

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTOS DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO PROTÉICO MUSCULAR DE
RATOS ALIMENTADOS COM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE E
SUBMETIDOS À ATIVIDADE FÍSICA**

Viviane Costa Silva Zaffani
Nutricionista

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em
Alimentos e Nutrição.

Campinas – SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Z13a Zaffani, Viviane Costa Silva
Avaliação do metabolismo protéico muscular de ratos alimentados com proteína do soro do leite submetidos à atividade física / Viviane Costa Silva Zaffani. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Soro do leite. 2. Atividade física. 3. Proteínas - Metabolismo. 4. Aminoácidos. I. Amaya Farfan, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of muscle protein metabolism in rats fed the whey proteins milk when subjected physical activity

Palavras-chave em inglês (Keywords): Whey protein, Physical activity, Protein - Metabolism, Aminoacids

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

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Jaime Amaya Farfan

Miguel Arcanjo Áreas

Mário Roberto Maróstica Junior

Maria Cristina Cintra Moraes Marcondes

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DEPAN – UNICAMP
(Orientador)

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Instituto de Biologia – Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia –
UNICAMP
(Membro)

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DEPAN – UNICAMP
(Membro)

Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Instituto de Biologia – Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia –
UNICAMP
(Membro Suplente)

Prof. Dra. Mara Patrícia Traina Chacon-Mikahil

Educação Física – Departamento de Ciências do Esporte
UNICAMP
(Membro suplente)

À Deus, por me estender a mão e conceder a realização do mestrado.

Ao meu amado esposo, Geazi Zaffani, pela paciência, companheirismo e amizade, que foram fundamentais durante o período de pós-graduanda, e por ser em parte responsável pela realização deste sonho.

Ao meu irmão, Antônio Geraldo Cavallari Junior, que eu tanto amo e por isso compartilho contigo a alegria desta vitória.

Dedico

Aos meus pais:

Wilson Aranda da Silva e Isa Maria Costa Figo

Por apoiarem meus passos até aqui como co-responsáveis pela realização dos meus sonhos. Eu os amo mais que tudo. Mesmo que o tempo passe, como criança eu para sempre vou amar vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela companhia durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, que me estendeu a mão quando o mestrado parecia perdido, também por confiar este trabalho a mim, e por cada explicação, orientação e conteúdo que me foi oferecido.

Aos técnicos e funcionários do DEPAN- FEA – UNICAMP, em especial à Carla de Marco Gregghi e ao Éder Muller, pelo apoio e disposição em ajudar durante as análises.

A Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, chefe do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia - UNICAMP e coordenadora do Laboratório de Bioquímica do Exercício, pelo auxílio imprescindível durante o processo experimental, tornando viva a interdisciplinaridade que enriqueceu e contribuiu na construção de todo o projeto de pesquisa.

A Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes, membro do corpo docente do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia do Instituto de Biologia - UNICAMP, que prontamente aceitou realizar análises fundamentais a este projeto, também fazendo parte da interdisciplinaridade, tornando minha pesquisa menos limitada e os resultados e meus conhecimentos mais amplos.

E também à aluna de pós-graduação Emiliane Miguel Salomão, do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia do Instituto de Biologia – UNICAMP, orientanda da profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes, pela ajuda com a realização de técnicas e auxílio com a execução de algumas análises muito importantes.

Ao Dr. Chao Wu, do Depto. de Pesquisa e Desenvolvimento, da Hilmar Ingredients, Dalhart, CA, e à Doremus Alimentos, São Paulo,

As colegas de pós-graduação, Carolina Cauduro Bensabath e Giovana Ermetice de Almeida Costa, pelo companheirismo, amizade, troca de experiências e conhecimento, e também pela paciência. Valeu meninas!

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
JUSTIFICATIVA	7

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
PROTEÍNAS.....	9
QUALIDADE DAS PROTEÍNAS	10
PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE	11
METABOLISMO DAS PROTEÍNAS.....	14
O DNA.....	14
SÍNTESE PROTÉICA	15
DEGRADAÇÃO PROTÉICA.....	17
<i>TURNOVER</i> PROTÉICO	18
O PAPEL DO IGF1	20
PROTEÍNAS E ATIVIDADE FÍSICA.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

Capítulo 2

EFFECT OF DIETARY WHEY PROTEIN HYDROLYZATE AND PHYSICAL ACTIVITY ON MUSCLE PROTEIN METABOLISM.....	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUCTION	31
2. MATERIAL AND METHODS	33
2.1 – BIOLOGICAL ASSAY	33
2.2 – EXPERIMENTAL DIETS	34
2.3 – TRAINING PROTOCOL.....	35
2.4 – SAMPLE COLLECTION FOR ANALYSIS.....	36
2.5 – DETERMINATION OF IGF1	37
2.6 – MUSCLE PROTEIN SYNTHESIS	37
2.7 – MUSCLE PROTEIN DEGRADATION	38
2.8 – DETERMINING TOTAL MUSCLE PROTEIN	38
2.9 – DETERMINATION OF DNA MUSCLE.....	39

2.10 – STATISTIC ANALYSIS	39
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	39
4. CONCLUSIONS.....	49
5. ACKNOWLEDGMENTS.....	50
6. REFERENCES	50

Capítulo 3

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DO HIDROLISADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE SOBRE OS PERFIS DE AMINOÁCIDOS SÉRICOS DE RATOS JOVENS TREINADOS	54
RESUMO.....	55
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.1 – ENSAIO BIOLÓGICO	58
2.2 – PROTOCOLO DE TREINAMENTO	60
2.3 – DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS DAS DIETAS	61
2.4 – COLETA DE AMOSTRAS	62
2.5 – <i>DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS SÉRICOS</i>	63
2.6 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
3.1 – PERFIS DE AMINOÁCIDOS DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	64
3.2 – PERFIS DE AMINOÁCIDOS SÉRICOS.....	66
3.3 – EVOLUÇÃO PONDERAL E PESO DOS MÚSCULOS SÓLEO E GASTROCNÊMIO	73
4. CONCLUSÕES.....	77
5. AGRADECIMENTOS.....	77
6. REFERÊNCIAS	78
CONCLUSÃO GERAL	80
ANEXO.....	83

Índice de figuras

Capítulo 2

Figura 1 - Segregation of animals by type of diet and physical activity.	33
Figura 2 - Time and speed table for training and physical performance.	35
Figura 3– Effect of diets containing either whey protein isolate (WPI) or hydrolyzed whey protein (HWP) on protein synthesis in the gastrocnemius muscle (A), and the soleus muscle (B) of sedentary and trained rats.....	45
Figura 4- Effect of diet with WPI and HWP on protein degradation in gastrocnemius muscle of sedentary and trained rats.....	47
Figura 5- Effect of diet with WPI and HWP on serum levels of IGF1.	48

Capítulo 3

Figura 1– Divisão em grupos dos animais por tipo de dieta e atividade física.	59
Figura 2- Teste de performance utilizado para avaliação da aptidão para o exercício.....	60
Figura 3– Evolução ponderal dos seis diferentes grupos de ratos durante as nove semanas de tratamento com treinamento e dieta com três diferentes tipos de proteína: caseína, PSLI e PSLH.	74

Índice de tabelas

Capítulo 2

Tabela 1 - Formulation of the three experimental diets (g/100g) fed during 9 weeks of training.....	34
Tabela 2 - Weekly training protocol.....	36
Tabela 3 - Protein and DNA of the gastrocnemius and soleus muscle protein, for the six groups of rats after 48 hours of recovery from training and 12 hours fasting ...	41

Capítulo 3

Tabela 1 - Composição das diferentes dietas experimentais (g/100g) administrada nas 9 semanas de treinamento.....	60
Tabela 2 - Protocolo de treinamento aplicado aos grupos CT, IT e HT.....	61
Tabela 3 - Composição aminoacídica das três dietas utilizadas (g/100g de matéria seca). .	66
Tabela 4 - Concentração de aminoácidos séricos livres (mg/100mg) após 48 horas de repouso e 12 horas de jejum.	69
Tabela 5 - Peso (mg) e peso corrigido (mg/kg de peso corporal) dos músculos sóleo e gastrocnêmio.....	76

Resumo geral

A ocorrência de desvios no metabolismo protéico durante o exercício depende tanto da intensidade, duração e frequência do exercício, como também da ingestão alimentar, especialmente da qualidade da dieta consumida. Neste contexto, proteína do soro do leite (PSL) destaca-se pelo seu alto valor nutritivo, devido tanto à composição de aminoácidos, quanto à rápida digestão, além de outras funcionalidades relacionadas com a saúde. O objetivo deste estudo foi avaliar em ratos os efeitos da ingestão da proteína do soro do leite, na sua forma intacta e hidrolisada (~12,5% de hidrólise), em associação à atividade física de *endurance*, sobre os níveis séricos de aminoácidos, evolução ponderal, conteúdo protéico em gastrocnêmio e sóleo, conteúdo de DNA no gastrocnêmio, níveis séricos de IGF1, síntese e degradação protéica no gastrocnêmio e síntese no sóleo. Ratos Wistar foram distribuídos em 6 grupos, de acordo com a proteína consumida (12%): caseína (CAS), isolado protéico do soro do leite (IPSL) ou hidrolisado protéico do soro do leite (HPSL)) e submetidos a um protocolo de atividade física (sedentários (S) e treinados (T)). Os ratos treinados correram em esteira, durante 9 semanas, e foram sacrificados após 48 horas de repouso e 12 horas de jejum. As três dietas utilizadas apresentaram conteúdos semelhantes de aminoácidos totais, mas as dietas IPSL e HPSL destacaram-se apresentando maiores valores absolutos de leucina, isoleucina, lisina, treonina, cistina, alanina e ácido aspártico, em relação a CAS. No geral, os níveis séricos de aminoácidos indispensáveis foram semelhantes para os grupos IS e HS, em comparação com os ratos controle sedentários (CS), enquanto o grupo HT apresentou o maior nível destes aminoácidos, em relação ao CT. A evolução ponderal foi semelhante para todos os grupos de ratos até o final

da oitava semana de treinamento. Na nona semana, os grupos treinados apresentaram peso significativamente menor que o CS. Não houve diferença estatística para o peso, conteúdo protéico dos músculos gastrocnêmio e sóleo, níveis séricos de IGF1 e taxas de degradação protéica muscular do gastrocnêmio, entre todos os grupos experimentais. O conteúdo e concentração de DNA no gastrocnêmio foi significativamente menor em ambos os grupos que consumiam a HPSL (HS e HT), independente da atividade física, comparado aos grupos que consumiam as proteínas intactas (CS, IS, CT e IT). As taxas de síntese protéica nos músculos gastrocnêmio e sóleo também foram menores para o grupo HT, comparado aos sedentários (CS, IS e HS), mas sem mostrar diferença com os grupos CT e IT. Os ratos do grupo HT destacaram-se por apresentar diminuição da demanda por nova síntese protéica, e da necessidade de utilização de aminoácidos do *pool* sérico diminuindo, conseqüentemente, a necessidade de aumentar a quantidade de DNA celular no músculo gastrocnêmio e ainda assim, manteve o peso, a concentração e o conteúdo protéico muscular sem diferença em relação aos demais grupos. Estes resultados, considerados em conjunto, sugerem que o consumo da proteína hidrolisada do soro do leite pode contribuir para a preservação da massa muscular no gastrocnêmio, quando associado à atividade física de *endurance*.

Abstract

Physical exercise promotes protein metabolic alterations depending not only on its intensity, duration and frequency, but also on food intake and especially on the quality of the diet. In this context, the milk whey proteins (PSL) stand out because of their high quality, meeting both amino-acid profile and digestibility requirements, besides other functional properties. The aim of this study was to assess the effects of milk whey protein intake in rats, in both the intact and hydrolyzed forms (~12,5% of hydrolysis), associated with physical activity of endurance, on serum amino acids levels, body weight, protein content in both the gastrocnemius and soleus muscles, total DNA content in the gastrocnemius, serum IGF1 levels, protein degradation rate in the gastrocnemius, and of protein synthesis in the soleus and gastrocnemius. Male Wistar rats were divided into six groups as follows: protein consumed (12%), casein – CAS, milk whey protein isolate – IPSL, or milk whey protein hydrolyzate –HPSL) and physical activity protocol (sedentary, S, and trained, T). The trained rats were exercised on the treadmill during nine weeks and sacrificed following 48 hours of rest; the last 12 hours being fasted. The three diets tested produced similar contents of total amino acids, although the IPSL and HPSL diets stood out because of the higher absolute values of leucine, isoleucine, lysine, threonine, cysteine, alanine and aspartate than those of CAS. As a whole, the serum indispensable amino acid levels were similar when comparing both IS and HS groups with the control group (CS). However, the HT group showed higher levels of these amino acids than the CT group. No difference in body weight evolution was apparent among the groups until the end of the eighth week of training. Nevertheless, on the ninth week the trained groups showed

significantly lower weights than group CS. There were no significant differences, among all groups studied, in the weight, the content and concentration of both gastrocnemius and soleus muscles, and serum IGF1 levels, as well as the degradation rate of proteins in the gastrocnemius muscle. The content and concentration of DNA in the gastrocnemius were significantly lower in both groups fed HPSL (HS and HT), regardless of physical activity, than in the groups fed intact protein (CS, IS, CT and IT). The rate of protein synthesis in both gastrocnemius and soleus muscles were also lower in the HT group than those found in the CS, IS and HS groups. However, there was no difference when compared to those of the IT and CT groups. Summarizing, the HT group stood out because of its lower demand for new protein synthesis and amino acid utilization from the serum pool, consequently decreasing the need for higher amount of cellular DNA in the gastrocnemius muscle. Even so, this group kept the same muscle mass, protein content and concentration, as those of the other groups. These results suggest that the consumption of hydrolyzed milk whey protein may contribute to the preservation of the gastrocnemius muscle when associated with physical activity of endurance.

Introdução geral

A composição e as características corporais de todos os animais são frutos da genética, da alimentação e do esforço físico. Estes são três elementos-chaves a serem considerados quando se deseja alcançar objetivos relacionados à saúde e ao rendimento físico.

Dentre estes três elementos-chaves apresentados, apenas a alimentação e a atividade física são ferramentas manipuláveis, e por isso são alvo de muitas pesquisas que almejam atender a grande demanda na área de desporto e atletismo e na área de saúde em geral.

A relação entre alimento, atividade física e saúde é conhecida desde o tempo das civilizações antigas, sendo uma das preocupações que ocupavam pensadores da Suméria, da Índia, do Egito, da China, da Pérsia e de outras⁽¹⁾. Por exemplo, na Grécia antiga, os pedótribas (treinadores ou técnicos particulares) prescreviam enormes quantidades de carne, com o objetivo de produzir massa e força musculares consideradas necessárias para os boxeadores e lutadores.

Desde os primeiros pensadores até a ciência atual houve grande progresso no que se trata de alimentação e atividade física, porém ainda hoje os alimentos protéicos são colocados em destaque tanto pela sabedoria popular, que expõe um conhecimento empírico preservado por gerações, quanto pela própria ciência, que, por meio de pesquisas, confirma diversos benefícios na ingestão destes macronutrientes.

O exercício físico promove alterações importantes no metabolismo das proteínas, que podem resultar em respostas anabólicas ou catabólicas⁽¹⁾, causando desvio no *turnover* protéico. A ocorrência deste desequilíbrio depende diretamente, tanto da intensidade,

duração, e frequência do exercício, como também da ingestão alimentar, especialmente da qualidade da dieta consumida⁽²⁾.

Desta forma, com o objetivo de alcançar um balanço metabólico protéico positivo (síntese maior que degradação protéica), os esportistas cada vez mais procuram suplementos e/ou produtos alimentares ricos em proteínas de alta qualidade⁽²⁾.

Diversos estudos mostram que alguns aminoácidos indispensáveis são necessários ao estímulo da síntese protéica no músculo e sugerem que a proteína a qual prove uma alta proporção deste aminoácido seria eficiente em promover crescimento.

Outra hipótese que está se tornando cada vez mais aceita é que a rápida digestibilidade e absorção das proteínas tem impacto importante sobre a cinemática protéica⁽³⁾, sendo capaz de promover e/ou reforçar o balanço metabólico protéico na direção do anabolismo. Isto inclusive justifica a utilização de proteínas parcialmente hidrolisadas por esportistas, a fim de conseguir um impacto metabólico positivo em função da velocidade de absorção.

Dentro deste contexto, a proteína do soro do leite destaca-se por ser classificada como de “alta qualidade”, atendendo tanto o quesito de composição de aminoácidos, quanto de velocidade de digestão, além de outros. Assim, dentre os vários aspectos deste macronutriente que hoje a ciência estuda, os benefícios sobre o metabolismo protéico são muito atrativos, principalmente para desportistas e atletas.

Justificativa

A ciência cada vez mais mostra a eficiência do exercício físico e da utilização da proteína do soro do leite para a saúde. No entanto a maioria das pesquisas existentes, relativas a estes dois temas (exercício físico e proteína do soro do leite), ou focam os efeitos sobre o metabolismo protéico de cada um deles separadamente, ou associados à outra variável, das diversas que existem, a fim de tentar responder algumas das muitas questões que ainda cercam a relação atividade física - nutrição – saúde.

A expectativa por bons resultados na associação entre exercício e a ingestão da proteína do soro do leite nasce das respostas obtidas até agora por estudiosos, por meio de pesquisas sobre cada um desses dois temas, apontando a possibilidade de uma associação que parece muito vantajosa. Por exemplo, se o exercício de *endurance* pode aumentar a quantidade de capilares sanguíneos por fibra muscular, a capacidade das mitocôndrias de gerar ATP por meio da fosforilação oxidativa, a capacidade de oxidação dos lipídios e dos carboidratos; e se a ingestão de proteína do soro pode aumentar rapidamente a disponibilidade de aminoácidos, e conseqüentemente o transporte destes para dentro do músculo, uma associação entre estas duas variáveis poderia sugerir um significativo favorecimento da preservação protéica muscular e/ou um grande favorecimento da síntese protéica, acarretando diversos reflexos também favoráveis no organismo.

