas proteínas do soro de leite também podem estar envolvidos nesse processo.

Há, contudo, trabalhos que não demonstram menores ganhos de peso em animais alimentados com proteínas do soro de leite. Eller et al. (2010), utilizou dieta rica em gordura e carboidratos, com diferentes teores de cálcio e observou que a dieta à base de

proteínas do soro de leite produziu efeitos similares à dieta com caseína. Resultado similar foi obtido por Haraguchi et al. (2011).

4.3 TESTE DE EXAUSTÃO

Como esperado, o tempo até exaustão foi significativamente maior para os animais treinados-exaustos (TX), conforme dados disponíveis na figura 4. Os animais TX mantiveram a corrida por cerca de 765 segundos (13 minutos) a mais que os animais sedentários-exaustos (SX). Considerando que o teste de exaustão baseia-se em velocidades crescentes, os animais TX correram cerca de 530 metros, em média, a mais que SX. No entanto, não houve diferenças entre si para as dietas, como encontrado também por Costa (2010) e Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998).

Esses resultados diferem dos obtidos por Nery-Diez et al. (2010), nos quais os animais alimentados com WPH alcançaram tempos significativamente maiores que os animais alimentados com WPI (18 % para SX e 31 % para TX) e com caseína (60 % para SX e 55% para TX). O grupo em dieta com WPI também manteve tempos significativamente maiores que os grupos alimentados com caseína (52 % para SX e 35% para TX). Resultados também bastante marcantes foram encontrados por Pimenta et al. (2006). Neste trabalho foi observado um tempo aproximadamente 60% maior no período até a exaustão, alcançado pelos animais alimentados com WPH, em comparação aos alimentados com WPI (nesse estudo não foi realizada a comparação com a caseína).

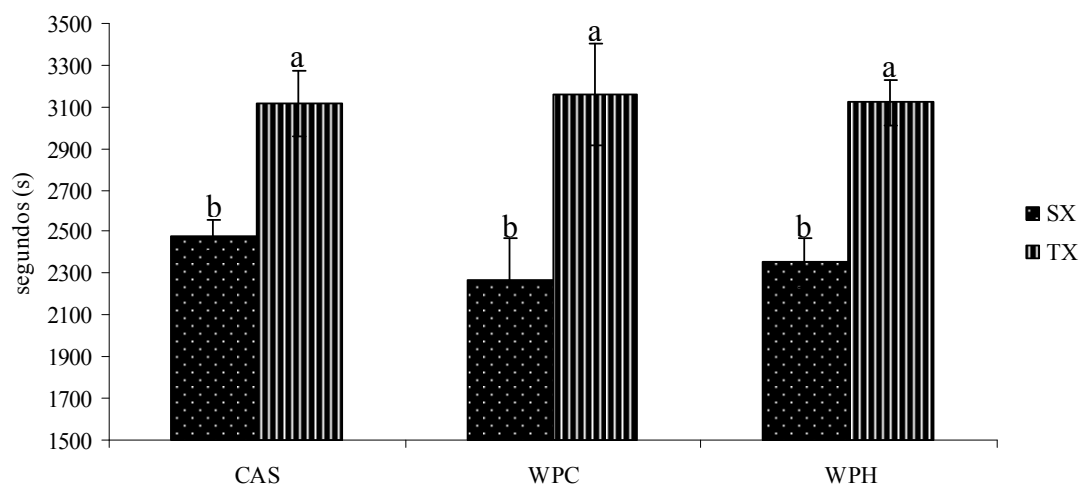


Figura 4. Médias dos tempos de exaustão \pm erro padrão ($n = 6-7$). SX = sedentários-exaustos; TX = treinados-exaustos. Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas. ANOVA multivariada em duas vias com *post hoc* Duncan.

Bensabath (2009) também encontrou um tempo significativamente superior para os animais alimentados com WPH, sendo 23% maior do que o grupo alimentado com WPI e 18% maior do que o do grupo alimentado com caseína na 8ª semana (não houve diferenças nas 12ª e 13ª semanas). Foi observada alguma resistência de certos animais do grupo alimentado com WPH a aceitar o exercício diariamente.

Uma possível explicação para essa divergência de resultados, como mostrado anteriormente é a diferença no grau de hidrólise do produto utilizado na confecção da dieta. Este parâmetro determina o tamanho e, por consequência, o tipo dos peptídeos que compõem WPH, que são diferentes para processamentos distintos dados a uma proteína. A proteína utilizada por Pimenta et al. (2006) apresentava grau de hidrólise de 7,8 %, enquanto Nery-Diez et al. (2010) usavam uma fonte protéica hidrolisada com cerca de 10 % de grau de hidrólise, ambos considerados valores médios. O produto WPH utilizado no experimento de Bensabath (2009) e Costa (2010) possuía 12,5 % de grau de hidrólise (informado pelo fabricante). Neste trabalho, utilizou-se um produto hidrolisado de 12,5 % de grau de hidrólise (também informado pela empresa produtora), embora se trate de outro produto. Ramos (2001) utilizou uma proteína com alto grau de hidrólise (aproximadamente 30%). Ainda que no trabalho mencionado não tenha sido realizado a exaustão dos animais, o autor observou que o consumo de dieta formulada com proteína do soro de leite com alto grau de hidrólise promoveu uma diminuição na capacidade de recuperação das reservas de glicogênio muscular em comparação às proteínas intactas, após exercício intenso.

Outra diferença a se destacar é a diferença entre os protocolos de exercício utilizados nos experimentos. Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998) e Ramos (2001) utilizaram natação como exercício físico. Os demais estudos deste laboratório utilizaram a corrida em esteira sem inclinação. Nery-Diez et al. (2010) usaram o protocolo proposto por Smolka et al. (2000). No presente trabalho, utilizou-se o protocolo sugerido por Hohl et al. (2009), o mesmo utilizado Costa (2010) e Bensabath (2010), embora essas autoras tenham realizado todo o protocolo, enquanto no presente trabalho o protocolo foi reduzido para apenas duas semanas. Neste ponto, é relevante destacar que os experimentos que apresentaram melhores resultados para os animais alimentados com as proteínas do soro de leite, como o de Nery-Diez et al. (2010) e Pimenta et al. (2006), utilizaram um teste de exaustão com progressão mais lenta e limitada da velocidade. Dos dois experimentos que utilizaram o mesmo protocolo de exaustão que este presente trabalho (embora tenham

cumprido um tempo bastante maior do protocolo), um deles não encontrou diferença entre as dietas (COSTA, 2010), corroborando nossos dados, e o outro encontrou diferença apenas no primeiro teste de exaustão, ocorrido na 8ª semana, e não mais nos testes seguintes, ocorridos na 12ª e 13ª (BENSABATH, 2009). De grande importância para nossas conclusões, a autora discute que teria sido interessante verificar em que momento do treinamento, anterior ao primeiro teste, os animais que consumiram a proteína hidrolisada poderiam ter alcançado o seu máximo rendimento.

O tempo de jejum é outro fator que pode influenciar intensamente o rendimento ao exercício. Neste trabalho, os animais permaneceram sem alimentação durante 12 horas anteriores ao sacrifício.

4.4 LACTATO SANGUÍNEO

No presente trabalho os níveis de lactato sanguíneo não apresentaram diferença estatística, seja por ação da dieta ou em consequência ao treinamento físico, como visto na tabela 6.

Tabela 6. Níveis de lactato sanguíneo

	Grupos de atividade física	
	SX	TX
Lactato sanguíneo (mmol/L)		
CAS	8,4 ± 1,7	6,2 ± 0,7
WPC	5,9 ± 0,5	6,3 ± 1,0
WPH	5,9 ± 0,7	8,1 ± 0,8

Valores médios ± erro padrão (n = 6-7). SX = sedentários-exaustos; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada em duas vias com *post hoc* Duncan.

Concordante com estes resultados e com a condição das análises também ocorrerem logo após a última sessão de exercício, o trabalho de Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998) demonstrou que os animais levados à exaustão (usando natação como exercício) apresentaram concentrações séricas quase duas vezes maiores que os animais não exaustos. Todavia, as alterações também não foram significativas, tampouco oriundas da dieta.

Bensabath (2009) observou que, tanto o treinamento, quanto a dieta produziram interação com os níveis de lactato sanguíneo. O que se mostrou com relação à dieta foi uma certa tendência dos animais alimentados com o WPH a terminarem com níveis significativamente superiores. Achados semelhantes foram relatados Pimenta et al., 2006.

Destaca-se, contudo, que Bensabath (2009) obteve resultados consideravelmente menores para esse parâmetro (valor médio máximo de 2,8 mmol/L) do que o obtido no presente trabalho. O mesmo pode ser visto no trabalho de Pimenta et al. (2006), embora este apresente valores mais próximos aos deste presente trabalho, para os grupos levados à exaustão.

Sabe-se que tanto na fase inicial do exercício, como em intensidade elevada, a transformação de energia acontece principalmente a partir do metabolismo anaeróbio (PAPOTI et al., 2003). Isso ocorre devido ao fato que, no início da atividade física existe um aumento na concentração de lactato, até que o metabolismo aeróbio seja capaz de suprir as necessidades energéticas do exercício, desde que seja mantido em intensidade moderada, a quantidade de lactato produzida e a quantidade removida passam a ser equivalentes, estabilizando os níveis de lactato, fase então chamada de "máxima fase estável de lactato". No entanto, com o prolongamento do exercício moderado, a participação anaeróbia glicolítica torna-se necessária novamente gerando um acúmulo de lactato, agora de forma exponencial (PAPOTI et al., 2003).

Quando este composto passa a ser abruptamente acumulado em níveis mais elevados que as concentrações observadas no repouso, apresenta-se o quadro denominado de "limiar do lactato". Já o alcance do máximo nível de lactato no "estado estável" (estado de equilíbrio) denota o momento de transição em que o metabolismo passa de predominantemente aeróbio para predominante anaeróbio. Esta segunda inflexão na curva do lactato ocorre numa concentração de aproximadamente 4 mmol/L em humanos e 5,5 mmol/l em ratos (GOBATTO et al., 2001; PAPOTI et al., 2003).

Ressalta-se que a redução da concentração sanguínea de lactato após um período de treinamento físico, sob uma mesma carga de trabalho, demonstra o efeito positivo do exercício crônico (GOBATTO et al., 2001). No entanto, para que essa adaptação ocorra, é necessário que o treinamento seja realizado em alta intensidade, próxima ao limiar de lactato. Tendo em vista a falta de diferenças significativas entre as dietas, chega-se à conclusão de que este parâmetro não teve maior relevância como fator discriminante, pois é

possível que a duração do treinamento ministrado (duas semanas) não tenha sido suficiente para promover a capacidade dos tecidos de metabolizar o lactato sérico.

4.5 TEMPERATURA MUSCULAR

A temperatura muscular é um parâmetro complementar que reflete o nível de esforço realizado pelo músculo. Sendo o teste de exaustão um intenso esforço físico, os grupos que o realizaram demonstraram uma temperatura muscular significativamente mais elevada, como era esperado. A figura 5 apresenta os resultados obtidos para essa análise. Não houve, contudo, diferença entre as temperaturas apresentadas entre os grupos SX e TX, demonstrando que não ocorreu adaptação promovida pelo treinamento. Também pelo maior esforço físico, juntamente ao fato de o sacrifício ter ocorrido logo após a realização da última sessão de exercício físico, os músculos dos animais treinados alcançaram temperaturas maiores do que os sedentários. Os grupos sedentários apresentaram as menores temperaturas musculares, uma vez que realizaram a última sessão de atividade física (leve) 48 horas antes do sacrifício.

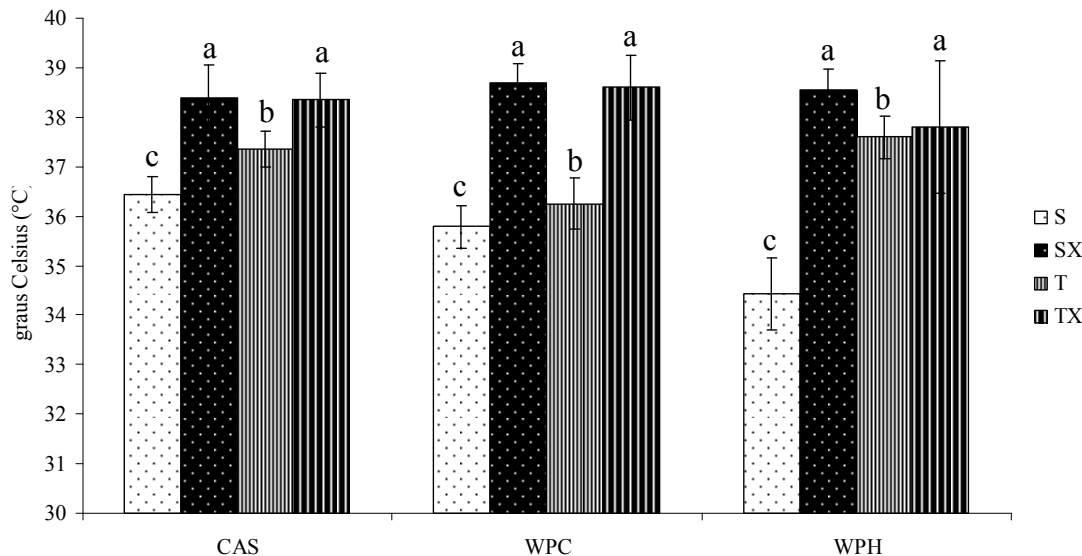


Figura 5. Médias das temperaturas do músculo *gastrocnemius* esquerdo (°C) \pm erro padrão (n= 6-7). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas. ANOVA multivariada de duas vias com post hoc Duncan.

Os músculos em exercício liberam calor, pois os ciclos de quebra de ATP são transdutores de energia, que a convertem da forma química em trabalho e calor durante a

contração (WOLEDGE; BARCLAY; CURTIN, 2009). Esta elevação de temperatura também é consequência do aumento do fluxo sanguíneo e da temperatura central. Em maiores temperaturas, as contrações são mais rápidas e a tensão é aumentada (COUPLAND; RANATUNGA, 2003; ROOTS et al., 2009). No entanto, a força relativa decai com o aumento de temperatura de 20°C para 40°C (SEGAL; FAULKNER; WHITE, 1984). As temperaturas para músculos da perna em repouso e após exercício exaustivo é de 36°C e 44°C, respectivamente, para ratos (BROOKS et al apud SEGAL; FAULKNER; WHITE, 1984).

4.6 CREATININA SÉRICA

No que se refere aos valores obtidos para creatinina sérica, não houve diferença estatística entre os grupos, tanto por ação da dieta, como do treinamento físico ou exaustão, como é apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Níveis séricos de creatinina e AST

	Grupos de atividade física			
	S	SX	T	TX
Creatinina sérica (mg/dL)				
CAS	0,55 ± 0,11	0,68 ± 0,14	0,55 ± 0,15	0,28 ± 0,10
WPC	0,58 ± 0,13	0,68 ± 0,25	0,56 ± 0,14	0,71 ± 0,22
WPH	0,68 ± 0,17	0,52 ± 0,18	0,70 ± 0,14	0,56 ± 0,12
Aspartato aminotransferase sérica (U/L)				
CAS	95,82 ± 6,81	86,77 ± 4,90	101,60 ± 11,02	55,96 ± 16,92
WPC	69,59 ± 4,29	88,08 ± 5,09	96,66 ± 7,72	85,45 ± 8,37
WPH	97,55 ± 12,87	94,76 ± 7,89	101,22 ± 18,47	83,00 ± 4,70

Valores médios ± erro padrão (n = 6-7). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

A creatinina é um composto nitrogenado, não protéico, produzido a partir da degradação da creatina. Por ser formada principalmente no músculo, sua concentração é considerada proporcional à massa muscular (RIEHL; FONTANA; LÓPEZ, 2004). Portanto, alterações nas suas concentrações séricas ou urinárias podem indicar degradação muscular ou, ainda, danos renais.

O consumo de proteínas do soro de leite, associado a uma dieta hipercolesterolemiantes, preveniu o aumento da concentração de creatinina observado em dieta hipercolesterolemiantes com caseína (HARAGUCHI et al., 2009). Estudando altos teores de proteína na dieta em mulheres adultas obesas, Bortolotti et al. (2011) encontrou que a suplementação com 60 g de proteínas de soro de leite/dia não afetou os níveis de creatinina plasmática.

Costa (2010) encontrou diferenças estatísticas apenas para o treinamento (sedentários x treinados), e em relação à dieta com WPH. Lippi et al. (2004) encontraram uma redução dos níveis de creatinina sérica para atletas de *endurance*. Já De Araujo et al. (2011) não encontraram diferenças entre animais sedentários e em treinamento periodizado linear. Resultado similar foi obtido por Pinheiro-Mulder et al. (2010). A realização de exercício exaustivo agudo elevou os valores séricos de creatinina (LIN et al., 2010; NEUMAYR et al., 2003), e após 72 horas de intenso exercício de força (MACHADO et al., 2011).

4.7 ALANINA AMINOTRANSFERASE SÉRICA

A concentração de alanina aminotransferase (ALT) sérica foi um parâmetro em que a fonte protéica exerceu alteração significativa, como observado na figura 6. Os animais alimentados com dieta com WPC e WPH apresentaram valores significativamente inferiores aos dos animais alimentados com caseína. É importante destacar, contudo, que níveis de todos os grupos foram considerados normais e, portanto, dentro dos valores de referência (DANTAS et al., 2006). Como era esperado, a exaustão causou aumento dos níveis de ALT, embora a diferença significativa tenha ocorrido apenas entre os animais SX e T.

A ALT é um marcador bioquímico da função ou de doença hepáticas (KONG et al., 2008), sendo mais específica que a aspartato aminotransferase (AST) para injúrias das células hepáticas (KAPLAN, 2002).

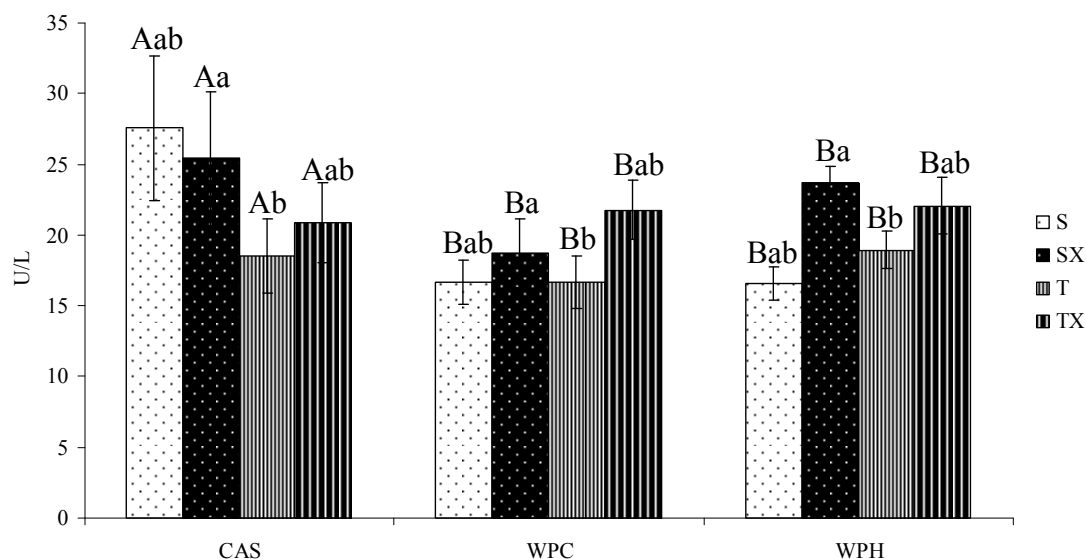


Figura 6. Médias dos níveis de ALT (U/L) \pm erro padrão (n = 6-7). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas e letras maiúsculas referem-se à diferença entre as dietas. ANOVA multivariada de duas vias com post hoc Duncan.

O resultado obtido no presente trabalho é condizente ao observado por Chitapanarux et al. (2009), utilizando a suplementação com WPI rico em cisteína, em pacientes com esteatohepatite não-alcoólica. As proteínas do soro de leite foram capazes de reduzir os níveis de ALT após a indução de hepatotoxicidade (GAD et al., 2011) e esteatose (HAMAD et al., 2011). No trabalho de Abecia-Soria (2010) a dieta com WPH proporcionou concentrações estatisticamente menores que a dieta com caseína nos grupos sedentários e SX, bem como menores concentrações que a dieta com WPI, nos grupos sedentários. Quanto ao exercício mais intenso, o aumento nos níveis de ALT foi observado apenas nos animais que chegaram na exaustão (ABECIA-SORIA, 2010). Já Costa (2010) observou validade estatística apenas para as diferentes níveis de atividade física (sedentários x treinados).

Resultado oposto foi encontrado por Morifuji, Sakai e Sugiura (2005) em ratos submetidos ao treinamento físico, nos quais a dieta com proteínas do soro de leite produziu níveis mais elevados de ALT hepática, do que com a caseína. A interpretação dos autores se baseia na maior atividade enzimática registrada no fígado, como resposta à maior liberação de alanina muscular para ser convertida em glicose no fígado (ciclo alanina-glicose). Do anterior, pode se concluir que o aumento dos níveis da ALT hepática, medidos

diretamente no fígado, não necessariamente estão relacionados com algum efeito nocivo causado pelo consumo das proteínas do soro de leite.

4.8 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE SÉRICA

Quanto aos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), não houve diferença estatística, por ação da dieta ou do condicionamento físico, conforme tabela 7. Contrário ao esperado, a exaustão não reduziu os níveis de AST sérica.

As proteínas do soro de leite impediram o aumento da atividade da AST provocada por uma dieta hipercolesterolemiantes (HARAGUCHI et al., 2009). As proteínas do soro de leite também resultaram em diminuição dos níveis dessa enzima após a indução da hepatotoxicidade (GAD et al., 2011) e esteatose (HAMAD et al., 2011) em ratos. De forma similar, Chitapanarux et al. (2009) demonstraram que suplementação com WPI, rica fonte de cisteína, em pacientes com esteatohepatite não-alcoólica reduziu a atividade da AST.

Costa (2010) encontrou diferenças estatísticas apenas entre sedentários e treinados, sem distinção entre as dietas. Estes resultados diferem do obtido por Morifuji, Sakai e Sugiura (2005), que encontraram valores idênticos entre animais sedentários e treinados, alimentados com caseína, proteínas do soro de leite e soja, lembrando que, no estudo mencionado, a enzima não foi estudada no soro e, sim, no fígado.

Abecia-Soria (2010) encontrou que a exaustão aumentou os níveis de AST sérica, sendo este aumento mais pronunciado para os grupos SX. Os grupos alimentados com WPH apresentaram valores significativamente menores desta enzima em todos os grupos, em relação a caseína. Valores inferiores também foram encontrados para os grupos SX e TX em relação à dieta WPI.

4.9 PESO DOS TECIDOS ADIPOSEO EPIDIDIMAL E PERITONEAL

Os pesos referentes ao tecido adiposo intraperitoneal e epididimal são mostrados na tabela 8.

Tabela 8. Peso do tecido adiposo e concentração de TAG séricos

	Grupos de atividade física			
	S	SX	T	TX
Gordura intraperitoneal e epididimal (g/100g peso corpóreo)				
CAS	5,00 ± 0,32	4,47 ± 0,35	4,32 ± 0,50	4,58 ± 0,63
WPC	4,08 ± 0,19	4,84 ± 0,35	3,79 ± 0,36	4,03 ± 0,22
WPH	5,02 ± 0,26	4,18 ± 0,28	4,58 ± 0,25	4,15 ± 0,46
Triacilgliceróis séricos (mg/dL)				
CAS	61,11 ± 11,18 ^a	40,27 ± 8,39 ^b	43,42 ± 8,56 ^{ab}	34,79 ± 9,92 ^{ab}
WPC	45,47 ± 9,57 ^a	37,15 ± 6,77 ^b	29,27 ± 5,40 ^{ab}	28,51 ± 4,76 ^{ab}
WPH	47,27 ± 8,70 ^a	23,91 ± 5,10 ^b	45,72 ± 10,06 ^{ab}	30,83 ± 5,99 ^{ab}

Valores médios ± erro padrão (n = 6 - 7). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Embora seja consenso que o treinamento físico propicie maior gasto energético, favorecendo menor acúmulo de estoques energéticos, como a gordura peritoneal e epididimal, isso não foi observado neste experimento. Uma possível explicação é a falta de acurácia do método, que consistia na retirada manual do tecido gorduroso do peritônio e epidídimo dos animais. Outra possível explicação é a reduzida duração do protocolo do experimento (duas semanas).