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

Proteínas

As proteínas são as mais abundantes macromoléculas biológicas e representam o principal componente estrutural e funcional de todas as células do organismo. Apesar da enorme diversidade de enzimas e de outras proteínas no corpo, quase 50% do conteúdo protéico total do ser humano está presente em apenas quatro proteínas (miosina, actina, colágeno e hemoglobina)⁽⁴⁾.

O corpo humano adulto, pesando em média 70 kg, contém entre 10 a 12 kg de proteína⁽⁵⁾. Ao considerar a grande representatividade da miosina e actina (proteínas musculares), nota-se então que as proteínas corporais estão localizadas de forma muito significativa dentro da massa dos músculos esqueléticos.

As proteínas assemelham-se aos carboidratos e lipídios, pois também contém átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio. As moléculas de proteínas contém aproximadamente 16% de nitrogênio, juntamente com enxofre e, ocasionalmente, fósforo, cobalto e ferro⁽⁵⁾.

As proteínas são estruturas complexas e poliméricas que tem como unidade estrutural os aminoácidos. As ligações peptídicas unem covalentemente os aminoácidos formando desde cadeias pequenas chamadas de polipeptídios (cadeia de no máximo 100 aminoácidos) até cadeias bem maiores e mais complexas denominando-se então de proteínas (cadeia maior que 100 aminoácidos)⁽⁵⁾.

O corpo é incapaz de sintetizar alguns aminoácidos, sendo necessário que eles sejam fornecidos como parte da dieta, e por isso são classificados como indispensáveis. Estes

aminoácidos são a treonina, triptofano, histidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, valina e fenilalanina.

Os aminoácidos indispensáveis são um dos mais importantes parâmetros de classificação das proteínas provenientes dos alimentos e, assim, podem ser classificadas com alto ou baixo valor nutricional, dependendo da sua capacidade de fornecer aminoácidos indispensáveis. Os alimentos protéicos de maior valor nutricional provêm de fontes animais (carne, leite, ovos), enquanto os vegetais (soja, lentilhas, feijões, ervilhas, nozes e cereais) são incompletos em um ou mais aminoácidos indispensáveis.

Qualidade das Proteínas

As proteínas podem variar de acordo com a fonte (animal ou vegetal), composição de aminoácido (particularmente seu conteúdo de aminoácidos indispensáveis), sua digestibilidade, textura e outros parâmetros⁽⁶⁾.

A composição aminoacídica de diferentes proteínas pode ter efeito ímpar sobre as funções fisiológicas no corpo humano. Por exemplo, uma proteína pode proporcionar grande estímulo à síntese protéica no músculo, enquanto outra pode mostrar ação estimuladora do sistema imune. Portanto, a qualidade da proteína é vital quando se consideram os benefícios nutricionais específicos que elas podem proporcionar.

Os parâmetros atualmente considerados para classificar uma proteína como de “alta qualidade” são a composição de aminoácidos, a digestibilidade e a biodisponibilidade dos aminoácidos⁽⁷⁾. Há várias escalas e técnicas para analisar a qualidade da proteína, mas os métodos em destaque são: Padrão de eficiência protéica (PER), Valor biológico, Rede de utilização da proteína, e Digestibilidade Protéica Adequada ao Score de Aminoácido⁽⁸⁾.

Diante disto, a proteína do soro consegue destaque por apresentar todos os quesitos relativos à qualidade, (alta digestibilidade, ótimas composição e biodisponibilidade de aminoácidos), comprovadas por todos os métodos de avaliação apontados, sendo que, em comparação com carne bovina, caseína, leite e ovos, sua posição no ranking foi a melhor, exceto na análise do PER, que se mostrou pouco menos eficiente que o conteúdo protéico do ovo⁽⁸⁾.

Proteínas do soro do leite

O termo soro refere-se a uma parte líquida translúcida do leite, remanescente do processo de fabricação do queijo (coagulação e retirada da coalhada). O soro é um dos dois maiores grupo protéico do leite bovino, contém cerca de 20% de proteína, sendo que o primeiro grupo, a caseína, responde por 80% da proteína⁽⁸⁾.

O soro do leite é composto por proteínas como a α -lactoalbuminas, lactoferrina, imunoglobulinas, β -lactoalbuminas, lactoperoxidase, glicomacropeptídios e uma variedade de fatores de crescimento. Essas proteínas têm sido destacadas em uma série de efeitos biológicos observados em estudos com humanos e com animais⁽⁹⁾.

Do ponto de vista aminoacídico, as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos indispensáveis em excesso às recomendações, destacando o triptofano, a cisteína, a leucina, a isoleucina e a lisina. Há exceção para os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades⁽¹⁰⁾.

Dentro deste contexto, é possível notar que os constituintes das proteínas do soro de leite oferecem alto conteúdo de aminoácidos indispensáveis e aminoácidos de cadeia ramificada, além de serem ricos em vitaminas e minerais⁽⁸⁾. Dentre a alta proporção de

aminoácidos de cadeia ramificada, a leucina se destaca por ser a mais abundante e de particular interesse⁽¹¹⁾.

Estudos têm demonstrado que a leucina é capaz de estimular o anabolismo protéico agindo sobre caminhos intracelulares implicados na regulação da síntese protéica (mTOR, S6K, e 4EBP1)⁽¹²⁾.

Uma pesquisa realizada na França avaliou os efeitos de várias proteínas do leite, que diferiam quanto à composição de aminoácido, e de suplemento com leucina livre sobre a síntese protéica muscular pós prandial em ratos idosos. Em conclusão os autores apontaram que assim como a leucina livre, a alimentação contendo proteínas ricas em leucina também foi capaz de melhorar a síntese protéica no músculo desses ratos⁽¹³⁾.

Além disso, o concentrado e o isolado do soro do leite são uma rara fonte de cisteína biodisponível⁽⁸⁾, quatro vezes maior comparada a outras fontes protéicas de qualidade como a caseína e soja. A cisteína tem papel indispensável no metabolismo humano e consegue promover preservação de tecidos musculares durante a atividade física⁽¹⁴⁾.

Alguns estudos têm demonstrado hipertrofia muscular com o uso de proteínas do soro isolada, por meio de biópsias do músculo, feitas antes e após o treinamento, revelando que a suplementação com a proteína do soro do leite aumentou o tamanho das fibras musculares do tipo II em 543% comparado ao grupo controle⁽¹⁴⁾.

A rápida digestão e absorção de aminoácidos observada tanto para proteínas do soro do leite quanto para proteínas hidrolisadas, é outra vantagem que pode ser explicada pela teoria de que o aumento da disponibilidade de aminoácidos aumentaria também o transporte destes para dentro do músculo, e isto sugeriria a estimulação da síntese protéica⁽¹⁵⁾. Por causa dessa velocidade de digestão e absorção alguns pesquisadores classificaram-nas como *fast metabolizing proteins*⁽³⁾, as quais são muito adequadas para

situações de estresses metabólicos, em que a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial⁽¹⁰⁾.

Estudos mostram que esta especificidade de *fast metabolizing proteins* da proteína do soro do leite é explicado pelo fato dessas proteínas não sofrer alterações conformacionais pela ação do suco gástrico, como acontece com a caseína, sendo então rapidamente esvaziadas pelo estômago. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando rapidamente a concentração aminoacídica e, assim, estimulando a síntese protéica⁽³⁾.

Desta forma, considerando a importância da velocidade de absorção para o metabolismo protéico, muitos atletas têm buscado as *fast metabolizing proteins*, como a *whey protein*, bem como seus hidrolisados, na expectativa de obter resultados ainda melhores⁽¹⁶⁾.

Além dos benefícios apresentados, as propriedades fisiológicas e funcionais da proteína do soro ainda podem promover inibição ou retardamento de processos patológicos ou do envelhecimento precoce em animais e, provavelmente, na espécie humana⁽¹⁰⁾.

A justificativa para essas propriedades fisiológico-funcionais vem dos diversos estudos que conferem à proteína do soro atividade imunomoduladora, principalmente devido à quantidade de imunoglobulinas do leite que permanecem quase integralmente no soro; atividade antimicrobiana e antiviral, devido a seu conteúdo de lactoferrina, lactoperoxidase, α -lactoalbuminas e imunoglobulinas; atividade antiúlcera, por conter grande quantidade de aminoácidos sulfurados, particularmente a cisteína, que promove o aumento da síntese de glutathione, que, por sua vez, é capaz de proteger tecidos epiteliais; atividade protetora do sistema cardiovascular; atividade anticâncer; atividade benéfica ao esporte; e outros⁽¹⁰⁾.

As alegações de atividades biológicas benéficas do soro do leite, combinadas ao grande crescimento do mercado de alimentos funcionais e ao aumento da demanda de consumidores por proteínas de alta qualidade, são um grande atrativo à utilização da proteína do soro e de suas frações como ingredientes para alimentos funcionais, e isto atualmente vem despertando o interesse da indústria de alimentos⁽⁹⁾.

Vários estudos estão desenvolvendo protótipos alimentares, a fim de expandir a disponibilidade de produtos que oferecem proteínas do soro. Os produtos incluem sorvetes, chocolates, barras de cereais, molhos, pudins e pastas. Esses produtos são capazes de oferecer de 5 a 30g de proteína do soro lácteo⁽⁹⁾.

Metabolismo das proteínas

Deoxyribose Nucleic Acid (DNA)

O DNA tem papel ímpar no processo de síntese protéica, pois é o local de armazenamento de informações genéticas, que funcionam como um “molde”, possibilitando que todas as proteínas sejam replicadas⁽¹⁷⁾.

O conteúdo de DNA está localizado dentro do núcleo celular e é utilizado como parâmetro de avaliação de hiperplasia e hipertrofia de um determinado tecido. Uma exceção é o músculo esquelético, composto de células multinucleadas, onde o aumento no conteúdo de DNA representa um aumento no número de núcleos e não necessariamente um aumento no número de células⁽¹⁸⁾.

Nos músculos estriados de ratos, o conteúdo de DNA aumenta até por volta dos 90 dias de idade, enquanto que o peso, as proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas continuam

a aumentar até por volta dos 140 dias de idade. Em meados dos 140 dias de idade, a síntese e a degradação protéica encontram o equilíbrio⁽¹⁸⁾.

Além do aumento natural durante a fase de crescimento, o conteúdo total de DNA muscular parece aumentar também em resposta a estímulos como presença do *Insulin-like Growth factor 1* (IGF1)⁽¹⁹⁾ e atividade física⁽²⁰⁾. Tanto no primeiro caso, quanto no segundo, este aumento de DNA foi acompanhado do aumento da massa muscular.

Síntese Protéica

A informação genética, armazenada nos cromossomos é transmitida às células filhas por meio da replicação do DNA, é expressa por meio da transcrição em RNA e, subsequente tradução em cadeias polipeptídicas⁽¹⁷⁾.

A primeira etapa da síntese é o processo de transcrição, onde as ligações de hidrogênio, que unem as bases do DNA, são rompidas e a enzima polimerase do ácido ribonucléico (RNA) forma uma seqüência de ribonucleotídios, seguindo o mesmo arranjo de pareamento de bases do filamento de DNA, formando o mRNA.

O mRNA é então transladado do núcleo, onde foi formado, para o citoplasma, onde os ribossomos (“maquinaria de síntese protéica”) estão localizados.

O próximo passo é o processo de tradução, que permite que as informações contidas na seqüência de bases do mRNA sejam utilizadas na determinação da seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica que será sintetizada.

Atualmente estudos mostram que a síntese protéica é muito ampla e, muitas descobertas foram acrescentadas ao antigo modelo de atuação do RNA, que tinha uma participação simplificada dentro do processo da síntese de proteínas, ainda pouco conhecido. Hoje, vários são os RNAs listados pela ciência, e sabe-se que a síntese protéica

depende mais de sua eficiência de tradução do que do número deles presentes na célula. Além disso, a eficiência em traduzir parece ser flexível a mudanças agudas no estado fisiológico, como por exemplo, do jejum ao pós prandial ⁽²¹⁾.

As células possuem um receptor que, em contato com o substrato circulante, como por exemplo a insulina, são autofosforilados e assim ativam proteínas como a IRS, e iniciam uma sinalização em cascata por meio da PI3K. Esta sinalização gerada converge para a mTOR⁽²²⁾. Esta convergência pode também requerer a ativação da PKC δ , que é uma proteína pouco conhecida, que está associada a mTOR e parece ter, entre outras, a função de fosforilar a 4E-BP1⁽²³⁾.

A 4E-BP1 é uma proteína que faz parte de uma família de inibidores que regula o complexo eIF4F. As 4E-BPs competem com a eIF4G para se ligar a eIF4E, e é capaz de sequestrar a eIF4E formando um complexo inativo. A ligação da 4E-BP1 a eIF4E é regulada pela fosforilação da primeira, sendo que quanto maior a fosforilação da 4E-BP1, menor é sua afinidade pela eIF4E⁽²⁴⁾.

A eIF4E faz parte de um grupo de proteínas denominado eIF4F. Em resumo, este complexo eIF4F é responsável basicamente por identificar, desdobrar e guiar o m-RNA ao complexo de pré-iniciação 43S⁽²⁴⁾. Vale destacar que o fator de iniciação 43S é formado na junção da subunidade ribossomal 40S com o metionil-tRNA, e esta reação é mediada pelo fator 2 de iniciação eucariótica (eIF2) e é regulada pela atividade de outro fator de iniciação, o eIF2B⁽²⁵⁾. O m-RNA ligado ao 43S ribossomal é então traduzido, concluindo o processo de síntese de um determinado peptídeo.

Estudiosos apontam que o processo de tradução não necessariamente segue os mesmos pontos sinalizadores. Atualmente as pesquisas mostram que enquanto hormônios como a insulina e a IGF1 dependem da cascata de sinalizadores da PI3K para estimular a

mTOR, os aminoácidos podem ativá-la diretamente. Além disso, quando a mTOR é estimulada pelos hormônios insulina e IGF1, ela inibe a ação da 4E-BP1, já no caso de estimulação pelos aminoácidos, ela ativa a P70S6K⁽²⁶⁾.

Interessante notar que, embora utilizem caminhos diferentes, os estímulos da insulina, IGF1 e aminoácido parecem convergir para a mTOR. Então a mTOR parece ter uma função central na integração de uma variedade de sinais de crescimento, desde estímulo nutricional simples, à ativação por fatores de crescimento protéico, resultando em síntese de proteínas⁽²⁶⁾.

Degradação Protéica

O processo de degradação protéica rompe as proteínas em sua unidade funcional, os aminoácidos. Este processo pode ser realizado de forma não lisossomal ou lisossomal, e este ocorre por meio de enzimas hidrolíticas, incluindo algumas proteinases e peptidases. Estas enzimas são oriundas dos lisossomos, que podem engolfar e digerir estruturas intracelulares, mas também existem sob forma solúvel⁽²⁷⁾.

O catabolismo dos aminoácidos ocorre principalmente com o objetivo de produzir intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (piruvato, α cetoglutarato, succinilcoenzima A, fumarato, acetoacetil-coenzima A, oxalacetato e acetil-coenzima A)⁽²⁷⁾, ajudando a suprir a demanda de energia corporal, que pode estar em déficit pela produção insuficiente de energia por meio de outros substratos (ácidos graxos e glicose).

O primeiro passo no catabolismo de todos os aminoácidos envolve a remoção do grupo alfa-amino. Uma vez removido, este nitrogênio pode ser incorporado em outros compostos ou excretado.

A transferência do grupo alfa-amino ao alfa-cetoglutarato, é um processo denominado de transaminação, e seus produtos são alfa-cetoácido e glutamato. Esse glutamato produzido pode ser oxidativamente desaminado ou ser utilizado como um doador de grupo amino na síntese de aminoácidos não-indispensáveis. Já o esqueleto de carbono (alfa-cetoácido) converge para formar algum dos intermediários do ciclo ácido tricarboxílico já citados⁽¹⁷⁾.

Ao contrário das reações de transaminação, que transferem grupos aminos, a desaminação oxidativa resulta na liberação do grupo amino como amônia, que é transportada até o fígado (ou como amônia livre ou como grupo amino), onde é transformada em uréia e esta, por sua vez, é difundida através da corrente sanguínea até os rins onde é filtrada e eliminada na urina⁽¹⁷⁾.

A uréia é a principal forma de eliminação dos grupos amino derivados do catabolismo dos aminoácidos e responde por mais de 90% dos componentes nitrogenados da urina.

Turnover Protéico

Não existe nenhum “reservatório” corporal de proteínas, pois todas contribuem para as estruturas teciduais ou existem como componentes importantes dos sistemas metabólicos, de transporte e hormonal⁽⁵⁾.

A maioria das proteínas corporais está constantemente sendo sintetizada e a seguir degradada. Nos adultos saudáveis, a quantidade total de proteínas no corpo permanece constante, porque a velocidade de síntese protéica é apenas suficiente para repor a proteína degradada. Este fenômeno é denominado de *turnover* de proteína⁽¹⁷⁾.

O *turnover* protéico é necessário para manter o *pool* metabólico de aminoácidos e a capacidade de satisfazer a demanda de aminoácidos de células e tecidos do organismo, quando esses são estimulados a sintetizar novas proteínas para uma determinada função.

O *pool* metabólico é constituído por aqueles aminoácidos liberados pela hidrólise de proteínas da dieta ou teciduais misturados a outros aminoácidos livres distribuídos pelo corpo. O *pool* de aminoácidos contém cerca de 100g de aminoácidos, e é pequeno em relação à quantidade de proteínas corporais (10 a 12 Kg em um homem de 70Kg)⁽¹⁷⁾.

O catabolismo de aminoácidos é parte do processo maior do metabolismo corporal global do nitrogênio. O nitrogênio entra no corpo em uma série de compostos presentes no alimento, sendo os mais importantes os aminoácidos contidos nas proteínas da dieta. O nitrogênio deixa o corpo em forma de uréia, amônia e outros produtos derivados do metabolismo dos aminoácidos⁽¹⁷⁾.

Existem determinadas condições em que podem ocorrer um desequilíbrio no *turnover* protéico. Na condição de balanço nitrogenado negativo, a quantidade de nitrogênio ingerido é menor do que aquela excretada. O contrário acontece na condição de balanço nitrogenado positivo, onde a quantidade de nitrogênio ingerido é maior comparada à quantidade excretada⁽⁴⁾.

A atividade física, por exemplo, é um importante fator que também é capaz de perturbar o equilíbrio entre as reações anabólicas e catabólicas. O exercício induz mudanças tanto na concentração de aminoácidos livres (*pool*) como no metabolismo protéico, e essas respostas têm se mostrado ser ambas agudas e em longo prazo, desde vários minutos, ou tão longo como vários dias⁽²⁸⁾.

Assim, quando o corpo necessita de aminoácidos, como substrato energético, plástico, ou sistêmico, os mesmo são subtraídos do plasma sanguíneo, do tecido visceral ou

do tecido muscular que são as principais fontes de proteína corporal. Os aminoácidos provenientes da hidrólise protéica destes tecidos convergem para o *pool* metabólico, e a partir de então ficam disponíveis as necessidades corporais. Da mesma forma, quando qualquer aminoácido é ingerido além da necessidade, não havendo “reservatório”, ele é então, imediatamente descartado ⁽⁵⁾.

O Papel do IGF1

As concentrações de GH (*Growth hormone*), IGF1 (*Insulin-like growth factor 1*), testosterona, cortisol e insulina séricos podem ser influenciadas por dieta e exercício ⁽²⁹⁾. Certas combinações de nutrientes, como proteína combinado com carboidrato (proporção de 1/3,4, por exemplo ⁽³⁰⁾), podem ser utilizadas para alterar a disponibilidade de nutrientes e hormônios a fim de aumentar o balanço protéico muscular. O exercício também pode modificar os níveis plasmáticos de substratos e hormônios, bem como induzir a sinalização de caminhos moleculares específicos que contribuiriam com a regulação do balanço metabólico nesses tecidos ⁽²⁹⁾.

O IGF1 é um peptídeo com 70 aminoácidos ⁽³¹⁾ classificado como um hormônio anabólico, que estimula o crescimento em quase todos os tecidos, e é provavelmente responsável por muitos dos efeitos do GH. O IGF1 é primariamente produzido no fígado, mas também em outros tecidos, como por exemplo, o músculo esquelético, sob estímulo do GH ⁽²⁹⁾.

Estudos apontam basicamente três formas de atuação do IGF1 que favorecem a hipertrofia no músculo esquelético. A primeira é que o IGF1, assim como a insulina, atua diretamente sobre as células endoteliais das artérias, as quais possuem receptores específicos para estes dois hormônios ⁽³²⁾, e estimula o transporte de glicose e aminoácido,

através das paredes vasculares, para dentro do tecido⁽³³⁾, e a presença destes nutrientes incita um balanço protéico positivo e ativação da síntese protéica.

A segunda forma de ação anabólica do IGF1 pode ser explicada pela sinalização molecular, iniciada por um receptor tirosino kinase, ativado quando ligado ao IGF1, e transmitida por meio de cascata de eventos intracelulares envolvendo fosforilação de várias proteínas reguladoras, incluindo alguns fatores de transcrição e marcadores de tradução, iniciando um aumento geral na síntese protéica⁽³⁴⁾.

Pesquisas apontam que os mecanismos pelos quais a insulina e IGF1 influenciam o metabolismo protéico diferem, sendo que a insulina tem maior efeito em inibir a proteólise, enquanto que o IGF1 estimula de forma mais eficaz a síntese protéica⁽³²⁾.

A terceira forma é a hipótese de que a IGF1 contribuir para a resposta hipertrófica, possivelmente via mobilização das células satélites e fusão destas com as miofibras, aumentando o número de mionúcleos e do conteúdo total de DNA, favorecendo o crescimento da fibra muscular⁽¹⁹⁾.

Proteínas e Atividade Física

Apesar da quantidade e proporção de proteína a ser ingerida por um indivíduo ser uma questão difícil, há um consenso de que o exercício físico, em geral, requer um aporte protéico maior do que aquele recomendado para pessoas sedentárias⁽³⁵⁾, sendo recomendado 1,6 a 1,7g.Kg⁻¹.dia⁻¹ para praticantes de exercício de força e 1,2 a 1,4g.Kg⁻¹.dia⁻¹ para praticantes de exercício de *endurance*⁽²⁾.

De acordo com a Diretriz da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte⁽³⁶⁾, a recomendação aumentada de proteínas para desportista e atletas é devido ao fato de que os

aminoácidos têm uma participação no fornecimento de energia durante a atividade física e são também necessários no período de recuperação.

Embora as proteínas não sejam utilizadas de maneira tão expressiva quanto os carboidratos e os lipídios como substrato energético, elas contribuem com cerca de 5 a 10% das necessidades energéticas, além de responderem pelo suprimento adequado de aminoácidos indispensáveis que garantem o crescimento, desenvolvimento e reconstituição tecidual⁽²⁷⁾.

O exercício físico promove alterações importantes no metabolismo protéico, que podem resultar em respostas anabólicas ou catabólicas, dependendo tanto da intensidade, duração, e frequência do exercício, como também da ingestão alimentar, especialmente qualidade da dieta consumida⁽²⁾.

O exercício físico, se considerado como única variável, parece influenciar o comportamento metabólico estimulando em diferentes níveis a ativação dos neurônios motores que suprem os diferentes tipos de fibras (tipo I, IIa e IIb) durante a atividade, determinando a ordem e o grau em que as fibras são recrutadas, e estas, por sua vez, produzem a resposta metabólica a determinado tipo de exercício⁽²⁷⁾.

Particularmente o treinamento de *endurance*, se repetido várias vezes por semana e por períodos relativamente longos, é capaz melhorar a resposta metabólica ao exercício por meio de adaptações que melhoram significativamente as capacidades funcionais do músculo, tais como: hipertrofia seletiva das fibras do tipo I, aumento da quantidade de capilares sanguíneos por fibra muscular, do conteúdo de mioglobina, da capacidade das mitocôndrias de gerar ATP através da fosforilação oxidativa, do tamanho e da quantidade de mitocôndrias, da capacidade de oxidação dos lipídios e dos carboidratos e da capacidade de resistência⁽²⁷⁾.

A busca por proteínas enquanto suplemento alimentar pelos desportistas e atletas é na verdade um meio para se conseguir uma resposta anabólica frente ao exercício e a nutrição, que é de particular interesse de indivíduos que querem obter benefícios como o aumento da massa muscular⁽¹⁾, da força e da resistência.

Assim, considerando que a base metabólica para o crescimento do músculo esquelético é resultado da relação entre a síntese e a quebra protéica muscular⁽¹⁾, percebe-se que indiretamente, através da ingestão de suplementos a base de proteína, esses esportistas esperam conseguir um balanço protéico positivo e/ou hipertrofia.

Apesar da crença de muitos técnicos, treinadores e atletas, consegue-se pouco benefício ao ingerir quantidades excessivas de proteínas, ou seja, ingestão acima de $1,7\text{g.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, conforme o máximo recomendado. Uma ingestão superior a três vezes o nível adequado não consegue aprimorar o físico e nem a capacidade de trabalho, ao contrário, todo excesso transforma-se em gorduras⁽⁵⁾ e, além disso, pode oferecer riscos à saúde do esportista como: desequilíbrio (situação em que uma mudança nas proporções de aminoácidos de uma dieta é traduzida em redução no crescimento de animais experimentais); antagonismo (quando a ingestão em excesso de um determinado aminoácido reduz a utilização de outro aminoácido estruturalmente semelhante); e toxidez (ocorre em situações em que há ingestão excessiva de aminoácidos individuais)⁽³⁷⁾.

Na verdade, está bem esclarecido que é possível conseguir e aperfeiçoar os efeitos desejados com e/ou na atividade física associando-a a uma alimentação adequada e com a utilização de proteínas ou suplementos protéicos, respeitando os limites saudáveis da ingestão diária para este macronutriente. Ciente disso, a escolha da proteína a ser utilizada mostra-se então mais importante do que a quantidade extra a ser ingerida, sendo que esta

escolha deve considerar a qualidade, o tipo e a adequação da proteína a determinado objetivo que se queira alcançar.

Referências Bibliográficas

1. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Value RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2004;2073-2081.
2. Lemon PWR. Effects of exercise on dietary protein requirements. *International Journal of Sport Nutrition* 1998;8:426-447.
3. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Varson M-P, Maubois J-L, Beaufrère B. Slow and fast dietary protein differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Science* 1997;94:14930-14935.
4. Silva SMCSd, Mura JDAP. *Tratado de Alimentação, Nutrição & Dietoterapia*. São Paulo; 2007.
5. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Nutrição para o desporto e o exercício*. Rio de Janeiro / RJ: Guanabara Koogan; 1999.
6. Recent developments in protein quality evaluation. In: Roma, Itália: Food and Agriculture Organization - World Health Organization; 1991.
7. Protein quality evaluation. In: Food and Agriculture Organization / World Health Organization; 1990; Rome, Itália: FAO Food and Nutrition Paper; 1990.
8. Hoffman JR, Falvo MJ. Protein - which is best? *Journal of Sports Science and Medicine* 2004;3:118-130.
9. McIntosh GH, Royle PJ, Leu RKL, Register GO, Johnson MA, Grinstead RL, et al. Whey protein as functional food ingredients? *International Dairy Journal* 1998;425-434.
10. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológica-funcionais das proteínas do soro do leite. *Revista de Nutrição* 2004;17(4):397-409.
11. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of nutritional biochemistry* 2003;14:251-258.
12. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Kohnke R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr* 2006;136(1 Suppl):269S-73S.
13. Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, et al. Increase availability of leucine-rich whey protein improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition* 2006;23:323-331.

14. Cribb PJ. U.S. whey protein in sports nutrition. In; 2006.
15. Wolfe RR. Effects of amino acid intake on anabolic processes. *Can J Appl Physiol* 2001;26 Suppl:S220-7.
16. Manninen AH. Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. *journal of sports science and medicine* 2004;3:60-63.
17. Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica ilustrada*. 2º ed. Porto Alegre, RS; 2000.
18. Winick M, Brasel JA, Rosso P. Nutrition and cell growth. *Curr Concepts Nutr* 1972;1:49-97.
19. Adams GR, Haddad F. The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 1996;81(6):2509-16.
20. Adams GR, Cheng DC, Haddad F, Baldwin KM. Skeletal muscle hypertrophy in response to isometric, lengthening, and shortening training bouts of equivalent duration. *J Appl Physiol* 2004;96(5):1613-8.
21. Svanberg E, Jefferson LS, Lundholm K, Kimball SR. Postprandial stimulation of muscle protein synthesis is independent of changes in insulin. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):E841-7.
22. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr* 2001;131(3):856S-860S.
23. Kumar V, Pandey P, Sabatini D, Kumar M, Majumder PK, Bharti A, et al. Functional interaction between RAFT1/FRAP/mTOR and protein kinase cdelta in the regulation of cap-dependent initiation of translation. *Embo J* 2000;19(5):1087-97.
24. Pain VM. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 1996;236(3):747-71.
25. Rhoads RE. Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J Biol Chem* 1993;268(5):3017-20.
26. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(4):1432-7.
27. Maughan R, Gleeson M, Greenhaff PL. *Bioquímica do exercício e do treinamento*. 1a. ed. Barueri / SP; 2000.
28. Pitkänen HT, Nykänen T, knuutinen J, Lahti K, Keinänen O, Alen M, et al. Free amino acid *pool* and muscle protein balance after resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2003;784-792.

29. Volek JS, Forsythe CE. Diete, Exercise and Hormone Interactions on Skeletal Muscle. *Hormone Research* 2006;66 (suppl 1):17 - 21.
30. Borsheim E, Aarsland A, Wolfe RR. Effect of an amino acid, protein, and carbohydrate mixture on net muscle protein balance after resistance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2004;14(3):255-71.
31. Adams GR. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading. *Exerc Sport Sci Rev* 1998;26:31-60.
32. Liu Z, Long W, Fryburg DA, Barrett EJ. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J Nutr* 2006;136(1 Suppl):212S-7S.
33. Attaix D, Mosoni L, Dardevet D, Combaret L, Mirand PP, Grizard J. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(10):1962-73.
34. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81(11 Suppl):S40-51.
35. Nóbrega ACLd, Herdy AH, Werutski CA, Fernandes Edo, Drummond FA, Michels G, et al. Modificação dietéticas, reposição hidrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2003;9(2):43-55.
36. Vary TC, Dardevet D, Grizard J, Voisin L, Buffiere C, Denis P, et al. Differential regulation of skeletal muscle protein turnover by insulin and IGF-I after bacteremia. *Am J Physiol* 1998;275(4 Pt 1):E584-93.
37. Araujo ACMd, Soares YdNG. Perfil de utilização de repositores protéicos nas academias de Belém - Pará. *Revista de Nutrição* 1999;12(1):5-19.

Capítulo 2

Effect of dietary whey protein hydrolyzate and physical activity on muscle protein metabolism

Autores: V C S Zaffani, C C B Carneiro-Leão, G E A Costa, E M Salomão, M C C Gomes-Marcondes, J Amaya-Farfán

Artigo configurado para ser apresentado à revista Journal of Food Science.

Effect of dietary whey protein hydrolyzed and physical activity on muscle protein metabolism

Abstract

This study compares the effects of combining the intake of milk whey protein either intact (I) or hydrolyzed (H), and physical activity on muscle protein synthesis and degradation in Wistar rats. Protein synthesis and degradation, protein and DNA contents, and concentration of the serum insulin-like growth factor 1 (IGF1) were determined in six experimental groups planned according to: type of protein consumed (casein (CAS), whey protein isolate (IWP) or hydrolyzed whey protein (HWP)) and the status of physical activity (sedentary (S) and trained (T)). Exercise was programmed for 9 weeks in a treadmill. Sacrifice followed after 48 hours of recovery from the last training bout and fasting for the final 12 hours. No significant difference was found between groups in serum levels of IGF1, protein content or concentration, or even protein degradation. The DNA contents and concentrations in the gastrocnemius, however, were significantly lower in both groups that consumed the hydrolyzate, whether sedentary or trained, compared to those that consumed the whole proteins and were sedentary (DNA concentrations ($\mu\text{g}/100\text{mg}$): HS: 17.03 ± 3 ; HT: 17.1 ± 3.7 ; CS: 22.7 ± 3 ; IS: 22.6 ± 5 , and DNA contents (μg): HS: 326 ± 55 ; HT: 310.8 ± 80 ; CS: 444.3 ± 78 ; IS: 419.3 ± 67 , $p < 0.05$). Protein synthesis in the gastrocnemius and soleus also proceeded more slowly in the hydrolyzed-trained (HT) group than in groups CS, IS and HS, but without differing from CT and IT. In conclusion, muscles of rats consuming hydrolyzed whey protein had a lower demand for myonuclear DNA and protein synthesis than those consuming the isolate when challenged by physical training, without affecting the final protein content. This suggests that the dietary

hydrolyzed whey protein can promote the preservation of gastrocnemius muscle during endurance exercise.

Keywords: whey protein, hydrolyzed protein, peptides in muscle nutrition, physical activity, rat diet

1. Introduction

Hydrolyzed whey proteins have been used as functional ingredients for various food formulations and yet a number of advantages have been pointed out when used as components of medical and sport foods^(1, 2).

Cellular proteins of mammals undergo a continuous process of synthesis and degradation. The balance between these two processes determines the gain or loss of muscle mass⁽³⁾, while physical activity and nutrition, for instance, are capable of promoting significant changes in protein metabolism that result in anabolic and catabolic responses⁽⁴⁾, depending on the intensity, duration, and frequency of exercise and the quality and quantity of the food intake⁽⁵⁾.

In order to recover or gain muscle mass, athletes and sportsmen often resort to such supplements and / or high-quality protein-rich foods, as the milk whey proteins, with the objective of achieving a positive metabolic protein balance, where protein synthesis would be greater than degradation⁽⁵⁾.

The bovine milk whey is a mixture of water soluble proteins that include β -lactoglobulin, α -lactalbumin, immunoglobulins, serum albumin, lactoferrin, lactoperoxidase, ceruloplasmin, glycomacropeptide and a variety of growth factors⁽⁶⁾. The serum of milk provides a high content of nutritionally indispensable amino acids and branched-chain amino acids⁽⁷⁾, with emphasis on leucine, outstanding for its abundant and of particular interest in current research on protein metabolism⁽¹⁾.

Another advantage of the milk whey proteins is its high speed of digestion and absorption, especially compared to casein, thus providing a fast and profuse supply of amino acids and small peptides, which have a significant impact on the turnover of body

proteins. Because of the positive promoting effect on the metabolic balance some researchers have classified the milk whey proteins as protein of rapid metabolism ^(8, 9), appropriate for situations of metabolic stress⁽¹⁰⁾, including that caused by physical exercise. In addition, a number of health properties have been attributed to milk whey proteins that would make them ideal as a food or food supplement for individuals suffering from muscle mass loss and muscle dysfunctions⁽¹¹⁾, and immune deficiencies, among others⁽¹⁰⁾.