Alguns pesquisadores têm encontrado que o consumo de proteínas do soro de leite resulta na diminuição de gordura corporal. Siddiqui et al. (2008), utilizando a técnica de absorciometria de raios-X de dupla energia (DEXA), encontrou que o consumo de dietas elaboradas com proteínas do soro de leite, vitamina D e cálcio, todos em altas quantidades, ocasionou um menor acúmulo de gordura corpórea em ratos. A ingestão de proteínas do soro de leite associada à dieta rica em lipídeos propiciou menor acúmulo de gordura corporal em fêmeas de camundongo C57BL/6J (SHERTZER et al., 2011). O consumo de um produto à base de proteínas do soro de leite favoreceu a maior perda de gordura corpórea em pessoas adultas (FRESTEDT et al., 2008).

Entretanto, outros estudos relatam a ausência de tal efeito causado pelo consumo das proteínas do soro de leite. Pal, Ellis e Dhaliwal (2010), por exemplo, não observaram mudanças no total de massa magra ou total de tecido gorduroso após 12 semanas de suplementação com WPI em adultos com sobrepeso/obesidade. Não houve diferença na quantidade de gordura na carcaça de ratos alimentados com a ingestão de WPI ou com

caseína (ELIA et al., 2006; ROYLE; McINTOSH; CLIFTON, 2008). O consumo de proteínas do soro de leite combinadas ou não com creatina não diminuiu os níveis de gordura corporal de homens acima de 48 anos (ELIOT et al., 2008).

4.10 TRIACILGLICERÓIS

Como apresentado na tabela 8, a dieta não influenciou sobre os níveis de triacilgliceróis (TAG) séricos, diferente do treinamento físico e exaustão, que reduziram as concentrações desse parâmetro, embora de forma significativa apenas para o grupo SX.

Coerente com nossos resultados, Ramos (2001) também não encontrou diferença entre as dietas com caseína, WPC e WPH, utilizando um protocolo de exercício com natação. Resultado idêntico foi obtido por Morifuji et al. (2005a) e Pal, Ellis e Dhaliwal (2010), comparando a caseína e as proteínas do soro de leite. Já Abecia-Soria (2003) encontrou que o consumo de dieta com WPH mostrou valores aumentados em relação ao WPI, não significativo apenas nos grupos sedentários. Haraguchi et al (2009) observaram que as dietas elaboradas com proteínas do soro de leite aumentaram significativamente a concentração de TAG séricos. Esse resultado é similar ao obtido por Jacobucci et al (2001). Nesse último trabalho, as proteínas do soro de leite se equivaleram às proteínas da soja em valores aumentados para os TAG séricos, em comparação à caseína, sendo, no entanto, denotada a oscilação deste parâmetro durante o experimento (45 dias).

Em estudo com mulheres pós-menopausa, Pal, Ellis e Ho (2010) encontraram que o consumo de proteínas do soro de leite é capaz de reduzir as concentrações de TAG pós-prandiais, em relação à caseína. Este resultado foi similar ao obtido por Bensabath (2009), no qual o WPH apontou menores níveis não apenas em relação à caseína, como a WPI. No entanto, deve-se ressaltar que a influência exercida pela dieta está associada à atividade física, visto que as variações ocorreram apenas nos grupos treinados.

No presente trabalho, exaustão foi capaz de alterar significativamente os níveis de TAG séricos. No entanto, os valores foram maiores nos animais que não foram levados à exaustão, exceto na dieta com WPC (na qual os treinados apresentaram valores menores que o grupo SX). Contrariamente, Abecia-Soria (2003) observou valores significativamente maiores nos animais levados à exaustão.

Dentre os animais não-exaustos, os animais sedentários apresentaram concentrações maiores de TAG que os treinados, exceção apenas para os animais com

alimentados WPH, no qual os grupos mantiveram níveis semelhantes. Essa redução dos teores de TAG séricos diante da execução de exercício físico também foi observada por Bensabath (2009), de modo significativo. Responsável pela remoção dos ácidos graxos das lipoproteínas, a lipase lipoprotéica está aumentada no músculo durante um exercício de longa duração (KIENS et al., 2004). Isto sugere que o músculo exercitado é capaz de utilizar mais TAG circulante durante o exercício (CARNEVALI JUNIOR; LIMA, 2009).

4.11 ÁCIDOS GRAXOS LIVRES NÃO-ESTERIFICADOS

A dieta não interferiu nos níveis séricos de ácidos graxos não-esterificados (NEFA, do inglês *non-esterified fatty acids*), como mostrados na figura 7. Esse resultado é concordante ao obtido por Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998) e por Abecia-Soria (2003). O mesmo foi observado por Ramos (2001) em estudo com dietas à base de caseína, concentrado e hidrolisado, concomitante a um protocolo de exercício com natação, e por Pal, Ellis e Dhaliwal (2010), em trabalho promovendo a suplementação com proteínas do soro de leite ou caseína, em indivíduos com sobrepeso e obesos. O consumo das proteínas do soro de leite intactas promoveu um maior nível de NEFA do que no caso da proteína hidrolisada, apenas em animais sedentários (BENSABATH, 2009).

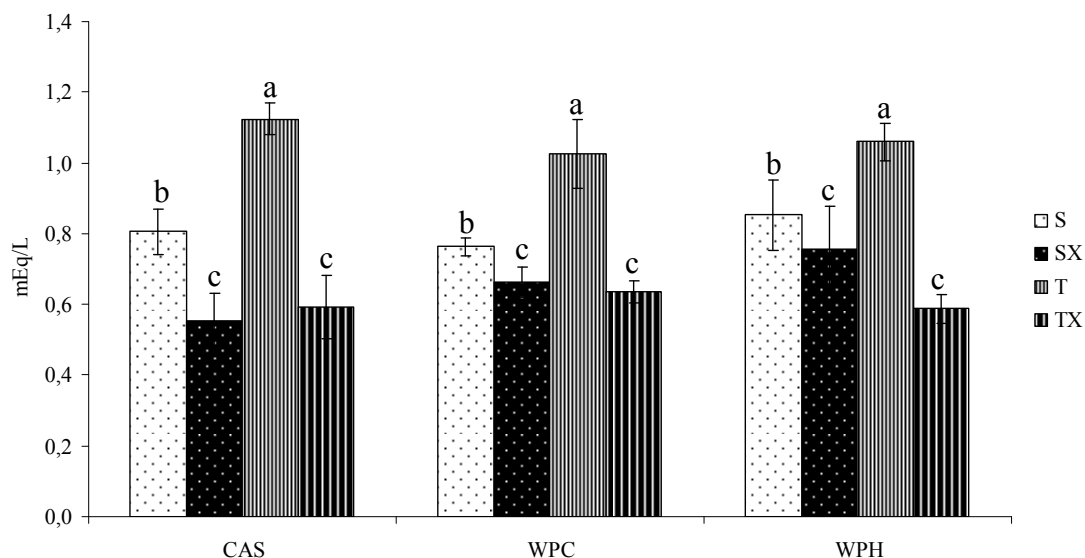


Figura 7. Médias dos níveis de ácido graxo não-esterificado sérico \pm erro padrão ($n = 7$). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas. ANOVA multivariada de duas vias com post hoc Duncan.

O exercício físico estimula a lipólise, aumentando assim os níveis de NEFA circulantes (RUSSEL et al., 2005). Esta condição foi observada no presente trabalho, de forma significativa, o que pode ser visto na figura 7. O ácido graxo é utilizado preferencialmente durante o repouso e no exercício de intensidade submáxima, já que é mantido por fibras do tipo I predominantemente. Como imediatamente após o começo do exercício, ocorre a vasodilatação muscular, facilita-se a disponibilidade e a captação dos ácidos graxos livres. Juntamente, há um aumento na secreção de hormônios lipolíticos. A atividade lipolítica do tecido adiposo é regulada pelo balanço entre hormônios estimuladores (primariamente catecolaminas) e inibidores da lipase sensível a hormônio (como insulina), a qual degrada TAG em ácidos graxos e glicerol (HOROWITZ; KLEIN, 2000).

A oxidação lipídica durante exercício do tipo *endurance* permite a manutenção da atividade física por maior tempo e posterga o consumo de glicogênio. O consumo de ácidos graxos como substrato requer a hidrólise dos TAG do tecido adiposo, músculo e plasma, além da liberação do ácido graxo para mitocôndria do miócito (HOROWITZ; KLEIN, 2000). As quatro principais fontes de lipídeos que podem ser utilizadas pelo músculo esquelético durante o exercício físico são: 1) os ácidos graxos complexados à albumina no plasma; 2) os ácidos graxos presentes nos TAG das lipoproteínas e 3) os ácidos graxos estocados nos TAG no citoplasma dos miócitos; 4) os ácidos graxos armazenados nos adipócitos entre as fibras musculares (perimisiais) (CARNEVALI JUNIOR; LIMA, 2009). Dentro das células musculares, o TAG é armazenado em gotículas lipídicas associadas às mitocôndrias. Em seres humanos, as fibras vermelhas oxidativas de contração lenta (tipo I) apresentam mais TAG do que as fibras intermediárias (tipo IIa) e as fibras brancas glicolíticas rápidas (tipo IIb). No entanto, o conteúdo real de TAG no músculo é determinado por diversos fatores, como a atividade das enzimas de síntese e hidrólise, o suprimento exógeno de ácidos graxos, a necessidade de substratos pela célula, a composição da dieta e o estado hormonal e de treinamento.

A oxidação lipídica corresponde a 40% a 50% da energia total consumida em exercício com 60% a 65% do VO_2 máximo, durante 180 minutos, em humanos. Os ácidos graxos livres plasmáticos contribuem com cerca de 24% do total da energia, enquanto 22% seriam oriundos de TAG intramuscular (STELLINGWERFF et al., 2007). Já em exercício de intensidade 40% W_{max} (carga máxima), a oxidação de lipídeos correspondeu a 55% do gasto total. Aumentando-se a intensidade para 55% W_{max} , cerca de 50% da energia foi

oriunda de lipídeos. Em intensidade de 75% W_{max} , a contribuição calórica de lipídeos foi de cerca de 24% (VAN LOON et al., 2001). No músculo em repouso quase a totalidade dos ácidos graxos oriundos das fontes extracelulares parece ser incorporado primeiro no *pool* endógeno de TAG. Em situação de exercício, o ácido graxo é diretamente oxidado nas vias de degradação na mitocôndria ou depois de entrar em um *pool* que possui um tempo de *turnover* de apenas alguns poucos minutos.

Já a redução da liberação de insulina durante exercício ou treinamento pode ser responsável pelo aumento nas taxas de *turnover* de NEFA durante os 30 primeiros minutos de atividade (MARTIN III, 1996). Assim, a concentração de ácidos graxos livres é menor no início do exercício, aumentando gradualmente (HOROWITZ; KLEIN, 2000). O treinamento elevou os níveis de ácidos graxos livres, enquanto a exaustão reduziu-os. Este achado é coerente ao proposto por Costill et al. (1977), os quais afirmam que quando concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres são altas, a utilização de glicogênio é diminuída. Contrariamente, baixos níveis desse composto promovem a depleção dos estoques de glicogênio, que é uma das principais causas de exaustão. Em exercícios com intensidade que não ultrapassa 80% a 90% do VO_2 máximo, os ácidos graxos são substratos importantes. Quando a atividade física excede 90% do VO_2 máximo, o substrato preferencial passa a ser carboidrato, reduzindo a contribuição lipídica (CARNEVALI JUNIOR; LIMA, 2009).

Similar aos resultados do presente trabalho, Abecia-Soria (2003), observou que os animais levados à exaustão apresentaram os menores níveis de ácidos graxos livres em relação aos demais grupos, sendo que o grupo treinado-exausto alimentado com isolado diferiu estatisticamente. Bensabath (2009), no entanto, encontrou efeito oposto quanto ao treinamento. Os animais treinados apresentaram valores menores que os sedentários (significativo para as dietas com proteínas do soro de leite). Já Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998) não observaram diferenças conforme a condição física.

Durante exercício de alta intensidade, portanto acima do limiar de lactato, a liberação de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo para o plasma é menor do que em exercício moderadamente intenso (KANALEY et al., 1995). Uma possível explicação para essa redução nos níveis plasmáticos de NEFA diante do aumento da intensidade acima do limiar de lactato é que lactato aumenta a reesterificação de ácidos graxos livres (BOYD et al., 1974). Outra possível justificativa é o aumento da competição entre acetil-CoA

derivado do piruvato e do acetil-CoA oriundo de ácido graxo, para entrar no ciclo do citrato (HOLLOSZY; KOHRT, 1996).

4.12 ALBUMINA SÉRICA

Quanto aos níveis séricos de albumina, não foi encontrada diferença significativa, seja por ação da dieta ou do exercício físico, como mostrado na figura 8.

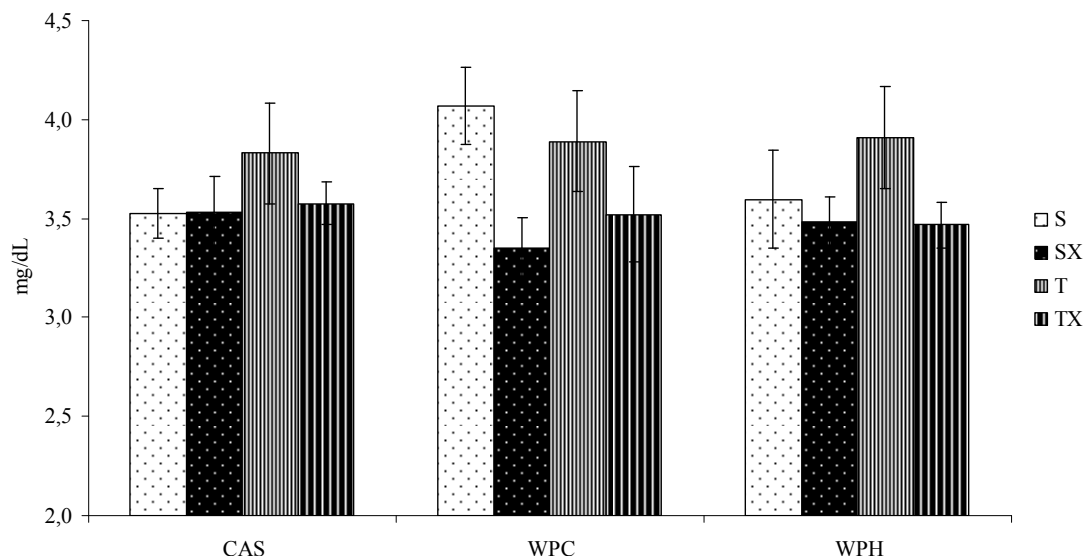


Figura 8. Médias dos níveis de albumina sérica \pm erro padrão (n = 6-7). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada de duas vias com post hoc Duncan.

A albumina é a proteína mais abundante do sangue. Por apresentar uma alta taxa absoluta de catabolismo em comparação a outras proteínas plasmáticas (WHICHER; SPENCE, 1987), além de sua forma de detecção ser de baixo custo e de fácil acesso (CABRAL; CARVALHO; MISZPUTEN, 2001), a albumina é um importante marcador do estado nutricional protéico.

O efeito do consumo do WPH sobre a concentração sérica de albumina também não é conclusivo. Concordante com o resultado encontrado no presente trabalho, estudos de nosso laboratório mostram que o consumo WPH não alterou os níveis de albumina sérica (RAMOS, 2001; BENSABATH, 2009). No entanto, outros trabalhos também de nosso laboratório indicam o contrário. Pimenta et al. (2006) encontraram níveis significativamente maiores para os grupos alimentados com WPH, em comparação com

WPI. A α -lactalbumina hidrolisada também foi capaz de elevar os níveis de albumina sérica em comparação com a mesma proteína na forma isolada e com a caseína (TASSI; AMAYA-FARFÁN; AZEVEDO, 1998). Na literatura encontramos que após a indução de hepatotoxicidade, Gad et al. (2011) observaram que a suplementação com WPC possibilitou aumento dos níveis de albumina. Haraguchi et al. (2009) não observou mudança nesse parâmetro diante do consumo de proteínas do soro de leite, em relação à caseína.

O exercício físico não apresentou impacto sobre os níveis de albumina sérica no trabalho de Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998) e Lippi et al. (2004). Pimenta et al. (2006), encontraram que o treinamento apresentou pequena influência, elevando os níveis apenas no grupo treinado alimentado com o WPH, em relação ao grupo sedentário de mesma dieta. Já Bensabath (2009) observou que o treinamento permitiu o aumento significativo desse parâmetro em todas as dietas.

4.13 PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES SÉRICOS

Os resultados da concentração de aminoácidos séricos são apresentados na tabela 9. Nesse parâmetro, a dieta influenciou apenas os níveis do aminoácido triptofano, como visto na figura 9. As duas dietas elaboradas com proteínas do soro de leite propiciaram uma elevação significativa da concentração desse aminoácido, que pode ser justificada por essas proteínas apresentarem altas concentrações de triptofano (SGARBIERI, 2004). Sabe-se que a concentração plasmática deste aminoácido na forma livre pode provocar alterações no nível de serotonina cerebral, uma vez que o triptofano é seu precursor. A serotonina, por sua vez, pode contribuir no aparecimento da fadiga central (NEWSHOLME; BLOMSTRAND, 2006). No entanto, os animais alimentados com dieta elaborada com proteínas do soro de leite alcançaram um tempo até a exaustão similar aos animais alimentados com dieta com caseína. É conhecido, ainda, que os níveis de aminoácidos de cadeia ramificada também podem influenciar a concentração de serotonina, pois esses aminoácidos competem com o triptofano livre pela entrada no cérebro, através da barreira hemato-encefálica (FERNSTROM, 2005). Embora fonte de BCAAs, as proteínas do soro de leite não proporcionaram aumento nos níveis séricos desses aminoácidos. Contudo, este resultado é coerente com a resposta ao tempo de exaustão, que não apresentou alterações oriundas das dietas.

Tabela 9. Concentração dos aminoácidos livres séricos (μMol/L)

		Asp	Glu	HPro	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Thr	Ala
CAS	S	44,8 ^a ± 7,1	152,1 ± 17,9	40,3 ± 3,7	35,6 ± 2,4	250,4 ± 2,7	620,1 ^{ab} ± 27,0	236,7 ^b ± 7,1	73,5 ± 4,5	28,4 ± 1,6	231,7 ± 1,2	407,7 ^b ± 16,3
	SX	20,7 ^b ± 5,3	171,2 ± 4,8	35,9 ± 5,2	26,3 ± 1,9	211,5 ± 19,3	671,9 ^a ± 49,1	289,0 ^{ab} ± 37,3	69,5 ± 7,1	29,3 ± 1,8	218,1 ± 26,9	375,5 ^a ± 45,0
	T	33,8 ^a ± 0,4	167,3 ± 27,6	40,3 ± 0,5	20,3 ± 4,1	258,6 ± 29,8	574,7 ^b ± 47,0	289,4 ^{ab} ± 39,6	60,9 ± 9,0	29,2 ± 2,6	224,7 ± 7,5	371,5 ^b ± 63,3
	TX	27,0 ^b ± 11,6	140,2 ± 107,5	45,0 ± 9,0	33,6 ± 5,2	285,2 ± 39,0	752,0 ^a ± 53,1	333,6 ^a ± 33,8	75,8 ± 5,1	40,5 ± 6,2	257,3 ± 23,9	496,7 ^a ± 17,4
WPC	S	53,0 ^a ± 1,1	152,1 ± 5,5	35,0 ± 3,9	25,0 ± 2,0	244,7 ± 8,7	645,1 ^{ab} ± 45,9	260,4 ^b ± 4,1	72,1 ± 2,5	29,5 ± 4,2	285,3 ± 7,9	361,1 ^b ± 38,4
	SX	26,8 ^b ± 1,5	221,9 ± 14,0	36,5 ± 1,5	29,1 ± 0,5	264,1 ± 7,3	740,7 ^a ± 6,7	314,4 ^{ab} ± 8,4	79,1 ± 3,0	32,1 ± 0,5	238,8 ± 4,1	460,9 ^a ± 45,6
	T	39,2 ^a ± 0,8	158,2 ± 5,4	38,6 ± 1,8	22,0 ± 1,8	253,8 ± 7,8	640,2 ^b ± 10,2	297,6 ^{ab} ± 7,6	68,0 ± 7,2	29,4 ± 0,5	271,4 ± 10,6	445,8 ^b ± 9,8
	TX	25,7 ^b ± 2,9	214,8 ± 25,7	38,9 ± 0,2	27,0 ± 9,8	242,7 ± 13,7	677,3 ^a ± 45,9	316,5 ^a ± 15,3	72,4 ± 8,4	32,1 ± 4,4	246,5 ± 20,2	427,9 ^a ± 39,8
WPH	S	36,5 ^a ± 8,5	166,8 ± 9,5	29,9 ± 3,6	26,7 ± 3,5	263,9 ± 0,7	621,9 ^{ab} ± 34,3	295,1 ^b ± 6,2	68,7 ± 4,8	29,8 ± 2,5	233,4 ± 8,1	382,4 ^b ± 1,8
	SX	20,4 ^b ± 8,5	216,8 ± 1,0	41,7 ± 1,4	29,3 ± 7,0	236,6 ± 8,0	721,5 ^a ± 14,9	307,0 ^{ab} ± 1,4	69,9 ± 6,8	37,9 ± 3,6	216,9 ± 4,6	570,4 ^a ± 58,0
	T	42,2 ^a ± 1,3	163,3 ± 14,9	38,2 ± 5,8	20,4 ± 8,5	241,3 ± 11,1	601,0 ^b ± 01,8	279,9 ^{ab} ± 16,0	66,6 ± 0,5	29,1 ± 7,4	276,7 ± 26,0	371,9 ^b ± 24,2
	TX	26,2 ^b ± 8,2	191,3 ± 21,6	38,9 ± 7,3	25,6 ± 8,0	255,0 ± 26,9	679,4 ^a ± 5,1	331,5 ^a ± 38,7	69,1 ± 7,9	35,1 ± 5,6	281,4 ± 37,3	482,6 ^a ± 30,7

*Arg + Tau. Médias dos níveis de aminoácidos livres séricos ± erro padrão (n = 2). Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas e letras maiúsculas referem-se à diferença entre as dietas. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Cont. Tabela 9. Concentração dos aminoácidos livres séricos ($\mu\text{Mol/L}$)

		Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Trp	Lys
CAS	S	120,3 $\pm 1,7$	51,2 ^b $\pm 0,6$	141,1 ^b $\pm 1,9$	58,7 $\pm 11,9$	11,1 $\pm 0,5$	82,9 ^b $\pm 0,1$	128,7 ^b $\pm 2,9$	77,3 ^b $\pm 1,7$	20,0 ^{Bb} $\pm 2,2$	365,7 $\pm 43,5$
	SX	109,6 $\pm 13,5$	72,2 ^a $\pm 18,1$	150,4 ^a $\pm 15,6$	58,8 $\pm 4,6$	15,5 $\pm 4,4$	71,7 ^a $\pm 6,3$	124,0 ^a $\pm 11,0$	72,9 ^a $\pm 0,3$	20,9 ^{Ba} $\pm 2,5$	389,2 $\pm 66,8$
	T	115,0 $\pm 4,1$	58,7 ^b $\pm 2,0$	140,3 ^b $\pm 12,7$	51,8 $\pm 3,3$	13,0 $\pm 3,4$	81,8 ^b $\pm 7,8$	131,8 ^b $\pm 14,8$	69,7 ^b $\pm 6,7$	22,5 ^{Bb} $\pm 2,2$	386,2 $\pm 13,1$
	TX	137,4 $\pm 11,5$	74,9 ^a $\pm 1,1$	181,0 ^a $\pm 0,8$	59,9 $\pm 0,8$	13,1 $\pm 1,7$	100,4 ^a $\pm 0,7$	174,9 ^a $\pm 5,2$	92,5 ^a $\pm 0,7$	28,1 ^{Ba} $\pm 0,8$	459,8 $\pm 74,8$
	S	111,6 $\pm 18,4$	37,6 ^b $\pm 2,2$	139,9 ^b $\pm 14,3$	53,7 $\pm 8,2$	10,6 $\pm 1,9$	80,5 ^b $\pm 0,3$	127,9 ^b $\pm 12,8$	70,2 ^b $\pm 3,4$	23,5 ^{Ab} $\pm 2,2$	390,5 $\pm 31,4$
	SX	122,0 $\pm 1,1$	63,5 ^a $\pm 3,1$	177,5 ^a $\pm 7,0$	66,5 $\pm 0,1$	10,6 $\pm 0,3$	100,7 ^a $\pm 6,7$	161,0 ^a $\pm 5,6$	94,0 ^a $\pm 2,2$	32,9 ^{Aa} $\pm 3,5$	436,5 $\pm 39,3$
	T	113,1 $\pm 3,8$	43,5 ^b $\pm 3,2$	144,6 ^b $\pm 17,3$	55,2 $\pm 10,2$	14,0 $\pm 1,2$	81,0 ^b $\pm 8,4$	126,8 ^b $\pm 17,3$	75,3 ^b $\pm 5,4$	25,2 ^{Ab} $\pm 0,6$	431,9 $\pm 19,1$
	TX	118,1 $\pm 15,1$	71,4 ^a $\pm 8,3$	182,9 ^a $\pm 23,9$	64,3 $\pm 11,0$	14,4 $\pm 0,6$	103,7 ^a $\pm 9,8$	170,5 ^a $\pm 21,8$	94,0 ^a $\pm 7,5$	31,7 ^{Aa} $\pm 1,1$	420,0 $\pm 58,8$
	S	112,4 $\pm 8,4$	43,6 ^b $\pm 5,3$	143,4 ^b $\pm 9,6$	46,1 $\pm 2,5$	14,2 $\pm 3,8$	82,0 ^b $\pm 6,4$	133,5 ^b $\pm 3,8$	68,4 ^b $\pm 3,2$	21,5 ^{Ab} $\pm 1,0$	352,8 $\pm 5,3$
	SX	130,8 $\pm 1,3$	64,0 ^a $\pm 4,8$	184,7 ^a $\pm 7,5$	56,4 $\pm 1,1$	12,3 $\pm 0,3$	113,5 ^a $\pm 2,4$	179,4 ^a $\pm 2,1$	96,4 ^a $\pm 0,5$	29,7 ^{Aa} $\pm 1,2$	407,2 $\pm 24,0$
	T	119,6 $\pm 19,8$	42,8 ^b $\pm 2,5$	130,2 ^b $\pm 1,2$	50,4 $\pm 7,7$	10,3 $\pm 0,5$	70,7 ^b $\pm 2,2$	121,4 ^b $\pm 5,2$	64,2 ^b $\pm 2,8$	22,5 ^{Ab} $\pm 2,3$	369,5 $\pm 38,4$
	TX	122,1 $\pm 9,9$	63,3 ^a $\pm 12,2$	153,7 ^a $\pm 17,5$	60,5 $\pm 7,0$	11,9 $\pm 3,3$	92,2 ^a $\pm 6,9$	146,3 ^a $\pm 10,1$	88,1 ^a $\pm 6,9$	30,4 ^{Aa} $\pm 3,2$	484,9 $\pm 76,2$

Médias dos níveis de aminoácidos livres séricos \pm erro padrão ($n = 2$). Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas e letras maiúsculas referem-se à diferença entre as dietas. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

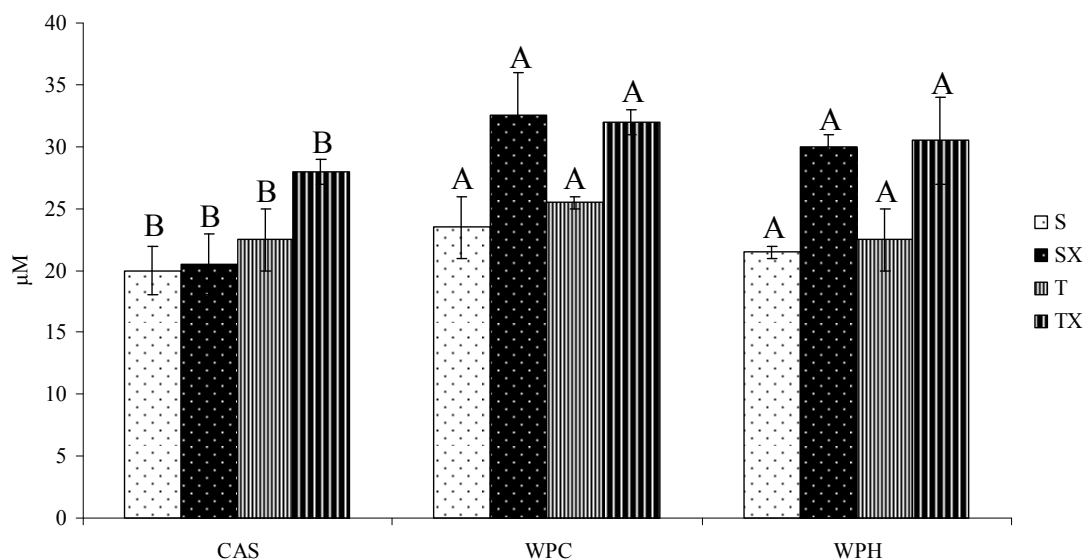


Figura 9. Médias dos níveis séricos de triptofano \pm erro padrão ($n = 2$). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. Letras maiúsculas referem-se à diferença entre as dietas. ANOVA multivariada em duas vias com *post hoc* Duncan.

No que se refere ao condicionamento físico, a exaustão exerceu influência sobre uma quantidade maior de aminoácidos, como destacado na tabela 10. Trp, Ala, Tyr, Phe, Val, Ile e Leu estavam em maiores concentrações nos animais submetidos à exaustão, sem diferenças entre os grupos SX e TX. Com menores concentrações, os animais S e T também não diferiram entre si. É válido lembrar que os aminoácidos Ile, Leu e Val, além de

Tabela 10. Agrupamento dos aminoácidos livres séricos conforme efeito do exercício/exaustão

Aminoácidos	
	Ala
	Tyr
	Trp
TX \approx SX > T \approx S	Phe
	Leu
	Ile
	Val

\geq Maior, sem diferença estatística; > maior, com diferença estatística. S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

serem considerados essenciais, apresentam uma estrutura similar de uma cadeia ramificada (SHIMOMURA et al., 2006), por isso são conhecidos como aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, do inglês *branched chain amino acids*). Eles têm grande importância no metabolismo muscular, pois são os primeiros aminoácidos a serem degradados pelo músculo (diferente de outros aminoácidos que são oxidados no fígado), fornecendo intermediários para o Ciclo de Krebs por meio de reações de anaplerose, o que poupa o consumo de estoques de glicogênio e a proteína muscular, além de fortalecer o sistema imune (UCHIDA et al., 2008). As proteínas do soro de leite são sempre listadas como fontes desses aminoácidos, embora não tenha sido encontrada relação entre dieta e níveis séricos dos BCAAs no presente trabalho.

A alanina é outro aminoácido que apresentou diferença significativa neste trabalho, e que participa ativamente do metabolismo muscular. Ela pode ser formada a partir da degradação de aminoácidos no músculo, alcançando a corrente sanguínea até chegar ao fígado, onde é capaz de ser metabolizada em glicose, fornecendo energia para a realização do exercício, por meio do ciclo de Cori. Resultado parecido ao dos aminoácidos citados, a glutamina mostrou concentração superior para os animais exercitados. No entanto, SX e TX foram significativamente distintos apenas dos grupos treinados. De modo semelhante à alanina, a glutamina pode ser formada na degradação de aminoácidos musculares, a partir de glutamato e NH_4^+ , e ser, então, metabolizada no fígado. Diferente dos demais aminoácidos, o aspartato encontrou-se significativamente em menor nível nos animais exercitados, também sem diferenças entre SX e TX, ou entre S e T. Já a glicina apresentou níveis maiores para os grupos TX, diferindo estatisticamente apenas dos grupos sedentários.

Diferente deste trabalho, Norton et al. (2009) encontraram maiores concentrações de leucina plasmática em ratos alimentados com proteínas do soro de leite, em comparação à dieta com trigo. Este resultado foi relacionado uma maior síntese de proteína muscular, parâmetro também observado nos grupos alimentados com proteínas do soro de leite. O nível de BCAAs pós-prandial foi aumentado estatisticamente após ingestão de proteínas do soro de leite, comparado à caseína (HALL et al., 2003). Alanina, arginina e glicina foram significativamente mais concentradas no soro de animais treinados alimentados com proteínas do soro de leite, em relação a animais treinados alimentados com dieta à base de caseína (MORIFUJI; SAKAI; SUGIURA, 2005).

Estudando mudanças de comportamento dos aminoácidos no sangue após ingestão de distintas fontes de proteínas do soro de leite, Farnfield et al. (2009) observaram que não

houve diferenças entre o consumo de WPC e a β -lactoglobulina. No entanto, após 45 minutos, os níveis de leucina foram significativamente menores para WPH, quando comparado à β -lactoglobulina. Boza et al. (1995) não observou diferenças no perfil de aminoácidos séricos entre WPH e a forma não-hidrolisada. Comparando os efeitos de proteínas do soro de leite com caseína, sendo ambos na forma nativa e WPH, Morifuji et al. (2010) observaram que níveis plasmáticos de aminoácidos totais foram maiores entre 10 e 45 minutos quando a proteína consumida foi WPH. Entretanto, esse nível foi significativamente menor aos 90 minutos, em relação à proteína íntegra. Esse mesmo parâmetro foi significativamente maior no grupo com proteínas do soro de leite, comparado a proteínas da soja. Os níveis de BCAAs também foram maiores com as proteínas do soro de leite. As concentrações plasmáticas de Thr, Arg, Met, Val, Ile, Leu foram significativamente maiores para indivíduos suplementados com proteínas do soro de leite (ESLAMI et al., 2009). Os autores concluem que a suplementação com proteínas do soro de leite após uma sessão de exercício de força não apenas compensou a queda dos níveis plasmáticos de aminoácidos, como aumentou seus níveis.

Contrário aos resultados desse presente trabalho, a fenilalanina apresentou concentração arterial maior a partir da ingestão de proteínas do soro de leite, seja antes ou depois do exercício (TIPTON et al., 2007). Dideriksen et al. (2011) encontraram que a ingestão de proteínas do soro de leite significativamente aumentou os níveis de leucina plasmática, aminoácidos essenciais e aminoácidos totais, em 30 e 60 minutos após ingestão, quando comparado ao consumo de caseinato antes e após sessão de exercício de força em idosos. No entanto, aos 150 minutos, esses valores igualaram-se aos grupos alimentados com caseína. Similar, os níveis de leucina e aminoácidos essenciais foram significativamente maiores para as proteínas do soro de leite até 120 minutos, do que caseína e caseína hidrolisada (PENNINGIS et al., 2011), também em idosos.

Quanto ao exercício, e concordante com alguns resultados deste presente trabalho, Morifuji, Sakai e Sugiura (2005) observaram que animais treinados apresentaram níveis séricos de Asn, Gln, Hys, Pro, Thr, Tyr, Ile, Leu e Val significativamente maiores que os animais sedentários, em ambos os grupos alimentados com caseína. Eslami et al. (2009) encontraram que após uma hora de exercício de força os níveis de treonina foram elevados.

4.14 PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIVRES MUSCULARES

A análise de aminoácidos livres no músculo demonstrou uma grande influência da dieta e do condicionamento físico, conforme tabela 11. Dos 22 aminoácidos analisados, 18 apresentaram efeito da dieta, com destaque para a superioridade das proteínas do soro de leite. Alguns aminoácidos comportaram-se de maneira similar e foram agrupados conforme tabelas 12 e 13. Os animais alimentados com WPH apresentaram níveis significativamente maiores de 16 aminoácidos (Trp, Phe, Leu, Ile, Cys, Met, Val, Tyr, Pro, Ala, Tau, His, Gly, Ser, Asn, Asp), em relação à caseína. Desses, 10 são também estatisticamente mais elevados que as proteínas do soro de leite concentradas (Leu, Ile, Met, Val, Tyr, Pro, His, Gly, Asn, Asp). Nota-se que os BCAAs estavam presentes em concentração superiores nos soros de animais alimentados com WPH e WPC, de forma que é provável que as proteínas do soro de leite, sendo fontes de BCAAs, tenham propiciado maior acúmulo desses aminoácidos no músculo, que são os mais prontamente utilizados em situações de proteólise, como o momento do exercício. O triptofano que foi o único aminoácido a ter a concentração sérica influenciada pela dieta, com maiores níveis para os animais alimentados com as proteínas do soro de leite, também apresentou comportamento similar no músculo. As proteínas do soro de leite são fonte de cisteína (SGARBIERI, 2004), o que justifica seu maior nível no músculo, na forma livre. Embora não apresentados na tabela 12, hidroliprolina e arginina também apresentaram interferência da dieta. Em ambos, a dieta com caseína propiciou significativamente maiores níveis musculares, quando comparado com o WPC. No entanto, apenas para hidroxiprolina essa diferença foi estatística também em relação ao WPH. Ácido glutâmico, glutamina, treonina e lisina não apresentaram mudança significativa por ação da dieta.

Os níveis de aminoácidos livres no músculo apresentaram grandes variações pelo efeito do treinamento e/ou da exaustão, sendo que alguns se portaram de maneira semelhante e foram agrupados na tabela 13. Os animais TX apresentaram maiores níveis séricos de 15 dos 22 aminoácidos livres analisados, sendo a diferença significativa para nove (Trp, Leu, Ile, Val, Tyr, Pro, Ser, Asn, Asp), em relação aos grupos treinados. Comparando-se aos grupos SX, os animais TX foram estatisticamente mais concentrados em seis aminoácidos (Lys, Trp, Leu, Tyr, Glu e Asp). Ainda, seis aminoácidos (Phe, Val, Tyr, His, Glu e Asp) apresentaram níveis séricos significativamente maiores para os

Tabela 11. Concentração dos aminoácidos livres musculares (μMol/kg)

		Asp	Glu	HPro	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Tau	Thr
CAS	S	27,2 ^{Cc} ± 0,4	1237,7 ^c ± 58,6	285,0 ^{Aa} ± 1,5	246,7 ^{Bb} ± 14,9	886,9 ^{Bb} ± 51,9	3813,3 ^a ± 257,3	4300,5 ^B ± 116,8	261,0 ^{Bb} ± 4,8	8893,7 ^A ± 611,7	9866,2 ^{Ba} ± 366,8	6414,4 ± 52,0
	SX	143,8 ^{Cb} ± 7,5	1181,2 ^{bc} ± 6,8	213,4 ^{Ab} ± 7,6	232,0 ^{Bab} ± 6,7	932,0 ^{Bab} ± 9,5	3123,4 ^b ± 6,8	4706,4 ^B ± 13,3	295,4 ^{Ba} ± 6,4	8267,7 ^A ± 8,0	9454,1 ^{Ba} ± 5,7	6175,9 ± 8,4
	T	102,3 ^{Cb} ± 11,6	1450,9 ^{ab} ± 16,1	305,3 ^{Aa} ± 26,0	236,4 ^{Bb} ± 38,9	810,8 ^{Bb} ± 26,6	3836,6 ^a ± 84,2	4968,0 ^B ± 163,4	249,1 ^{Ba} ± 21,1	9795,4 ^A ± 106,3	9962,7 ^{Bab} ± 657,3	3368,2 ± 2768,6
	TX	1442,3 ^{Ca} ± 607,5	868,7 ^a ± 81,4	238,9 ^{Ab} ± 4,5	271,6 ^{Ba} ± 37,8	931,2 ^{Ba} ± 55,1	3560,0 ^{ab} ± 451,2	4620,3 ^B ± 435,1	301,1 ^{Ba} ± 50,2	9356,8 ^A ± 803,8	9897,0 ^{Bb} ± 136,9	6619,4 ± 179,1
WPC	S	375,0 ^{Bc} ± 10,0	1054,0 ^c ± 26,9	321,3 ^{Ba} ± 4,5	259,4 ^{Bb} ± 30,1	1053,0 ^{Ab} ± 166,6	4147,1 ^a ± 206,6	4846,6 ^B ± 133,8	172,3 ^{Bb} ± 8,3	7907,8 ^B ± 739,4	10854,5 ^{ABa} ± 534,2	7037,9 ± 558,3
	SX	642,8 ^{Bb} ± 24,9	1066,4 ^{bc} ± 71,2	164,2 ^{Bb} ± 14,8	244,6 ^{Bab} ± 27,9	1143,8 ^{Aab} ± 249,4	3589,1 ^b ± 259,3	4688,1 ^B ± 288,4	242,9 ^{Ba} ± 5,2	8505,0 ^B ± 473,0	10336,1 ^{ABa} ± 50,8	6162,4 ± 219,3
	T	664,2 ^{Bb} ± 29,0	1257,2 ^{ab} ± 4,1	211,8 ^{Ba} ± 21,9	212,8 ^{Bb} ± 2,5	1067,3 ^{Ab} ± 158,6	3992,0 ^a ± 474,5	4761,6 ^B ± 344,8	312,6 ^{Ba} ± 55,1	7462,3 ^B ± 12,4	10209,5 ^{ABab} ± 432,3	6529,7 ± 172,9
	TX	2749,6 ^{Ba} ± 271,9	1623,5 ^a ± 233,2	181,1 ^{Bb} ± 15,6	327,9 ^{Ba} ± 2,4	1665,0 ^{Aa} ± 357,1	3657,3 ^{ab} ± 208,6	4754,4 ^B ± 189,8	385,6 ^{Ba} ± 0,9	7851,9 ^B ± 816,9	9346,7 ^{ABb} ± 331,2	7137,3 ± 522,9
WPH	S	748,5 ^{Ac} ± 1,7	1077,2 ^c ± 176,4	224,0 ^{Ba} ± 3,8	263,8 ^{Ab} ± 26,9	1182,6 ^{Ab} ± 67,8	3741,5 ^a ± 146,5	4887,2 ^A ± 443,8	289,6 ^{Ab} ± 50,4	8082,3 ^{AB} ± 107,0	10371,7 ^{Aa} ± 268,4	6511,2 ± 141,8
	SX	2187,5 ^{Ab} ± 35,5	1213,7 ^{bc} ± 75,2	198,8 ^{Bb} ± 8,4	354,4 ^{Aab} ± 27,2	1357,6 ^{Aab} ± 160,4	3200,9 ^b ± 186,6	4711,0 ^A ± 174,4	381,2 ^{Aa} ± 24,0	7837,6 ^{AB} ± 107,0	11244,8 ^{Aa} ± 512,9	6414,8 ± 373,6
	T	1891,3 ^{Ab} ± 177,3	1242,6 ^{ab} ± 58,1	279,2 ^{Ba} ± 35,9	339,7 ^{Ab} ± 45,4	1363,0 ^{Ab} ± 142,2	3942,5 ^a ± 35,9	5490,4 ^A ± 191,3	377,1 ^{Aa} ± 45,1	9022,4 ^{AB} ± 228,1	10705,8 ^{Aab} ± 152,4	6511,6 ± 121,2
	TX	3073,6 ^{Aa} ± 32,5	1592,6 ^a ± 121,7	232,0 ^{Bb} ± 4,0	375,2 ^{Aa} ± 39,5	1711,4 ^{Aa} ± 163,8	3261,1 ^{ab} ± 223,7	5916,2 ^A ± 310,7	373,9 ^{Aa} ± 23,6	8895,3 ^{AB} ± 634,8	9717,0 ^{Ab} ± 176,2	7426,3 ± 373,3

Médias dos níveis de aminoácidos livres musculares ± erro padrão (n = 2). Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas e letras maiúsculas referem-se à diferença entre as dietas. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Cont. Tabela 11. Concentração dos aminoácidos livres musculares ($\mu\text{Mol/kg}$)

		Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Trp	Lys
CAS	S	3944,8 ^B ± 308,6	318,1 ^{Bc} ± 18,9	28,8 ^{Cc} ± 8,3	140,5 ^{Cc} ± 11,6	16,1 ^{Cb} ± 0,1	25,4 ^B ± 1,7	178,5 ^{Bb} ± 14,5	175,6 ^{Bb} ± 20,8	55,4 ^{Bb} ± 1,0	15,3 ^{Bb} ± 0,1	1314,9 ^{ab} ± 54,6
	SX	3504,9 ^B ±11,2	279,5 ^{Bab} ± 8,7	61,0 ^{Cbc} ± 5,5	158,8 ^{Cab} ± 8,5	31,9 ^{Cab} ± 6,7	29,4 ^B ± 4,2	58,6 ^{Bab} ± 7,6	193,7 ^{Bb} ± 7,6	82,1 ^{Ba} ± 6,1	29,0 ^{Bb} ± 4,9	930,0 ^b ± 6,8
	T	3539,6 ^B ± 655,4	347,7 ^{Bbc} ± 30,4	72,0 ^{Cb} ± 2,1	131,6 ^{Cb} ± 1,3	18,2 ^{Cab} ± 0,7	36,2 ^B ± 6,1	26,8 ^{Bb} ± 3,2	122,9 ^{Bb} ± 7,3	144,0 ^{Ba} ± 103,1	22,3 ^{Bb} ± 1,6	1167,0 ^{ab} ± 134,0
	TX	2750,3 ^B ± 432,5	232,1 ^{Ba} ± 9,7	64,9 ^{Ca} ± 5,1	223,5 ^{Ca} ± 23,9	55,2 ^{Ca} ± 10,1	35,9 ^B ± 3,1	90,5 ^{Ba} ± 7,4	201,2 ^{Ba} ± 0,6	108,0 ^{Ba} ± 7,3	43,9 ^{Ba} ± 5,4	1129,8 ^a ± 4,2
WPC	S	4045,2 ^{AB} ± 30,2	295,7 ^{Bc} ± 35,0	73,2 ^{Bc} ± 16,4	148,4 ^{Bc} ±18,4	31,5 ^{Bb} ± 2,1	44,5 ^{AB} ± 2,5	47,0 ^{Bb} ± 2,6	147,5 ^{Bb} ± 5,0	76,9 ^{Ab} ± 9,0	22,9 ^{Ab} ± 0,7	1234,0 ^{ab} ± 321,1
	SX	3884,2 ^{AB} ± 558,5	349,8 ^{Bab} ± 65,5	48,2 ^{Bbc} ± 5,2	228,8 ^{Bab} ± 40,1	102,6 ^{Bab} ± 52,8	36,7 ^{AB} ± 7,4	119,6 ^{Bab} ± 42,5	196,5 ^{Bb} ± 7,1	175,9 ^{Aa} ± 71,7	41,2 ^{Ab} ± 5,6	821,1 ^b ± 13,9
	T	2816,7 ^{AB} ± 397,8	233,2 ^{Bbc} ± 17,8	112,3 ^{Bb} ± 30,8	234,2 ^{Bb} ± 12,3	67,9 ^{Bab} ± 2,2	37,6 ^{AB} ± 5,2	97,2 ^{Bb} ± 9,3	263,4 ^{Bb} ± 30,5	204,7 ^{Aa} ± 89,4	43,3 ^{Ab} ± 18,5	1119,8 ^{ab} ± 83,2
	TX	4604,4 ^{AB} ± 716,6	424,8 ^{Ba} ± 24,9	164,8 ^{Ba} ± 11,2	333,9 ^{Ba} ± 54,6	157,6 ^{Ba} ± 21,7	39,6 ^{AB} ± 0,6	222,7 ^{Ba} ± 3,8	482,4 ^{Ba} ± 30,4	236,8 ^{Aa} ± 13,2	78,5 ^{Aa} ± 20,4	1743,4 ^a ± 138,8
WPH	S	3592,9 ^A ± 86,3	297,5 ^{Ac} ± 23,5	88,1 ^{Ac} ± 10,1	294,3 ^{Ac} ± 13,0	157,0 ^{Ab} ± 34,0	32,9 ^A ± 4,1	235,7 ^{Ab} ± 24,2	476,5 ^{Ab} ± 121,9	156,9 ^{Ab} ± 3,6	44,9 ^{Ab} ± 9,8	585,2 ^{ab} ± 484,2
	SX	4602,9 ^A ± 110,4	487,8 ^{Aab} ± 23,1	153,4 ^{Abc} ± 2,0	532,2 ^{Aab} ± 63,9	168,2 ^{Aab} ± 6,7	40,7 ^A ± 2,5	307,3 ^{Aab} ± 53,4	577,9 ^{Ab} ± 43,4	298,8 ^{Aa} ± 29,5	70,5 ^{Ab} ± 2,0	930,5 ^b ± 41,8
	T	4278,5 ^A ± 582,2	444,1 ^{Abc} ± 12,7	158,1 ^{Ab} ± 19,8	491,5 ^{Ab} ± 25,3	200,8 ^{Aab} ± 36,8	48,2 ^A ± 0,9	272,1 ^{Ab} ± 22,5	608,7 ^{Ab} ± 19,2	237,1 ^{Aa} ± 35,6	51,6 ^{Ab} ± 3,2	1410,0 ^{ab} ± 9,5
	TX	4917,5 ^A ± 419,9	611,4 ^{Aa} ± 72,1	214,7 ^{Aa} ± 42,2	526,3 ^{Aa} ± 28,0	163,2 ^{Aa} ± 5,5	60,9 ^A ± 18,8	372,7 ^{Aa} ± 113,9	720,6 ^{Aa} ± 177,1	286,0 ^{Aa} ± 24,9	75,3 ^{Aa} ± 17,5	1004,2 ^a ± 188,7

Médias dos níveis de aminoácidos livres musculares \pm erro padrão ($n = 2$). Letras minúsculas referem-se à diferença entre as atividades físicas e letras maiúsculas referem-se à diferença entre as dietas. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Tabela 12. Agrupamento dos aminoácidos livres musculares conforme efeito da dieta

WPH>WPC>CAS	WPH>WPC≈ CAS	WPH≈WPC>CAS	WPH>CAS*
Met	Leu	Trp	Cys
Val	Ile	Phe	Ala
Tyr	Pro	Ser	Tau
Asp	His		
	Gly		
	Asn		

> maior, com diferença estatística; ≈ sem diferença estatística; * WPC não diferiu estatisticamente dos outros grupos. CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

animais treinados, em relação aos grupos sedentários (não-exaustos). Gly, Arg, Thr, Ala, Cys não demonstraram alteração causada pelo condicionamento físico.