Considering that the milk whey proteins meet high nutritional quality standards and its healthy properties warrant its recommendation as a food for special dietary uses, our laboratory has conducted studies comparing the physiological effects produced in the exercising rat by the hydrolyzed milk whey protein (HWP) and the milk whey protein isolate (WPI). Pimenta and others⁽²⁾, for example, showed a decreased level of blood lactate, increased concentration of serum albumin and higher levels of muscle glycogen in both sedentary and trained rats, which had consumed a hydrolyzed whey protein (7.8% degree of hydrolysis) for several weeks and were brought to exhaustion, as compared to those that consumed the unhydrolyzed milk whey protein, thus suggesting that the partly hydrolyzed milk whey protein offer an advantage over the WPI when used in animals undergoing physical activity.

This study was aimed at comparing the effects produced by a dietary whey protein isolate, against a whey protein hydrolyzate, on several muscular protein metabolic parameters in the rat that included: concentration and total protein content, DNA (deoxyribonucleic acid) content, protein synthesis and degradation, and the concentration of serum IGF1. These parameters were assessed for the two types of protein in association with the state of physical activity, using six groups of rats in a 2x3 array.

2. Material and Methods

2.1 – Biological assay

Seventy-two male Wistar rats (specific-pathogen free, 21 days old), bred at the Multidisciplinary Center for Biological Research, University of Campinas, SP, Brazil, were housed (approx 22 °C, 55% RH, inverted 12-hour light cycle) in individual growth cages and supplied with free access to commercial chow (Labina, Purina, Brazil) and water at all times, until they completed six weeks of life. At 42 days and still consuming the commercial chow, the rats were tested for their running aptitude in order to exclude those that did not pass the initial steps of the protocol. The selected animals were then segregated into six groups according to diet and physical activity (Figure 1). The research methodology was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA / UNICAMP, protocol 1340-1).

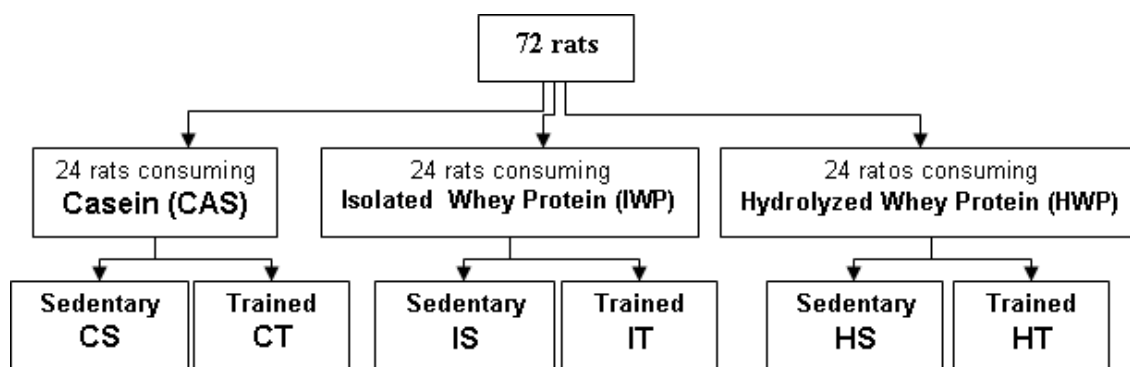


Figura 1 - Segregation of animals by type of diet and physical activity.

CS: casein diet and sedentary, CT: casein diet and trained, IS: IWP diet and sedentary, IT: IWP diet and trained, HS: HWP diet and sedentary, and HT: HWP diet and trained.

2.2 – Experimental diets

The experimental diets were isonitrogenous (approximately 12% protein, dry basis), isolipidic and isocaloric (about 300 kcal/100 g) and formulated following the recommendations of the American Institute of Nutrition AIN93-M diet⁽¹²⁾ (Table 1). The three diets differed among themselves with respect to the nature of the protein source, considering that in one case the whey protein was prehydrolyzed (HWP) and in the other, the protein was not (IWP). The standard reference protein was casein (CAS). The prehydrolyzed whey protein exhibited a degree of hydrolysis of approximately 12.5%. Both the whey proteins, IWP and HWP, were donated by Hilmar Ingredients (Dalhart, CA, USA).

Table 1- Formulation of the three experimental diets (g/100g) fed during 9 weeks of training.

Ingredients	Diets		
	CAS	IWP	HWP
Protein	14.70	12.74	15.13
Corn starch	46.11	47.39	45.84
Dextrinized starch	15.35	15.77	15.26
Sucrose	9.90	10.17	9.84
Soybean oil	4.00	4.00	4.00
Fiber (microcryst. cellulose)	5.00	5.00	5.00
Mineral mixture AIN 93 M ^a	3.50	3.50	3.50
Vitamin mixture AIN 93 M ^b	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.18	0.18	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
<i>tert</i> -butylhydroquinone (mg/100g)	0.8	0.8	0.8

2.3 – Training Protocol

The animals began training on the day they started to consume the experimental diets. The performance test (Figure 2) was used as a criterion for the selection of rats fit to exercise. In this test, the speed was increased as time elapsed and was not considered fit the rat that stood for 30 seconds without departing from the base of the treadmill.

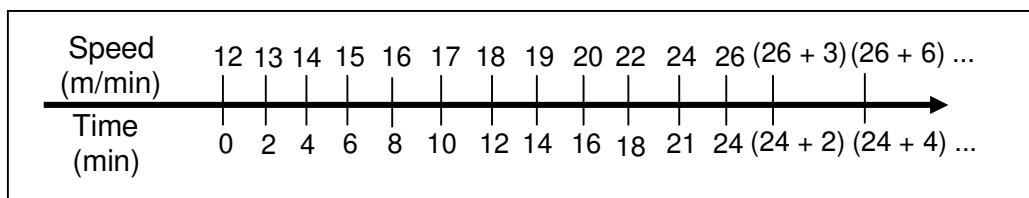


Figure 2 - Time and speed table for training and physical performance.

Training in the treadmill followed the protocol of progressive speeds and times of Table 2 (protocol of Holh⁽¹³⁾). The training and feeding of the experimental diets lasted for 9 weeks. The sedentary rats were also subjected to a minimum of physical activity, running at the speed of 15 m/min for 10 minutes, 3 times a week.

Table 2 - Weekly training protocol

Week	Speed (m/min)	Time (min)	Number of daily sessions	Intervals between sessions (h)
1	15	20	1	-
2	20	30	1	-
3	22.5	45	1	-
4	25	60	1	-
5	25	60	1	-
6	25	60	1	-
7	25	60	1	-
8	25	60	1	-
9	25	60	2	4

2.4 – Sample collection for analysis

In order to minimize the consequences of both acute and chronic stress due to either training or diet, the animals were sacrificed following a 48-hour period of recovery, of which, the last 12 hours were of fasting. The animals were sedated with xylazine hydrochloride (8mg/kg weight) and anesthetized with ketamine hydrochloride (80mg/kg weight) in order to remove all the blood by cardiac puncture and organs. After sacrifice, the blood was immediately collected in plain test tubes, centrifuged, and the serum stored at -20°C for the determination of serum IGF1. The gastrocnemius and soleus muscles, which were intended for the analysis of protein synthesis and degradation, were dissected, weighed and placed in a Krebs-Hanseleit (KHB) bicarbonate solution. The muscle tissues collected to protein analysis, were stored in liquid nitrogen until the time of analysis. The gastrocnemius and soleus muscles were chosen for the analysis of protein synthesis and degradation because of their proportions and types of fibers. While the gastrocnemius

contains white fibers slightly larger than the red, the soleus has a high content (> 70%) of red fibers⁽¹⁴⁾.

2.5 – Determination of IGF1

The levels of serum IGF1 were determined by radioimmunoassay using the Lincoplex kit for rat/mouse IGF1 (cat No RMIGF1 87k), from Lincis ® Research Inc., according to the manufacturer's recommended procedure, in cooperation with the Genesis and Diagnostic Products Ltda (Sao Paulo, Brazil).

2.6 – Muscle protein synthesis

The gastrocnemius and soleus muscles placed in bicarbonate KHB (110 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 3.4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ and 1 mM KHP₂O₄, pH 7.4, supplemented with 5.5 mM glucose and 0.01% (w/v) of albumin). The muscles were pre-incubated for 30 minutes at 37 °C with continuous oxygenation (95% O₂ and 5% CO₂), as described by Vary and others⁽¹⁵⁾. Next, a new solution KHB supplemented with L-5μCi[³H]-phenylalanine/mL was added for other 2 hours. At the end of incubation, the tissues were homogenized in 10% of trichloroacetic acid (TCA, 1:3 w/v), centrifuged to 10,000 x g for 15 minutes at 4 °C, the resulting granules were suspended in 1 M NaOH and incubated 40 °C for 30 minutes. Samples of this mixture were used to measure the total protein content and the radioactivity of β-emission on a scintillating counter.

The pattern of protein synthesis was calculated from the amount of radioactivity incorporated from phenylalanine during the two hours of incubation, and was expressed in nanomoles of [³H]-phenylalanine, per microgram of muscle protein.

2.7 – Muscle protein degradation

The gastrocnemius and soleus muscles were placed in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) and then pre-incubated for 30 minutes at 37 °C, with continuous oxygenation (95% O₂; 5% CO₂), as described by Vary and others⁽¹⁵⁾. After this step, the tissues were placed in KHB buffer, supplemented with cicloheximide (130 µg/mL), followed by another 2 hours of incubation. At the end of this period, the tissues were drained, weighed and frozen in liquid nitrogen. The pattern of degradation was established by fluorimetry analysis, in terms of nanomoles of tyrosine released per microgram of muscle protein/h, as described by Waalkes & Udenfriend⁽¹⁶⁾.

2.8 – Determining total muscle protein

Tissue samples weighing ~50 mg were submitted to protein extraction, in 250 µL solution of 1N HClO₄ at 110 °C for 30 minutes. Then the solution was centrifuged at 1006 x g for 30 minutes. The protein analysis was performed in accordance with the method of Lowry and others⁽¹⁷⁾. We used 10 µL of the supernatant from extraction, adding 1 mL of distilled water and 0.9 mL of solution A (0.4 g of Na and K tartrate, 20 g of sodium carbonate, 1 g NaOH and 200 mL distilled water), followed by incubation in a water bath (50 °C) for 10 minutes. After this 0.1 mL of solution B (0.4 g of Na and K tartrate, 200 mL of distilled water, 0.2 g of CuSO₄.5H₂O, 0.08 g NaOH) was added to the system and allowed to stand at room temperature for 10 minutes. Next, 3 mL of solution C (10 mL of reactive Folin Ciocalteu and 140 mL of distilled water) were added and the mixture placed in a 50 °C water bath for 10 minutes. Then, the solution was allowed to cool to room temperature and held for reading in a spectrophotometer, set at 650 nm.

2.9 – Determination of DNA muscle

Muscle samples (~50 mg) were submitted to protein extraction, in 250 µL of 1M HClO₄ solution at 110 °C for 30 minutes. Then the solution was centrifuged at 1006 x g for 30 minutes. The analysis of the content of DNA was carried out in accordance with the method of Giles & Myers⁽¹⁸⁾. We used 0.5 mL of extract, adding 500 µL of 1M HClO₄ and 1.0 mL of solution of diphenylamine. The solution was vortex stirred, and transferred to a water bath (30 °C) for 12 hours. After cooling to room temperature the reaction mixtures were read in the spectrophotometer set at 595 nm.

2.10 – Statistical analysis

The results were subjected to statistical analysis using the software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), version 16.0. The data were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity, both available in the software. For the parametric data, univariate analysis of variance (ANOVA) was used, and means were compared (Tukey test), accepting the criterion of $P \leq 0.05$ for statistical significance. When the data did not follow a normal distribution, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used, adopting the criterion of $P \leq 0.053$ for statistical significance.

3. Results and discussion

At the end of the experiment, the rats were 113 days old and had completed 9 weeks of training and consumption of the experimental diets. Age is an important parameter for metabolic studies and in particular for the metabolism of proteins. In the normal Wistar male rat, both DNA and protein increase in skeletal muscle, between 4 and 44 days after

birth due to the intense protein synthesis necessary for muscle mass accretion⁽¹⁹⁾. From there on, the contents of DNA may remain high and constant until about day 95, while protein continues to rise till day 140. Thus, treatment with different dietary proteins in combination with training could affect muscle composition by changing the contents of DNA and protein.

The results showed no statistic differences in protein content among treatments CS, IS, HS, CT, IT and HT, regarding the two different representative muscles tested, soleus and gastrocnemius (Table 3), thus signifying that neither protein concentration, total muscle protein, nor the weight-normalized total muscle protein were affected by either physical activity or the form in which the dietary protein was administered in this experiment. The weights of the gastrocnemius and soleus muscles also did not differ between groups (Chapter 3 of this Dissertation). An earlier study by Pimenta and others⁽²⁾, evaluated young rats that ingested a diet containing 12% protein from either whey isolate or whey protein hydrolyzate (with a degree of hydrolysis of about 8%) for 2 weeks, while being subjected to physical activity. The authors found no significant changes in muscle protein content in response to the different treatments. Ramos⁽²⁰⁾ also evaluated the effect of milk whey protein concentrate and its hydrolyzate (degree of hydrolysis ~31%) fed to rats and did not detect any significant differences with regard to muscle protein between the experimental and control groups. These results, as a whole and in spite of the variation, suggest that the milk whey protein, whether intact or hydrolyzed to a medium or high extent, and regardless of any association with physical activity of endurance, does not result in an increase of the content of muscle protein.

Tabela 3 - Protein and DNA of gastrocnemius and protein of soleus muscles, for the six groups of rats after 48 hours of recovery from training and 12 hours fasting.

	Groups of rats, according to both diet and level of activity					
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Gastrocnemius						
Muscle protein (mg/100mg)	12 ± 2	11 ± 3	11 ± 2	12 ± 2	11 ± 1.9	11 ± 1
Total protein content (mg)	230 ± 44	207 ± 58	207 ± 43	234 ± 39	219 ± 38	207 ± 27
*Total protein content (mg/kg)	0.55 ± 0.1	0.53 ± 0.14	0.51 ± 0.08	0.63 ± 0.12	0.58 ± 0.85	0.55 ± 0.05
DNA in muscle (µg/100mg)	23 ^a ± 3	23 ^a ± 5	17 ^b ± 2.8	22 ^a ± 1	21 ^{ab} ± 3	17 ^b ± 3.2
Total content of DNA (µg)	444 ^a ± 78	419 ^a ± 67	326 ^b ± 55	427 ^a ± 25	406 ^{ab} ± 67	311 ^b ± 80
Soleus						
Muscle protein (mg/100mg)	12 ± 3	12 ± 2	13 ± 4	12 ± 1	12 ± 3	12 ± 2
Total content of protein (mg)	20 ± 7	17 ± 5	20 ± 8	17 ± 4	16 ± 6	16 ± 4
*Total protein content (mg/kg)	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00

* Total protein content in relation to body weight.

The values represent means $\pm$ SD. For the statistical analysis of the gastrocnemius data one-way ANOVA and Tukey test were used, considering the standard criterion of significance $P \leq 0.05$. For the soleus data the Kruskal-Wallis test, with significance set at $P \leq 0.05$ was used. Abbreviations: CS, control diet and sedentary; IS, diet with milk whey protein isolate and sedentary; HS, diet with hydrolyzed whey protein and sedentary, CT, control diet and trained, IT, diet with protein isolate and trained; HT, diet with hydrolyzed whey protein and trained. Means with different superscript letters along horizontal lines are different.

The analyses showed that feeding the hydrolyzed whey protein resulted in considerably lower concentrations and total contents of DNA in the gastrocnemius as opposed to feeding the unhydrolyzed proteins, regardless of whether the animals were sedentary or exercised (groups HS and HT; Table 3), which is to say that the groups consuming the whole proteins

(whey and casein) did not show the lowered DNA contents of the gastrocnemius with physical activity. Therefore, it seems that the difference in DNA content and DNA concentration observed between IS and HS was minimized with training, leading to no difference between IT and HT.

It can be said that consumption of the hydrolyzate rather than the casein decreased significantly the total content of DNA, independent of the physical activity (either HS or HT < either CS or CT; highest value of $p = 0.05$), suggesting that some compositional difference between the two sources of protein conferred the muscle the ability to normally operate with a smaller amount of DNA material when the hydrolyzate was fed to the rat. Taking into account that the DNA levels resulting from either casein or the isolate were indistinguishable from each other, the difference then can be understood as originating from peptides generated during the hydrolysis process of the whey protein.

The fact that the muscle protein content did not differ among the groups while the content of DNA was consistently lower in the rats consuming the HWP than in those consuming the whole proteins, does not necessarily mean that the HWP was detrimental to the muscle, but rather the opposite, suggesting that consumption of the hydrolyzate was at least as adequate as the whole proteins to guarantee the necessary muscle protein required by both the sedentary and the exercised animals throughout training and along the initial period of recovery.

Investigations involving physical activity and WP in the hydrolyzed form have shown that the protein hydrolyzate effectively increased the liver and muscle glycogen stores^(2, 21, 22), compared to the unhydrolyzed WP. Another study shows also that the WP promotes lipolysis, especially during prolonged exercise⁽²³⁾. Thus, encouraging the use of

carbohydrate and fat as energy substrates, the consumption of the WP could be useful to preserve the muscle protein⁽²⁴⁾. By minimizing the fall protein for energy purposes, the demand for the biosynthesis of new proteins will be lower, and thus, indirectly result in a reduction or alleviation of the need to increase the cellular DNA.

Generally, the content of DNA present in myonuclei at a given moment is only required for the maintenance of muscle fiber, while protein production is limited by the number of cores in the fiber⁽²⁵⁾. Thus, if there is an increase in demand for protein, the DNA content should also increase accordingly.

From the results of protein synthesis, measured by the incorporation of [³H]-Phe in both the gastrocnemius and the soleus muscles (Figures 3A, 3B), it was surprising to observe large variations occurring particularly among the animals fed the casein. Despite such large dispersion of most of the data for the gastrocnemius (Figure 3A), it was possible to assert that the trained group that consumed the hydrolyzate, HT, incorporated significantly lower amounts of radioactive phenylalanine than those of sedentary groups (CS, IS and HS, highest $p = 0.052$), regardless of the type of protein in the diet. Since the rate of protein synthesis in group HS was significantly higher than that of HT, it can also be seen that consumption of the HWP alone would not be sufficient to guarantee the lower protein synthesis in this muscle. Why was then the rate of synthesis much lower in group HT? Considering that the gastrocnemius fibers of all groups had equivalent amounts of protein, it was interesting to realize that group HT had also the lowest amount of DNA. The rate of protein synthesis for the HT was also consistent with the lowest content of DNA found in this group. It is important to mention that the difference in protein synthesis between groups HT and CT was considered as marginally significant ($p = 0.057$).

With regard to the sedentary groups, the pattern of protein synthesis did not follow those for the DNA content. While group HS had a smaller content of DNA, groups CS and IS exhibited rates of protein synthesis that did not differ from that of HS. This lack of correlation could only be explained taking into consideration at least two conditionants, one being the relative greater ease with which muscle protein can be used as a source of energy in favor of the other two sources, when the body is adapted to the sedentary state⁽¹⁴⁾. Secondly, the DNA content is known to change only in the long term, being stable to short term physiological or prandial states⁽²⁵⁾. Protein synthesis and degradation, on the other hand, can vary acutely in response to these factors. Thus, after 12 hours of fasting, the gastrocnemius of those animals in group HS apparently needed to replace stores of muscle mass as much as those in cohorts CS and IS.

In the soleus muscle (Figure 3B) we found that the average rate of protein synthesis of the trained groups was substantially lower than that of the sedentary. In spite of this, the rate for the sedentary group fed the isolate (IS) did not differ from that of the trained group (IT). This was believed to be because of the larger variation of individual responses among the sedentary, thus appearing as though the training did not affect protein synthesis in those animals consuming the IWP. These results, therefore suggest that, firstly, consumption of HWP, in combination with physical activity, resulted in low rates of protein synthesis in the soleus, just as occurred with the gastrocnemius and, secondly, that the HWP, just like the dietary whole proteins, also promoted the resynthesis of muscle proteins in the sedentary state in order to maintain their levels constant.

Overall, physical activity seems to have had a greater influence on protein synthesis in soleus than the dietary protein, regardless of being hydrolysed or intact. The synthesis profile observed in the soleus kept certain similarities with that observed in the

gastrocnemius, the major difference between the two muscles being among the trained groups.

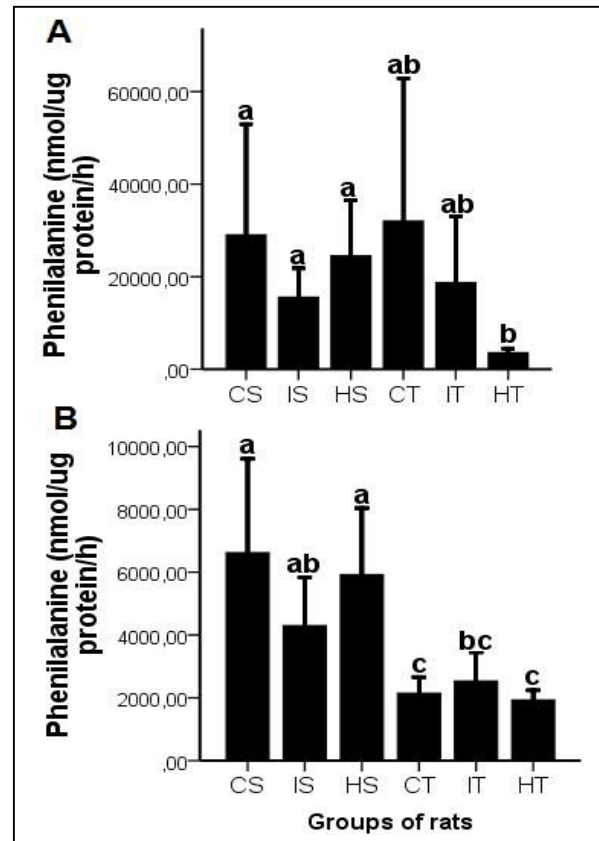


Figure 3– Effect of diets containing either whey protein isolate (WPI) or hydrolyzed whey protein (HWP) on protein synthesis in the gastrocnemius muscle (A), and the soleus muscle (B) of sedentary and trained rats. The analysis was performed as described in Methods for protein synthesis, and expressed the incorporation of phenylalanine in nmol/g protein of muscle per hour. CS, sedentary control with casein; IS, diet with WPI and sedentary; HS, diet with HWP and sedentary; CT, control diet and trained; IT, diet with IWP and trained; and HT, diet with HWP and trained. The data for the six groups correspond to mean of 12 determinations $\pm$ SD. The non-parametric Kruskal-Wallis, with significance of $p < 0.053$ in A, and $p \leq 0.050$ in B.

The better defined pattern (more coherent responses among the trained groups) seen in Figure 3B was consistent with the notion that the predominant type of muscle fibers in the soleus is type-I (> 70% of the fibers)⁽³⁾ and that running depends to a greater extent on these fibers against the type-II fibers, which predominate (~60%) in the gastrocnemius.

Since type-I fibers are less glucose-dependent than the type-II fibers, it is reasonable to suppose that the former would have a lower need to replace muscle protein than the type-II fibers as in the gastrocnemius. Therefore, the HWP seems to have been more effectively utilized by the gastrocnemius than by the soleus.

Studies have shown that after consumption of the whey proteins, the appearance of amino acids in plasma is fast, abundant and transient, and this profile is associated with an increase in protein synthesis⁽⁸⁾. Moreover, leucine, which is abundant in the whey proteins, seems to have an anabolic effect by working along the intracellular pathways involved in stimulating the synthesis of proteins⁽²⁶⁾. The present study, however, was unable to detect a stimulating effect measurable as an increasing in the rate of synthesis.

It is pertinent to clarify that studies evaluating the effect of whey proteins, their derivatives or whey proteins supplemented with leucine, on protein synthesis deal with the post-prandial state, which is the period in which the plasma concentration of amino acids is at its highest. In this study, however, protein synthesis was evaluated after 12 hours of fasting, so as to minimize the post-prandial effect on the anabolic process.

It is also important to point out that endurance training, besides being associated with the reduction of synthesis⁽²⁷⁾, is considered to be conducive to protein degradation⁽²⁸⁾. For this reason, consumption of the whey proteins for this type of training appears should be more with objective of preserving rather than increasing muscle protein.

One advantage of the milk whey proteins in physical activity is their high leucine content, which has a net effect on muscle protein balance because, while endurance exercise may promote degradation, leucine generally exerts the opposite effect, whether at normal or at increased levels⁽²⁹⁾. Our results on the release of tyrosine, showing the degradation in the gastrocnemius, did not detect any significant protein catabolism in the

muscle (Figure 4). It still should be noted that the tyrosine levels of both groups IT and HT were substantially lower than those of CT, suggesting that even without statistical difference ($p = 0.058$), the mean losses of muscle protein with training were lower in the animals fed the leucine-rich whey proteins. It should be finally pointed out that the large variations found in groups IS, HS and CT, may reflect the individual responses to the prolonged training, followed by fasting.

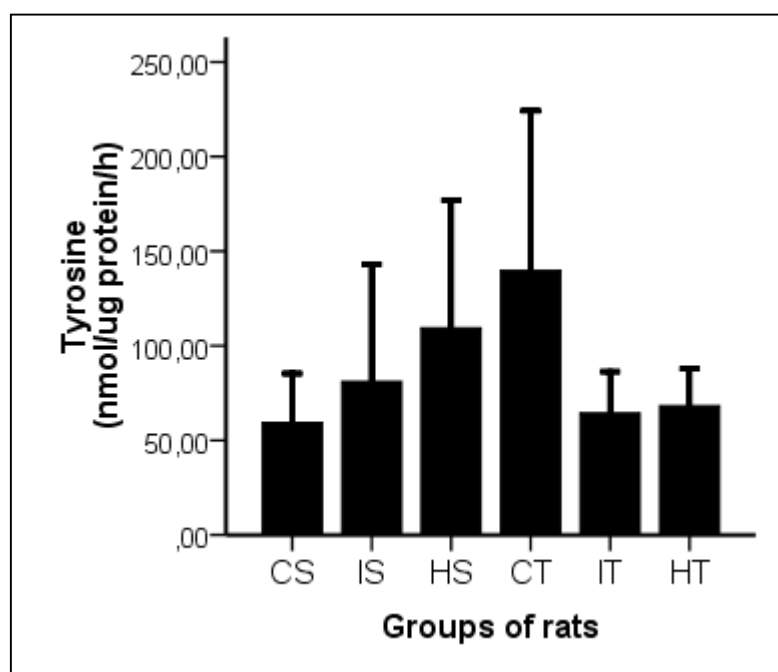


Figure 4- Effect of diet with IWP and HWP on protein degradation in gastrocnemius muscle of sedentary and trained rats. The analysis was performed as described in Materials and Methods for protein degradation, and expressed the release of tyrosine in nmole/g protein of muscle/hour. Abbreviations: CS, sedentary control; IS, diet with whey protein isolate (WPI) and sedentary; HS, diet with hydrolyzed whey protein (HWP) and sedentary; CT, trained control; IT, diet with WPI and trained; and HT, diet with HWP and trained. The data for the six groups are mean of 12 determinations $\pm$ SD. We used the non-parametric Kruskal-Wallis statistical analysis, at the 0.05 level of significance. The value of "p" found was 0.058.

Comparing the results of protein synthesis with those of degradation, it will be noticed that every large mean value of synthesis was matched by a large value of degradation, being consistent with the final constant levels found in the muscle protein.

Regarding the effect of both diet and physical activity on muscle protein balance, IGF1 is known to shift protein metabolism in favor of synthesis⁽³⁰⁾. The serum IGF1 levels we found showed no statistical difference between any two groups of this study (Figure 5).

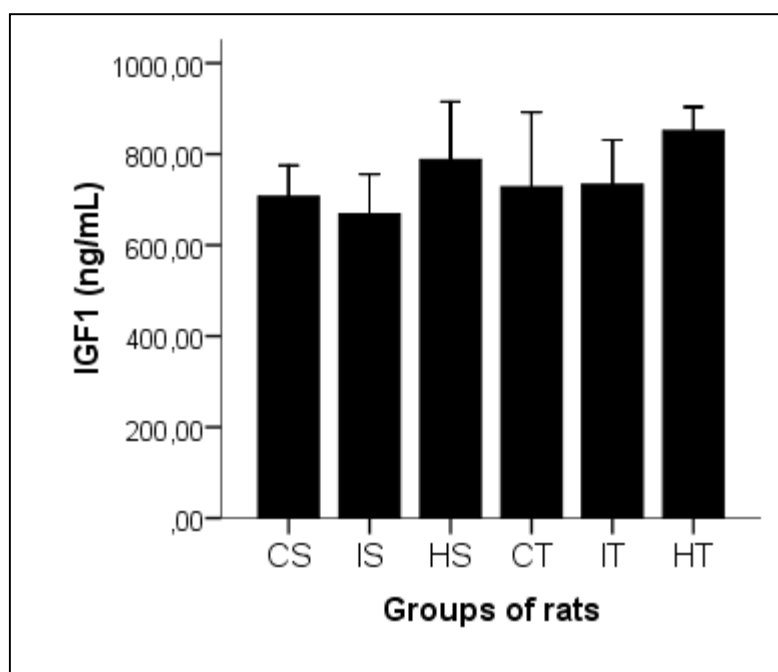


Figure 5- Effect of diet with WPI and HWP on serum levels of IGF1. The analysis was performed as described in Materials and Methods for IGF1. CS, sedentary control; IS, diet with whey protein isolate (WPI) and sedentary; HS, diet with hydrolyzed whey protein (HWP) and sedentary; CT, trained control; IT, diet with WPI and trained; and HT, diet with HWP and trained. The data for the six groups represent mean of 12 determinations $\pm$ SD. We used the one-way ANOVA statistical analysis and Tukey, with significance < 0.05 .

Studies show that the nutrients or diet components may stimulate the release of hormones such as IGF1 in the long term⁽³¹⁾, but it also seems that the increase in activity of this hormone can be elicited by muscular activity, particularly in exercises with overload⁽³²⁾.

Recent findings suggests that the IGF1 stimulates protein synthesis in the vascular endothelial tissue, favoring the transport of amino acids and glucose into the myocyte⁽³³⁾.

Such anabolic function can be exerted through molecular signaling, which involves the phosphorylation of several regulatory proteins, including some transcription and translation factors, and triggers a general increase in protein synthesis⁽³⁾. Moreover, the action could occur via mobilization of satellite cells and their merging with myofibers, thus increasing the number of myonuclei and the total contents of DNA, and ultimately favoring the expansion of the muscle fiber⁽³⁴⁾.

According to our results, the consumption of either WPI or HWP did not result in changes in serum IGF1 levels, even when in combination with physical activity. Thus, the muscle tissue of rats in all groups (CS, IS, HS, CT, IT and HT) remained subject to the same degree of stimulation by endogenous IGF1. Another point to consider is that a positive correlation between the content of DNA and IGF1 is most evident when the muscle is stimulated above its baseline of activity with the objective of increasing protein mass⁽³⁴⁾, which was not the case in this study.

4. Conclusions

The response of young adult Wistar rats undergoing endurance training in the treadmill for nine weeks and consuming prehydrolyzed milk whey proteins (medium degree of hydrolysis) was compared with cohorts that consumed the intact whey proteins. The consumption of the hydrolyzate was found to be more efficient in endurance trained rats than the intact protein in reducing the need for myonuclear DNA and protein synthesis, without influencing the final protein content, and suggesting that the hydrolyzate can afford a greater capacity preservation of the gastrocnemius proteins than unhydrolyzed whey proteins.

These results were consistent with the finding that protein synthesis and degradation determinations by the use of phenylalanine incorporation and tyrosine release from the gastrocnemius were minimal when the diet was prepared with the prehydrolyzed protein rather than with the intact whey proteins suggesting that the hydrolyzate was conducive to preserve the muscle fiber. Additionally, a higher rate of protein synthesis by each diet was matched by a correspondingly higher rate of degradation so that neither the muscle protein nor the levels of IGF1 were significantly altered.

It could be concluded, therefore, that the prehydrolyzed whey proteins have distinct and possibly advantageous physiologic characteristics from those of the unhydrolyzed milk whey product when used as a dietary protein for the exercising rat.

5. Acknowledgments

The authors acknowledge the Brazilian Research Council (CNPq) for the scholarship granted to VCSZ, CCBCL and GEAC, and to Hilmar Ingredients (Dalhart, CA, USA) for the donation of the whey proteins, through Doremos Alimentos, São Paulo, Brazil.

6. References

1. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of nutritional biochemistry* 2003;14:251-258.
2. Pimenta FMV, Abécia-Soria MI, Auler F, Amaya-Farfán J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. *International Dairy Journal* 2005;16:984-991.

3. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81(11 Suppl):S40-51.
4. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Value RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2004;2073-2081.
5. Lemon PWR. Effects of exercise on dietary protein requirements. *International Journal of Sport Nutrition* 1998;8:426-447.
6. McIntosh GH, Royle PJ, Leu RKL, Regester GO, Johnson MA, Grinstead RL, et al. Whey protein as functional food ingredients? *International Dairy Journal* 1998;425-434.
7. Hoffman JR, Falvo MJ. Protein - which is best? *Journal of Sports Science and Medicine* 2004;3:118-130.
8. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Varson M-P, Maubois J-L, Beaufrère B. Slow and fast dietary protein differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Science* 1997;94:14930-14935.
9. Fruhbeck G. Protein metabolism. Slow and fast dietary proteins. *Nature* 1998;391(6670):843, 845.
10. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológica-funcionais das proteínas do soro do leite. *Revista de Nutrição* 2004;17(4):397-409.
11. Agin D, Gallagher D, Wang J, Heymsfield SB, Pierson RN, Jr., Kotler DP. Effects of whey protein and resistance exercise on body cell mass, muscle strength, and quality of life in women with HIV. *Aids* 2001;15(18):2431-40.
12. Reeves PG, Nielsen FH, Jr. CGF. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 1993;123(11):1939-1951.
13. Holh R, Padronização de um modelo de indução de overreaching em ratos: desenvolvimento e perspectivas de investigação em natação e esteira. 2007. Dissertação (Doutorado em Biologia funcional e molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Biologia, Campinas, 2007.
14. Maughan R, Gleeson M, Greenhaff PL. Bioquímica do exercício e do treinamento. 1a. ed. Barueri / SP; 2000.
15. Vary TC, Dardevet D, Grizard J, Voisin L, Buffiere C, Denis P, et al. Differential regulation of skeletal muscle protein turnover by insulin and IGF-I after bacteremia. *Am J Physiol* 1998;275(4 Pt 1):E584-93.

16. Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 1957;50(5):733-6.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
18. Giles KW, Myers A. An Improved Diphenylamine Method for Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* 1965;206(4979):93-&.
19. Winick M, Brasel JA, Rosso P. Nutrition and cell growth. *Curr Concepts Nutr* 1972;1:49-97.
20. Ramos AG. Utilização das proteínas do soro lácteo pelo rato jovem. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2001.
21. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *Br J Nutr* 2005;93(4):439-45.
22. Tassi EM, Amaya-Farfan J, Azevedo JRM. Hydrolysed α -lactoalbumina as a source of protein to the exercising rat. *Nutrition Research* 1998;18:875-881.
23. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. *Nutrition* 2005;21:1052-1058.
24. Bouthegourd JC, Roseau SM, Makarios-Lahham L, Leruyet PM, Tome DG, Even PC. A preexercise alpha-lactalbumin-enriched whey protein meal preserves lipid oxidation and decreases adiposity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283(3):E565-72.
25. Kraemer WJ, Spiering BA. Skeletal muscle physiology: plasticity and responses to exercise. *Hormone Research* 2006;66(suppl 1):2-16.
26. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Kohnke R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr* 2006;136(1 Suppl):269S-73S.
27. Booth FW, Tseng BS, Fluck M, Carson JA. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiol Scand* 1998;162(3):343-50.
28. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Nutrição para o desporto e o exercício*. Rio de Janeiro / RJ: Guanabara Koogan; 1999.
29. Garlick PJ. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J Nutr* 2005;135(6 Suppl):1553S-6S.

30. Liu Z, Long W, Fryburg DA, Barrett EJ. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. *J Nutr* 2006;136(1 Suppl):212S-7S.
31. Volek JS, Forsythe CE. Diet, Exercise and Hormone Interactions on Skeletal Muscle. *Hormone Research* 2006;66 (suppl 1):17 - 21.
32. Hamilton DL, Baar K. Muscle growth: no IGFs, ands, or butts. *J Physiol* 2008;586(1):5-6.
33. Attaix D, Mosoni L, Dardevet D, Combaret L, Mirand PP, Grizard J. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(10):1962-73.
34. Adams GR, Haddad F. The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 1996;81(6):2509-16.

Capítulo 3

Influência da ingestão do hidrolisado protéico do soro do leite sobre os perfis de aminoácidos séricos de ratos jovens treinados

Autores: V C S Zaffani, C C B Carneiro-Leão, G E A Costa, J Amaya-Farfán

Influência da ingestão do hidrolisado protéico do soro do leite sobre os perfis de aminoácidos séricos de ratos jovens treinados

Resumo

O presente estudo verificou os efeitos da ingestão da proteína do soro do leite, intacta e hidrolisada, em combinação com a atividade física, no perfil de aminoácidos séricos, de acordo com o perfil de aminoácidos das dietas, na evolução ponderal, e no peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo. Os ratos foram divididos em 6 grupos de acordo com: a proteína consumida (12% caseína (CAS), 12% isolado protéico do soro do leite (IPSL) ou 12% hidrolisado protéico do soro do leite (HPSL)), e com um protocolo de atividade física (sedentários (S) e treinados (T)). Os ratos treinados correram em esteira, durante 9 semanas, e foram sacrificados após 48 horas de repouso e 12 horas de jejum. As três dietas utilizadas apresentaram semelhante conteúdo de aminoácido total, mas as dietas IPSL e HPSL destacaram-se apresentando maiores valores absolutos de leucina, isoleucina, lisina, treonina, cistina, alanina e ácido aspártico, em relação a CAS. No geral, os níveis de aminoácidos indispensáveis séricos foram semelhantes comparando os IS e HS com os ratos controles (CS). Entretanto, o grupo HT apresentou os maiores níveis destes aminoácidos, comparado ao CT. A evolução ponderal foi semelhante para todos os grupos de ratos até meados da oitava semana de treinamento, mas na nona semana, os grupos treinados apresentaram peso significativamente menor que o CS, e esta característica se manteve até a data do sacrifício. Não houve diferença estatística ao comparar o peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo, mas o peso ajustado (peso músculo/peso corporal) do gastrocnêmio foi maior nos grupos HS, CT, IT e HT, comparados ao CS. Concluindo, o

consumo da PSL, principalmente na sua forma hidrolisada, associado à atividade física por período prolongado, pareceu provocar adaptações no organismo capazes de modificar o *pool* de aminoácidos séricos, especialmente aumentando os níveis dos indispensáveis no grupo HT. O consumo das proteínas do soro lácteo resultou em menor massa corpórea dos animais sedentários, embora a única diferença significativa tenha sido a registrada entre o grupo CS e os demais treinados. Na massa do músculo sóleo, nem as dietas e nem o exercício tiveram qualquer efeito. Diferente do sóleo, no gastrocnêmio, ambos, a dieta e o exercício mostraram que podem ter influência. Além do efeito positivo que a atividade física teve na massa ajustada do gastrocnêmio, as proteínas hidrolisadas do soro lácteo, aumentaram a massa ajustada do gastrocnêmio nos sedentários, com relação ao grupo caseína.

Palavras Chaves: Soro do leite, Aminoácidos séricos, Proteína hidrolisada, Atividade física, Dieta AIN 93.

1. Introdução

O exercício físico e a alimentação, considerados juntos ou individualmente, são capazes de alterar as variáveis do metabolismo protéico, promovendo respostas anabólicas ou catabólicas⁽¹⁾, que podem ser agudas ou em longo prazo, durando desde vários minutos até ao longo de vários dias⁽²⁾. Esta alteração metabólica depende tanto da intensidade, duração, e frequência do exercício, como também da ingestão alimentar, especialmente da qualidade da dieta consumida⁽³⁾.

A concentração plasmática de aminoácidos é uma das complexas variáveis do metabolismo protéico, representando um *pool* de aminoácidos livres, que, assim como a maioria dos nutrientes, está sujeito a homeostase⁽⁴⁾, e pode ser influenciado pelo stress físico e a ingestão protéica. Esta concentração de aminoácidos plasmáticos é resultado da relação entre seu perfil ingressante no plasma (soma dos aminoácidos provenientes da absorção intestinal e daqueles liberados dos tecidos), e o perfil de desaparecimento (soma dos aminoácidos oxidados e incorporados às proteínas, e em menor extensão, perdas pela urina)⁽⁴⁾.

Cada aminoácido em particular pode desempenhar diferentes funções no organismo como: substrato ou sinalizador⁽⁵⁾ para a síntese protéica, produção de energia e substratos para a gliconeogênese⁽⁶⁾, entre outras. Desta forma, uma determinada proteína ingerida, dependendo do seu perfil de aminoácidos em particular, pode ter efeito mais marcante sobre alguns processos do metabolismo protéico, em comparação ao de outras proteínas de diferente composição.

Assim, a qualidade de uma proteína pode ser mais importante do que a quantidade a ser ingerida, sendo que a escolha deve considerar o tipo e a adequação da proteína a determinado objetivo que se queira alcançar.

As proteínas do soro do leite são de alta qualidade nutritiva e apresentam quase todos os aminoácidos indispensáveis em excesso às recomendações, destacando o triptofano, a cisteína, a leucina, a isoleucina e a lisina⁽⁷⁾. Dentre estes aminoácidos, a leucina e a isoleucina são apontados por diversas pesquisas por estarem envolvidos na construção de tecido muscular e regeneração de trauma múltiplo⁽⁸⁾. Além disso, evidências mostram que a proteína do soro do leite também pode alterar a composição corporal⁽⁹⁾ e influenciar a ingestão alimentar mediante o aumento do nível de aminoácidos plasmáticos, associado à elevação da colecistoquinina (CCK) e do *glucagon-like* peptídeo 1 (GLP-1), regulando a saciedade⁽¹⁰⁾.

O objetivo do presente estudo foi verificar o perfil de aminoácidos de dietas com caseína e proteína do soro do leite e avaliar os efeitos da associação entre a ingestão destas dietas, com a fonte protéica do soro do leite intacta e hidrolisada, em associação à atividade física, sobre o perfil de aminoácidos plasmático, a evolução ponderal e o peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio.

2. Materiais e métodos

2.1 – Ensaio biológico

Setenta e dois ratos machos da linhagem Wistar, (21 dias de idade), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, foram alojados em gaiolas de crescimento (22±2°C, 50-60%

umidade do ar, ciclo claro 12 h), com dieta comercial (Labina, Purina, Brasil) *ad libitum*, até atingirem aproximadamente seis semanas de vida. Aos 42 dias de idade e ainda com a dieta Labina, os ratos foram avaliados com a finalidade de excluir aqueles sem aptidão física, sendo os selecionados divididos em grupos, de acordo com a dieta e exercício (Figura 1). A metodologia da pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA/UNICAMP, protocolo 1340-1).

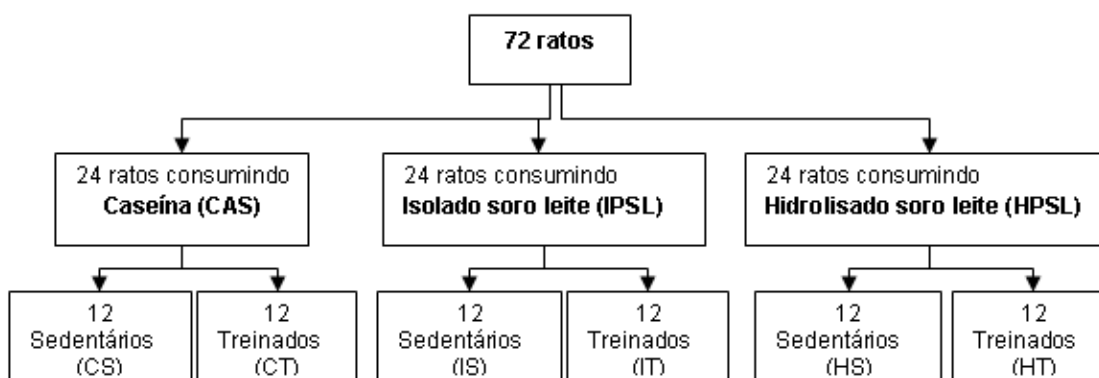


Figura 1– Divisão em grupos dos animais por tipo de dieta e atividade física.

Grupos: CS: dieta com caseína e sedentários, CT: dieta com caseína e treinados, IS: dieta com isolado e sedentário, IT: dieta com isolado e treinado, HS: dieta com hidrolisado e sedentários, e HT: dieta com hidrolisado protéico e treinados.

As dietas experimentais foram isoprotéicas (aproximadamente 12% de proteína), isolipídicas e isoenergéticas (cerca de 300 kcal/100g) e formuladas segundo as recomendações do American Institute of Nutrition⁽¹¹⁾, dieta AIN 93-M, para ratos em manutenção (Tabela 1). No total foram três dietas, diferindo entre si de acordo com a fonte e grau de hidrólise: caseína (CAS), isolado protéico do soro do leite (IPSL) e hidrolisado protéico do soro do leite (HPSL), com grau de hidrólise aproximadamente 12,5%. As proteínas do soro do leite (PSL), isolada e hidrolisada, foram fornecidas pela Hilmar Ingredients (CA, EUA), sendo produzidas de forma padronizada pela empresa.

Tabela 1- Composição das diferentes dietas experimentais (g/100g) administrada nas 9 semanas de treinamento.

Ingredientes	Dietas		
	CAS	IPSL	HPSL
Proteína	14,70	12,74	15,13
Amido de milho	46,11	47,39	45,84
Amido dextrinizado	15,35	15,77	15,26
Sacarose	9,90	10,17	9,84
Óleo de soja	4,00	4,00	4,00
Fibra	5,00	5,00	5,00
Mistura mineral AIN 93 M ^a	3,50	3,50	3,50
Mistura vitamínica AIN 93 M ^b	1,00	1,00	1,00
L-cistina	0,18	0,18	0,18
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
tert-Butilhidroquinona (mg/100g)	0,8	0,8	0,8

2.2 – Protocolo de Treinamento

O teste de *performance* (Figura 2) foi utilizado como critério para a seleção dos ratos aptos à prática de exercícios. Nesse teste, a velocidade aumentava conforme o tempo, sendo considerados aptos os ratos que correram durante mais tempo. O tempo era encerrado quando o animal demorava 30 segundos sem poder se afastar da parte inicial da esteira.

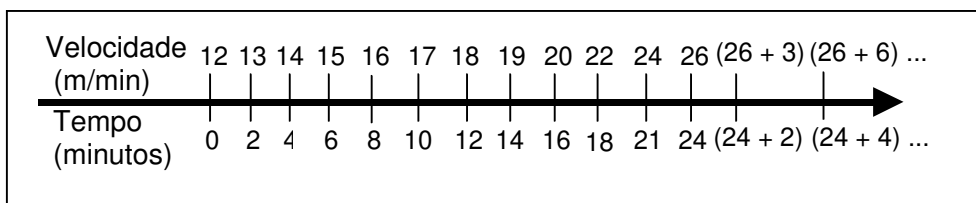


Figura 2- Teste de performance utilizado para avaliação da aptidão para o exercício.

No dia em que os animais começaram a consumir as dietas experimentais, foi feita a divisão simultânea envolvendo também a atividade física, obtendo-se os seis grupos definidos na Figura 1. Os treinados eram submetidos a um protocolo de treinamento em

esteira, correndo nas velocidades e tempos progressivos apresentados na Tabela 2. O período de treinamento, nas respectivas dietas foi de 9 semanas. Os ratos sedentários foram também submetidos a regime de atividade de manutenção, correndo na velocidade de 15 m/min e tempo fixo de 10 minutos, 3 vezes por semana.

O teste de performance e o treinamento em esteira seguiram o protocolo desenvolvido por Holh⁽¹²⁾.

Tabela 2– Protocolo de treinamento aplicado aos grupos CT, IT e HT.

Semanas	Velocidade (m/min)	Tempo (min)	Número de sessões diárias	Intervalo entre as sessões (h)
1 ^a	15	20	1	-
2 ^a	20	30	1	-
3 ^a	22,5	45	1	-
4 ^a	25	60	1	-
5 ^a	25	60	1	-
6 ^a	25	60	1	-
7 ^a	25	60	1	-
8 ^a	25	60	1	-
9 ^a	25	60	2	4

2.3 – Determinação do perfil de aminoácidos das dietas

Amostras das três dietas (CAS, IPSL e HPSL) foram submetidas à hidrólise com solução 6N de HCL com fenol, a 110°C, por vinte e quatro horas. A solução foi colocada em bomba de vácuo de duplo estágio (Edwards, E2MB) para separar o ácido da amostra hidrolisada e fazer a secagem. Foi acrescentado uma solução padrão (AAAB à 99% e HCL 0,1 M) à amostra hidrolisada e seca, e homogeneizado.

Cerca de 5 ml da solução homogeneizada foi filtrada em microseringa com membrana de 0,22 μm , sendo que 1 μL do filtrado foi encaminhado para a secagem. A secagem foi realizada em uma estação de vácuo, em duas etapas iguais que se repetem: adicionou-se 20 μL de solução de re-secagem, agitou-se em vortex por 30 segundos, e colocava no equipamento de secagem.

Após o processo de secagem, foram adicionados 20 μL de solução derivatizante, homogeneizou-se e ficou em repouso por 20 minutos. Após o repouso o processo de secagem era repetido. Logo em seguida foi adicionado 500 μL de diluente, e os tubos foram colocados em ultrassom por 10 minutos, e continuou-se a homogeneização em vortex por 30 segundos. O conteúdo amostral homogeneizado foi centrifugado por 2 minutos a $9 \times g$, e o sobrenadante foi transferido para o vial de injeção, para realização das leituras em conjunto de aparelho HPLC (desgaseificador Spectra System (Thermo Separation Products), bomba quaternária Spectra System P4000 (Thermo Separation Products), válvula de injeção Rheodyne, Forno Thermasphere TS-130 HPLC (Phenomenex - USA 2000 Torrance, CA.), módulo detecção UV (Thermo Separation Products), coluna Luna C18 100 Å 5 μ , 250x4.6mm 00G-4252-EQ (Phenomenex - USA Torrance, CA.)).

2.4 – Coleta de amostras

Visando minimizar as consequências ou efeitos agudos e ressaltar os efeitos crônicos do treinamento e da dieta, optou-se por sacrificar os animais após 48 horas de repouso e 12 horas de jejum. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (80mg/kg de peso) e sedados com cloridrato de xilazina (8mg/kg de peso) para retirar todo o sangue por punção cardíaca, seguido de retirada dos órgãos.

Após o sacrifício, o sangue foi imediatamente coletado em tubos de ensaio comuns, centrifugado, e o soro estocado à temperatura -20°C , para posterior análise do perfil de aminoácidos. Os músculos sóleo e gastrocnêmico foram dissecados e imediatamente pesados.

2.5 – Determinação do perfil de aminoácidos séricos

Amostra de 200 μL do soro dos ratos foi diluída em 50 μL solução padrão B1 (solução de 0,65g ácido α -aminobutírico a 99% e 1L de HCL 0,1M) e 250 μL de metanol a 99%). Após a solução amostral foi centrifugada a 9 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em microseringa com membrana de 0,22 μm , sendo que 40 μL do filtrado foi levado à secura. A secagem foi realizada em uma estação de vácuo, em duas etapas iguais que se repetem: adicionou-se 20 μL de solução de re-secagem, agitou-se em vortex por 15 segundos, e colocava no equipamento de secagem. Após este processo, foram adicionados 20 μL de solução derivatizante e agitada. Após o repouso de 20 minutos, o processo de secagem foi repetido. Logo em seguida, foram adicionados 500 μL de diluente e os tubos colocados em ultrassom por 10 minutos, seguidos de nova homogeneização em vortex por 30 segundos. O conteúdo amostral homogeneizado foi centrifugado por 2 minutos a 9 x g, e o sobrenadante transferido para o vial de injeção para realização das leituras em conjunto de aparelho HPLC (desgasseificador Spectra System (Thermo Separation Products), bomba quaternária Spectra System P4000 (Thermo Separation Products), válvula de injeção Rheodyne, Forno Thermasphere TS-130 HPLC (Phenomenex - USA Torrance, CA.), detecção UV, Spectra UV 2000 (Thermo Separation Products), coluna Luna C18 100 Å 5u, 250x4.6mm 00G-4252-EQ (Phenomenex - USA Torrance, CA.)).