Tabela 13. Agrupamento dos aminoácidos livres musculares conforme efeito do exercício/exaustão

TX > SX ≈ T ≈ S	TX ≈ SX ≈ T > S	TX > T ≈ S*
Trp	Phe	Ile
Leu	His	Ser
		Asn

> maior, com diferença estatística; ≈ sem diferença estatística; * SX não diferiu estatisticamente dos outros grupos. S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Diferente da análise de aminoácidos livres no plasma ou soro, que possui diversos artigos para comparação, a análise de aminoácidos livres musculares parece ser uma análise pouco empregada, dificultando a comparação dos resultados.

Essén-Gustavsson e Blomstrand (2002) também encontraram uma redução significativa de ácido glutâmico livre no músculo de atletas após execução de exercício, comparado com momento antes do exercício. O mesmo ocorreu com fenilalanina e valina, sendo significativo apenas nas fibras do tipo II. Diferente de nossos resultados, o trabalho citado demonstrou aumento significativo dos níveis de tirosina e metionina. Destaca-se, contudo, a diferença de protocolos, uma vez que no trabalho mencionado, foram estudados atletas, com sessão prévia de exercício intenso para reduzir os estoques de glicogênio. Os

níveis de lisina foram significativamente aumentados no músculo *soleus* de ratos que foram permitidos correrem de forma voluntária, em relação a ratos sedentários. Diferentemente, treonina e serina foram reduzidos, embora de modo não significativo (NAGAO et al., 2010). O exercício causou aumento na produção muscular líquida de treonina, lisina e tirosina (VAN HALL; SALTIN; WAGENMAKERS, 1999).

4.15 CORTICOSTERONA SÉRICA

No que se refere aos níveis séricos de corticosterona, não houve diferenças estatísticas, contrário ao previsto. É possível que isso se deva ao pequeno número de amostras/grupo final (n=4) para esse experimento. Todavia, é notável a equivalência dos níveis séricos resultantes do consumo de WPH, o que permite especular sobre um possível efeito redutor dos níveis de corticosterona por ação de WPH. Não foram encontrados, contudo, trabalhos sobre a relação das proteínas do soro de leite e este hormônio, o que limita a discussão.

Tabela 14. Níveis de corticosterona sérica

	Grupos de atividade física			
	S	SX	T	TX
Corticosterona sérica (ng/mL)				
CAS	458,2 ± 47,9	515,2 ± 47,8	347,8 ± 17,2	445,4 ± 55,4
WPC	370,6 ± 50,4	475,2 ± 50,4	427,3 ± 46,9	387,1 ± 48,1
WPH	396,8 ± 66,6	398,8 ± 59,4	387,0 ± 44,4	386,1 ± 52,7

Valores médios de corticosterona sérica ± erro padrão (n = 4). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

A corticosterona é um glicocorticóide produzido por roedores, enquanto em humanos, o hormônio correspondente é o cortisol (CONTARTEZE et al., 2007). Os glicocorticóides, juntamente com as catecolaminas, são os primeiros hormônios liberados em resposta a situações de estresse (MÖSTL; RETTENBACHER; PALME, 2005).

Quanto a efeito de dietas, Markus et al. (2000) encontraram níveis de cortisol da saliva de humanos foram diminuídos diante do consumo de dieta enriquecida com α -lactalbumina, uma importante fração das proteínas do soro de leite, rica em triptofano, diferentemente de Scrutton et al. (2007). Condizente com esse segundo estudo, a ingestão

de proteínas do soro de leite suplementadas junto a diferentes fontes de carboidrato não causou alterações nos níveis de cortisol em indivíduos que treinavam exercício de peso, com relação ao grupo controle (sem suplementação) (KREIDER et al., 2007). Similar, Hoffman et al. (2010) não encontraram diferenças nas concentrações de cortisol com a suplementação de proteínas do soro de leite *versus* placebo (maltodextrina), mediante exercício de força, em humanos.

Testando a suplementação de farelo de aveia em ratos treinados com natação por oito semanas e submetidos à exaustão, Donatto et al. (2010) encontraram resultados em proporção diferente aos obtidos no presente trabalho. Os animais exaustos apresentaram níveis significativamente maiores que os animais sedentários.

Estudando efeito do exercício, De Araujo et al. (2011) encontraram valores significativamente menores de corticosterona para animais em treinamento periodizado linear na 2ª e 3ª medições (na 10ª e 12ª semana), em comparação com animais sedentários. No entanto, na 1ª medição (após seis semanas) a concentração foi maior para o grupo treinado. Resultado similar foi apresentado em relação aos animais sacrificados no início do experimento (*control baseline*). O treinamento prévio impediu o aumento dos níveis de corticosterona em ratos submetidos a estresse agudo (Leandro et al., 2006). Murakami, Hasegawa e Yoshinaga (2011) não encontraram diferenças nos níveis de corticosterona com corrida em esteira, em ratos. Já El Elj et al. (2007) observaram que o treinamento *endurance* aumentou os níveis de corticosterona. Aumento dos níveis desse hormônio após o exercício foi obtido também por Chennaoui et al. (2002).

A mistura de proteínas do soro de leite com a caseína proporcionou a redução dos níveis de cortisol em porcos, inversamente proporcional ao teor das proteínas do soro de leite (LARSON; DONOVAN; POTTER, 1996).

4.16 ÁCIDO ÚRICO SÉRICO

Para tornar a análise de ação antioxidante mais abrangente, optou-se por estudar parâmetros *in vitro* e *in vivo*, sendo este último analisado em nível sérico (ácido úrico) e celular (eritrócito), conforme proposto por Nikolaidis e Jamurtas (2009).

Quanto aos níveis séricos de ácido úrico, este trabalho não demonstrou diferenças significativas, por ação da dieta ou do condicionamento físico, de acordo com a tabela 15. Ressalta-se, contudo, que a grande variação nos valores obtidos para este parâmetro

dificulta sua interpretação e acarreta em uma análise inconclusiva. Embora não significativo, a exaustão causou a elevação dos níveis de ácido úrico sérico, com exceção apenas para o grupo sedentário alimentado com caseína. Não aparentou haver diferenças entre os animais SX e TX.

Os níveis de ácido úrico são indicadores de estresse ou dano oxidativos (TAULER et al., 2006), por ser um potente agente de captura de radicais livres em tecidos humanos e animais (HELLSTEN et al., 1997). Este composto também já foi associado com degradação protéica, pois é resultado do metabolismo de purinas. No entanto, essa função está em desuso e, atualmente, ele tem sido relacionado a proteção antioxidante.

Tabela 15. Níveis de ácido úrico sérico e glutatona reduzida em eritrócitos

	Grupos de atividade física			
	S	SX	T	TX
Ácido úrico sérico (mg/dL)				
CAS	2,52 ± 1,13	1,91 ± 0,17	0,88 ± 0,12	2,10 ± 0,19
WPC	1,11 ± 0,11	1,53 ± 0,32	1,66 ± 1,05	1,75 ± 0,33
WPH	0,43 ± 0,12	1,84 ± 0,33	1,31 ± 0,49	2,08 ± 0,36
Glutathione reduzida em eritrócito (mg GSH %)				
CAS	73,32 ± 4,87	56,08 ± 14,43	67,49 ± 5,42	65,05 ± 13,47
WPC	75,50 ± 5,77	62,91 ± 13,92	74,67 ± 8,20	67,99 ± 11,05
WPH	78,84 ± 5,38	73,66 ± 8,73	73,51 ± 10,17	65,56 ± 9,17

Valores médios ± erro padrão; n = 6 – 7 (ácido úrico); n = 5 (glutathione reduzida). S = sedentários; SX = sedentários-exaustos; T = treinados; TX = treinados-exaustos; CAS = caseína; WPC = proteína do soro de leite concentrada; WPH = proteína do soro de leite hidrolisada. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

O único estudo encontrado para comparação para este parâmetro, a respeito da dieta com proteínas do soro de leite, demonstra que o consumo de proteínas do soro de leite ou de soja por mulheres jovens resulta em níveis similares de ácido úrico sérico (BAZZOLI; HILL; DISILVESTRO, 2002).

Após uma única sessão de exercício, indivíduos não treinados apresentaram níveis de ácido úrico sérico mais elevado, no trabalho de Kaya et al. (2006). Estudando alterações metabólicas oriundas do *endurance*, Lippi et al. (2004) encontrou valores séricos de ácido úrico menores em atletas em comparação a indivíduos sedentários. Após 12 horas da finalização de uma maratona, atletas apresentaram valores significativamente mais baixos, sendo os níveis normalizados até 24 horas (ZBIGNIEW et al., 2010). Concentrações séricas

aumentadas de ácido úrico foram apresentadas por ratos sedentários e ratos treinados, após o treinamento por 10 e 12 semanas. Os autores mencionam que a falta de estudos sobre esse composto dificulta a sua comparação (DE ARAUJO et al., 2011). Como já especulado a partir dos resultados deste presente trabalho, a exaustão aguda causou a elevação das concentrações deste composto em ciclista (NEUMAYR et al., 2003, AGUILÓ et al., 2004; TAULER et al., 2006). No entanto, Antunes-Neto et al. (2006) observaram que os níveis de ácido úrico de ratos foi reduzido, embora não significativamente, até duas horas após a exaustão, elevando-se de modo significativo após 3 horas. Ainda neste trabalho, os autores afirmam que o protocolo de exercício exaustivo realmente elevou o nível de estresse oxidativo detectado entre duas a três horas após exercício para todos os parâmetros analisados. Portanto, é possível que nossa ausência de respostas significativas deva-se à dosagem dos parâmetros logo após realizada a exaustão.

4.17 GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS

Diferente do relatado em alguns estudos, os níveis de glutathione reduzida nos eritrócitos não foram alterados por ação da dieta ou do exercício físico, conforme tabela 15. No entanto, ressalta-se a grande variação obtida entre os animais de um mesmo grupo. Outro fator a se considerar é o baixo número de amostras por grupo (n=5).

É sabido que o exercício induz múltiplas mudanças fisiológicas e bioquímicas no sangue, que podem afetar seu estado redox (NIKOLAIDIS; JAMURTAS, 2009). O maquinário antioxidante da glutathione é um dos mais importantes sistemas de proteção endógena não-enzimática (ELIA et al., 2006), de grande importância para os eritrócitos. O tripeptídeo glutathione (sequência L- γ -glutamyl-L-cisteinyl-glicina) sua forma reduzida (GSH), pode doar elétron e suprimir o radical livre, oxidando-se. Uma vez oxidada, a glutathione forma uma ponte dissulfeto ligando-se com uma segunda molécula de glutathione oxidada, formando glutathione dissulfeto (GSSG) (KENT; HARPER; BOMSER, 2003).

As proteínas do soro de leite têm recebido atenção nos tratamentos médicos pelo seu alto teor de aminoácidos que contém enxofre, tal como cisteína e metionina, que podem melhorar a função imune por meio da conversão intracelular em glutathione (HONGSPRABHAS; KERDCHOUAY; SAKULSOM, 2011). Além disso, as proteínas do soro de leite são ricas no dipeptídeo glutamylcistina (ELIA et al., 2006), que é facilmente

transportado para dentro das células e fica prontamente disponível como substrato para a síntese de glutathiona.

Um resultado similar ao obtido no presente trabalho foi encontrado por Rankin et al (2006), que não observaram influência do tipo de proteína suplementada (proteína do soro de leite versus caseína) sobre as concentrações de glutathiona total em linfócitos e da relação GSH/GSSG em ciclistas.

Em trabalho abordando a glutathiona total e a glutathiona peroxidase, Costa (2010) encontrou que houve aumento significativo apenas o grupo sedentário alimentado com WPI, em relação ao grupo sedentário consumindo dieta formulada com caseína. Já a glutathiona peroxidase não diferiu entre os grupos. Especificamente em relação ao WPH, Kent, Harper e Bomser (2003), observaram um significativo aumento na GSH em células RWPE-1 (linhagem de célula epitelial da próstata humana) a partir do tratamento com WPH, enquanto WPI não demonstrou o mesmo resultado. Os autores sugerem que apenas os peptídeos pequenos e/ou aminoácidos liberados durante a hidrólise foram utilizados para a síntese de GSH.

Haraguchi et al (2010) observaram um aumento no conteúdo de glutathiona total hepática com o consumo de dieta formulada com proteína do soro de leite, em ratos exercitados e sedentários. As proteínas do soro de leite também estimularam a síntese de glutathiona em células PC 12 (TSENG et al., 2006) e sua concentração plasmática em pacientes infectados com o vírus HIV em estado avançado (MICKE; BEEH; BUHL, 2002). Chitapanarux et al. (2009) demonstraram que suplementação com WPI rico em cisteína aumentou a glutathiona plasmática em pacientes com esteatose-hepática não-alcoólica. Os níveis de GSH hepática foram aumentados significativamente a partir da suplementação de diferentes produtos do soro de leite (WPC, WPH e β -lactoglobulina) diante do consumo de dieta indutora de esteatose (HAMAD et al., 2011). Já Aguilar- Aguilar-Nascimento, Silveira e Dock-Nascimento (2011) observaram o aumento em pacientes idosos com acidente vascular cerebral isquêmico, a partir da ingestão de fórmula com base em WPH, comparada a uma fórmula elaborada com hidrolisado de caseína.

Contudo, em experimento testando o efeito de WPI e de proteínas de soja em camundongos treinados (natação), Elia et al. (2006) observaram uma diminuição da relação GSH/GSSG com o consumo de proteínas do soro de leite, contrário ao esperado. Os autores especulam que os animais alimentados com proteínas do soro de leite estavam pré-condicionados a altos níveis de GSH, utilizando preferencialmente esse sistema

antioxidante quando necessário. No entanto, os autores ressaltam que não pode ser excluída a possibilidade da cisteína oriunda das proteínas do soro de leite ter sido usada na síntese de outros compostos antioxidantes contendo grupamento tiol, como N-acetil-L-cisteína, ácido alfa-lipóico e outros.

As proteínas do soro de leite demonstraram a habilidade de elevar os níveis de glutathiona no fígado diante da intoxicação aguda com CCl_4 (BALBIS et al., 2009). Em pacientes com fibrose cística, os níveis de glutathiona também foram aumentados pelo consumo de proteínas do soro de leite (GREY et al., 2003).

4.18 ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* ORAC

A determinação de atividade antioxidante pelo método ORAC foi a análise que permitiu maior comparação com a literatura sobre efeito do WPH, em específico. É provável que a possibilidade da realização da hidrólise sem grandes dificuldades em laboratório (desde que em pequenas quantidades) e, se tratando de uma análise *in vitro*, as publicações de estudos com emprego desse produto são mais numerosas do que em análises experimentais biológicas. No entanto, o fato desse produto ser fabricado em laboratório também dificulta a comparação com nossos resultados obtidos a partir de produto comercial.

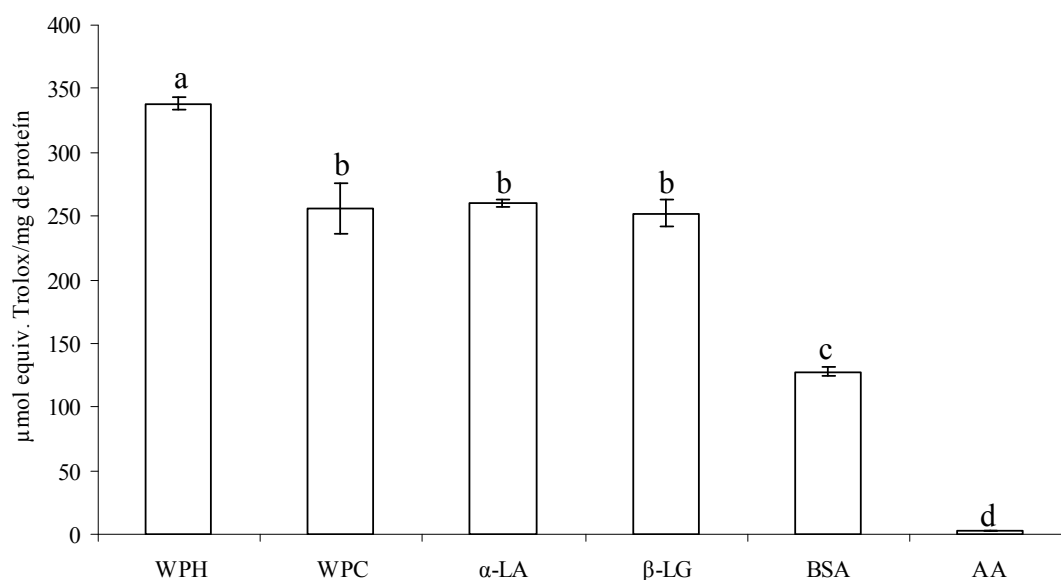


Figura 10. Efeito antioxidante avaliado pelo método ORAC ($n = 3$). WPH = proteína do soro de leite hidrolisada; WPC = proteína do soro de leite concentrada; α -LA: α -lactalbumina; β -LG; β -lactoglobulina; BSA: albumina sérica bovina; AA: ácido ascórbico. ANOVA simples com *post hoc* Duncan.

O WPH se destacou com o melhor resultado para ação antioxidante pelo método ORAC, como visto na figura 10. Este método se baseia na inibição da oxidação induzida por radical peroxil formado pela decomposição do dicloridrato de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) (PRIOR et al., 2003) e se destaca por utilizar uma fonte biologicamente relevante de radicais, além de ser o único método a determinar a ação antioxidante através da combinação de dados de grau de inibição *versus* tempo de inibição (PRIOR et al., 2003), por meio do cálculo da área sob a curva (AUC).

Em concentração idêntica às demais proteínas utilizadas (1 mg/mL), o WPH teve diferença significativa, tanto em relação ao WPC, como das frações constituintes α -lactalbumina, β -lactoglobulina e albumina sérica bovina. Esta última fração foi a que apresentou menor atividade antioxidante, embora ainda superior à do ácido ascórbico na concentração de 25 mg/ml. Fica, então, denotada a superioridade das proteínas do soro de leite, especialmente na sua forma de WPH, no que se refere a ação antioxidante *in vitro*. Contreras et al. (2011) também observaram que um WPC rico em β -lactoglobulina apresentou menor atividade antioxidante (pelo método ORAC-FL) do que os hidrolisados obtidos a partir dele. Similar, Dryáková et al. (2010), observaram por três métodos diferentes (ABTS, TRAP e inibição da peroxidação lipídica em sistema lipossomal) que a atividade antioxidante foi aumentada quando a proteína do soro de leite foi hidrolisada. Resultado idêntico foi encontrado por Hongprabhas, Kerdchouay e Sakulsom (2011). Estudando as proteínas do soro de leite, Peng et al. (2010) também encontraram que o WPH apresenta um efeito antioxidativo superior à forma WPI, seja por uma maior capacidade de captura de radicais livres, por uma melhor habilidade de quelar íons Cu^{2+} ou por melhorar o poder redutor do ferro (FRAP).

Avaliando a atividade antioxidante pelo método ORAC, verificou-se que a hidrólise realizada com a enzima corolase PP resultou em peptídeos de α -lactalbumina e β -lactoglobulina de maior atividade antioxidante dos que os peptídeos originados de hidrólise com pepsina, tripsina, quimotripsina e termolisina (Hernández-Ledesma et al., 2005). Foi observado também, pela separação dos peptídeos de peso molecular menor de 3 kDa, que essas pequenas moléculas são as principais responsáveis pela atividade antioxidante dos hidrolisados, correspondendo a 71% e 85% do total da atividade dos hidrolisados de α -lactalbumina e β -lactoglobulina, respectivamente. A partir da seleção do produto obtido da ultrafiltração do hidrolisado da β -lactoglobulina, sendo este submetido ao HPLC acoplado com espectrometria de massa, foi atribuída a atividade de captura de radicais livres aos

aminoácidos triptofano, tirosina, metionina e histidina, mas não cisteína. Os autores justificam a atividade antioxidante do triptofano e tirosina pela capacidade dos grupos indólicos e fenólicos, respectivamente, de servir como doadores de hidrogênio, enquanto a metionina tende a oxidação para sulfóxido de metionina.

Sadat et al. (2011) também encontraram cinco peptídeos a partir da hidrólise da α -lactalbumina com alta atividade antioxidante pelo método ABTS e todos apresentaram ao menos um resíduo de tirosina ou triptofano.

Embora tenham observado que as proteínas do soro de leite tenham menor poder antioxidante que a caseína, Clausen, Skibsted e Stagsted (2009) corroboram nossos resultados que as frações α -lactalbumina e β -lactoglobulina possuem atividade antioxidante similar. Concordante com o estudo mencionado, Zulueta et al. (2009) também encontraram menor poder antioxidante para as proteínas do soro de leite, em relação à caseína.

Gad et al. (2011) observaram que o consumo do WPC resultou em um aumento significativo da capacidade antioxidante total (TAC) do fígado (medida *in vitro*). O mesmo ocorreu após aplicação de substância hepatotóxica. Sob esta segunda condição, também foi observada um menor formação de malonaldeído, um produto final da peroxidação lipídica. Resultado semelhante ao de Gad et al. (2011) foi obtido por Chitapanarux et al. (2009), os quais também demonstraram que suplementação com WPI rico em cisteína aumentou a capacidade antioxidante total em pacientes com esteatohepatite não-alcoólica, medida pelo método TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox, do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

Peña-Ramos, Xiong e Arteaga (2004) encontraram um curioso resultado em seus experimentos sobre efeito antioxidante das proteínas do soro de leite. Utilizando uma amostra de WPI comercial e três amostras de hidrolisados obtidos experimentalmente a partir do primeiro produto (por diferentes enzimas), além de dois WPH comerciais, encontraram a inibição de TBARS por todas as frações. Chama a atenção que no WPI e seus respectivos hidrolisados, os peptídeos de maior peso molecular (> 45 kDa) apresentaram maior inibição de TBAR, enquanto nos hidrolisados comerciais os melhores resultados foram obtidos nas frações de menor peso molecular (1,5 – 0,35 kDa). Os autores ainda afirmam que a capacidade de retardar a oxidação lipídica foi relacionada à prevalência de histidina e outros aminoácidos hidrofóbicos. Resultado similar encontrado por Peng, Xiong e Kong (2009), mostrando que peptídeos pequenos, de 0,1 a 2,8 kDa, de um WPH obtido após cinco horas de hidrólise com enzima alcalase, mostraram maior ação

antioxidante que as demais frações. Também concordante, Contreras et al. (2011) encontraram que peptídeos de até 3 kDa obtidos a partir um WPC rico em β -lactoglobulina e hidrolisado com corolase PP® ou termolisina, alcançaram mais altas capacidades de captura de radicais livres pelo método ORAC-FL. Os autores afirmam ainda que, sob controladas condições de reação de hidrólise (com temperatura, tempo de reação e razão de enzima para substrato definidas) é possível a produção de um WPH com atividade de captura de radicais tão efetiva quanto do BHA, conhecido antioxidante sintético, amplamente usado em alimentos.

O resultado deste presente trabalho corrobora a atividade antioxidante como uma importante propriedade funcional das proteínas do soro de leite, especialmente na sua forma WPH, coerente com a literatura atual.

4.19 EXPRESSÃO GÊNICA

São poucos os trabalhos que tratam de expressão gênica, mediante ação da dieta com proteínas do soro de leite. Em geral, tratam de temas que envolvem alguma ação protetora contra o câncer ou doenças intestinais, quando não se referem à algum aspecto microbiológico específico, ou à produção de leite. Limitando a busca para exercício ou treinamento físico, encontram-se poucos trabalhos. Refinando-se mais a pesquisa bibliográfica para os genes propostos neste trabalho, foram encontrados apenas sete trabalhos. Destes, quatro abordam o gene da miostatina. Outros dois, os mais recentes, tratam da expressão gênica do PPAR de isoforma γ , a qual não foi estudada neste trabalho. Portanto, podemos afirmar que o presente trabalho é inédito no estudo da expressão dos genes PPAR α e PPAR δ , e não possui outros trabalhos aos quais possa ser relacionado.

4.19.1 Avaliação da expressão do gene PPAR α

Neste trabalho, não houve mudanças na expressão do gene PPAR α , seja por ação da dieta ou do exercício/exaustão, como apresentado na figura 11.

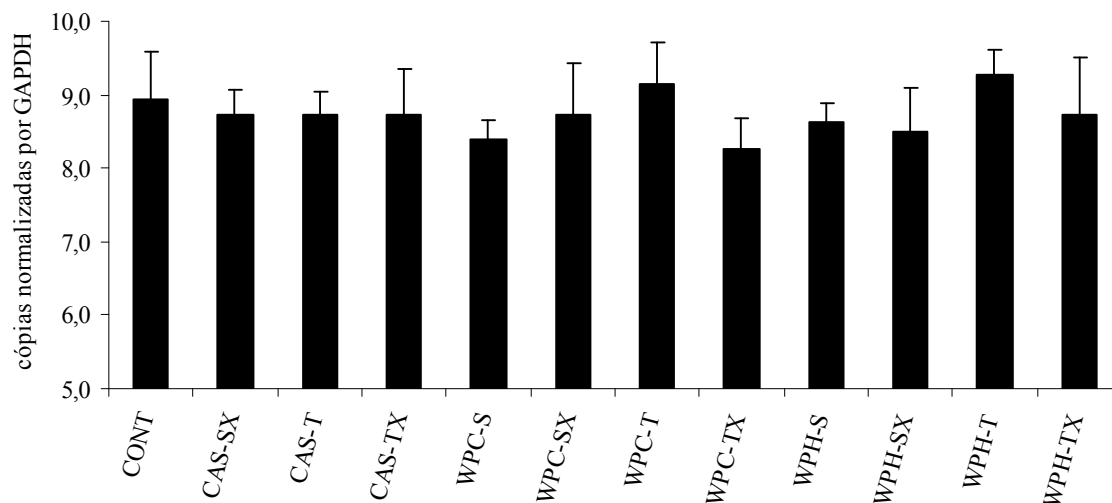


Figura 11. Comparativo da expressão do gene PPAR α no *gastrocnemius* (n = 4). CONT = caseína sedentário, CAS = caseína, WPC = proteína do soro de leite concentrada, WPH = proteína do soro de leite hidrolisada, S = sedentários, SX = sedentários-exaustos, T = treinados, TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Os genes PPARs α e δ estão relacionadas com o aumento a expressão de genes envolvidos no consumo de lipídeos, transporte lipídico entre os órgãos e metabolismo de ácidos graxos (KOULMANN; BIGARD, 2006). O PPAR α é altamente expresso em tecidos com elevada atividade de β -oxidação mitocondrial e peroxissomal (DESERGNE; WAHL, 1999), onde controla a expressão de genes importantes nesse processo metabólico (GULICK et al., 1994; VEGA; HUSS; KELLY, 2000). Em outras palavras, é expresso especialmente em tecidos de metabolismo bastante ativo, como fígado, coração, rim, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (KLIEWER et al., 2001).

Existe um trabalho que compara o efeito de uma dieta elaborada com caseína e de outra formulada com proteína de soja em ratos submetidos ao exercício físico (MORIFUJI; SANBONGI; SUGIURA, 2006), no qual é relatado que tanto o exercício como o consumo de proteínas de soja aumentaram a expressão do gene PPAR α no músculo, sendo que o efeito da proteína de soja foi maior que o da caseína.

Pesquisando o efeito do exercício, Petridou et al. (2007) obtiveram resultado similar ao deste trabalho, pois não observaram diferenças na expressão do gene PPAR α no músculo *gastrocnemius*, em ratos Wistar, após exercício de *endurance* voluntário. O mesmo foi encontrado em estudos com humanos, por Helge et al. (2007), com quatro semanas de treino em *leg press*, por Russell et al. (2005), usando uma única sessão de

exercício em bicicleta ergométrica, e por Tunstall et al. (2002), logo após a uma sessão de exercício também em bicicleta e após nove dias de repetição do mesmo exercício.

Diferentemente, PPAR α se encontrou aumentado (mais de 2,5 vezes) após oito horas de repouso a uma sessão de exercício *endurance*, retornando a valores basais após 24 horas, em humanos (PILEGAARD et al., 2005). Horowitz et al. (2000) encontraram aumento na expressão do gene PPAR α em mulheres também treinadas com exercícios de resistência. O mesmo gene apresentou a sua expressão cerca de 1,6 vezes maior em leucócitos de humanos, após quatro semanas de exercício em esteira de baixa intensidade (YAKEU et al., 2001). Resultado coincidente foi encontrado por Russell et al. (2003), que obtiveram *upregulation* desse gene em homens exercitados (*endurance*) por seis semanas, sendo a expressão maior nas fibras do tipo I (oxidativas), do que no tipo II. O mesmo ocorreu no estudo de Dobrzyn et al. (2010), no qual a expressão de PPAR α foi aumentada pelo exercício de força no músculo *soleus* (predomínio de fibras oxidativas), mas não no músculo *extensor digitorum longus* (predomínio de fibras glicolíticas), de ratos.

A ativação da expressão do gene PPAR α , assim como o δ , no músculo esquelético pode ser um importante mecanismo adaptativo em resposta ao aumento do metabolismo lipídico em animais jovens e magros (KANNISTO et al., 2006).

4.19.2 Avaliação da expressão do gene PPAR δ

Embora pareça haver uma tendência a uma expressão maior nos grupos alimentados com proteínas do soro, especialmente com o hidrolisado, este estudo não demonstrou diferenças estatísticas na expressão do gene PPAR δ , conforme figura 12.

Ao contrário dos PPAR α e PPAR γ que estão presentes abundantemente em poucos tecidos, PPAR δ , também chamado de PPAR β (ESCHER et al., 2001), é a isoforma que se distribui em níveis equivalentes em todos os tecidos (KLIEWER et al., 2001). É o PPAR mais abundante nos músculos esquelético de ratos (MUOIO et al., 2002), justificando, assim, o interesse pelo estudo da expressão desse gene. Carnevali Junior e Lima (2009) destacam que na fase adulta esse gene é onipresente e, principalmente no músculo esquelético, apresenta-se em níveis mais elevados do que as demais isoformas.

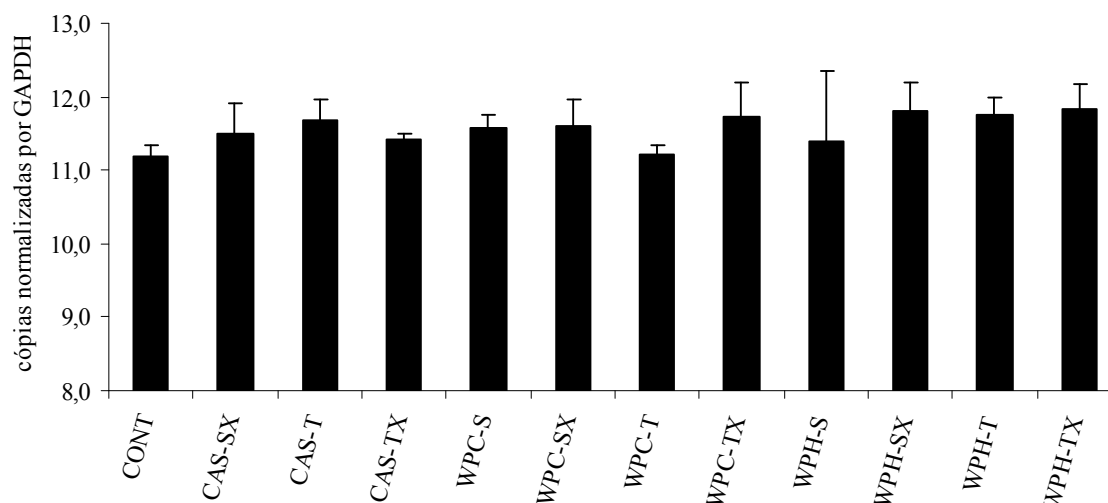


Figura 12. Comparativo da expressão do gene PPAR δ no *gastrocnemius* (n = 4). CONT = caseína sedentário, CAS = caseína, WPC = proteína do soro de leite concentrada, WPH = proteína do soro de leite hidrolisada, S = sedentários, SX = sedentários-exaustos, T = treinados, TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Condizente com nosso resultado, a expressão do gene PPAR δ não foi alterada em ratos geneticamente modificados para obesidade hiperfágica (OLETF, do inglês *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty*), seja entre animais sedentários ou exercitados com *endurance* (MORRIS et al., 2008). Resultado semelhante foi obtido por Petridou et al (2007), a partir do músculo *gastrocnemius*, em ratos Wistar, após exercício voluntário.

Já Dobrzyn et al. (2010) encontraram que a expressão de PPAR δ foi aumentada pelo exercício *endurance* no músculo *soleus* de ratos. Resultado similar foi obtido por Fritz et al (2006), em pacientes com diabetes tipo 2, com exercício de baixa intensidade.

Interessante destacar que o gene PPAR δ teve a expressão aumentada nos músculos *vastus lateralis* após 4 horas do exercício, sem alteração entre imediatamente após exercício e uma hora após (RUSSELL et al., 2005).

Outro aspecto relevante refere-se ao tipo de fibra muscular. Spangenburg et al. (2009) encontraram que os níveis de mRNA PPAR δ foi aumentados no músculo *plantaris* (predominante em fibras glicolíticas), porém reduzido no músculo *soleus* (predominante em fibras oxidativas), após 12 semanas de treinamento, comparado com os animais sedentários.

Stephens et al. (2010) obtiveram uma expressão do gene PPAR δ cerca de 20% maior após sessão de exercício, além de uma forte tendência do conteúdo protéico ser duas vezes maior no músculo *vastus lateralis* de homens.

Mesmo relativo ao gene PPAR γ , o qual não foi estudado neste trabalho, é também interessante mencionar que, em estudo utilizando uma fração altamente bioativa da proteína do soro de leite isolada, mostrou-se uma inibição dose-dependente da expressão protéica de PPAR γ . Neste mesmo estudo, observou-se a inibição da adipogênese *in vitro* e amenização dos efeitos deletérios da dieta com altas concentrações de gordura *in vivo* (RAJIC et al., 2010). Eller e Reimer (2010) também encontraram *downregulation* do gene PPAR γ para as proteínas do soro de leite em relação à caseína.

4.19.3 Avaliação da expressão do gene PGC 1 α

Na presente pesquisa, não foi possível detectar um aumento na expressão do gene PGC 1 α , seja pela ação da dieta ou do exercício. Os dados são apresentados na figura 13.

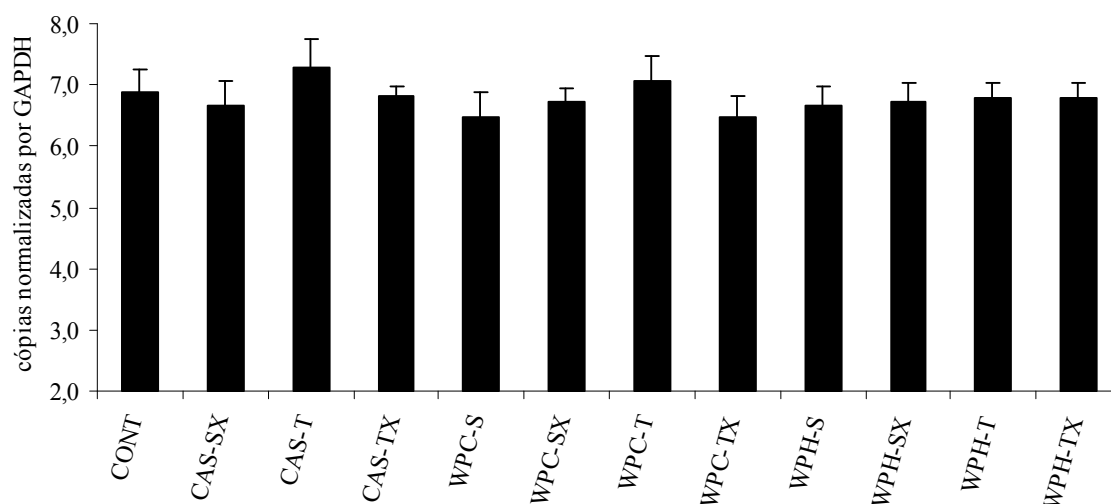


Figura 13. Comparativo da expressão do gene PGC 1 α no *gastrocnemius* (n = 4). CONT = caseína sedentário, CAS = caseína, WPC = proteína do soro de leite concentrada, WPH = proteína do soro de leite hidrolisada, S = sedentários, SX = sedentários-exaustos, T = treinados, TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Esse gene é considerado como um medidor da capacidade oxidativa, sendo sua expressão aumentada relacionada ao aumento na expressão do gene AMPK e na biogênese mitocondrial (TERADA et al., 2002). Este gene é capaz de induzir a substituição de cerca de 10% de fibras do tipo rápida para lenta (LIN et al., 2002), sendo o seu conteúdo protéico maior em músculo com maior quantidade de fibras tipo I, do que de fibras tipo II.

Do único trabalho encontrado na literatura utilizando a expressão deste biomarcador, com relação à presença das proteínas do leite na dieta, não foi possível extrair resultados para comparação (SIDDIQUI et al., 2008). Esses autores encontraram que a expressão do gene PGC 1 α é aumentada no músculo *gastrocnemius* de animais alimentados com altas quantidades de proteínas do soro de leite, cálcio e vitamina D; contra outra dieta com baixos níveis desses nutrientes, tanto com altos teores de lipídeos ou de carboidratos.

Quanto ao exercício, Terada et al. (2002) encontraram que exercício agudo (natação) aumentou os níveis de mRNA do PGC 1 α no músculo *epitrochlearis* de ratos. Russell et al. (2003) obtiveram *upregulation* desse gene em homens em treinamento *endurance* por 6 semanas. Confirmando os achados de expressão aumentada desse gene, Laye et al. (2009) demonstraram uma redução da expressão do gene PGC 1 α no músculo, após diminuição da rotina diária de exercício físico.

Goto et al. (2000) utilizaram a natação como exercício durante três ou sete dias (2 horas/dia) e demonstraram um efeito de *upregulation* apenas no músculo *epitrochlearis*, sem demonstrar essa alteração no músculo *soleus*, justificada pelo baixo recrutamento do músculo *soleus* na execução do exercício, embora sem ponderar as diferenças provenientes do tipo de fibra muscular. Resultado similar foi obtido por Koves et al. (2005), os quais encontraram que o exercício em esteira aumentou a expressão desse gene em 4,5 vezes mais no músculo *soleus* (vermelho), do que nos músculos *gastrocnemius* (misto) e *extensor digitorum longus* (predominante branco). Já a isoforma PGC 1 β foi mais abundante no músculo com predominância de fibras brancas (tipo I). Essa segunda isoforma teve sua expressão aumentada aproximadamente duas vezes após exercício de baixa intensidade (esteira), analisado em leucócitos humanos (YAKEU et al., 2010).

Pilegaard, Saltin e Neufer (2003), em estudo com exercício de peso, encontraram um pico de expressão cerca de duas horas após exercício. Já Leick et al. (2010), observaram que a expressão de PGC 1 α foi maior após 18 horas de única sessão de exercício em bicicleta ergométrica. Russell et al. (2005), contudo, encontraram que o nível de mRNA de PGC 1 α foi aumentado significativamente 4,8 vezes, imediatamente pós-exercício e continuou elevando até 12 vezes, 1 hora após exercício. No entanto, após quatro horas do exercício, a expressão deste gene já havia retornado a níveis próximos ao logo após a sessão de exercício. Os mesmos autores sugerem que o exercício induz sinais que estimulam a biogênese mitocondrial muscular, a partir da contração do músculo esquelético, independente, entretanto, de sinais oriundos da mudança dos ácidos graxos circulantes.

Está de acordo com os nossos resultados, entretanto, um estudo crônico, com pacientes com síndrome metabólica, conduzido por Fatone et al (2010), no qual não foram observadas mudanças na expressão do gene PGC 1 α em resposta à combinação de exercícios de força e *endurance*, com frequência de duas vezes por semana, durante 6 e 12 meses.

4.19.4 Avaliação da expressão do gene CPT 1 β

Apesar de nenhuma diferença significativa entre os grupos de diferentes dietas e condições físicas, a exaustão parece ter reduzido a expressão gênica de CPT 1 β , enzima que é considerada uma etapa limitante da β -oxidação. Os resultados são apresentados na figura 14.

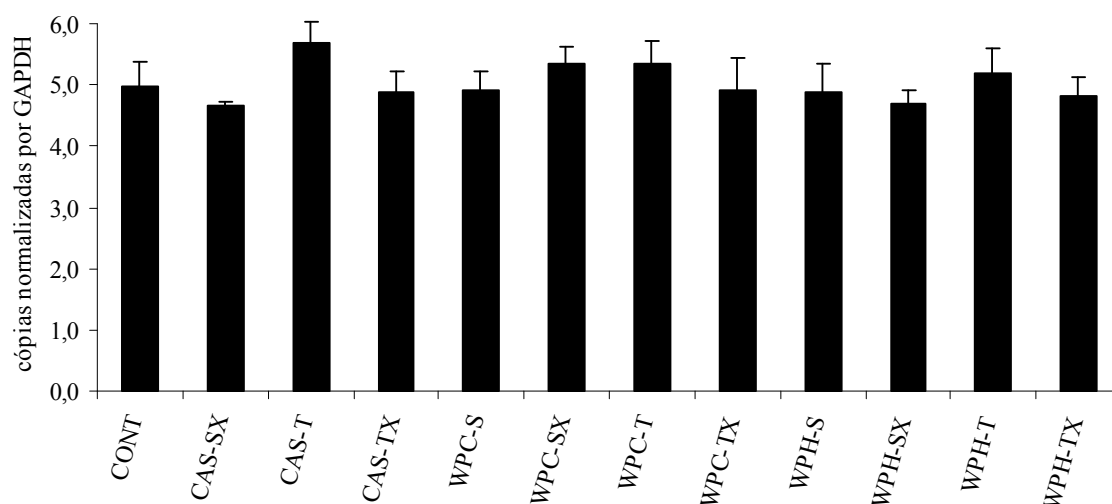


Figura 14. Comparativo da expressão do gene CPT 1 β no *gastrocnemius* (n = 4). CONT = caseína sedentário, CAS = caseína, WPC = proteína do soro de leite concentrada, WPH = proteína do soro de leite hidrolisada, S = sedentários, SX = sedentários-exaustos, T = treinados, TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Segundo Bruce et al. (2007), a expressão elevada do gene CPT 1 e consequente *upregulation* da oxidação da ácidos graxos levam a uma redução no estoque de triacilgliceróis no músculo. Seguindo este raciocínio, pode-se pensar que a exaustão favorece a utilização de outros substratos, que não os triacilgliceróis musculares.

Siddiqui et al (2008) também não encontraram diferença na expressão deste gene em músculo *gastrocnemius* de animais alimentados com baixas quantidades de proteínas do

soro de leite, cálcio e vitamina D. No entanto, utilizando dietas ricas em gorduras e com proteínas do soro de leite e altos níveis de cálcio, Pilvi et al. (2008) encontraram *downregulation* do gene CPT 1 α no tecido adiposo de camundongos obesos da linhagem C57Bl/6J. Nesse mesmo trabalho, utilizando a técnica de microarranjo, a leptina e as vias de sinalização da insulina e adipocitocina tiveram expressão aumentada, enquanto a via do metabolismo dos ácidos graxos foi reprimida. Junto aos resultados de menor peso e gordura corporal dos animais alimentados com proteínas do soro de leite, os autores propõem que as proteínas do soro de leite junto com a suplementação de cálcio não só inibiu o acúmulo de gordura da dieta rica nesse ingrediente, mas também modulou significativamente a expressão gênica no tecido adiposo visceral.

O consumo de proteínas de soja associado à prática de exercício físico aumentou a expressão do gene CPT 1 no músculo (MORIFUJI; SANBONGI; SUGIURA, 2006).

Tunstall et al. (2002) já afirmaram que o impacto do treinamento físico na expressão de proteínas mitocondriais geneticamente codificadas é altamente variável. Fatone et al (2010) observaram que a combinação de exercícios de força e *endurance*, com frequência de 2 vezes por semana, não foi suficiente para elevar a expressão de CPT 1 em indivíduos com diabetes tipo 2.

Pilegaard et al (2005) encontraram que a transcrição de CPT 1 estava aumentada em humanos (no músculo *vastus lateralis*), durante a recuperação da sessão de exercício tipo *endurance*, obtendo valores mais elevados (aproximadamente 2,2 vezes maior) duas horas após exercício quando em dieta com alto teor de carboidratos e 8 horas após exercício (aproximadamente 2,9 vezes maior), em dieta com baixa quantidade de carboidratos. Tunstall et al. (2002), contudo, observaram que a expressão de CPT 1 não foi alterada pré-exercício, seguido a uma única sessão e após 3 horas desta única sessão. No entanto, após 9 dias de repetição do exercício em bicicleta ergométrica, houve um *upregulation* deste gene em todos os 3 momentos. Os autores ainda propõem que a capacidade aumentada de oxidação de ácidos graxos induzida pelo treinamento é mais associada com genes envolvidos na regulação do consumo de ácidos graxos através da membrana plasmática e mitocondrial, bem como que o aumento da disponibilidade de CPT 1 representa o ponto-chave para a regulação adaptativa da capacidade da β -oxidação, proporcionada pelo treinamento.

Laye et al. (2009), estudando sobre o efeito da redução da frequência de exercício físico em ratos, mostraram que a atividade da enzima CPT 1 foi diminuída em cerca de

40%, sugerindo que a regulação do CPT 1 pelo malonil CoA, acentuada pelo exercício, é rapidamente perdida se a atividade física diária não for mantida.

4.19.5 Avaliação da expressão do gene miostatina

Assim como os demais genes estudados nesta pesquisa, não foi encontrada diferença na expressão do gene da miostatina (figura 15).

Miostatina é membro da superfamília TGF- β (LÓPEZ-SORIANO et al., 2006) produzida pelo músculo. Ela atua como regulador negativo do crescimento muscular (ARGILÉS et al., 2005).

Nosso resultado é similar ao obtido por Siddiqui et al (2008), estudando a expressão desse gene também no músculo *gastrocnemius*, em animais não exercitados alimentados com dieta com altos níveis de proteínas do soro de leite, cálcio e vitamina D, tanto com altos teores de lipídeos ou de carboidratos.

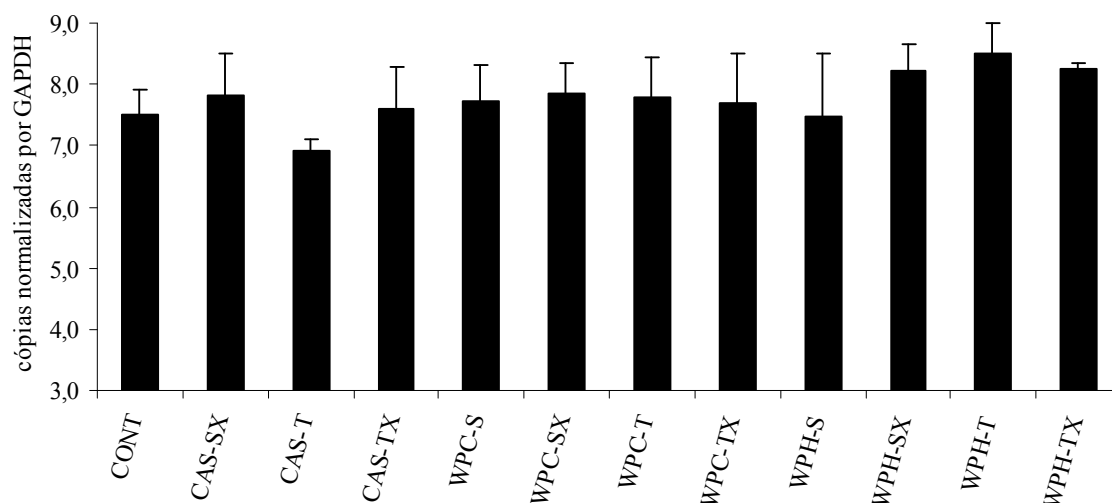


Figura 15. Comparativo da expressão do gene miostatina no *gastrocnemius* (n = 4). CONT = caseína sedentário, CAS = caseína, WPC = proteína do soro de leite concentrada, WPH = proteína do soro de leite hidrolisada, S = sedentários, SX = sedentários-exaustos, T = treinados, TX = treinados-exaustos. ANOVA multivariada de duas vias com *post hoc* Duncan.

Hulmi et al. (2008) encontraram que a ingestão de proteínas do soro de leite preveniu a diminuição da expressão gênica da miostatina, encontrada sem a suplementação protéica, depois de sessão de exercício de força, em idosos treinados. Os autores especulam seus resultados utilizando o argumento proposto por Guernec, Chevalier e Duclos (2004),

de que a diminuição na miostatina poderia ser um mecanismo protetor contra o definhamiento muscular. Esse possível mecanismo protetor poderia não ser necessário quando a proteína é ingerida, visto que o consumo das proteínas do soro de leite aumenta o balanço protéico muscular (TIPTON et al., 2007). O mesmo grupo de pesquisadores (HULMI et al., 2009a) encontrou resultado similar na expressão gênica da miostatina em jovens. Estudando, então, se a expressão protéica seguiria a mesma trajetória da expressão gênica da miostatina, também em jovens, novamente não observaram a redução da expressão da miostatina no grupo alimentado com proteínas do soro de leite, encontrada no grupo placebo (HULMI et al., 2009b). Além de sugerir que a miostatina seja regulada transcricionalmente, os autores questionam se isso poderia ter impedido a maior hipertrofia no grupo alimentado com proteínas do soro de leite, visto que este grupo apresentou aumento na expressão protéica de mTOR. A via da mTOR é oposta à da sinalização da miostatina, sendo que esta última pode inibir a via de sinalização da mTOR (AMIROUCHE et al., 2009).

Matsakas et al. (2005) encontraram redução na expressão da miostatina em ratos submetidos a natação durante 5 dias. Essa diferença, contudo, foi observada nos músculos *gastrocnemius* e *vastus lateralis*, não havendo distinção no músculo *soleus* (predominância de fibras tipo I).

A partir deste presente trabalho, conclui-se que, tanto a dieta quanto o exercício, não mostraram efeito na expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico e protéico. Vários fatores podem ter sido responsáveis por este desfecho, não coincidente com resultados obtidos com outros biomarcadores e parâmetros metabólicos obtidos em outros experimentos do nosso grupo de pesquisas. Dentre eles, podemos destacar o tempo pós-exercício no qual os tecidos foram extraídos para efetuar as análises. O sacrifício dos animais ocorreu logo após treinamento ou exaustão (para os grupos sedentários-exaustos, treinados e treinados-exaustos), sendo que a ausência de diferenças na expressão gênica tenha sido oriunda da inadequação no horário de medição desses genes.

Segundo alguns pesquisadores, porém, a ativação transcricional primeiramente acontece nas horas iniciais de recuperação para muitos genes, retornando a níveis basais por volta de 24h depois do exercício (PILEGAARD et al., 2002). Mahoney et al. (2005) encontraram *upregulation* dos genes PPAR α , PPAR δ e PGC 1 α após 3 horas de exercício em bicicleta, o que não foi observado após 24 horas de repouso. Já Tarada et al. (2002) sugerem que a expressão do gene PGC 1 α possa ocorrer várias horas após o estímulo.

Segundo Carnevali Junior e Lima (2009) para o aumento na expressão do PPAR α e CPT 1 pode ser necessário um período longo de treinamento. Vê-se, portanto, que não há consenso sobre o momento para a dosagem do mRNA, assim como não temos um tempo padrão para todos os genes.

Outra possível explicação se refere ao tipo de fibras presente no músculo estudado. Em humanos, PPAR α , PPAR δ e PGC 1 α foram correlacionados com o conteúdo de fibras oxidativas ou tipo I (KRÄMER et al., 2006). Resultado idêntico pode ser visto no trabalho de Dobrzyn et al. (2010). Neste trabalho foi usado o músculo *gastrocnemius* por ser um músculo que apresenta equilíbrio na quantidade de fibras de contração lenta e de contração rápida (KOVES et al., 2005), além da ampla utilização em experimentos, observada na literatura consultada previamente.

Ainda, é possível que outras isoformas dos genes estudados possam ter respostas distintas seja à dieta ou ao exercício, como sugerido por Baar (2004) a respeito de outros membros da família PGC 1.

Independente das considerações acima é ainda possível questionar se os animais realmente alcançaram a exaustão. Embora exista uma definição tempo de exaustão como o momento em que o animal não consiga sair do choque elétrico constante durante 30 segundos, esta definição é dependente de um funcionamento pleno do equipamento, o que não correspondeu à realidade da execução deste projeto. Por mais fracos que os choques utilizados sejam, estes estímulos são indispensáveis para que o animal fique exaurido. Quando esses estímulos não acontecem (como, no caso, de espaços muito largos entre eletrodos) abre-se a possibilidade de que o animal pare de correr ao primeiro cansaço. No entanto, ressalta-se que cuidados para minimizar as chances do animal não entrarem em exaustão foram realizados.

5 CONCLUSÕES

Os dados relatados neste trabalho apontam para poucas diferenças entre uma dieta formulada com proteínas do soro de leite bovino e outra elaborada com as mesmas proteínas hidrolisadas por processo enzimático. As principais diferenças observadas nos indicadores bioquímicos foram talvez provocadas mais pelo exercício, do que pela dieta.

No que se refere aos efeitos da dieta, a enzima sérica ALT, e não a AST, mostrou-se reduzida com o consumo das proteínas do soro de leite, tanto inteiras, quanto hidrolisadas, com relação à caseína. Por sua vez, o triptofano circulante foi o aminoácido livre que aumentou significativamente diante do consumo de proteínas do soro. Dezesseis foram os aminoácidos musculares livres que sofreram influência da dieta, sendo que houve uma tendência de se apresentarem em maior concentração nos animais que consumiram o hidrolisado, do que naqueles que consumiram a caseína. O consumo do hidrolisado promoveu o aparecimento de dez desses aminoácidos em concentrações maiores do que nos animais que consumiram a proteína concentrada do soro. Os demais indicadores não mostraram influência produzida pela dieta. Contudo, o WPH, enquanto matéria-prima, apresentou atividade antioxidante *in vitro* expressivamente superior ao do seu controle, o concentrado de proteínas do soro de leite, além de α -lactalbumina e a β -lactoglobulina.

O treinamento mostrou ser um fator de aprimoramento da condição física do animal, por quanto houve um aumento significativo nos tempos de exaustão dos animais treinados-exaustos, embora não com relação à dieta.

O exercício físico contínuo e a exaustão influenciaram o resultado de diversas análises. A temperatura muscular foi um parâmetro que mostrou aumento em relação ao exercício físico e a exaustão. Já no músculo, os animais TX apresentaram níveis superiores em 15 aminoácidos livres musculares, em relação aos animais sedentários. O treinamento físico aumentou os níveis de NEFA séricos, enquanto a exaustão os diminuiu. Em oposição, a ALT foi reduzida pelo treinamento e aumentada pela exaustão. A exaustão causou a redução dos níveis de TAG séricos. Entretanto, esta variável elevou os níveis de nove aminoácidos séricos, entre eles os BCAAs, Ala e Gln.

Em suma, estas observações sugerem que as avaliações da resposta orgânica do rato, frente às diversas condições experimentais estão sujeitas a consequências não levadas em consideração nos ensaios de rotina e que efetivamente afetam os resultados. Dentre tais

condições, se encontra o nível de exercício físico, fator altamente citado como relevante na utilização dos componentes da dieta saudável pelo organismo humano. Uma possível recomendação é a de que seja levado em consideração a condição natural do animal, envolvendo algum nível de atividade física, equivalente ao exercício de "treinado", senão também o nível de "exausto".

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na realização deste trabalho algumas dificuldades foram observadas e são aqui listadas como sugestões para trabalhos futuros:

- A escassez de literatura científica a respeito de aspectos fisiológicos ligados à condição de exaustão causada por exercício físico torna limitada a discussão dessa variável.
- A falta de uma padronização do método de corrida em esteira sobre o exato momento em que os animais chegam à exaustão dificulta a experimentação, seja em termos de indicadores bioquímicos, ou de caráter prático/operacional. Os artigos publicados consideram o ponto de exaustão como o pequeno intervalo de tempo em que os animais já não são capazes de se distanciar dos eletrodos. No entanto, durante a execução, alguns animais podem se lesionar, o que costuma causar a exclusão do animal e paralisar o teste.

Esses motivos levam a sugerir que outros métodos, por exemplo a natação, possam ser mais adequados quando se deseja estudar a exaustão, pois facilita a visualização dessa condição nos animais.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Reduzir os níveis protéicos das dietas para valores como 6, 8 ou 10% e observar as diferenças na utilização da proteína.
- Determinar se há resposta distinta na análise de expressão gênica em outros tecidos ou de outros genes.
- Utilizar outros métodos para determinar se as condições de estresse que foram usadas no exercício foram suficientes para desencadear a alteração da homeostase (indução da lipólise).

REFERÊNCIAS

ABECIA-SORIA, M.I. **Efeito da alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactossoro em ratos sedentários e exercitados**. 2003. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ABECIA-SORIA, M.I. **Efeitos metabólicos induzidos pelo consumo de dietas com caseína (padrão) e proteínas de soro de leite bovino (isolado e hidrolisado) usadas como única fonte protéica em ratos (Wistar) submetidos a treinamento físico em esteira**. 2010. Tese (Doutora em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

AGUILAR-NASCIMENTO, J.E.; SILVEIRA, B.R.P.; DOCK-NASCIMENTO, D.B. Early enteral nutrition with whey protein or casein in elderly patients with acute ischemic stroke: A double-blind randomized trial. **Nutrition**, v. 27, p. 440–444, 2011.

AGUILÓ, A. et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiol Behav**, v. 84, p. 1–7, 2005.

AMIROUCHE, A. et al. Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 286–294, 2009.

ANTUNES-NETO, J.M.F. et al. Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. **Stress**, v. 9, n. 2, p. 107–115, 2006.

APRÓ, W.; BLOMSTRAND, E. Influence of supplementation with branched-chain amino acids in combination with resistance exercise on p70^{S6} kinase phosphorylation in resting and exercising human skeletal muscle. **Acta Physiol**, v. 200, p. 237–248, 2010.

ARGILÉS, J.M. et al. Cross-Talk Between Skeletal Muscle and Adipose Tissue: A Link With Obesity? **Med Res Rev**, v. 25, n. 1, p. 49–65, 2005.

Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**, 16. ed. Washington, DC, 1995.

BAAR, K. Involvement of PPAR γ co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR α in the adaptive response to endurance exercise. **P Nutr Soc**, v. 63, p. 269–273, 2004.

BALBIS, E. et al. Whey proteins influence hepatic glutathione after CCl₄ intoxication. **Toxicol Ind Health**, v. 25, n. 4-5, p. 325-328, 2009.

BAZZOLI, D.L.; HILL, S.; DISILVESTRO, R.A. Soy protein antioxidant actions in active, young adult women. **Nutr Res**, v. 22, p. 807–815, 2002.

BENEKE, R.; BÖNING, D. The limits of human performance. **Essays Biochem**, v. 44, p. 11-25, 2008.

BENÍTEZ, R.; IBARTZ, A.; PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquím Clín Latinoam**, v. 42, n. 2, p. 227-236, 2008.

BENSABATH, C.C. **Composição bioquímica dos músculos cardíacos e gastrocnêmio, fígado e sangue de ratos alimentados com proteína intacta e hidrolisada do soro de leite e submetidos à atividade física**. 2009. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BERGER, J.; MOLLER, D.E. The Mechanisms Of Action Of Ppars. **Annu Rev Med**, v 53, p. 409–35, 2002.

BERGER, J.P.; AKIYAMA, T.E.; MEINKE, P.T. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 5, p. 244-251, 2005.

BERTHON, P.M. et al. Human skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase I activity determined in isolated intact mitochondria. **J Appl Physiol**, v. 85, p. 148-153, 1998.

BEUTLER, E. **A Manual of Biochemical Methods**. 2. ed. New York: Grune and Stratton, p.89-90, 1975.

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

BOIRIE, Y. et al. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, n. 26, p. 14930-14935, 1997.

BOMPA, T. **A periodização no treinamento físico**. São Paulo: Manole, 2001.

BORTOLOTTI, M. et al. Effects of a whey protein supplementation on intrahepatocellular lipids in obese female patients. **Clin Nutr**, v. 30, p. 494-498, 2011.

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

BOUNOUS, G.; MOLSON, J.H. The antioxidant system. **Anticancer Res**, v. 23, 2B, p. 1411-1415, 2003.

BOYD, A.E. et al. Lactate inhibition of lipolysis in exercising man. **Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 531-542, 1974.

BOZA, J.J. et al. Protein v. enzymic protein hydrolysates: Nitrogen utilization in starved rats. **Brit J Nutr**, v. 73, p. 1, p. 65-71, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais e ou saúde alegadas em**

rotulagem de alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=109>>. Acesso em: 07 mar 11.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 19 de 30 de abril de 1999. **Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou saúde em sua rotulagem.** Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110>>. Acesso em: 07 mar 11.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia Alimentar para a População Brasileira:** promovendo uma alimentação saudável. Brasília, 2006.

BRUCE, C.R. et al. Overexpression of carnitine palmitoyltransferase I in skeletal muscle in vivo increases fatty acid oxidation and reduces triacylglycerol esterification. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. E1231–E1237, 2007.

CABRAL, V.L.R.; CARVALHO, L.; MISZPUTEN, S.J. Importância da albumina sérica na avaliação nutricional e de atividade inflamatória em pacientes com doença de Crohn. **Arq Gastroenterol**, v 38, n. 2, p. 104-108, 2001.

CALBET, J.A.L.; HOLST, J.J. Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. **Euro J Nutr**, v. 43, p. 127–139, 2004.

CARNEVALI JUNIOR, L.C.; LIMA, W.P. Lipídeos, expressão gênica e exercícios. In: LIMA, WP (Org.) **Lipídeos e exercício:** aspectos fisiológicos e do treinamento. 1 ed. São Paulo: Editora Phorte, 2009, v. 1, p. 47-66.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHENNAOUI, M. et al. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo–pituitary–adrenal axis in rats. **Acta Physiol Scand**, v. 175, p. 113–121, 2002.

CHITAPANARUX, T. et al. Open-labeled pilot study of cysteine-rich whey protein isolate supplementation for nonalcoholic steatohepatitis patients. **J Gastroen Hepatol**, v. 24, p. 1045–1050, 2009.

CLAUSEN, M.R.; SKIBSTED, L.H.; STAGSTED, J. Characterization of Major Radical Scavenger Species in Bovine Milk through Size Exclusion Chromatography and Functional Assays. **J Agric Food Chem**, v.57, p. 2912–2919, 2009.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Sci Tech**, v. 11, p. 254-262, 2000.

CONTARTEZE, R.V.L. et al. Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 3, 2007.

CONTRERAS, M.M. et al. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. **LWT - Food Sci Tech**, v. 44, p. 9-15, 2011.

COSTA, G.E.A. **Comparação dos efeitos nutricionais, bioquímicos e fisiológicos decorrentes do consumo de proteínas do soro de leite por ratos sedentários e treinados**. 2010. Tese (Doutora em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

COSTILL, D.L. et al. Effects of elevated plasma FFA and insulin on muscle glycogen usage during exercise. **J Appl Phys**, v. 43, p. 695-699, 1977.

COUPLAND, M.E.; RANATUNGA, K.W. Force generation induced by rapid temperature jumps in intact mammalian (rat) skeletal muscle fibres. **J Physiol**, v. 548, p. 439-449, 2003.

DANTAS, J.A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá Estado do Paraná. **Acta Sci Health Sci**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-COROVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **J Agric Food Chem**, v. 52, p. 48-54, 2004.

DE ARAUJO, G.G. et al. Physiological responses during linear periodized training in rats. **Eur J Appl Physiol**, in press. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/rv78016126515742/>>. Acesso em: 19 ago 2011.

DE WIT, J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in foods products. **J Dairy Sci**, v. 81, p. 3, p. 597-608, 1998.

DESVERGNE, B.; WAHL, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. **Endocr Rev**, v. 20, n. 5, p. 649-688, 1999.

DIDERIKSEN, K.J. et al. Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals. **Scand J Med Sci Sports**, 2011. in press. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0838.2011.01318.x/pdf>>. Acesso em: 20 ago 2011.

DOBRZYN, P. et al. Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. **J Appl Physiol**, v. 109, p. 1653-1661, 2010.

DONATTO, F.F. et al. Effect of oat bran on time to exhaustion, glycogen content and serum cytokine profile following exhaustive exercise. **J Int Soc Sport Nutr**, v. 7, p. 32, 2010.

DREYER, C. et al. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. **Cell**, v. 68, p.879-887, 1992.

- DRYÁKOVÁ, A. et al. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. **Eur Food Res Technol**, v. 230, p. 865–874, 2010.
- DURIEUX, A. et al. Ectopic Expression of Myostatin Induces Atrophy of Adult Skeletal Muscle by Decreasing Muscle Gene Expression. **Endocrinology**, v. 148, p. 3140–3147, 2007.
- EL ELJ, N. et al. Effects of endurance training on plasma IGF-1 concentrations in rat. **Science & Sports**, v. 22, p. 54–56, 2007.
- ELIA, D. et al. Effect of soy- and whey protein-isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. **Eur J Nutr**, v. 45, p. 259–266, 2006.
- ELIOT, K.A. et al. The effects of creatine and whey protein supplementation on body composition in men aged 48 to 72 years during resistance training. **J Nutr Health Aging**, v. 12, n. 3, 208-212, 2008.
- ELLER, L.K.; REIMER, R.A. Dairy Protein Attenuates Weight Gain in Obese Rats Better Than Whey or Casein Alone. **Obesity**, v. 18, p. 704-711, 2010.
- ESCHER, P. et al. Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. **Endocrinology**, v. 142, p. 4195–4202, 2001.
- ESLAMI, S. et al. The Study of Whey Protein Supplementation on Plasma Essential Amino Acids Concentrations after Resistance Exercise in Healthy Young Athletes. **J Biol Sci**, v. 9, n. 2, p. 145-151, 2009.
- ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; BLOMSTRAND, E. Effect of exercise on concentrations of free amino acids in pools of type I and type II fibres in human muscle with reduced glycogen stores. **Acta Physiol Scand**, v. 174, p. 275–281, 2002.
- FARNFIELD, M.M. et al. Plasma amino acid response after ingestion of different whey protein fractions. **Int J Food Sci Nutr**, v. 60, n. 6, p. 476-486, 2009.
- FATONE, C. et al. Two weekly sessions of combined aerobic and resistance exercise are sufficient to provide beneficial effects in subjects with Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. **J Endocrinol Inv**, v. 33, n. 7, p. 489-495, 2010.
- FERNSTROM, J.D. Branched-chain amino acids and brain function. **J Nutr**, v. 135, p. 1539S–46S, 2005.
- FITZGERALD, R.J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotech Adv**, v. 24, p. 234– 237, 2006.
- FRESTEDT, J.L. et al. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. **Nutr Metab**, v. 5, n. 1, 2008.

FRITZ, T. et al. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPAR δ and UCP3 in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 22, p. 492–498, 2006.

FÜRNSINN, C.; WILLSON, T.M.; BRUNMAIR, B. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ , a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. **Diabetologia**, v. 50, p. 8–17, 2007.

GAD, A.S. et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. **Nutrition**, v. 27, p. 582–589, 2011.

GAUTHIER, S.F.; POULIOT, Y.; SAINT-SAUVEUR, D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Int Dairy J**, v. 16, p. 1315–1323, 2006.

GIBSON, U.E.M.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res**, v. 6, p. 10, p. 995-1001, 1996.

GILDE, A.J. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , Modulate the Expression of Genes Involved in Cardiac Lipid Metabolism. **Circ Res**, v.92, p. 518-524, 2003.

GOBATTO, C.A. et al. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos Wistar. **Motriz**, v. 7, n. 1, p.S57-S62, 2001.

GOENA, M. et al. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. **Rev Esp Fisiol**, v. 45, p. 55-60, 1989.

GOSTON, J.L.; CORREIA, M.I.T.D. Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors. **Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 604-611, 2010.

GOTO, M. et al. cDNA Cloning and mRNA Analysis of PGC-1 in Epitrochlearis Muscle in Swimming-Exercised Rats. **Biochem Bioph Res Co**, v. 274, p. 350–354, 2000.

GREY, V. et al. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. *J Cyst Fibros*, v. 2, p. 195–198, 2003.

GUERNEC, A.; CHEVALIER, B.; DUCLOS, M.J. Nutrient supply enhances both IGF-I and MSTN mRNA levels in chicken skeletal muscle. **Domest Anim Endocrinol**, v. 26, n. 2, p. 143–154, 2004.

GULICK, T. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 11012–11016, 1994.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HA, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. **J Nutr Biochem**, v. 14, p. 251–258, 2003.

HALL, W.L. et al. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. **Brit J Nutr**, v. 89, p. 239–248, 2003.

HAMAD, E.M. et al. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. **Lipids Health Dis**, v. 10, 57, 2011.

HARAGUCHI, F.K. et al. Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos. **Rev Nutr**, v. 22, n. 4, p. 517–525, 2009.

HARAGUCHI, F.K. et al. Whey protein precludes lipid and protein oxidation and improves body weight gain in resistance-exercised rats. **Euro J Nutr**, v. 50, n. 5, p. 331–339, 2011.

HEID, C.A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6. p. 10, p. 986–994, 1996.

HELGE, J.W. et al. Four weeks one-leg training and high fat diet does not alter PPAR α protein or mRNA expression in human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 101, p. 105–114, 2007.

HELLSTEN, Y. et al. Oxidation Of Urate In Human Skeletal Muscle During Exercise. **Free Radical Bio Med**, v. 22, n. 1/2, p. 169–174, 1997.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. et al. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 588–593, 2005.