2.6 – Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise estatística usando o *Software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 16.0. Os dados foram testados quanto à normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov), e homogeneidade disponíveis no SPSS 16.0. Para os dados considerados paramétricos e homogêneos, foi utilizado o teste de variância univariada (ANOVA) e confronto de médias (teste de Tukey), considerando o valor de $p \leq 0,05$ como critério de significância estatística. Para os dados paramétricos não homogêneos foi utilizado Tamhane's T2, com significância $p \leq 0,05$. Para os dados não-paramétricos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, com significância estatística para $p \leq 0,05$.

3. Resultados e discussões

3.1 – Perfis de aminoácidos das dietas experimentais

As três dietas utilizadas apresentaram semelhante conteúdo de aminoácido total, mas houve várias diferenças quanto à composição de aminoácidos, principalmente ao comparar a dieta CAS com as dietas que utilizaram a proteína do soro do leite (IPSL e HPSL) (Tabela 3). Embora esses dados não tenham sido processados estatisticamente, a apreciação da magnitude dos valores absolutos mostra que os aminoácidos indispensáveis fenilalanina e histidina estão em menor quantidade no HPSL e IPSL do que na CAS. O contrário acontece com os aminoácidos de cadeia ramificada leucina e isoleucina, confirmando os resultados de Pacheco e outros⁽⁸⁾ e Boirie e outros⁽¹³⁾, mas para a valina não houve diferença expressiva entre CAS e HPSL, embora o IPSL fosse aproximadamente 15% menor que as demais dietas. A lisina e a treonina estão em maior quantidade nas dietas com proteína do soro do leite (IPSL e HPSL). Dos aminoácidos sulfurados houve

diferença apenas para cistina, visto que as dietas com proteína do soro do leite apresentaram conteúdo em cerca de 60% maior do que a CAS.

Dentre os aminoácidos não indispensáveis, destaca-se o elevado conteúdo de alanina e aspartato contido nas dietas com proteína do soro do leite, apresentando mais da metade daqueles presentes na dieta CAS.

Do ponto de vista aminoacídico, as proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos indispensáveis em excesso às recomendações, destacando o triptofano, a leucina, a isoleucina e a lisina⁽⁷⁾. Há exceção para os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades⁽⁷⁾.

As peculiaridades encontradas na proteína do soro do leite, em especial a elevada quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada, é uma boa alternativa para atletas, desportistas ou pessoas com patologia que inicia algum desgaste muscular, visto que vários estudos apontam vantagens às características apresentadas como o aumentado anabolismo muscular^(5, 14) e preservação de tecido musculares, principalmente durante o treinamento⁽¹⁵⁾.

Tabela 3- Composição aminoacídica das três dietas utilizadas (g/100g de matéria seca).

	CAS	IPSL	HPSL
Fenilalanina*	0,4946	0,3440	0,4001
Histidina*	0,3085	0,1602	0,2030
Isoleucina*	0,4685	0,5528	0,5821
Leucina*	1,0042	1,2504	1,225
Lisina*	0,9624	1,1590	1,2020
Metionina*	0,3796	0,3685	0,3562
Treonina*	0,4585	0,6475	0,7499
Triptofano*+	+	+	+
Valina*	0,6726	0,5740	0,6326
Alanina	0,4140	0,7484	0,7091
Arginina	0,4213	0,2624	0,3084
Aspartato	0,8461	1,2173	1,2712
Cistina	0,1241	0,1989	0,2026
Glutamato	2,9397	2,3447	2,3806
Glicina	0,2603	0,2151	0,3044
Prolina	1,1137	0,6245	0,6920
Serina	0,7317	0,5748	0,7196
Tirosina	0,5277	0,2393	0,2827
Total	12,1274	11,4819	12,2220

* Aminoácidos indispensáveis. + Aminoácido ausente nas leituras da análise, devido à utilização de hidrólise ácida no método. Dietas: CAS refere-se à dieta que utilizou apenas caseína como fonte protéica; IPSL refere-se à dieta que utilizou apenas o isolado protéico como fonte protéica; e HPSL, refere-se à dieta que utilizou apenas hidrolisado protéico do soro do leite como fonte protéica.

3.2 – Perfis de aminoácidos séricos

De fato, as particularidades das três dietas, associadas com a atividade física, promoveram diferentes adaptações ao longo do período experimental, influenciando o *pool* de aminoácidos livres. É pertinente lembrar que as amostras para a análise foram coletadas

após 48 horas de repouso e 12 de jejum, de modo que os resultados refletem a complexidade dos processos de captação e liberação de aminoácidos entre os tecidos e o sangue, e não o quadro da absorção imediatamente após a refeição.

A perda de proteínas que ocorre em alguns tecidos, principalmente na fase inicial da privação alimentar, permite que os aminoácidos componentes fiquem disponíveis para a oxidação e/ou gliconeogênese⁽¹⁶⁾. A gliconeogênese inicia-se entre 4 e 6 horas de jejum e torna-se completamente ativa quando os depósitos de glicogênio são exauridos (10 a 18 horas de jejum). Os esqueletos de carbono para a gliconeogênese são provenientes de aminoácidos, glicerol e lactato⁽¹⁷⁾.

Os aminoácidos indispensáveis são de crucial importância para preservar as funções corporais. Eles estão envolvidos no metabolismo de energia como substrato (diretamente ou por meio da gliconeogênese) e como precursores de componentes intermediários do Ciclo de Krebs. Eles também são precursores de numerosos componentes nitrogenados como: ácidos nucleicos, glutathione, creatina, taurina, histamina, catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina) e serotonina⁽¹⁸⁾.

Observando os níveis de aminoácidos indispensáveis dos ratos sedentários dos controles (CS) (Tabela 4) com os resultados dos grupos IS e HS, podemos verificar que eles não foram diferentes entre si. Entretanto, foi evidente que o grupo IS apresentou níveis significativamente menores de histidina e triptofano, comparado ao HS, enquanto o contrário ocorreu com a metionina.

Quando se consideraram apenas os grupos de ratos treinados, os níveis da maioria dos aminoácidos indispensáveis (fenilalanina, histidina, leucina, lisina, treonina, triptofano e valina) do grupo HT foram maiores que no CT. Por sua vez, no grupo IT houve maiores níveis de histidina, triptofano e valina, do que no CT. Já comparando os grupos controle

CS e CT, nota-se que os aminoácidos indispensáveis lisina e valina registraram significativa redução nos seus níveis no grupo CT.

Os níveis dos aminoácidos fenilalanina, histidina, lisina, triptofano e valina no grupo CT também foram significativamente mais baixos, quando comparados ao HS. Já para a metionina, o nível deste aminoácido no grupo CT foi maior que no HS, embora esta diferença não tenha um significado conhecido sob as condições do experimento. Da mesma forma, menores níveis de histidina e valina foram encontrados no grupo CT, em comparação ao IS.

Em se tratando dos grupos HS e HT, é relevante salientar que houve níveis significativamente maiores de leucina, metionina e treonina no HT, em relação ao HS, enquanto o contrário ocorreu para o triptofano, sugerindo que a atividade física, em conjunto com o jejum, propiciaram um estado metabólico tal que não precisou da utilização desses três aminoácidos, e sim de triptofano, para se manter em equilíbrio.

Quando o HT é comparado ao IT, nota-se que o HT apresenta os maiores níveis para leucina, metionina e fenilalanina. Estes dados sugerem que nos grupos consumindo a dieta com o HPSL, é a atividade física que conduz à elevação de leucina e metionina.

Tabela 4 - Concentração de aminoácidos séricos livres (mg/100mg) após 48 horas de repouso e 12 horas de jejum.

	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Fenilalanina*	7,80 ± 0,94 ^{ab}	7,19 ± 0,52 ^{ab}	7,80 ± 0,39 ^a	7,05 ± 0,37 ^b	7,21 ± 0,82 ^{ab}	8,33 ± 1,4 ^a
Histidina*	5,33 ± 1,81 ^{ab}	4,49 ± 0,19 ^a	5,23 ± 0,65 ^b	4,22 ± 0,37 ^a	5,75 ± 0,74 ^b	5,44 ± 0,84 ^b
Isoleucina*	12,08 ± 1,74	11,65 ± 0,88	11,98 ± 0,71	10,14 ± 4,03	12,35 ± 1,90	13,19 ± 4,47
Leucina*	6,80 ± 1,15 ^a	6,63 ± 0,24 ^a	6,61 ± 0,35 ^a	6,33 ± 0,34 ^a	7,02 ± 0,86 ^a	8,44 ± 1,42 ^b
Lisina*	24,65 ± 3,13 ^a	24,13 ± 2,09 ^{ab}	25,28 ± 1,50 ^a	22,00 ± 1,71 ^b	27,32 ± 6,69 ^{ab}	29,31 ± 8,23 ^a
Metionina*	6,60 ± 0,69 ^{ab}	7,02 ± 0,27 ^{bc}	6,37 ± 0,23 ^a	6,82 ± 0,28 ^{bc}	6,84 ± 0,67 ^b	7,51 ± 1,12 ^c
Treonina*	17,98 ± 2,60 ^{ac}	14,44 ± 1,90 ^c	17,85 ± 1,21 ^{ac}	17,13 ± 1,58 ^{ac}	22,03 ± 5,12 ^{ab}	23,34 ± 5,68 ^b
Triptofano*	10,49 ± 4,34 ^{abc}	8,71 ± 1,05 ^{ac}	11,89 ± 1,25 ^b	7,61 ± 0,25 ^c	9,78 ± 1,26 ^a	9,19 ± 1,75 ^a
Valina*	7,93 ± 1,19 ^a	7,74 ± 0,19 ^a	8,11 ± 0,56 ^a	6,93 ± 0,56 ^b	8,28 ± 0,79 ^a	9,74 ± 2,93 ^a
Alanina	31,20 ± 8,24 ^{ab}	22,64 ± 4,26 ^a	26,67 ± 1,24 ^a	29,29 ± 1,30 ^b	30,71 ± 8,14 ^{ab}	32,49 ± 9,94 ^{ab}
Arginina	28,55 ± 5,08 ^{ab}	25,05 ± 3,10 ^{ab}	25,03 ± 2,24 ^a	26,59 ± 3,47 ^{ab}	29,57 ± 2,13 ^b	28,99 ± 9,53 ^{ab}
Ácido Aspártico	3,59 ± 1,52 ^a	5,19 ± 1,66 ^b	1,09 ± 0,43 ^c	1,77 ± 0,32 ^d	2,54 ± 1,20 ^d	3,56 ± 1,41 ^a
Cistina	5,87 ± 0,93 ^{ab}	5,73 ± 0,29 ^b	3,88 ± 0,20 ^c	6,19 ± 0,05 ^a	5,00 ± 1,29 ^{ab}	4,05 ± 0,20 ^c
Ácido glutâmico	22,81 ± 6,68	21,79 ± 3,92	19,95 ± 1,46	19,80 ± 3,18	28,07 ± 9,43	26,83 ± 9,59
Glutamina	16,81 ± 5,04	20,18 ± 2,80	20,38 ± 2,46	16,28 ± 1,11	13,43 ± 6,09	19,03 ± 7,87
Glicina	16,99 ± 2,88	15,09 ± 1,13	15,51 ± 0,85	15,24 ± 1,43	18,92 ± 4,09	16,13 ± 5,84
Prolina	11,61 ± 1,89 ^{ac}	9,78 ± 0,71 ^b	10,14 ± 0,37 ^{ab}	10,28 ± 0,49 ^{ab}	12,61 ± 1,79 ^c	12,15 ± 2,67 ^{ac}
Serina	16,99 ± 2,18 ^{ac}	15,07 ± 0,46 ^c	17,22 ± 0,53 ^a	15,65 ± 1,80 ^{ac}	17,95 ± 2,48 ^{ab}	20,12 ± 2,77 ^b
Tirosina	9,14 ± 1,89 ^{ad}	7,62 ± 0,52 ^{ab}	6,63 ± 0,97 ^{bc}	6,51 ± 0,47 ^c	7,33 ± 0,77 ^{abc}	10,19 ± 1,46 ^d
Taurina	6,62 ± 7,52 ^a	16,53 ± 7,18 ^{ab}	4,27 ± 3,04 ^a	6,64 ± 2,32 ^a	10,13 ± 5,01 ^{ab}	19,51 ± 9,93 ^b

* Aminoácidos indispensáveis. Os valores correspondentes são apresentados como média±DP. Abreviaturas: CS, controle sedentário; IS, dieta com isolado protéico do soro do leite e sedentário; HS, dieta com hidrolisado protéico do soro do leite e sedentários; CT, controle treinado; IT, dieta com isolado protéico do soro do leite e treinado; HT, dieta com hidrolisado protéico do soro do leite e treinado. Para a análise estatística foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, considerando significativo $p \leq 0,05$, para os seguintes aminoácidos: isoleucina, lisina, metionina, valina, aspartato e cistina. Para os demais aminoácidos foi utilizado o teste Tamhane's T2, com significância $p \leq 0,05$. (n replicatas, entre 6 e 9 animais por grupo).

Comparando apenas os grupos IS e IT, a maioria dos níveis de aminoácidos indispensáveis não mostrou diferença, com exceção da histidina e a treonina, para os quais estavam elevados no grupo IT. Notou-se também que não houve diferença significativa para os aminoácidos indispensáveis, de modo geral, entre IT e CS, embora no IT registrasse maior nível de metionina e menor de triptofano, do que no HS. As poucas diferenças estatísticas encontradas entre IS e HT foram para os níveis de histidina, leucina e treonina, nos quais HT foi maior.

Esses resultados sugerem que a associação entre dieta e exercício físico exerceu maior influência sobre o *pool* de aminoácidos indispensáveis plasmáticos do que considerando as duas variáveis (dieta e exercício) isoladamente. Isto porque a proteína do soro do leite mostrou resultados semelhantes aos da caseína para os ratos sedentários, enquanto que o treinamento por si só trouxe poucas diferenças entre os perfis dos grupos controle (CS e CT) e os perfis dos grupos com o isolado (IS e IT), situação em que dois aminoácidos estavam variando (CS > CT para lisina e valina, e IS < IT para histidina e treonina, $p \leq 0,05$), sendo que a comparação HS-HT revelou quatro aminoácidos variantes (HS < HT para leucina, metionina e treonina, e HS > HT para triptofano, $p \leq 0,05$).

De fato, os ratos treinados que consumiram a HPSL (grupo HT) foram os que apresentaram os maiores níveis plasmáticos para maioria dos aminoácidos indispensáveis, sugerindo que o consumo prolongado da proteína hidrolisada do soro do leite, associado à atividade física pode influenciar o *pool* plasmático, após 48 horas de repouso e 12 horas de jejum. Vale destacar também que em todas as diferenças estatísticas encontradas entre a IPSL e HPSL, os ratos que consumiam a HPSL apresentaram os maiores níveis de aminoácidos indispensáveis (HS > IS para histidina e triptofano, e HT > IT para leucina e

metionina), exceto para a metionina nos ratos sedentários, a qual, no grupo IS se apresentou em maiores níveis que nos HS.

Quanto aos aminoácidos de cadeia ramificada no soro, foi interessante notar que o grupo CT apresentou o menor nível de valina, o que sugere que o exercício físico foi responsável por esta diminuição e que a fonte protéica CAS não sustenta a valina sérica nos níveis considerados normais, considerando o nível do animal sedentário (CS) como sendo o normal.

Dentre os aminoácidos de cadeia ramificada, a leucina tem destaque na ciência devido à sua capacidade de estimular a síntese protéica agindo como mediador modulando a atividade de kinases intracelulares ligadas à tradução protéica ^(5, 14). Outro aspecto interessante deste aminoácido é a facilidade de sua utilização para fins energéticos no próprio músculo, inclusive em situação de jejum, devido à presença local de aminotransferases ⁽¹⁹⁾. Considerando a importância desse aminoácido para o metabolismo protéico, o resultado para leucina plasmática destaca o grupo HT por apresentar o maior nível, sendo que entre os demais grupos, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Pelas considerações apresentadas acima, poderia se dizer que os níveis elevados de leucina neste grupo não teve um grau tão intenso de utilização, quanto nos demais grupos, incluindo o próprio HS. Deve ser lembrado que, no estado de jejum, os níveis de glicogênio começam a ser depletados e a gliconeogênese a ser ativada. É justamente nesse intervalo que a leucina poderia ser utilizada como substrato energético. Sendo esse o caso, todos os grupos, exceção ao HT, procederam a efetuar a substituição da fonte energética, efetivando-se um excedente de leucina no grupo HT. Tal suposição se apóia em resultados obtidos de trabalho paralelo realizado com os mesmos grupos de animais⁽²⁰⁾, o qual mostrou que os

estoques de glicogênio muscular deste grupo foram ~300% maiores que os dos demais grupos.