HIRSCHBRUCH, M.D.; FISBERG, M.; MOCHIZUKI, L. Consumo de Suplementos por Jovens Frequentadores de Academias de Ginástica em São Paulo. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 6, 2008.

HOFFMAN, J.R.; FALVO, M.J. Protein – which is best? **J Sports Sci Med**, v. 3, n. 2, p. 130–133, 2004.

HOFFMAN, J.R. et al. Effect of a proprietary protein supplement on recovery indices following resistance exercise in strength/power athletes. **Amino Acids**, v. 38, p. 771–778, 2010.

HOHL, R. et al. Development and characterization of an overtraining animal model. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 5, p. 1155–1163, 2009.

HOLLOSZY, J.O.; KOHRT, W.M. Regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. **Anna Rev Nutr**, v. 16, p. 121–138, 1996.

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

HOROWITZ, J.F. et al. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: A potential role for PPAR α in the metabolic response to training. **Am J Physiol-Endoc M**, v. 279, p. E348-E355, 2000.

HOROWITZ, J.F.; KLEIN, S. Lipid metabolism during endurance exercise. **Am J Clin Nutr**, v. 72, p. 558S–63S, 2000.

HULMI, J.J. et al. Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. **Amino Acids**, v. 37, p. 297–308, 2009a.

HULMI, J.J. et al. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. **J Appl Physiol**, v. 106, p.1720–1729, 2009b.

HULMI, J.J. et al. The effects of whey protein on myostatin and cell cycle-related gene expression responses to a single heavy resistance exercise bout in trained older men. **Eur J Appl Physiol**, v. 102, p. 205–213, 2008.

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, p. 645–650, 1990.

JACOBUCCI, H.B. et al. Impact of different dietary protein on rat growth, blood serum lipids and protein and liver cholesterol. **Nutr Res**, v. 21, p. 905–915, 2001.

KANALEY, J.A. et al. Fatty acid kinetic responses to running above or below lactate threshold. **J Appl Physiol**, v. 79, p. 439-47, 1995.

KANNISTO, K. et al. Differential expression of peroxisomal proliferator activated receptors α and δ in skeletal muscle in response to changes in diet and exercise. **Int J Mol Med**, v. 17, n. 1, p. 45-52, 2006.

KAPLAN, M.M. Alanine aminotranferase levels: what's normal? **Ann Intern Med**, v. 137, p. 49-51, 2002.

KAYA, M. et al. Plasma concentrations and urinary excretion of purine bases (uric acid, hypoxanthine, and xanthine) and oxypurinol after rigorous exercise. **Metabolism**, v. 55, p. 103– 107, 2006.

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

KIENS, B. et al. Lipid-binding proteins and lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle: influence of physical activity and gender. **J Appl Physiol**, v. 97, p. 1209–1218, 2004.

KIMBALL SR, JEFFERSON LS. Signaling Pathways and Molecular Mechanisms through which Branched-Chain Amino Acids Mediate Translational Control of Protein Synthesis. **J Nutr**, v. 136, p. 227S–231S, 2006.

KLIEWER, S.A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: From genes to physiology. **Recent Prog Horm Res**, v. 56, p. 239–263, 2001.

KONG, A.P.S. et al. Independent associations of alanine aminotransferase (ALT) levels with cardiovascular risk factor clustering in Chinese adolescents. **J Hepatol**, v. 49, p. 115–122, 2008.

KOSIKOWSKI, Frank V. (Ed.). **Cheese and Fermented Milk Foods**. 2. ed. New York: Edwards Brothers, 1982.

KOULMANN, N.; BIGARD, A. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. **Pflügers Arch Eur J Physiol**, v.452,p.125–39, 2006.

KOVES, T.R. et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Co-activator 1 α -mediated Metabolic Remodeling of Skeletal Myocytes Mimics Exercise Training and Reverses Lipid-induced Mitochondrial Inefficiency. **J Biol Chem**, v. 280, n. 39, p. 33588–33598, 2005.

KRÄMER, D.K. et al. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR α , PPAR δ and PGC-1 α mRNA. **Acta Physiol**, v. 188, p. 207–216, 2006.

KREIDER, R.B. et al. Effects of ingesting protein with various forms of carbohydrate following resistance-exercise on substrate availability and markers of anabolism, catabolism, and immunity. **J Int Soc Sport Nutr**, v. 4, p. 18, 2007.

LAHL, W.J.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technol**, v. 48, n. 10, p. 68–71, 1994.

LARSON, M.R.; DONOVAN, S.M.; POTTER, S.M. Effects of Dietary Protein source on Cholesterol Metabolism in Neonatal Pigs. **Nutr Res**, v. 16, n. 9, p. 1563–1574, 1996.

LAVIANO, A. et al. Role of leucine in regulating food intake. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1236–8, 2006.

LAYE, M.J. et al. Cessation of daily wheel running differentially alters fat oxidation capacity in liver, muscle, and adipose tissue. **J Appl Physiol**, v. 106, p. 161–168, 2009.

LEANDRO, C.G. et al. Physical Training Attenuates the Stress-Induced Changes in Rat T-Lymphocyte Function. **Neuroimmunomodulat**, v. 13, p. 105–113, 2006.

LEE, S.J.; McPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 16, p. 9306–9311, 2001.

LEICK, L. et al. Endurance exercise induces mRNA expression of oxidative enzymes in human skeletal muscle late in recovery. **Scand J Med Sci Sports**, v. 20, p. 593–599, 2010.

LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, p. 797–801, 2002.

LIN, X. et al. Protective Effect of Erythropoietin on Renal Injury Induced by Acute Exhaustive Exercise in the Rat. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 12, p. 847-853, 2010.

LIPPI, G. et al. Comparison of serum creatinine, uric acid, albumin and glucose in male professional endurance athletes compared with healthy controls. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, n. 6, p. 644–647, 2004.

LONNERDAL, B. Nutrition and physiologic significance of human milk proteins. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 6, p. 1537-1543, 2003.

LÓPEZ-SORIANO, J. et al. Roles of Skeletal Muscle and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in the Development and Treatment of Obesity. **Endocr Rev**, v. 27, p. 318–329, 2006.

MACHADO, M. et al. Relationship of glomerular filtration rate and serum CK activity after resistance exercise in women. **Int Urol Nephrol**, in press. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/611n474306287730/>>. Acesso em: 19 ago 2011.

MADUREIRA, A.R. et al. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Res Int**, v. 40, p. 1197–1211, 2007.

MAHONEY, D.J. et al. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **FASEB J**, v. 19, n. 11, p. 1498-1500, 2005.

MANNINEN, A.H. Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. **J Sports Sci Med**, v. 3, p. 60-63, 2004.

MARKUS, C.R. et al. The bovine protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. **Am J Clin Nutr**, v. 71, p. 1536–1544, 2000.

MARKUS, C.R.; OLIVIER, B.; DE HAAN, E.H.F. Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 75, p. 1051–1056, 2002.

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Altern Med Rev**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.

MARTIN III, W.H. Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 24, p. 203-231, 1996.

MATSAKAS, A. et al. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. **Acta Physiol Scand**, v. 183, p. 299–307, 2005.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHALF, P.L. **Bioquímica do exercício e do treinamento**. São Paulo: Manole, 2000.

McARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do exercício**: energia, nutrição e desempenho humano. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

McINTOSH, G.H. et al. Whey Proteins as Functional Food Ingredients? **Int Dairy J**, v. 8, p. 425–434, 1998.

McPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 83–90, 1997.

MICKE, P.; BEEH, K.M.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **Eur J Nutr**, v. 41, p. 12–18, p. 2002.

MORIFUJI, M. et al. Branched-Chain Amino Acid-Containing Dipeptides, Identified from Whey Protein Hydrolysates, Stimulate Glucose Uptake Rate in L6 Myotubes and Isolated Skeletal Muscles. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 55, p. 81–86, 2009.

MORIFUJI, M. et al. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. **Nutrition**, v. 21, n. 10, p. 1052–1058, 2005a.

MORIFUJI, M. et al. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. **Brit J Nutr**, v. 93, n. 4, p. 439–445, 2005b.

MORIFUJI, M. et al. Comparison of Different Sources and Degrees of Hydrolysis of Dietary Protein: Effect on Plasma Amino Acids, Dipeptides, and Insulin Responses in Human Subjects. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 8788–8797, 2010.

MORIFUJI, M.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats. **Brit J Nutr**, v. 96, n. 3, p. 469–475, 2006.

MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SUGIURA, K. Dietary whey protein modulates liver glycogen level and glycoregulatory enzyme activities in exercise-trained rats. **Exp Biol Med**, v. 230, p. 23–30, 2005.

MORRIS, R.T. et al. Exercise-induced attenuation of obesity, hyperinsulinemia, and skeletal muscle lipid peroxidation in the OLETF rat. **J Appl Physiol**, v. 104, p. 708–715, 2008.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds' Droppings: An Analytical Approach. **Ann NY Acad Sci**, v. 1046, p. 17–34, 2005.

MUOIO, M.D. et al. Fatty Acid Homeostasis and Induction of Lipid Regulatory Genes in Skeletal Muscles of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α Knock-out Mice. **J Biol Chem**, v. 277, n. 29, p. 26089–26097, 2002.

MURAKAMI, T.; HASEGAWA, K.; YOSHINAGA, M. Rapid induction of REDD1 expression by endurance exercise in rat skeletal muscle. **Biochem Bioph Res Co**, v. 405, p. 615–619, 2011.

NAGAO, K. et al. Voluntary wheel running is beneficial to the amino acid profile of lysine-deficient rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. E1170–E1178, 2010.

NERY-DIEZ, A.C. et al. Prolonged ingestion of prehydrolyzed whey protein induces little or no changes in digestive enzymes, but decreases glutaminase activity in exercising rats. **J Med Food**, v. 13, n. 4, p. 992–998, 2010.

NEUMAYR, G. et al. The Effect of Marathon Cycling on Renal Function. **Int J Sports Med**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2003.

NEWSHOLME, E.A.; BLOMSTRAND, E. Branched-Chain Amino Acids and Central Fatigue. **J Nutr**, v. 136, n. 1, p. 274S-276S, 2006.

NIKOLAIDIS, M.G.; JAMURTAS, A.Z. Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. **Arch Biochem Biophys**, v. 490, p. 77–84, 2009.

NORTON, L.E. et al. The Leucine Content of a Complete Meal Directs Peak Activation but Not Duration of Skeletal Muscle Protein Synthesis and Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Rats. **J Nutr**, v. 139, p. 1103–1109, 2009.

O'BRIEN, B.J. et al. The effects of interval-exercise duration and intensity on oxygen consumption during treadmill running. **J Sci Med Sport**, v. 11, n. 3, p. 287-290, 2008.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **J Agric Food Chem**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PAL, S.; ELLIS, V.; DHALIWAL, S. Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. **Brit J Nutr**, v. 104, p. 716–723, 2010.

PAL, S.; ELLIS, V.; HO, S. Acute effects of whey protein isolate on cardiovascular risk factors in overweight, post-menopausal women. **Atherosclerosis**, v. 212, p. 339–344, 2010b.

PAPOTI, M. et al. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. **Motriz**, v. 9, n. 2, p. 97-104, 2003.

PEÑA-RAMOS, E.A.; XIONG, Y.L.; ARTEAGA, G.E. Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. **J Sci Food Agric**, 84: 1908–1918, 2004.

PENG, X. et al. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. **Int Dairy J**, v. 20, p. 360–365, 2010.

PENG, X.; XIONG, Y.L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chem**, v. 113, p. 196–201, 2009.

PENNA, S.P. **Níveis de glutathiona reduzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio.** 1995. Dissertação (Mestre em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PENNINGS, B. et al. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. **Am J Clin Nutr**, v. 93, p. 997–1005, 2011.

PEREIRA, R.F.; LAJOLO, F.M.; HIRSCHBRUCH, M.D. Consumo de suplementos por alunos de academias de ginástica em São Paulo. **Rev Nutr**, v. 16, n. 3, p. 265-272, 2003.

PERREAULT, M.; ERBE, D.V.; TOBIN, J.F. PPAR δ Agonism for the Treatment of Obesity and Associated Disorders: Challenges and Opportunities. **PPAR Res**, 2008, Article ID 125387, 9 p., 2008.

PETRIDOU, A. et al. Long-term exercise increases the DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor γ in rat adipose tissue. **Metabolism**, v. 56, p. 1029–1036, 2007.

PILEGAARD, H. et al. Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. **Metabolism**, v. 54, p. 1048– 1055, 2005.

PILEGAARD, H. et al. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. **J Physiol**, v. 541, n. 1, p. 261–271, 2002.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P.D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **J Physio**, v. 546, n. 3, p. 851–858, 2003.

PILVI, T.K. et al. Effect of Dietary Calcium and Dairy Proteins on the Adipose Tissue Gene Expression Profile in Diet-Induced Obesity. **J Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 1, p. 240–251, 2008.

PILVI, T.K. et al. Effects of high-calcium diets with different whey proteins on weight loss and weight regain in high-fat-fed C57BL/6J mice. **Brit J Nutr**, v. 102, p. 337–341, 2009.

PIMENTA, F.M.V. et al. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **Int Dairy J**, v. 16, p. 984–991, 2006.

PINHEIRO-MULDER, A. et al. Exercise counters diet-induced obesity, proteinuria, and structural kidney alterations in rat. **Pathology**, v. 206, p. 168–173, 2010.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do exercício**: teoria e aplicação no condicionamento e ao desempenho. 5, ed. Barueri: Manole, 2005.

PRIOR, R.L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PUIGSERVER, P. et al. Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. **Mol Cell**, v. 8, p. 971–982, 2001.

RAJIC, A. et al. A novel dairy-derived isolate that inhibits adipogenesis and significantly reduces weight gain in a high fat animal model. **Int Dairy J**, v. 20, p. 480-486, 2010.

RAMOS, A.G. **Utilização de proteínas do soro lácteo pelo rato jovem**. 2001, Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RANKIN, J.W. et al. Energy restriction but not protein source affects antioxidant capacity in athletes. **Free Radical Bio Med**, v. 41, p. 1001–1009, 2006.

RAUGHT, B.; GINGRAS, A.; SONENBERG, N. The target of rapamycin (TOR) proteins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 13, p. 7037-7044, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RENNIE, M.J. et al. Control of the size of the human muscle mass. **Annu Rev Physiol**, v. 66, p. 799–828, 2004.

RIEHL, O.; FONTANA, K.E.; LÓPEZ, R.F.A. Excreção de creatinina como meio de análise da massa magra corporal. **Lecturas Educación Física y Deportes**, v. 10, p. 1-8, 2004.

ROOTS, H. et al. Muscle fatigue examined at different temperatures in experiments on intact mammalian (rat) muscle fibers. **J Appl Physiol**, v. 106, p. 378–384, 2009.

ROYLE, P.J.; McINTOSH, G.H.; CLIFTON, P.M. Whey protein isolate and glycomacropeptide decrease weight gain and alter body composition in male Wistar rats. **Brit J Nutr**, v. 100, p. 88–93, 2008.

RUSSELL, A.P. et al. Endurance Training in Humans Leads to Fiber Type–Specific Increases in Levels of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ Coactivator-1 and Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- α in Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 52, p. 2874-2881, 2003.

- RUSSELL, A.P. et al. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. **FASEB J**, v. 19, n. 8, p. 986-988, 2005.
- SADAT, L. et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. **Int Dairy J**, v. 21, p. 214-221, 2011.
- SCRUTTON, H. et al. Effects of α -lactalbumin on emotional processing in healthy women. **J Psychopharmacol**, v. 21, p. 5, p. 519-24, 2007.
- SEGAL, S.S.; FAULKNER, J.A.; WHITE, T.P. Skeletal muscle fatigue in vitro is temperature dependent. **J Appl Physiol**, v. 61, n. 2, p. 660-665, 1986.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev Nutr**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.
- SHERTZER, H.G. et al. Dietary Whey Protein Lowers the Risk for Metabolic Disease in Mice Fed a High-Fat Diet. **J Nutr**, v. 141, p. 582–587, 2011.
- SHIMOMURA, Y et al. Nutraceutical Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. **J Nutr**, v. 136, p. 529S–532S, 2006.
- SHIMOMURA, Y et al. Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. **J Nutr**, n. 134, p. 1583S–1587S, 2004.
- SIDDIQUI, S.M.K. et al. Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats. **Nutr Res**, v. 28, p. 783–790, 2008.
- SIFF, M.; VERKHOSHANSKY, Y. **Superentrenamiento**. Barcelona: Paidotribo, 2004.
- SILK, D.B.A.; CHUNG, Y.C.; BERGER, K.L. Comparison of oral feeding of peptide and amino acid meals to normal human subjects. **Gut**, v. 20, n. 4, p. 291-299, 1979.
- SMOLKA, M.B. et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, p. 1539–1545, 2000.
- SPANGENBURG, E.E. et al. Alterations in peroxisome proliferator-activated receptor mRNA expression in skeletal muscle after acute and repeated bouts of exercise. **Mol Cell Biochem**, v. 332, p. 225–231, 2009.
- SPRIET, L.L. Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans. **Med Sci Sport Exer**, v. 34, n. 9, p. 1477-1484, **2002**.

- STELLINGWERFF, T. et al. Significant intramyocellular lipid use during prolonged cycling in endurance-trained males as assessed by three different methodologies. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. E1715–E1723, 2007.
- STEPHENS, F.B. et al. Basal and insulin-stimulated pyruvate dehydrogenase complex activation, glycogen synthesis and metabolic gene expression in human skeletal muscle the day after a single bout of exercise. **Exp Physiol**, v. 95, p. 808–818, 2010.
- TAKAHASHI, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ), a novel target site for drug discovery in metabolic syndrome. **Pharmacol Res**, v. 53, p. 501–507, 2006.
- TASSI, E.M.M.; AMAYA-FARFÁN, J.; AZEVEDO, R.M. Hydrolyzed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutr Res**, v. 18, n. 5, p. 875–881, 1998.
- TAULER, P. et al. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. **J Nutr Biochem**, v. 17, p. 665–671, 2006.
- TERADA, S. et al. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. **Biochem Bioph Res Co**, v. 296, p. 350–354, 2002.
- TIPTON, K.D. et al. Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, p. E71–E76, 2007.
- TSENG, Y.M. et al. Effects of Alcohol-Induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Pretreated Whey Protein Concentrate (WPC) on Oxidative Damage. **J Agri Food Chem**, v. 56, n. 17, p. 8141–8147, 2008.
- TSENG, Y. et al. Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p. 574–578, 2006.
- TUNSTALL, R.J. et al. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, p. E66–E72, 2002.
- UCHIDA, M.C. et al. Consumo de Aminoácidos de Cadeia Ramificada não Afeta o Desempenho de *Endurance*. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 1, p. 42–45, 2008.
- UNIVERSITY OF GUELPH. **Dairy Chemistry and Physics**. Disponível em: <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>>. Acesso em: 12 maio 2011.
- URSO, M.L.; CLARKSON, P.M.. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41–54, 2003.
- VALLADA, W.F. **Manual de técnicas hematológicas**. Rio de Janeiro: Ateneu, p. 31–35, 1998.

VAN HALL, G.; SALTIN, B.; WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle protein degradation and amino acid metabolism during prolonged knee-extensor exercise in humans. **Clin Sci**, v. 97, p. 557–567, 1999.

VAN LOON, L.J.C. et al. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. **J Physiol**, v. 536, n. 1, pp.295–304, 2001.

VEGA, R.B.; HUSS, J.M.; KELLY, D.P. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 5, p. 1868–1876, 2000.

WANG, Y.X. et al. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor δ Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. **Cell**, v. 113, p. 159–170, 2003.

WANG, Y.X. et al. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR δ . **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, 1532-1539, 2004.

WHICHER, J.; SPENCE, C. When is serum albumin worth measuring? **Ann Clin Biochem**, v. 24, n. 6, p. 572-580, 1987.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An Evaluation Of The Waters Pico-Tag System For The Amino-Acid-Analysis Of Food Materials. **J Autom Chem**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WILLIAMS, P.C. Use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. **J Sci Food Agr**, v. 24, p. 343, 1973.

WOLEDGE, R.C.; BARCLAY, C.J.; CURTIN, N.A. Temperature change as a probe of muscle crossbridge kinetics: a review and discussion. **Proc R Soc B**, v. 276, p. 2685-26, 2009.

WONG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. **J Agric Food Chem**, v. 44, p. 701-705, 1996.

YAKEU, G. et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPAR γ and Th2 cytokines. **Atherosclerosis**, v. 212, p. 668–673, 2010.

YAMASHITA, A.S. et al. Influência do Treinamento Físico Aeróbio no Transporte Mitochondrial de Ácidos Graxos de Cadeia Longa no Músculo Esquelético: Papel do Complexo Carnitina Palmitoil Transferase. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 2, 2008.

YAN, Z.; LI, P.; AKIMOTO, T. Transcriptional Control of the Pgc-1 α Gene in Skeletal Muscle In Vivo. **Exerc Sport Sci Rev**, v 35, n. 3, p. 97-101, 2007.

YOSHIZAWA, F. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, p. 417–422, 2004.

ZBIGNIEW, W. et al. Changes in the Blood Antioxidant Defense Capacity During a 24 Hour Run. **J Hum Kinet**, v. 24, p. 65-74, 2010.

ZHOU, J. et al. Dietary Whey Protein Decreases Food Intake and Body Fat in Rats. **Obesity**, v. 19, p. 1568–1573, 2011.

ZULUETA, A. et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized Milk. **Int Dairy J**, v. 19, p. 380–385, 2009.

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2079-1, sobre "Efeitos do consumo do hidrolisado de proteínas do soro do leite na expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e glutaminase intestinal", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán / Daniela Gasparetto, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 10 de maio 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2079-1, entitled "Effect of the consumption of hydrolyzed whey proteins on the expression of genes involved in lipid metabolism and intestinal glutaminase", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 10, 2010.

Campinas, 10 de maio de 2010.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

APÊNDICE A - Planilha de análise estatística sobre o efeito da dieta no resultado de diversos parâmetros analisados

Pairwise Comparisons							
Dependent Variable	(I) dieta	(J) dieta	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
						Lower Bound	Upper Bound
consumo	CAS	WPC	,750	,566	,194	-,400	1,900
		WPH	-,138	,555	,806	-1,264	,989
	WPC	CAS	-,750	,566	,194	-1,900	,400
		WPH	-,888	,566	,126	-2,037	,262
	WPH	CAS	,138	,555	,806	-,989	1,264
		WPC	,888	,566	,126	-,262	2,037
peso	CAS	WPC	,248	,297	,409	-,355	,851
		WPH	,363	,291	,221	-,228	,953
	WPC	CAS	-,248	,297	,409	-,851	,355
		WPH	,115	,297	,702	-,488	,717
	WPH	CAS	-,363	,291	,221	-,953	,228
		WPC	-,115	,297	,702	-,717	,488
temperatura	CAS	WPC	,106	,512	,837	-,933	1,146
		WPH	-,069	,502	,892	-1,087	,950
	WPC	CAS	-,106	,512	,837	-1,146	,933
		WPH	-,175	,512	,735	-1,214	,864
	WPH	CAS	,069	,502	,892	-,950	1,087
		WPC	,175	,512	,735	-,864	1,214
urico	CAS	WPC	,411	,571	,476	-,748	1,570
		WPH	,614	,560	,280	-,522	1,750
	WPC	CAS	-,411	,571	,476	-1,570	,748
		WPH	,203	,571	,724	-,956	1,363
	WPH	CAS	-,614	,560	,280	-1,750	,522
		WPC	-,203	,571	,724	-1,363	,956
creatinina	CAS	WPC	-,195	,131	,147	-,462	,072
		WPH	-,098	,129	,451	-,360	,163
	WPC	CAS	,195	,131	,147	-,072	,462
		WPH	,097	,131	,467	-,170	,364
	WPH	CAS	,098	,129	,451	-,163	,360
		WPC	-,097	,131	,467	-,364	,170
TAG	CAS	WPC	8,458	8,797	,343	-9,401	26,316
		WPH	7,162	8,619	,412	-10,335	24,660

		WPC _ CAS	-8,458	8,797	,343	-26,316	9,401
		_ WPH	-1,295	8,797	,884	-19,153	16,563
		WPH _ CAS	-7,162	8,619	,412	-24,660	10,335
		_ WPC	1,295	8,797	,884	-16,563	19,153
NEFA		CAS _ WPC	,000	,078	,998	-,159	,159
		_ WPH	-,057	,077	,464	-,213	,099
		WPC _ CAS	,000	,078	,998	-,159	,159
		_ WPH	-,057	,078	,472	-,216	,102
		WPH _ CAS	,057	,077	,464	-,099	,213
		_ WPC	,057	,078	,472	-,102	,216
GSH		CAS _ WPC	,980	8,601	,910	-16,481	18,441
		_ WPH	-4,508	8,427	,596	-21,616	12,600
		WPC _ CAS	-,980	8,601	,910	-18,441	16,481
		_ WPH	-5,488	8,601	,528	-22,949	11,973
		WPH _ CAS	4,508	8,427	,596	-12,600	21,616
		_ WPC	5,488	8,601	,528	-11,973	22,949
ALT		CAS _ WPC	6,791 ⁺	2,541	,011	1,632	11,950
		_ WPH	5,852 ⁺	2,490	,025	,798	10,907
		WPC _ CAS	-6,791 ⁺	2,541	,011	-11,950	-1,632
		_ WPH	-,938	2,541	,714	-6,097	4,221
		WPH _ CAS	-5,852 ⁺	2,490	,025	-10,907	-,798
		_ WPC	,938	2,541	,714	-4,221	6,097
AST		CAS _ WPC	6,961	9,719	,479	-12,769	26,690
		_ WPH	4,194	9,522	,662	-15,137	23,525
		WPC _ CAS	-6,961	9,719	,479	-26,690	12,769
		_ WPH	-2,766	9,719	,778	-22,496	16,963
		WPH _ CAS	-4,194	9,522	,662	-23,525	15,137
		_ WPC	2,766	9,719	,778	-16,963	22,496
albumina		CAS _ WPC	-,002	,181	,991	-,370	,366
		_ WPH	,078	,178	,665	-,283	,438
		WPC _ CAS	,002	,181	,991	-,366	,370
		_ WPH	,080	,181	,663	-,288	,448
		WPH _ CAS	-,078	,178	,665	-,438	,283
		_ WPC	-,080	,181	,663	-,448	,288
corticosterona		CAS _ WPC	41,565	47,275	,385	-54,408	137,537
		_ WPH	42,744	46,319	,362	-51,290	136,777
		WPC _ CAS	-41,565	47,275	,385	-137,537	54,408

		WPH	1,179	47,275	,980	-94,793	97,152
	WPH	CAS	-42,744	46,319	,362	-136,777	51,290
		WPC	-1,179	47,275	,980	-97,152	94,793
PPARa	CAS	WPC	,198	,374	,600	-,562	,957
		WPH	-,018	,367	,961	-,762	,726
	WPC	CAS	-,198	,374	,600	-,957	,562
		WPH	-,216	,374	,567	-,976	,543
	WPH	CAS	,018	,367	,961	-,726	,762
		WPC	,216	,374	,567	-,543	,976
PPARd	CAS	WPC	-,032	,291	,913	-,622	,558
		WPH	-,248	,285	,391	-,826	,331
	WPC	CAS	,032	,291	,913	-,558	,622
		WPH	-,216	,291	,463	-,806	,375
	WPH	CAS	,248	,285	,391	-,331	,826
		WPC	,216	,291	,463	-,375	,806
PGC1a	CAS	WPC	,255	,253	,321	-,259	,769
		WPH	,215	,248	,392	-,288	,718
	WPC	CAS	-,255	,253	,321	-,769	,259
		WPH	-,040	,253	,876	-,554	,474
	WPH	CAS	-,215	,248	,392	-,718	,288
		WPC	,040	,253	,876	-,474	,554
CPI1b	CAS	WPC	-,079	,264	,766	-,616	,458
		WPH	,166	,259	,525	-,360	,692
	WPC	CAS	,079	,264	,766	-,458	,616
		WPH	,245	,264	,360	-,291	,782
	WPH	CAS	-,166	,259	,525	-,692	,360
		WPC	-,245	,264	,360	-,782	,291
miostatina	CAS	WPC	-,445	,421	,298	-1,299	,410
		WPH	-,649	,412	,124	-1,487	,188
	WPC	CAS	,445	,421	,298	-,410	1,299
		WPH	-,205	,421	,630	-1,059	,650
	WPH	CAS	,649	,412	,124	-,188	1,487
		WPC	,205	,421	,630	-,650	1,059
relat_gord	CAS	WPC	,630	,410	,134	-,203	1,462
		WPH	,467	,402	,252	-,348	1,283
	WPC	CAS	-,630	,410	,134	-1,462	,203
		WPH	-,162	,410	,695	-,994	,670

WPH _ CAS	-,467	,402	,252	-1,283	,348
_ WPC	,162	,410	,695	-,670	,994

Based on estimated marginal means a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments). *. The mean difference is significant at the ,05 level.

APÊNDICE B - Planilha de análise estatística sobre o efeito de exercício/exaustão no resultado de diversos parâmetros analisados

Pairwise Comparisons							
Dependent Variable	(I) atividade	(J) atividade	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
						Lower Bound	Upper Bound
consumo	S	SEX	-,125	,658	,851	-1,462	1,212
		TEX	1,025	,658	,129	-,312	2,362
		TEX	,033	,658	,960	-1,303	1,370
	SEX	S	,125	,658	,851	-1,212	1,462
		TEX	1,150	,641	,081	-,151	2,451
		TEX	,158	,641	,806	-1,143	1,459
	TEX	S	-1,025	,658	,129	-2,362	,312
		SEX	-1,150	,641	,081	-2,451	,151
		TEX	-,992	,641	,131	-2,293	,309
	TEX	S	-,033	,658	,960	-1,370	1,303
		SEX	-,158	,641	,806	-1,459	1,143
		T	,992	,641	,131	-,309	2,293
peso	S	SEX	,269	,345	,440	-,431	,970
		TEX	,503	,345	,154	-,198	1,203
		TEX	,636	,345	,074	-,064	1,337
	SEX	S	-,269	,345	,440	-,970	,431
		TEX	,233	,336	,492	-,449	,915
		TEX	,367	,336	,282	-,315	1,049
	TEX	S	-,503	,345	,154	-1,203	,198
		SEX	-,233	,336	,492	-,915	,449
		TEX	,133	,336	,694	-,549	,815
	TEX	S	-,636	,345	,074	-1,337	,064
		SEX	-,367	,336	,282	-1,049	,315
		T	-,133	,336	,694	-,815	,549
temperatura	S	SEX	-2,708*	,595	,000	-3,916	-1,500
		TEX	-1,292*	,595	,037	-2,500	-,084
		TEX	-2,800*	,595	,000	-4,008	-1,592
	SEX	S	2,708*	,595	,000	1,500	3,916
		TEX	1,417*	,579	,020	,241	2,593
		TEX	-,092	,579	,875	-1,268	1,084

urico	T	S	1,292 ⁺	,595	,037	,084	2,500
	SEX		-1,417 ⁺	,579	,020	-2,593	-,241
	TEX		-1,508 ⁺	,579	,013	-2,684	-,332
	TEX	S	2,800 ⁺	,595	,000	1,592	4,008
	SEX		,092	,579	,875	-1,084	1,268
	T		1,508 ⁺	,579	,013	,332	2,684
	S	SEX	-,455	,664	,498	-1,802	,893
	T		,257	,664	,701	-1,091	1,605
	TEX		-,655	,664	,331	-2,002	,693
	SEX	S	,455	,664	,498	-,893	1,802
	T		,712	,646	,278	-,600	2,023
	TEX		-,200	,646	,759	-1,512	1,112
	T	S	-,257	,664	,701	-1,605	1,091
	SEX		-,712	,646	,278	-2,023	,600
	TEX		-,912	,646	,167	-2,223	,400
	TEX	S	,655	,664	,331	-,693	2,002
	SEX		,200	,646	,759	-1,112	1,512
	T		,912	,646	,167	-,400	2,223
creatinina	S	SEX	-,152	,153	,327	-,462	,158
	T		,092	,153	,550	-,218	,403
	TEX		-,057	,153	,712	-,367	,253
	SEX	S	,152	,153	,327	-,158	,462
	T		,244	,149	,110	-,058	,546
	TEX		,095	,149	,527	-,207	,397
	T	S	-,092	,153	,550	-,403	,218
	SEX		-,244	,149	,110	-,546	,058
	TEX		-,149	,149	,323	-,451	,153
	TEX	S	,057	,153	,712	-,253	,367
	SEX		-,095	,149	,527	-,397	,207
	T		,149	,149	,323	-,153	,451
TAG	S	SEX	23,339 ⁺	10,225	,029	2,581	44,097
	T		14,808	10,225	,156	-5,950	35,567
	TEX		21,226 ⁺	10,225	,045	,468	41,984
	SEX	S	-23,339 ⁺	10,225	,029	-44,097	-2,581
	T		-8,531	9,952	,397	-28,735	11,674
	TEX		-2,113	9,952	,833	-22,318	18,091
	T	S	-14,808	10,225	,156	-35,567	5,950

		SEX	8,531	9,952	,397	-11,674	28,735
		TEX	6,417	9,952	,523	-13,787	26,622
	TEX	S	-21,226 ⁺	10,225	,045	-41,984	-,468
	SEX		2,113	9,952	,833	-18,091	22,318
	T		-6,417	9,952	,523	-26,622	13,787
	NEFA	S	,201 ⁺	,091	,034	,016	,386
		T	-,269 ⁺	,091	,006	-,454	-,084
		TEX	,236 ⁺	,091	,014	,051	,421
		SEX	-,201 ⁺	,091	,034	-,386	-,016
		T	-,470 ⁺	,089	,000	-,650	-,290
		TEX	,036	,089	,689	-,144	,216
		T	,269 ⁺	,091	,006	,084	,454
		SEX	,470 ⁺	,089	,000	,290	,650
		TEX	,506 ⁺	,089	,000	,326	,686
		TEX	-,236 ⁺	,091	,014	-,421	-,051
	GSH	SEX	-,036	,089	,689	-,216	,144
		T	-,506 ⁺	,089	,000	-,686	-,326
		S	10,727	9,998	,291	-9,569	31,023
		T	1,467	9,998	,884	-18,829	21,763
		TEX	10,188	9,998	,315	-10,108	30,484
		SEX	-10,727	9,998	,291	-31,023	9,569
		T	-9,260	9,731	,348	-29,015	10,495
		TEX	-,539	9,731	,956	-20,294	19,216
		T	-1,467	9,998	,884	-21,763	18,829
		SEX	9,260	9,731	,348	-10,495	29,015
	ALT	TEX	8,721	9,731	,376	-11,034	28,476
		S	-10,188	9,998	,315	-30,484	10,108
		SEX	,539	9,731	,956	-19,216	20,294
		T	-8,721	9,731	,376	-28,476	11,034
		S	-3,268	2,954	,276	-9,265	2,728
		T	3,723	2,954	,216	-2,273	9,720
		TEX	-1,613	2,954	,588	-7,610	4,383
		SEX	3,268	2,954	,276	-2,728	9,265
		T	6,992 ⁺	2,875	,020	1,155	12,828
		TEX	1,655	2,875	,569	-4,182	7,492
	T	S	-3,723	2,954	,216	-9,720	2,273
		SEX	-6,992 ⁺	2,875	,020	-12,828	-1,155

		TEX	-5,337	2,875	,072	-11,173	,500
	TEX	S	1,613	2,954	,588	-4,383	7,610
		SEX	-1,655	2,875	,569	-7,492	4,182
		T	5,337	2,875	,072	-,500	11,173
AST	S	SEX	-5,934	11,297	,603	-28,867	17,000
		T	-13,162	11,297	,252	-36,095	9,771
		TEX	6,998	11,297	,540	-15,935	29,931
	SEX	S	5,934	11,297	,603	-17,000	28,867
		T	-7,228	10,995	,515	-29,550	15,093
		TEX	12,932	10,995	,247	-9,390	35,253
	T	S	13,162	11,297	,252	-9,771	36,095
		SEX	7,228	10,995	,515	-15,093	29,550
		TEX	20,160	10,995	,075	-2,162	42,482
	TEX	S	-6,998	11,297	,540	-29,931	15,935
		SEX	-12,932	10,995	,247	-35,253	9,390
		T	-20,160	10,995	,075	-42,482	2,162
albumina	S	SEX	,175	,211	,411	-,252	,603
		T	,130	,211	,540	-,297	,558
		TEX	,062	,211	,770	-,366	,490
	SEX	S	-,175	,211	,411	-,603	,252
		T	-,045	,205	,828	-,461	,371
		TEX	-,113	,205	,584	-,530	,303
	T	S	-,130	,211	,540	-,558	,297
		SEX	,045	,205	,828	-,371	,461
		TEX	-,068	,205	,741	-,485	,348
	TEX	S	-,062	,211	,770	-,490	,366
		SEX	,113	,205	,584	-,303	,530
		T	,068	,205	,741	-,348	,485
corticosteron a	S	SEX	-36,369	54,951	,512	-147,925	75,186
		T	32,656	54,951	,556	-78,900	144,211
		TEX	15,614	54,951	,778	-95,942	127,170
	SEX	S	36,369	54,951	,512	-75,186	147,925
		T	69,025	53,485	,205	-39,555	177,605
		TEX	51,983	53,485	,338	-56,597	160,564
	T	S	-32,656	54,951	,556	-144,211	78,900
		SEX	-69,025	53,485	,205	-177,605	39,555
		TEX	-17,042	53,485	,752	-125,622	91,539

	TEX	S	-15,614	54,951	,778	-127,170	95,942
	SEX		-51,983	53,485	,338	-160,564	56,597
	T		17,042	53,485	,752	-91,539	125,622
PPARa	S	SEX	-,085	,435	,847	-,968	,798
	T		-,477	,435	,280	-1,360	,406
	TEX		-,001	,435	,997	-,884	,881
	SEX	S	,085	,435	,847	-,798	,968
	T		-,393	,423	,360	-1,252	,467
	TEX		,083	,423	,845	-,776	,943
	T	S	,477	,435	,280	-,406	1,360
	SEX		,393	,423	,360	-,467	1,252
	TEX		,476	,423	,269	-,383	1,335
	TEX	S	,001	,435	,997	-,881	,884
	SEX		-,083	,423	,845	-,943	,776
	T		-,476	,423	,269	-1,335	,383
PPARd	S	SEX	-,312	,338	,361	-,998	,373
	T		-,229	,338	,502	-,915	,457
	TEX		-,342	,338	,318	-1,028	,343
	SEX	S	,312	,338	,361	-,373	,998
	T		,083	,329	,801	-,584	,751
	TEX		-,030	,329	,928	-,698	,638
	T	S	,229	,338	,502	-,457	,915
	SEX		-,083	,329	,801	-,751	,584
	TEX		-,113	,329	,732	-,781	,554
	TEX	S	,342	,338	,318	-,343	1,028
	SEX		,030	,329	,928	-,638	,698
	T		,113	,329	,732	-,554	,781
PGC1a	S	SEX	-,053	,294	,858	-,650	,544
	T		-,386	,294	,198	-,984	,211
	TEX		,023	,294	,939	-,574	,620
	SEX	S	,053	,294	,858	-,544	,650
	T		-,333	,286	,252	-,915	,248
	TEX		,076	,286	,793	-,505	,657
	T	S	,386	,294	,198	-,211	,984
	SEX		,333	,286	,252	-,248	,915
	TEX		,409	,286	,162	-,172	,990
	TEX	S	-,023	,294	,939	-,620	,574

			SEX	-,076	,286	,793	-,657	,505
			T	-,409	,286	,162	-,990	,172
CPI1b	S	—	SEX	,028	,307	,928	-,596	,652
			T	-,479	,307	,128	-1,103	,145
			TEX	,054	,307	,862	-,570	,678
	SEX	—	S	-,028	,307	,928	-,652	,596
			T	-,507	,299	,099	-1,114	,101
			TEX	,026	,299	,932	-,581	,633
	T	—	S	,479	,307	,128	-,145	1,103
			SEX	,507	,299	,099	-,101	1,114
			TEX	,532	,299	,084	-,075	1,140
	TEX	—	S	-,054	,307	,862	-,678	,570
			SEX	-,026	,299	,932	-,633	,581
			T	-,532	,299	,084	-1,140	,075
miostatina	S	—	SEX	-,206	,489	,677	-1,199	,788
			T	,014	,489	,978	-,980	1,007
			TEX	-,092	,489	,852	-1,085	,901
	SEX	—	S	,206	,489	,677	-,788	1,199
			T	,219	,476	,648	-,748	1,186
			TEX	,113	,476	,813	-,853	1,080
	T	—	S	-,014	,489	,978	-1,007	,980
			SEX	-,219	,476	,648	-1,186	,748
			TEX	-,106	,476	,825	-1,073	,861
	TEX	—	S	,092	,489	,852	-,901	1,085
			SEX	-,113	,476	,813	-1,080	,853
			T	,106	,476	,825	-,861	1,073
relat_gord	S	—	SEX	-,053	,477	,912	-1,020	,915
			T	,526	,477	,277	-,441	1,494
			TEX	-,024	,477	,959	-,992	,943
	SEX	—	S	,053	,477	,912	-,915	1,020
			T	,579	,464	,220	-,363	1,521
			TEX	,028	,464	,952	-,913	,970
	T	—	S	-,526	,477	,277	-1,494	,441
			SEX	-,579	,464	,220	-1,521	,363
			TEX	-,551	,464	,243	-1,493	,391
	TEX	—	S	,024	,477	,959	-,943	,992
			SEX	-,028	,464	,952	-,970	,913

	T	,551	,464	,243	-,391	1,493
--	---	------	------	------	-------	-------

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

APÊNDICE C – Valores individuais de aminoácidos séricos livres (μMol/L)

		Asp	Glu	Hpro	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg+Tau	Thr	Ala
CAS	S	38	170	37	38	248	593	230	68	27	231	424
		52	134	44	33	253	647	244	79	30	233	391
	SX	26	166	41	28	231	623	326	78	31	245	421
		15	176	31	24	192	721	252	61	27	191	331
	T	33	195	41	24	288	622	329	62	32	217	435
		34	140	40	16	229	528	250	60	27	232	308
	TX	39	33	54	39	324	805	367	83	47	281	514
		15	248	36	28	246	699	300	69	34	233	479
	S	52	158	39	27	253	691	265	73	34	313	399
		54	147	31	23	236	599	256	71	25	257	323
WPC	SX	28	208	35	29	257	734	323	78	33	235	415
		25	236	38	30	271	747	306	80	32	243	506
	T	40	164	37	20	262	650	305	72	30	261	456
		38	153	40	24	246	630	290	64	29	282	436
	TX	23	241	39	37	256	723	332	84	36	267	468
		29	189	39	17	229	631	301	60	28	226	388
	S	28	176	26	23	265	588	301	73	27	225	381
		45	157	33	30	263	656	289	64	32	241	384
WPH	SX	29	216	43	36	229	736	308	77	41	212	512
		12	218	40	22	245	707	306	62	34	221	628
	T	41	178	44	29	252	703	296	80	37	303	396
		43	148	32	12	230	499	264	53	22	251	348
	TX	34	213	46	34	282	685	370	77	41	319	513
		18	170	32	18	228	674	293	61	30	244	452

		Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Trp	Lys
CAS	S	119	52	139	47	12	83	126	76	22	322
		122	51	143	71	11	83	132	79	18	409
	SX	123	90	166	63	20	78	135	73	23	456
		96	54	135	54	11	65	113	73	18	322
	T	119	61	153	55	10	90	147	76	25	399
		111	57	128	49	16	74	117	63	20	373
	TX	149	74	182	61	11	100	180	93	27	535
		126	76	180	59	15	101	170	92	29	385
	S	130	40	154	62	12	81	141	74	21	422
		93	35	126	45	9	80	115	67	26	359
WPC	SX	121	67	170	66	10	94	155	92	29	397
		123	60	184	67	11	107	167	96	36	476
	T	117	47	162	65	13	89	144	81	26	451
		109	40	127	45	15	73	110	70	25	413
	TX	133	80	207	75	15	114	192	102	33	479
		103	63	159	53	14	94	149	86	31	361
WPH	S	104	49	134	44	18	76	130	65	22	348
		121	38	153	49	10	88	137	72	21	358
	SX	129	59	177	58	12	116	181	96	29	431
		132	69	192	55	13	111	177	97	31	383
	T	139	45	131	58	10	68	127	67	25	408
		100	40	129	43	11	73	116	61	20	331
	TX	132	76	171	67	9	99	156	95	34	561
		112	51	136	54	15	85	136	81	27	409

APÊNDICE D – Valores individuais de aminoácidos musculares livres (μMol/kg)

		Asp	Glu	HPro	Asn	Ser	Gln	Gly	His	Arg	Tau	Thr
CAS	S	27	1296	287	232	835	4071	4184	256	8282	9499	6362
		28	1179	283	262	939	3556	4417	266	9505	10233	6466
	SX	136	1174	206	225	922	3117	4693	289	8260	9448	6168
		151	1188	221	239	942	3130	4720	302	8276	9460	6184
	T	91	1435	331	197	837	3921	4805	228	9902	9305	6137
		114	1467	279	275	784	3752	5131	270	9689	10620	600
	TX	835	787	243	234	876	3109	4185	251	8553	9760	6440
		2050	950	234	309	986	4011	5055	351	10161	10034	6798
	S	365	1081	317	229	886	3941	4980	181	7168	11389	7596
		385	1027	326	289	1220	4354	4713	164	8647	10320	6480
WPC	SX	668	995	149	217	894	3330	4400	248	8032	10285	5943
		618	1138	179	273	1393	3848	4977	238	8978	10387	6382
	T	693	1261	190	210	909	3517	4417	258	7475	9777	6357
		635	1253	234	215	1226	4466	5106	368	7450	10642	6703
	TX	2478	1390	197	326	1308	3449	4565	385	7035	9015	6614
		3022	1857	166	330	2022	3866	4944	387	8669	9678	7660
WPH	S	750	901	220	237	1115	3595	5331	239	8189	10103	6369
		747	1254	228	291	1250	3888	4443	340	7975	10640	6653
	SX	2152	1289	190	327	1197	3014	4537	357	7945	11758	6788
		2223	1139	207	382	1518	3387	4885	405	7731	10732	6041
	T	2069	1185	243	385	1505	3978	5682	422	8794	10858	6633
		1714	1301	315	294	1221	3907	5299	332	9250	10553	6390
	TX	3041	1471	236	336	1548	3037	6227	350	8260	9541	7053
		3106	1714	228	415	1875	3485	5605	397	9530	9893	7800

		Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Trp	Lys
CAS	S	3636	299	20	129	16	24	193	155	56	15	1370
		4253	337	37	152	16	27	164	196	54	15	1260
	SX	3494	271	55	150	25	25	51	186	76	24	923
		3516	288	66	167	39	34	66	201	88	34	937
	T	2884	317	70	130	17	30	30	116	41	21	1301
		4195	378	74	133	19	42	24	130	247	24	1033
	TX	3183	242	60	200	45	33	83	201	101	38	1126
		2318	222	70	247	65	39	98	202	115	49	1134
	S	4015	261	57	167	29	42	50	143	68	22	913
		4075	331	90	130	34	47	44	152	86	24	1555
	SX	3326	284	53	189	50	29	77	189	104	36	807
		4443	415	43	269	155	44	162	204	248	47	835
WPC	T	3214	251	81	222	66	32	88	233	115	25	1037
		2419	215	143	247	70	43	106	294	294	62	1203
	TX	3888	400	154	388	136	40	227	452	224	58	1605
		5321	450	176	279	179	39	219	513	250	99	1882
	S	3507	274	98	281	123	29	212	355	153	35	101
		3679	321	78	307	191	37	260	598	160	55	1069
WPH	SX	4492	465	151	468	162	38	254	534	269	72	972
		4713	511	155	596	175	43	361	621	328	68	889
	T	4861	457	178	517	238	49	250	589	273	55	1400
		3696	431	138	466	164	47	295	628	201	48	1419
	TX	4498	539	172	498	169	42	259	543	261	58	1193
		5337	683	257	554	158	80	487	898	311	93	816