Dentre os aminoácidos não indispensáveis destacamos a alanina e glutamina, que são os principais aminoácidos liberados do músculo esquelético, indicativos de degradação protéica e produção de energia⁽¹⁶⁾. A tabela 4 mostra que a alanina e glutamina não diferiram significativamente dentre o conjunto dos sedentários (CS, IS e HS), e nem dentre o conjunto dos treinados (CT, IT e HT). O grupo CT mostrou nível estatisticamente maior de alanina do que IS e HS. Em adição, é pertinente notar que a fonte CAS, associada ou não à atividade física, pouco alterou os níveis de alanina e glutamina já que não foi encontrada diferença entre os grupos CT e CS.

Quanto aos demais aminoácidos não indispensáveis: arginina, ácido glutâmico, glicina e taurina, não houve diferença significativa entre o conjunto dos ratos sedentários. Por outro lado, o grupo CS mostrou nível significativamente maior de prolina, comparado ao IS, assim como a tirosina foi maior, com relação ao HS. Os três grupos diferiram estatisticamente para o ácido aspártico, sendo que o grupo HS apresentou o menor e o IS o maior valor. Para o conjunto dos ratos treinados também não houve diferença estatística para arginina, ácido glutâmico e glicina. No grupo HT, por sua vez, se registraram os maiores níveis de aspártico e tirosina da categoria dos treinados e o menor para cistina. O grupo HT também foi maior que CT para serina e taurina. O grupo IT apresentou maior nível de prolina que CT.

Comparando os grupos controle CS e CT, nota-se que o exercício pouco alterou os níveis dos diferentes aminoácidos não essenciais, sendo que houve diminuição significativa dos níveis de ácido aspártico e tirosina no CS. Também houve pouca influência do exercício entre os ratos que consumiram o IPSL (IS e IT), sendo que as diferenças

limitaram-se ao maior nível de aspártico e menor de prolina e serina, encontrados no IS. As diferenças existentes entre HS e HT, mostraram HT contendo os maiores níveis de aspártico, serina, tirosina e taurina.

Os níveis séricos elevados de diversos aminoácidos, principalmente os indispensáveis, encontrados no grupo HT não significam necessariamente que se trate de alguma vantagem, visto que há pelo menos duas possibilidades metabólicas para estes resultados. A primeira seria que as altas concentrações sejam resultado de uma proteólise aumentada, principalmente no músculo e no intestino^(16, 21), para atender especialmente a demanda de energia corporal. A segunda seria que a alta concentração seja resultado de uma baixa captação tecidual destes aminoácidos livres no plasma⁽⁴⁾.

Embora a consideração isolada dos resultados de aminoácidos séricos seja difícil de interpretar, a segunda possibilidade pode ser mais plausível, visto que os resultados de síntese e degradação protéica muscular (Capítulo 2 desta Dissertação) mostraram que o HT apresentou a menor taxa de síntese, sugerindo assim existir a menor captação de aminoácidos nesse grupo, ao passo que não diferiu estatisticamente dos demais grupos quanto à degradação.

3.3 – Evolução ponderal e peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio

A figura 3 mostra que a evolução ponderal foi semelhante para todos os grupos de ratos até meados da oitava semana de treinamento. No entanto, é possível notar o início de um discreto distanciamento no peso dos ratos caseína sedentários (CS), em relação aos grupos treinados (CT, IT e HT), entre a quinta e a sexta semana. Porém, é somente na nona semana que o CS apresenta peso estatisticamente maior que os grupos treinados. Esta diferença se mantém até a data do sacrifício.

A diferença significativa entre CS e CT sugere que o treinamento isoladamente foi importante para diminuir o ganho de peso, enquanto que a não-diferença entre as médias dos grupos IS, HS, CT, IT e HT, sugere que a dieta com PSL funcionou mantendo o peso dos ratos sedentários próximo daqueles dos treinados.

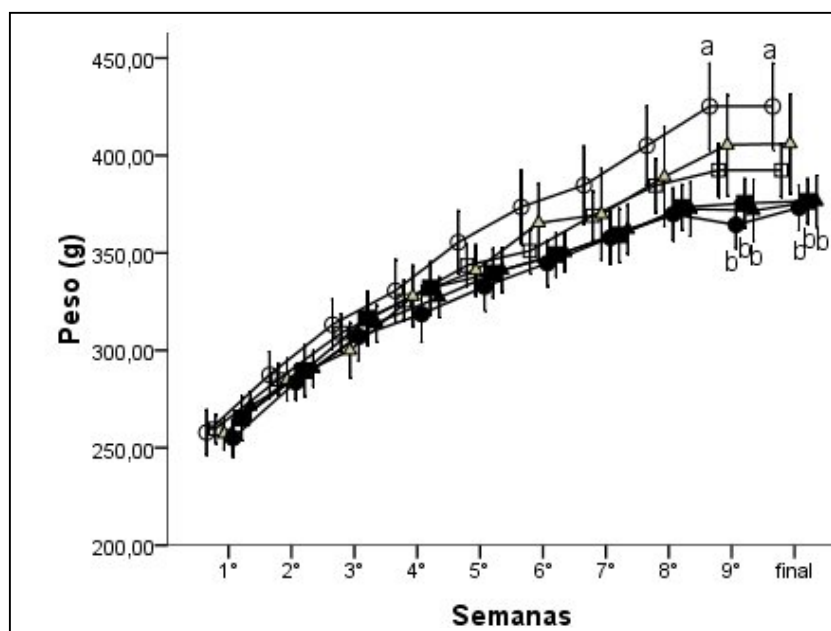


Figura 3– Evolução ponderal dos seis diferentes grupos de ratos durante as nove semanas de tratamento com treinamento e dieta com três diferentes tipos de proteína: caseína, PSLI e PSLH.

Abreviaturas e símbolos: CS, caseína sedentário (○); IS, isolado sedentário (□); HS, hidrolisado sedentário, (Δ); CT, caseína treinado, (●); IT, isolado treinado, (■); HT, hidrolisado treinado, (▲). A diferença entre a 9ª semana e o final foi de dois dias.

O maior peso do grupo CS comparado aos grupos treinados pode ser evidência de maior percentual de massa gorda no CS, constatada pela inspeção visual (dados não apresentados). Isoladamente, é consenso que o treinamento diminui o ganho de peso corporal, além de estimular a utilização dos ácidos graxos como combustível para a atividade física, sendo ainda possível que a PSL também diminua a síntese de ácidos graxos e a gordura corporal⁽²²⁾.

Pimenta e outros⁽²³⁾, avaliaram ratos jovens submetidos à atividade física, e dieta com 12% de IPSL ou HPSL (grau de hidrólise ~8%), durante 5 semanas, não encontrando diferença ponderal entre os grupos de dietas e regimes de atividade física. O estudo de Royle e outros⁽²⁴⁾, examinou a influência da dieta com IPSL, CAS e Glicomacropéptido por 7 semanas sobre o peso e a composição corporal de ratos Wistar sem treinamento, após o qual também não encontraram diferença estatística no peso final dos ratos. De fato, resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, visto que na 5ª e 7ª semanas experimentais também não houve diferença estatística entre os grupos, sugerindo que o menor peso foi resultado do longo tempo de tratamento (9 semanas), com aplicação de atividade física e dieta.

A ingestão alimentar é um fator passível de influenciar o ganho de peso dos animais alimentados com dietas bastante diferentes. Tendo em vista que os animais foram alojados em gaiolas coletivas, notou-se que as médias de consumo de dieta pelos animais CS foram maiores, em comparação aos demais grupos (dados não apresentados), contribuindo provavelmente para a diferença entre CS e os grupos treinados (CT, IT e HT) na nona semana.

As nove semanas de treinamento e tratamento dietético não influenciaram o peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo, sendo que neste último também não houve diferença para o peso corrigido (Tabela 5). No caso do peso corrigido do gastrocnêmio, o grupo CS apresentou o menor valor de peso muscular por peso corporal.

Tabela 5– Peso (mg) e peso corrigido (mg/kg de peso corporal) dos músculos sóleo e gastrocnêmio.

	Grupos sedentários			Grupos treinados		
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Gastrocnêmio (mg)	1994 ± 105	1890 ± 172	1930 ± 180	1924 ± 138	1935 ± 146	1926 ± 136
Sóleo (mg)	165 ± 52	139 ± 22	150 ± 31	141 ± 28	142 ± 36	130 ± 20
Gastrocnêmio (mg/kg)	4,73 ^a ± 0,36	4,82 ^{ab} ± 0,32	4,78 ^b ± 0,34	5,16 ^b ± 0,25	5,14 ^b ± 0,27	5,13 ^b ± 0,38
Sóleo (mg/kg)	0,39 ± 0,13	0,35 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,07	0,38 ± 0,09	0,35 ± 0,05

Os valores correspondentes são apresentados como média±DP. Abreviaturas: CS, controle sedentário; IS, dieta com isolado protéico do soro do leite e sedentário; HS, dieta com hidrolisado protéico do soro do leite e sedentários; CT, controle treinado; IT, dieta com isolado protéico do soro do leite e treinado; HT, dieta com hidrolisado protéico do soro do leite e treinado.

Em um estudo semelhante realizado por Morifuji e outros⁽²⁵⁾, em que se utilizaram ratos machos Wistar, alimentados com caseína ou *whey protein*, não foi encontrada diferença significativa para o peso do músculo gastrocnêmio corrigido entre sedentários ou treinados com natação por duas semanas.

Os resultados sugerem que o tratamento com a HPSL, independente da atividade física, aumentou a massa proporcional do gastrocnêmio, em relação ao peso do animal. Além disso, foi também evidenciada a contribuição do treinamento ao aumento relativo da massa do gastrocnêmio, haja visto que para os grupos treinados, as massas ajustadas foram superiores às do grupo caseína sedentário (CS).

4. Conclusões

Pode ser concluído que o perfil de aminoácido fornecido pela dieta com PSL parece disponibilizar maior quantidade de aminoácidos indispensáveis e outros aminoácidos de grande interesse para a aplicação dos conhecimentos da bioquímica do metabolismo ao melhor desempenho do organismo exercitado, quando comparado ao perfil da caseína. O consumo da PSL, principalmente hidrolisada, e associada à prática de atividade física por um período longo, parece também estimular adaptações metabólicas não adversas no organismo, as quais podem ter reflexos no *pool* de aminoácidos séricos. Sendo que o consumo rotineiro de substratos protéicos pré-hidrolisados não constitui um procedimento normal na alimentação, os dados apresentados não detectam nenhum sinal de adverso com os parâmetros estudados. No entanto, novos estudos se fazem necessários para chegar a conclusões mais abrangentes sobre a utilização da PSL, hidrolisada ou não, na prática de atividade física e os *pools* de aminoácidos.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de pós-graduação concedidas à VCSZ, à CCBCL e GEAC; e à Empresa Hilmar Ingredients (Dalhart, CA, USA) pela doação da proteína do soro do leite (*whey proteins*), e também à Doremos Alimentos, São Paulo, Brasil.

6. Referências

1. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, Value RR. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2004;2073-2081.
2. Pitkänen HT, Nykänen T, Knuutinen J, Lahti K, Keinänen O, Alen M, et al. Free amino acid *pool* and muscle protein balance after resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2003;784-792.
3. Lemon PWR. Effects of exercise on dietary protein requirements. *International Journal of Sport Nutrition* 1998;8:426-447.
4. Cynober LA. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 2002;18(9):761-6.
5. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Kohnke R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr* 2006;136(1 Suppl):269S-73S.
6. Rennie MJ, Tipton KD. Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. *Annu Rev Nutr* 2000;20:457-83.
7. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológica-funcionais das proteínas do soro do leite. *Revista de Nutrição* 2004;17(4):397-409.
8. Pacheco MTB, Dias NFG, Baldini VLS, C.Tanikawa. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2005;25(2):333-338.
9. Frestedt JL, Zenk JL, Kuskowski MA, Ward LS, Bastian ED. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. *Nutr Metab (Lond)* 2008;5:8.
10. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr* 2003;89(2):239-48.
11. Reeves PG, Nielsen FH, Jr. CGF. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 1993;123(11):1939-1951.
12. Holh R, Padronização de um modelo de indução de overreaching em ratos: desenvolvimento e perspectivas de investigação em natação e esteira. 2007. Dissertação (Doutorado em Biologia funcional e molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Biologia, Campinas, 2007.

13. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Varson M-P, Maubois J-L, Beaufrère B. Slow and fast dietary protein differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Science* 1997;94:14930-14935.
14. Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, et al. Increase availability of leucine-rich whey protein improves postprandial muscle protein synthesis em aging rats. *Nutrition* 2006;23:323-331.
15. Cribb PJ. U.S. whey protein in sports nutrition. In; 2006.
16. Maughan R, Gleeson M, Greenhaff PL. *Bioquímica do exercício e do treinamento*. 1a. ed. Barueri / SP; 2000.
17. Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica ilustrada*. 2º ed. Porto Alegre, RS; 2000.
18. Tome D. Protein, amino acids and the control of food intake. *Br J Nutr* 2004;92 Suppl 1:S27-30.
19. Layman DK. Protein quantity and quality at levels above the RDA improves adult weight loss. *J Am Coll Nutr* 2004;23(6 Suppl):631S-636S.
20. Carneiro-Leão CCB, *Composição bioquímica dos músculos cardíaco e gastrocnêmio, fígado e sangue de ratos alimentados com proteína intacta e hidrolisada do soro do leite e submetidos à atividade física*. 2009. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2009.
21. Hamada K, Matsumoto K, Okamura K, Doi T, Minehira K, Shimizu S. Effect of amino acid and glucose os exercise-induced gut and skeletal muscle proteolysis in dogs. *Metabolism* 1999;48(2):161-166.
22. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. *Nutrition* 2005;21:1052-1058.
23. Pimenta FMV, Abécia-Soria MI, Auler F, Amaya-Farfán J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. *International Dairy Journal* 2005;16:984-991.
24. Royle PJ, McIntosh GH, Clifton PM. Whey protein isolate and glycomacropeptide decrease weight gain and alter body composition in male Wistar rats. *Br J Nutr* 2008;100(1):88-93.
25. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *Br J Nutr* 2005;93(4):439-45.

Conclusão Geral

Conclusão geral

Os dados aqui apresentados confirmam que a proteína do soro do leite é de fato uma boa fonte protéica para praticantes de esportes de *endurance*, devido à riqueza de sua composição aminoacídica, principalmente considerando os aminoácidos de cadeia ramificada, quando comparada à principal proteína do leite, a caseína. Em adição, também na sua forma hidrolisada, a proteína do soro do leite não mostrou nenhuma desvantagem quando comparada à caseína com relação aos níveis de aminoácidos.

Além disso, o consumo da proteína do soro do leite na forma hidrolisada, quando associado à atividade física, mostrou ter maior influência sobre o *pool* de aminoácidos séricos, sendo que grande parte dos aminoácidos apresentava-se em concentração elevada no grupo HT, principalmente quando comparado aos grupos que consumiam dieta com caseína (CS e CT). No entanto, parece prematuro rotular a elevação das concentrações aminoacídicas como sendo vantagem ou desvantagem da proteína hidrolisada, visto que existem pelo menos duas explicações metabólicas: 1 – menor demanda do organismo exercitado por aminoácidos (possível vantagem), e/ou 2 – excessiva quebra protéica tecidual, o qual pode ser desvantajoso.

A proteína do soro do leite mostrou ter menor efeito sobre o peso corporal do que a prática de atividade física, mas este pequeno efeito foi importante, resultando inclusive na redução do peso dos ratos sedentários que consumiam a PSL e aproximando-o àquele dos que foram treinados.

O consumo da proteína do soro do leite não alterou nem o peso nem conteúdo e concentração de proteína nos músculos gastrocnêmio e sóleo. Mas, tanto o HPSL quanto o

exercício físico aumentaram a proporção de tecido muscular gastrocnêmio, ajustado pelo peso corporal. No entanto, os gastrocnêmios dos ratos que consumiam HPSL apresentaram menor conteúdo e concentração de DNA. Esses resultados, tomados em conjunto, sugerem que a massa protéica muscular pode ter sido preservada pelo consumo do HPSL, em comparação ao tratamento com as dietas com as proteínas CAS e IPSL.

De fato, os resultados para a síntese e degradação também foram consistentes com a hipótese de preservação muscular, principalmente quando considerada a associação HPSL-exercício físico, visto que o grupo HT apresentou a menor taxa de síntese no gastrocnêmio, sem diferir quanto à degradação protéica muscular. Lembrando que nenhum dos tratamentos com dieta ou exercício foi capaz de alterar significativamente os níveis de IGF1 sérico e, mostrando que as diferenças encontradas para os parâmetros metabólicos estudados ocorreram independente do estímulo deste hormônio.

De modo geral, o consumo da proteína hidrolisada do soro do leite, por período de tempo relativamente longo (9 semanas) e associada à atividade física de *endurance*, parece preservar o tecido muscular, na hipótese de haver desgaste principalmente na prática da atividade física. Deste modo, quebrando menos proteína durante a atividade física ao longo do tratamento, o organismo pode diminuir a demanda por nova síntese protéica, diminuindo a necessidade de captação de aminoácidos do *pool* sérico e diminuindo também a necessidade de maior quantidade de DNA celular no músculo gastrocnêmio.

Anexo



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

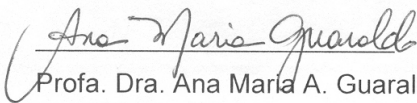
CERTIFICADO

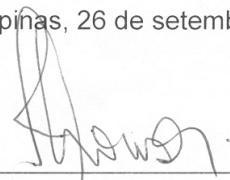
Certificamos que o Protocolo nº **1340-1**, sobre "**Avaliação do metabolismo proteico muscular de ratos alimentados com hidrolisado proteico do soro de leite e submetidos à atividade física aeróbica**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán / Viviane Costa Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **26 de setembro de 2007**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1340-1**, entitled "_____", 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 **September 26, 2007**.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva