



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO



Efeito das Proteínas do Soro do Leite no Estresse Oxidativo em Animais submetidos ao Exercício Físico de Alta Intensidade

KELY RASPANTE TEIXEIRA

Ouro Preto
2013

KELY RASPANTE TEIXEIRA

**Efeito das Proteínas do Soro do Leite no
Estresse Oxidativo em Animais
submetidos ao Exercício Físico de Alta
Intensidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Saúde e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

Coorientador: Dr. Fabiano Kenji Haraguchi

Ouro Preto

2013

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado

Aos 21 dias do mês de fevereiro de 2013, às 14h00min no Núcleo de Pesquisas e Estudos em Nutrição e Saúde Coletiva da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a defesa da dissertação de mestrado da aluna Kely Raspante Teixeira. A banca examinadora definida anteriormente foi composta pelos professores Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior (UFOP), Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira (UFOP) e Dr. Marcelo Eustáquio Silva (UFOP). Dando início ao exame a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: "EFEITO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE NO ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO DE ALTA INTENSIDADE". Após a apresentação a candidata foi argüida pela banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado ao projeto de dissertação do candidato. Após julgamento os membros da banca decidiram por:



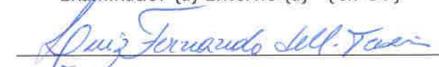
APROVAR



REPROVAR



Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior
Examinador (a) Externo (a) - (UFOP)



Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira
Examinador (a) Externo (a) - (UFOP)



Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva
Orientador (a) - (UFOP)



Kely Raspante Teixeira
Mestrando (a) - (UFOP)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Por cuidar de mim, providenciando tudo o que eu preciso, sempre guiando os meus passos e me dando forças para superar os desafios. Pois sei que Nele nada é impossível!

Ao professor Marcelo Eustáquio Silva, pela orientação, oportunidade e confiança na realização deste projeto. Agradeço também por todos os ensinamentos que certamente contribuíram para minha formação e pelos exemplos que levarei durante toda a minha vida profissional.

A toda a minha família, em especial aos meus pais Mauro Fernandes Teixeira e Cleuza Raspante Teixeira, pelo exemplo de vida que sempre foram para mim, pela dedicação e amor. Pelas muitas vezes que renunciaram os seus sonhos, para que, pudesse realizar o meu. E mesmo em meio a tantas dificuldades, priorizaram os meus estudos, me dando a oportunidade de um futuro melhor. Aos meus irmãos Michele Raspante Teixeira Oliveira e Matheus Raspante Teixeira por toda cumplicidade, apoio e carinho. Por me incentivarem e vibrarem com minhas conquistas.

Ao Reginaldo Dias Silva, que acreditou em mim e estive ao meu lado sempre que precisei. Por toda a paciência e amor nos momentos em que precisei, por me compreender e me dar forças pra continuar, pelo ombro amigo nas horas boas e ruins.

Às amigas do mestrado Isabela Fernandes, Lunara Freitas, Lorena Goulart, Nathalia Nascimento, Isabel de Abreu e Roberta Ribeiro, pela força e ajuda constante para superar as dificuldades, vocês tornaram os meus dias melhores e felizes. Em especial, a minha família de Ouro Preto, a “Belbel” e a “Beta”, duas irmãs que Deus colocou em minha vida, que foram fundamentais durante esses dois anos. Pelas brincadeiras, pelas risadas, pelas críticas nos momentos certos, pelas lágrimas divididas, pela preocupação e cuidado, pela companhia e amizade de todas as horas.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Metabólica e do Laboratório de Nutrição Experimental, pelo muito que aprendi com vocês e aos momentos de risadas compartilhados na bancada. Em especial, a Maísa Silva e Joyce Ferreira pela paciência ao me ensinar e pela disposição em ajudar sempre que

precisei. A minha gratidão e a certeza de, que sem todos vocês, esse trabalho não seria possível.

As professoras Maria Lúcia Pedrosa e Daniela Caldeira Costa pela colaboração, competência, todas as discussões e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Wanderson Geraldo Lima e ao Marcorélio Divino de Souza, por toda atenção, pela disponibilidade e pelos muitos ensinamentos.

Aos amigos de Ipatinga, por entenderem a minha ausência e por me apoiarem em cada decisão.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu alcançasse essa vitória, o meu:

MUITO OBRIGADA!

Resumo: As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de ERO instala-se o processo de estresse oxidativo. Este resulta na oxidação de biomoléculas, cuja manifestação é o dano oxidativo contra células e tecidos. O simples fato de consumir oxigênio gera uma contínua formação de ERO. Dessa forma, o aumento da contração muscular e o aumento do consumo de oxigênio, na atividade física, resultam em uma maior produção de ERO. Dentre os inúmeros compostos alimentares que apresentam atividade antioxidante, podemos citar as proteínas do soro do leite (PSL). Conhecidas por serem de alto valor biológico, estudos tem demonstrado seus benefícios para o desempenho físico, assim como em melhorar o sistema de defesa antioxidante. No entanto, o mecanismo como isso ocorre ainda não está bem elucidado. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das proteínas do soro do leite sobre os biomarcadores do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes em animais submetidos ao treinamento físico de alta intensidade. Para isso, foram utilizados 32 ratos, divididos em 4 grupos de 8 animais cada: grupo controle sedentário (CS) e controle exercitado (CE) proteína do soro do leite sedentário (WS) e proteína do soro do leite exercitado (WE). Após o período experimental foram mensurados o colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e as frações não-HDL, albumina sérica, glicose sérica, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALA), creatinina e ureia, glutathiona total, atividade de catalase (CAT) e de superóxido dismutase (SOD), proteínas carboniladas (PC), TBRAS, a expressão de enzimas das defesas antioxidantes, por meio do ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real e a análise histopatológica do músculo. Além disso, foi quantificado as mudanças na ingestão alimentar e no ganho de peso corporal dos animais. Para análise dos dados foram feitos os teste de two-way ANOVA e de Kruskal-Wallis, com pós teste de Tukey. Assim, observou-se que o exercício, juntamente com a ingestão de PSL, melhorou o perfil lipídico dos animais, reduzindo a concentração plasmática de colesterol total e das frações não-HDL. Já o nível de HDL foi maior, apenas, nos grupos que receberam as PSL. Foi encontrado,

também, um aumento da concentração da glutathiona total seguida da redução de PC e TBRAS, da atividade da CAT e de SOD nos grupos que receberam as PSL. O ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real apresentou resultados semelhantes aos das análises de atividade das enzimas de defesa antioxidante, confirmando esses dados. Na análise histologia verificou-se que as PSL foram capazes de reduzir a inflamação muscular ocasionada pela atividade física de alta intensidade. Tais achados apontam para um possível efeito sinérgico do exercício com as PSL. Além disso, as PSL mostraram-se benéficas no exercício físico de alta intensidade ao agir de forma indireta na redução do estresse oxidativo.

Palavras Chave: proteínas do soro do leite, atividade física de alta intensidade, estresse oxidativo.

Abstract: The reactive oxygen species (ROS) are generated normally in mitochondria, cell membranes and cytoplasm. However, when an imbalance occurs between compounds pro-oxidants and antioxidants in favor of excessive generation of ROS settles the process of oxidative stress. This results in oxidation of biomolecules, whose expression is oxidative damage to cells and tissues. Simply consume oxygen generates a continuous formation of ROS. Thus, increased muscle contraction and increased oxygen consumption, physical activity, resulting in increased production of ROS. Among the many food compounds that have antioxidant activity, can Scythians whey proteins in milk (PSL). Known to be of high biological value, studies have shown its benefits for physical performance, as well as improve the antioxidant defense system. However, the mechanism how this occurs is not yet fully elucidated. Accordingly, the objective of this study was to evaluate the effect of whey proteins on biomarkers of oxidative stress and antioxidant defenses in animals undergoing physical training at high intensity. For this, we used 32 rats were divided into 4 groups of 8 animals each: sedentary control group (CS) and exercised control (EC) protein whey sedentary (WS) and whey protein exercised (WE). After the trial period we measured total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) and non-HDL fractions, serum albumin, serum glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALA), creatinine and urea, total glutathione, activity catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), protein carbonyl (PC), TBRAS the expression of enzymes of antioxidant defenses, through testing RT-PCR and real-time quantitative histopathology of muscle. In addition, was quantified changes in food intake and body weight gain of animals. Data analysis were done the test two-way ANOVA and Kruskal-Wallis test with post Tukey test. Thus, it was observed that the exercise along with the intake PSL, improved lipid profile of the animals by reducing plasma levels of total cholesterol and non-HDL fraction. The level of HDL was higher only in the groups that received the PSL. It was found, also, an increase in the concentration of total glutathione followed by reduction of PC and TBRAS, the activity of CAT and SOD in the groups receiving the PSL. The RT-PCR assay for quantitative real-time showed similar results to the analysis of activity of antioxidant defense enzymes, confirming that data. In histological

analysis it was found that the PSL were able to reduce muscle inflammation caused by physical activity of high intensity. These findings suggest a possible synergistic effect of exercise with the PSL. Moreover, the PSL proved beneficial in high-intensity exercise by acting indirectly in reducing oxidative stress.

Keywords: whey protein, high-intensity physical activity, oxidative stress.

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais.....	26
Tabela 2. Atividade sequestradora de radical DPPH.....	37
Tabela 3: Dados de peso corporal inicial, ingestão alimentar, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos estudados.....	38
Tabela 4: Valores de colesterol total sérico, HDL colesterol, colesterol não HDL, glicose, albumina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, creatinina e concentrações de uréia dos grupos estudados.....	39

Lista de figuras

Figura 1. Concentração muscular de proteínas carboniladas dos animais estudados.....	40
Figura 2. Concentração muscular de TBARS dos animais estudados.....	41
Figura 3. Atividade da enzima catalase em tecido muscular dos animais em estudados.....	42
Figura 4. Atividade da enzima superóxido dismutase em tecido muscular dos animais estudados.....	42
Figura 5. Concentração de glutathiona total no tecido muscular dos animais.....	43
Figura 6. Razão de expressão da Catalase no tecido muscular dos animais estudados.....	44
Figura 7. Razão de expressão de Superóxido dismutase citosolica no tecido muscular dos animais estudados.....	45
Figura 8. Razão de expressão da Glutationa peroxidase no tecido muscular dos animais estudados.....	46
Figura 9. Razão de expressão da γ - glutamilcisteína sintetase no tecido muscular dos animais estudados.....	46
Figure 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos de músculo e o número de células inflamatórias no tecido muscular dos animais estudados.....	47

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

$(^1\text{O}_2)^2$ - Oxigênio singlete

$\cdot\text{OH}$ – Radical hidroxila

ALA – Alanina aminotransferase

APC - Células apresentadoras de antígenos

AST – Aspartato aminotransferase

CaCO_3 – Carbonato de cálcio

CAT – Catalase

cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar

CE – Grupo controle exercitado

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CS – Grupo controle sedentário

CT – Colesterol total

Cu,Zn-SOD - Superóxido dismutase cobre, zinco

CuCO_3 – Carbonato de cobre

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina

dNTPs - Desoxiribonucleotídeos trifosfato

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DTNB - Ácido 5,5´ditio-bis (2-nitrobenzóico)

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathiona peroxidase

GR – Glutathiona redutase

GSH – Glutathiona reduzida

GSSH – Glutathiona oxidada

H&E - Hematoxilina & Eosina

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HOCl - Ácido hipocloroso

K_2SO_4 – Sulfato de potássio

KCl – Cloreto de potássio

KH_2PO_4 – Dihidrogenofosfato de potássio

MDA - Malondialdeído;

MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MgO – Óxido de magnésio
MnCO₃ – Carbonato de Magnésio
Mn-SOD - superóxido dismutase manganês
mRNA - RNA mensageiro;
mTOR - Alvo da rampamicina em mamíferos
MTT - Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium)
Na₂SeO₄ – Selenato de Sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO[•] - Óxido nítrico
O₂ – Gás oxigênio
O₂^{•-} - Radical superóxido
O₃ - Ozônio
PC – Proteína Carbonilada
Pirogalol - 1,2,3-benzenotriol
PSL – Proteínas do Soro do Leite
qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
RNA - Ácido ribonucleico
SOD – Superóxido Dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
TNB - Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
WE – Grupo proteínas do soro do leite exercitado
WS – Grupo proteínas do soro do leite sedentário
γGCS – Gama-glutamilcisteína sintetase
ZnCO₃ – Carbonato de Zinco
Zn-SOD – Superóxido dismutase zinco

Sumário

1. Introdução	16
1.1 Extresse oxidativo.....	16
1.2 Estresse oxidativo e Atividade física	19
1.3 Proteínas do soro do leite, exercício físico e estresse oxidativo.....	21
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. Metodologia.....	25
3.1 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical DPPH.....	25
3.2 Animais.....	26
3.3 Dietas e delineamento experimental	27
3.4 Eutanásia, coleta de sangue e de tecidos	28
3.5 Dosagens bioquímicas.....	29
3.6 Defesas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo em tecido muscular.....	29
3.6.1 Proteína carbonilada.....	29
3.6.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	30
3.6.3 Proteínas totais	30
3.6.4 Catalase	31
3.6.5 Superóxido dismutase	32
3.6.6 Glutathiona total.....	33
3.7 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real	34
3.7.1 Extração do RNA total	34
3.7.2 Síntese do cDNA	34
3.7.3 Desenho dos <i>primers</i>	35
3.7.4 RT-PCR quantitativa em tempo real.....	35
3.7.5 Curva de eficiência dos primers.....	36
3.8 Análises histológicas.....	36
3.9 Análises estatísticas.....	37
4. Resultados	37
4.1 Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i> contra o Radical DPPH.....	37

4.2 Caracterização bioquímica e biométrica dos grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), proteínas do soro do leite sedentário (WS) e proteínas do soro do leite exercitado (WE)	38
4.3 Biomarcadores do estresse oxidativo.....	40
4.4 Atividade das enzimas de defesa antioxidante	42
4.4 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real	44
4.5 Análises histológicas	48
5. Discussão.....	49
6. Conclusão	55
7. Referências	56
8. Trabalhos publicados durante o mestrado.....	65

1. Introdução

1.1 Extresse oxidativo

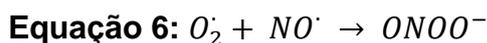
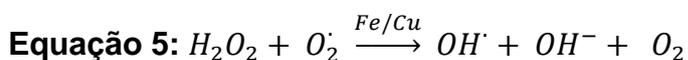
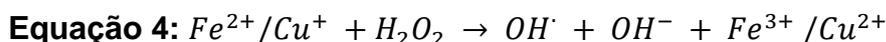
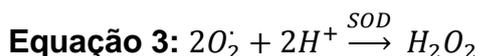
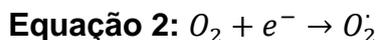
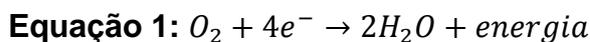
As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas incluem luz ultravioleta, irradiações ionizantes e agentes químicos. Já as ERO formadas intracelularmente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular ou durante processos patológicos, como por exemplo, o que ocorre em uma resposta inflamatória ⁽¹⁾.

ERO é um termo bastante amplo que abrange além dos radicais de oxigênio como radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), também derivados do oxigênio que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)^(2, 3).

Os mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (equação 1). A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. A ação da dessa enzima controla a geração de ERO, impedindo sua geração excessiva nessa organela ^(4, 5).

No entanto, cerca de 2 % a 5 % do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem as ERO. Assim, o radical superóxido é formado pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio (equação 2). Por sua vez, o radical superóxido ao receber íons de hidrogênio, gera peróxido de hidrogênio. Tal reação, conhecida por dismutação, é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), que acelera a reação na ordem de 10^4 vezes (equação 3). Quando o peróxido de hidrogênio reage com íons ferro ou cobre é originado o radical hidroxil, esse processo é chamado de reação de *Fenton* (equação 4). O radical hidroxil também pode ser gerado na reação de *Haber-weiss*, na qual os referidos íons catalisam a reação entre o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido (equação 5). Além disso, o radical superóxido quando reage com o óxido nítrico forma o peroxinitrito (equação 6). Nesse sentido, observa-se que a

produção de ERO se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e cobre ^(4, 5, 6, 7).



No organismo, as ERO encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, mediação da transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA ^(3, 8, 9). Dessa forma, a instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio ou em detrimento da velocidade de remoção dessas. Isso resulta na oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos ⁽¹⁰⁾.

A oxidação de proteínas é mais frequentemente representada pela formação de derivados de carbonila, caracterizada pela adição de um grupo carbonila, como aldeído ou cetona, a partir de uma cascata de reações oxidativas irreversíveis e irreparáveis. Tais reações podem levar à perda da função catalítica ou estrutural, fazendo com que essas proteínas fiquem

suscetíveis à degradação proteolítica. Já a peroxidação lipídica, envolve a degradação de ácidos graxos poliinsaturados e fosfolipídios. No que se refere aos seus produtos finais, tem havido ampla medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador indireto da peroxidação lipídica, além da avaliação de um aldeído importante, o malondialdeído. Este último é capaz de interagir com ácidos nucleicos e outras proteínas, levando a formação de compostos de características genotóxicas. Assim, um aumento na peroxidação lipídica pode levar a prejuízos na função fisiológica normal, ou seja, perda de fluidez e aumento da permeabilidade da membrana, com perda de proteínas citosólicas e alterações na função enzimática ^(11, 12, 13).

Evolutivamente, foram elaboradas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio. Um antioxidante é, por definição, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, atrasa significativamente ou inibe a oxidação de substratos pelas ERO. Estas substâncias possuem a capacidade de fornecer elétrons/átomos de hidrogênio as ERO sem se transformarem em moléculas instáveis. Os mecanismos de defesa antioxidante nos diferentes tecidos compreendem sistemas enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx); e não enzimáticos, como a vitamina E, b-carotenos, ubiquinona e ubiquinol, flavonoides, vitamina C e glutathione ^(1, 14, 15).

A catalase é uma enzima contendo ferro heme que converte o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, estando em grande parte localizada em organelas celulares, como os peroxissomos. Mitocôndrias e retículo endoplasmático contêm pouca CAT. Quando a taxa de H₂O₂ se eleva acredita-se que a CAT adquira um papel importante como um mecanismo adicional de defesa antioxidante celular, evitando que essa ERO forme radical hidroxil, via reação de *Fenton* e limitando a acumulação intracelular de H₂O₂ ⁽¹⁶⁾.

Já a glutathione peroxidase possui uma maior afinidade pelo H₂O₂ do que a CAT, o que significa que, em concentrações baixas de peróxido de hidrogênio, a GPx apresenta um papel muito mais ativo na sua remoção celular. O seu correto funcionamento está dependente da presença de selênio na sua constituição e da disponibilidade de H₂O₂ e de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como doador de elétrons/hidrogênios, formando glutathione oxidada (GSSH) e água. Este funcionamento atribui à GPx

um papel importante na proteção celular das membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos contra as ERO ⁽¹⁵⁾.

Por sua vez, a superóxido dismutase é uma metaloproteína que metaboliza o radical superóxido gerando peróxido de hidrogênio como produto final da dismutação. Existem três isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a citosólica, superóxido dismutase cobre, zinco (Cu,Zn-SOD ou SOD¹), a mitocondrial, superóxido dismutase manganês (Mn-SOD ou SOD²) e uma forma extracelular da Cu,Zn-SOD ou (SOD³) ⁽¹⁶⁾.

Para Limón-Pacheco; Gonsebatt ⁽¹⁶⁾, a indução de um estresse oxidativo modula a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, bem como os níveis de moléculas antioxidantes, utilizando caminhos semelhantes aos de doenças subjacentes degenerativas. A idade, o sexo, a suscetibilidade genética, os hábitos alimentares e o estilo de vida são fatores importantes que influenciam a capacidade de um organismo para montar uma resposta protetora. Assim, o acúmulo de dano oxidativo resultante da exposição crônica a fatores estressantes tem sido associado ao câncer, à aterosclerose, a doenças pulmonares e cardiovasculares. Esses autores também afirmam que, a quimioprevenção por nutrientes antioxidantes e por agentes indutores de enzimas antioxidantes tem sido usada com sucesso para inibir a formação de espécies reativas.

1.2 Estresse oxidativo e Atividade física

O simples fato de consumir oxigênio gera, pelo metabolismo celular, uma contínua formação de ERO, por meio da redução da molécula de oxigênio. Como supracitado estas espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas em vários locais da célula, especificamente nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos lisossomos, nas membranas celulares, nos peroxissomos e no citosol. Contudo, de todas as fontes referidas, a mitocôndria parece constituir a principal fonte de ERO no músculo esquelético, quer em repouso ou durante o exercício ^(15, 17).

Dessa forma, o aumento da contração muscular e o consequente aumento da taxa do consumo de oxigênio, na atividade física, resultam em uma maior produção de ERO. Isto ocorre, pois a taxa de formação destes compostos na mitocôndria parece ser proporcional à quantidade de oxigênio aí

consumido por unidade de tempo. Quando essa geração de espécies reativas é maior que a capacidade da célula de neutralizá-la, ocorre uma reação em cadeia envolvendo a oxidação de lipídios, o que leva a geração de mais espécies reativas. Assim, as ERO levam a alterações na estrutura das proteínas de membrana e também trazem mudanças na atividade enzimática (18, 19).

O aumento da síntese de ERO no exercício pode ocorrer de diversas formas, como a ativação da cadeia de transporte de elétrons, a síntese aumentada das enzimas xantina-oxidase e NADPH-oxidase, o prolongado processo de isquemia e reperfusão tecidual e a atividade fagocítica. Adicionalmente, o aumento da síntese de ácido láctico, catecolaminas e o elevado processo inflamatório após exercícios de alta intensidade, também contribuem significativamente para a produção de ERO. Contudo, o aumento na síntese de espécies reativas também é importante para a homeostasia corporal e para o adequado funcionamento do sistema antioxidante. Nesse sentido, a gradativa elevação na produção de ERO promovida pela realização de exercícios físicos, pode aumentar a resistência ao novo estresse, efeito conhecido como adaptação ao treinamento (20, 21, 22, 23, 24).

Estudos demonstram que o músculo esquelético, submetido a uma carga isolada de trabalho exaustivo, produz aumento da peroxidação lipídica e estimula a atividade de diversas enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). O exercício exaustivo pode impor um estresse oxidativo grave no músculo esquelético, sendo o sistema das enzimas antioxidantes importante para lidar com a lesão muscular mediada pelas espécies reativas (14, 25, 26).

As respostas de dores musculares e inflamação ao exercício de alta intensidade podem estar associadas com a formação de espécies reativas de oxigênio, o que possivelmente dificulta o processo de recuperação. Na tentativa de reduzir os efeitos deletérios induzidos por estas ERO tem sido sugerida a suplementação com antioxidantes (27, 28, 29).

Na literatura, existem relatos de trabalhos que abordam sobre a suplementação de antioxidantes no exercício físico. Parte das evidências mostra que a suplementação de antioxidantes previne a produção excessiva de ERO em modelos de exercício exaustivo agudo, favorecendo o desempenho e

controlando os níveis de lesão muscular ^(30,31). Por outro lado, outras pesquisas mostram que a suplementação indiscriminada de antioxidantes pode levar a uma inibição dos processos de sinalização intracelular gerados pelas ERO nos tecidos, especialmente no músculo esquelético, atrapalhando especialmente o desenvolvimento de força muscular e, conseqüentemente, o desempenho físico ^(32, 33).

Rebelatto *et al.* ⁽³⁸⁾, em estudo com objetivo de verificar a influência da suplementação de vitaminas antioxidantes na dieta de mulheres idosas que praticam exercícios físicos regulares, observaram que a prática regular de exercícios físicos de intensidade moderada induz o estresse oxidativo e que o referido estresse pode ser antagonizado quando a dieta é suplementada diariamente com bebida funcional antioxidante. Assim, esses autores concluíram que uma intervenção nutricional regular e prolongada, por meio de alimentos funcionais antioxidantes, pode ser um agente que previne o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico.

Nesse sentido, é razoável supor que se o estresse oxidativo possui efeito danoso no desempenho esportivo, uma suplementação com substâncias antioxidantes deve produzir um efeito ergogênico, aumentando, assim, o desempenho físico ⁽²⁰⁾.

1.3 Proteínas do soro do leite, exercício físico e estresse oxidativo

Dentre os inúmeros compostos alimentares que apresentam atividade antioxidante, podemos citar as proteínas do soro do leite (PSL). Estas merecem atenção especial, pois são encontradas em uma variedade de suplementos alimentares esportivos ^(35, 36). Conhecidas por serem de alto valor biológico, estudos tem demonstrado seus benefícios para o desempenho físico, assim como em melhorar o sistema de defesa antioxidante ^(37, 38).

As proteínas do soro do leite são aquelas que permanecem na porção aquosa do leite, gerada durante a coagulação das caseínas, como por exemplo, na produção do queijo ⁽³⁹⁾. As principais proteínas que compõem esse soro são a beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas, glicomacropéptídeos, lactoferrina, beta-microglobulinas, gamaglobulinas, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento. Estão presentes em todos os tipos de leite, sendo que a

proteína do leite bovino contém cerca de 80% de caseínas e 20% de PSL. Além disso, apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que lhe conferem certo grau de estabilidade estrutural e uma rápida absorção ⁽⁴⁰⁾.

As PSL possuem uma alta qualidade proteica e contêm uma proporção relativamente elevada de aminoácidos de cadeia ramificada (aproximadamente 26%) e de aminoácidos essenciais (em torno de 43%). Sua composição aminoacídica é similar a do músculo esquelético, fornecendo quase todos os aminoácidos em proporção aproximada às concentrações no músculo. Além disso, as PSL são conhecidas por possuírem peptídeos bioativos, raramente encontrados em outras fontes alimentares. Tais peptídeos conferem as PSL diferentes propriedades biológicas e funcionais ⁽⁴¹⁾.

Haraguchi *et al.* ⁽³⁶⁾, em pesquisa com ratos, na qual compararam a qualidade biológica de uma PSL comercial com a caseína e o seu efeito sobre os parâmetros bioquímicos, concluíram que as PSL possuem qualidade biológica semelhante a da caseína, apresentando influência positiva na homeostase da glicemia de jejum e no perfil lipídico, sem afetar as funções renal e hepática. Acrescido a isto as PSL apresentam, entre outras propriedades fisiológicas e funcionais, atividade imunomoduladora, antimicrobiana e antiviral, anticancerígena, antioxidante, proteção ao sistema cardiovascular e benefícios à atividade esportiva ^(40, 42).

A quantidade e o tipo de proteína consumida podem influenciar nos resultados do exercício físico, o que se deve às diversas velocidades de absorção, as diferenças nos perfis de aminoácidos, a resposta hormonal e os efeitos positivos sobre as defesas antioxidantes ⁽⁴³⁾.

Devido ao perfil de aminoácidos e a capacidade de estimular a síntese de proteína muscular, a incorporação de PSL na dieta pode melhorar o desenvolvimento da hipertrofia muscular e a composição corporal durante o treinamento. Isso porque, as PSL são fonte de leucina, um aminoácido de cadeia ramificada que é modulador do metabolismo de proteínas muscular, além de ter sido identificado como um regulador chave na via de iniciação de tradução da síntese proteica no músculo. Assim, as vantagens das PSL, em termos de anabolismo muscular, podem estar relacionadas com sua rápida

taxa de absorção, bem como a sua composição de aminoácidos para fornecer substrato para a síntese proteica ⁽⁴¹⁾.

Outra característica benéfica das PSL ao metabolismo das proteínas é a velocidade da sua digestão, estando relacionada ao fato das proteínas do soro não se coagularem no pH ácido do estômago. Com isso, são digeridas mais rapidamente quando comparadas às caseínas, que se coagulam no pH do estômago, retardando sua digestão. Dessa forma, por promoverem rápida absorção e aumento nas concentrações plasmáticas de aminoácidos, as PSL estimulam maior síntese proteica pós-prandial, sendo uma vantagem sua ingestão após o exercício físico ⁽⁴⁴⁾.

Frequentemente a depleção do glicogênio muscular se relaciona com o aparecimento da fadiga durante o exercício. Nesse sentido, altas concentrações de glicogênio muscular são essenciais para melhor desempenho físico. A suplementação de proteína, após o exercício, pode gerar um maior armazenamento de glicogênio muscular ^(45, 46). Para Morifuji *et al.* ⁽⁴⁷⁾, o tipo de proteína na dieta afeta tanto o conteúdo de glicogênio no fígado, quanto no músculo. Em pesquisa com ratos treinados, estes autores constataram que, a dieta à base de PSL apresentou um maior acúmulo de glicogênio no músculo esquelético e no fígado, do que a dieta à base de caseína. Assim, supõem que uma ingestão diária de proteína de soro de leite pode desempenhar um papel importante no aumento do conteúdo de glicogênio nos tecidos de ratos treinados.

Diversos estudos observaram que as proteínas do soro do leite podem melhorar a recuperação do exercício de alta intensidade e possivelmente diminuir danos e dores musculares, além de promover maiores ganhos de força e hipertrofia muscular ^(48, 49, 50, 51, 52). Tal achado pode estar relacionado com a composição aminoacídica das PSL e, com a ação destas proteínas sobre o sistema de defesa antioxidante ^(51, 53).

Essa capacidade antioxidante das proteínas do soro se deve, principalmente, ao fato de serem doadoras de cisteína, um aminoácido precursor da glutathione. Por sua vez, a glutathione é um peptídeo com função metabólica antioxidante, protegendo as células dos efeitos deletérios dos radicais livres e amenizando o processo de fadiga. Dessa forma, as PSL melhoram o desempenho muscular, por elevarem as concentrações de

glutathione, diminuindo, assim, a ação dos agentes oxidantes nos músculos esqueléticos ^(38,54).

HARAGUCHI *et al.* ⁽⁵⁵⁾, em pesquisa com ratos sedentários e treinados que foram alimentados com dietas controle ou com as PSL, verificaram que as mesmas inibem a oxidação de proteínas musculares induzidas pelo exercício e mantem baixos os níveis de peroxidação lipídica tanto nos animais exercitados, quanto nos sedentários. Os autores supracitados sugerem que a redução do estresse oxidativo pode estar relacionada com as propriedades antioxidantes das PSL. No entanto, ainda não se tem o conhecimento da forma como as proteínas do soro do leite reduzem o estresse oxidativo ocasionado pelo exercício.

Até o momento, se tem o conhecimento de que as proteínas do soro do leite apresentam um grupo heterogêneo de proteínas, o que lhes confere a característica de terem alto valor biológico. Além disso, tem sido sugerido que as PSL possuem, entre outras propriedades fisiológicas, atividade antioxidante, provavelmente devido sua abundância em cisteína. Dessa forma, as proteínas do soro podem ser consideradas como uma ferramenta terapêutica possível em doenças correlacionadas ao estresse oxidativo ⁽⁵⁶⁾.

Pouco tem sido descrito sobre a qualidade biológica nutricional dos produtos comerciais compostos pelas proteínas do soro do leite, apesar dos diversos estudos envolvendo produtos não comerciais. Do mesmo modo, mesmo com o conhecimento científico acerca das propriedades funcionais das PSL em diversas condições patológicas, são principalmente os atletas e praticantes de atividade física que procuram por estes suplementos. Estudar suas propriedades sob as condições metabólicas do exercício pode ajudar a elucidar os possíveis benefícios e consequências advindos do seu consumo ⁽⁵⁷⁾.

Diante do exposto e considerando que as espécies reativas de oxigênio têm sua produção aumentada durante o exercício físico e que a ingestão de PSL, favorece a recuperação e a síntese proteica muscular ⁽²¹⁾, é de crucial importância ter o conhecimento mais aprofundado das características das PSL e dos mecanismos que envolvem seus efeitos, principalmente no estresse oxidativo, uma vez que, o mecanismo como isso acontece ainda não está bem elucidado ^(46, 52).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das proteínas do soro do leite sobre os biomarcadores do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes em animais submetidos ao treinamento físico de alta intensidade.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar modificações do estado nutricional provocadas pelas proteínas do soro do leite e pelo exercício físico de alta intensidade, por meio dos parâmetros bioquímicos e biométricos;
- Avaliar a atividade dos marcadores biológicos do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes;
- Avaliar o efeito das proteínas do soro do leite sobre a expressão de enzimas antioxidantes;
- Avaliar o efeito das proteínas do soro do leite sobre o dano tecidual provocado pelo exercício físico, por meio da avaliação histopatológica;
- Avaliar o papel das PSL na resposta inflamatória através da contagem do número de células inflamatórias no tecido muscular dos animais estudados.

3. Metodologia

3.1 Capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical DPPH

A capacidade antioxidante das proteínas do soro do leite foi determinada de acordo com o método previamente descrito por Brand-Williams *et al.* ⁽⁵⁸⁾. Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) em solução de metanol.

Foram preparadas cinco concentrações de PSL (20, 40, 60, 80 e 100 mg/100mL) para análise *in vitro*. As soluções foram misturadas com um agitador magnético e deixadas em refrigerador por 24 horas, para hidratação completa. Utilizou-se Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em diferentes concentrações (200, 400, 600, 800 µM) em metanol 80%, como antioxidante de referência.

As determinações foram realizadas adicionando-se em tubos de ensaio, 3,9 mL de solução de DPPH 60 µM, dissolvidos em metanol 80 % e 100 µL das soluções de PSL que foram preparadas anteriormente. As soluções foram homogeneizadas e mantidas na ausência de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Metanol 80 % foi usado como branco. A atividade antioxidante foi determinada através da redução da absorbância do radical DPPH a 515nm e o percentual de inibição foi determinado de acordo com a equação 7.

Equação 7: % de inibição do radical DPPH = $\left(A_{Controle515} - \frac{A_{amostra515}}{A_{Controle515}} \right) \times 100$

Onde;

$A_{amostra515}$ é a absorbância da amostra obtida a 515 nm,

$A_{controle515}$ é a absorbância da solução de DPPH sem a presença de antioxidantes obtida a 515 nm (controle).

3.2 Animais

Foram utilizados no experimento 32 ratos adultos da linhagem Fisher, albinos, obtidos de acasalamento de matrizes provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental, do Departamento de Alimentos, da Escola de Nutrição, da Universidade Federal de Ouro Preto.

Após o desmame, que ocorreu três semanas após o nascimento, os animais foram separados da genitora e alimentados com ração comercial Nuvital® até que atingissem peso médio de 100 gramas. Em seguida, foram mantidos em gaiolas individuais, do tipo galvanizada, de fundo aramado, de forma a permitir a coleta de alimento não ingerido, para quantificação das mudanças na ingestão alimentar e na eficiência alimentar.

Os animais foram submetidos a condições controladas de umidade (50-65% de umidade relativa do ar) e temperatura (22-24%), em ciclo de 12 horas claro/escuro. Todos os procedimentos foram cuidadosamente realizados segundo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP), sendo o protocolo de aprovação da comissão o de número #036/2008.

3.3 Dietas e delineamento experimental

Dietas semipurificadas foram elaboradas segundo a recomendação do *American Institute of Nutrition*, modelo AIN-93M⁽⁵⁹⁾. A diferença entre as dietas está na fonte proteica utilizada. Os animais foram divididos em 4 grupos de 8 animais cada, como se segue: grupo Controle Sedentário (CS) e Controle Exercitado (CE) receberam dieta modelo AIN-93M, com a caseína como fonte proteica. Os grupos Proteínas do Soro do Leite Sedentário (WS) e Proteínas do Soro do Leite Exercitado (WE) receberam dieta modificada, com a substituição integral da caseína pelas PSL. Os animais receberam água e alimento *ad libitum* durante o período experimental. A composição das dietas que foram utilizadas no experimento encontra-se na Tabela 1. O peso corporal e o consumo de ração foram medidos semanalmente. O consumo alimentar foi corrigido para o derrame (desperdício).

Tabela 1: Composição percentual das dietas Controle Sedentário (CS), Controle Exercitado (CE), Proteína do Soro do Leite Sedentário (WS) e Proteína do Soro do Leite Exercitado (WE)

Ingredientes	Composição da Dieta (%)	
	CS/CE	WS/WE
Caseína ¹	14	-
Proteína do soro do Leite ²	-	14
Mistura Mineral*	3,5	3,5
Mistura Vitamínica*	1	1
Óleo de Soja	4	4
Colina	0,25	0,25
Celulose	5	5
Sacarose	10	10
Amido de milho	q.s.p.100	q.s.p.100

¹ Caseína comercial – ISOFAR®. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC 2000)

² PSL comercial – ISOPRO® O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC 2000)

*A mistura salina utilizada teve a seguinte composição (g/Kg de mistura): CaCO₃ 357, KH₂PO₄ 250, NaCl 74, K₂SO₄ 46,6, citrato tri-potássico 28, MgO 24, citrato de Fe 6,06, ZnCO₃ 1,65, MnCO₃ 0,63, CuCO₃ 0,3, KI 0,01, Na₂SeO₄ 0,01, (NH₄)₆MoO₂₄•4H₂O 0,00795. A mistura vitamínica teve a seguinte composição (g/Kg de mistura): niacina 3, pantotenato de cálcio 1,6, piridoxina HCl 0,7, tiamina HCl 0,6, riboflavina 0,6, ácido fólico 0,2, biotina 0,02, cianocobalamina 2,5, vitamina E (500IU/g) 15, vitamina A (500,000 IU/g) 0,8, vitamina D (400,000 IU/g) 0,25, vitamina K 0,075, sacarose q.s.p. 1 kg. (Reeves et al. 1993).

O exercício físico empregado teve por objetivo simular um modelo de treinamento de levantamento de peso para os músculos dos membros posteriores e constou em duas etapas. A primeira consistiu em um período de adaptação e teve duração de uma semana, na qual os animais dos grupos CE

e WE foram estimulados a nadar progressivamente por 15 minutos até 30 minutos em um tanque de natação com profundidade de 40 cm, sem sobrecarga.

Após o período supracitado os animais desses dois grupos, foram submetidos a um exercício físico, no qual foram estimulados a realizar séries de saltos, no tanque com água, com uma carga acoplada ao tórax suficiente para promover sua submersão. Ao tocar o fundo do tanque, o animal gerava impulso para emergir e respirar. A profundidade da água no tanque e a carga acoplada ao corpo do animal promoveram a resistência ao esforço. Os animais foram submetidos a quatro séries de 10 saltos por dia, cinco vezes por semana, durante 8 semanas. Cada conjunto de saltos foi interrompido por um intervalo de 1 minuto de descanso.

O tanque continha água a uma profundidade correspondente a 150% do tamanho de animal e a carga acoplada ao tórax proporcional ao peso do mesmo, que aumentou gradualmente conforme as semanas de treinamento, de acordo com a seguinte evolução: 25% na primeira semana, 30% na segunda, 35% na terceira, 40% na quarta, 50% na sexta e 55% nas sétima e oitava semanas. Os animais dos grupos sedentários foram mantidos durante o período de treinamento em tanque com água rasa, cinco centímetros de profundidade, com o intuito de submeter esses animais ao mesmo estresse provocado pelo ambiente aquático.

3.4 Eutanásia, coleta de sangue e de tecidos

Ao final da 8ª semana, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, em seguida foram anestesiados na câmara de sacrifício usando isoflurano, e posteriormente foi realizada a ensanguinação. O sangue foi, então, centrifugado a 10.000 rpm, a 4 °C por 15 minutos, para obtenção do soro e plasma, que foi armazenado em tubos de polipropileno, fora do abrigo da luz, a 4°C, para análises posteriores. Em seguida, o músculo gastrocnêmio foi retirado cirurgicamente, rapidamente pesado, fragmentado em ambiente de gelo e guardado em tubos criogênicos a -80 °C para posterior análise.

3.5 Dosagens bioquímicas

Todas as dosagens bioquímicas de glicose sérica, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), albumina sérica, creatinina, ureia e a atividade da enzima aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), foram realizadas utilizando-se kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG – Brasil, site: <http://www.labtest.com.br>).

Para a determinação da concentração do colesterol não-HDL foi feita a subtração da concentração do colesterol total pela concentração do colesterol HDL. Os resultados obtidos foram expressos em mmol/L.

3.6 Defesas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo em tecido muscular

3.6.1 Proteína carbonilada

Os níveis de proteínas carboniladas foram determinados de acordo com o método de Levine *et al.* ⁽⁶⁰⁾. A oxidação de proteína por espécies reativas de oxigênio leva à formação de derivados carbonilados. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente.

Dessa forma, 400 mg de tecido muscular foram homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida centrifugado a 10000 g por 15 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no procedimento experimental. Quinhentos microlitros do sobrenadante do homogenato foram transferidos para dois tubos de polipropileno denominados, amostra (A) e controle (C), a cada tubo, foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e após centrifugação, a 5000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados ao tubo A 500 µL de DNPH 10 mM, em 2 M de ácido clorídrico (HCl), e ao tubo C 500 µL de HCL 2M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos e a cada 15 minutos, misturava-se vigorosamente.

Em seguida, foram adicionados 500 µL de TCA 10% em cada tubo. Logo após, os tubos foram centrifugados a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C e os

sobrenadantes foram descartados. Posteriormente, os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, na proporção de 1:1, misturados no vórtex e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior, o sobrenadante foi descartado. Esta última etapa foi repetida por duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foi adicionado em ambos os tubos 1 mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10.000 g por 10 minutos à 4 °C. Finalmente as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína.

O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo a lei de Lambert Beer.

3.6.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando o método de Buege; Aust (1978)⁶¹. A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados. Cem miligramas do tecido muscular foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCL 20 mM (pH 7,4) e em seguida centrifugado por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Quinhentos microlitros do sobrenadante do homogenato foram misturados com ácido tricloroacético (28% p/v em HCl 0,25N), TBA (1% em ácido acético 0,25M) e butil-hidroxi-tolueno (125mM em etanol), aquecido por 15 min a 95 °C e em seguida colocado em um banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4 °C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Os níveis de TBARS foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA ($154000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo a lei de Lambert Beer.

3.6.3 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.* ⁽⁶²⁾. O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteau, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

Reagente A: Foram dissolvidos 0,25 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 0,5 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Reagente B: Foram dissolvidos 5 g de carbonato de sódio e 1 g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada.

Reagente C: Em 50 mL de reagente B foram adicionados 1 mL de reagente A.

Reagente D: Em 1 mL de reagente de Folin foram adicionados 1 mL água destilada.

Para a realização do ensaio, 10 μL do sobrenadante do homogenato de tecido muscular, foram diluídos em 90 μL de água destilada. Em tubos de polipropileno foram adicionados 100 μL da amostra diluída ou soluções padrão de albumina e água destilada (branco). Em seguida foram adicionados 1 mL do reagente C. Os tubos foram agitados no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos.

Posteriormente foram adicionados 100 μL do reagente D em todos os tubos, misturou-se vigorosamente e após 30 minutos de incubação no escuro as absorbâncias das amostras relativas ao branco foram determinadas a 660nm. Diluições seriadas de uma solução de concentração conhecida de albumina bovina sérica foram utilizadas para a construção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta, esta foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato muscular.

3.6.4 Catalase

A atividade da catalase foi determinada de acordo com Aebi ⁽⁶³⁾. O método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima observada durante 5 minutos por espectrofotometria a 240 nm.

Assim, 50 mg de tecido muscular foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50 µL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 µL de água destilada, mantendo a solução em banho maria 30 °C por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 10 µL da amostra e a reação foi iniciada pela adição de 900 µL de H₂O₂ (10 mM). As absorbâncias foram determinadas exatamente a cada minuto, durante três minutos a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer, pela seguinte equação:

$$A = \epsilon bc$$

Onde;

A é a absorbância,

ε é o coeficiente de extinção molar em unidades de Mol⁻¹ cm⁻¹

b é caminho óptico,

c é a concentração da enzima expressa em mol L⁻¹

A absorbância utilizada corresponde ao delta de absorbância por minuto. Utilizou-se o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio (39,4 M⁻¹cm⁻¹). Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é equivalente à hidrólise de 1umol de H₂O₂ por minuto.

3.6.5 Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada por meio de um método que se baseia na habilidade dessa enzima em limpar o O₂⁻, diminuindo assim a razão de auto oxidação do pirogalol (1,2,3-benzenotriol).

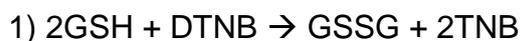
Tecido muscular (50 mg) foi homogeneizado em 0,5 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. Em uma microplaca foram adicionados 30 µL da amostra, em seguida adicionou-se 99 µL de tampão fosfato, 6 µL de MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium) a 1,25 mM) e 15 µL de pirogalol (100µM). As amostras foram, então, incubadas por 5 minutos em estufa à 37 °C. Logo após, 150 µL de DMSO foram adicionados às mesmas para parar a

reação. As absorbâncias das amostras foram lidas no leitor de ELISA em um comprimento de onda de 570 nm.

Considerando que uma unidade de SOD (U) é responsável pela oxidação de 50% do pirogalo, e que a absorbância padrão corresponde a uma unidade de SOD, converteu-se a absorbância da amostra obtida em unidades de SOD. Em seguida, esse resultado foi dividido pelo valor de proteínas totais do homogenato encontrado. Assim, os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.6.6 Glutathiona total

O conteúdo de glutathiona total foi determinado em homogenato de músculo utilizando um Kit Sigma CS0260 (St. Louis, Mo., USA). Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)) a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412 nm conforme descrito nas reações abaixo:



A combinação das duas reações:



Para o procedimento experimental, 50,0 mg do tecido muscular foram homogeneizados com 0,5mL de ácido de sulfosalicílico 5%, e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Em uma microplaca foram adicionados 10 µL da amostra, em seguida adicionou-se 150 µL da mistura de trabalho composta por 95 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 µM de NADPH, 0.031 mg/mL de DTNB, 0,115 unidades/ml de glutathiona redutase, e 0,24% de ácido de sulfosalicílico. As amostras foram, então, incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL de NADPH 0,16 mg/mL foram adicionados às mesmas e o

cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutathiona reduzida foram determinadas conforme descrito anteriormente, para obtenção da curva de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta (Concentração = $a \cdot (\Delta \text{absorbâncias}) + b$). Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutathiona total em 10 μL de amostra, e este valor extrapolado para 1 mL de amostra.

3.7 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real

3.7.1 Extração do RNA total

O RNA total do tecido muscular dos animais foi isolado utilizando o sistema RNAagents Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 50mg dos tecidos foram homogeneizados com 600 μL de solução desnaturante. A separação da fase aquosa foi feita através da adição de 60 μL de acetato de sódio 2M e 600 μL de fenol: clorofórmio, álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação a 10000 g por 20 minutos a 4 °C. Para a precipitação do RNA foi adicionada à fase aquosa igual volume de isopropanol, a mistura foi então incubada a -20 °C por 20 minutos e depois centrifugada a 10000 g a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 75%, seco a temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente ressuspendido com 100 μL de água deionizada livre de RNase. A concentração e pureza do RNA total foram verificadas a 260 e 280 nm no espectrofotômetro Nano Vue da GE Health care (Reino Unido).

3.7.2 Síntese do cDNA

O ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA total utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription da Applied Biosystems, (Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação conterá 2 μL de tampão 10x (500mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, 25 mM de MgCl_2 , pH 8,3), 0,8 μL da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 100 mM, 2 μL de primers randômicos

e 1 µL da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/µL). A reação foi realizada nas seguintes condições, 10 minutos a 25 °C, seguido de 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C no termociclador Biocycler modelo MJ96+.

3.7.3 Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de nucleotídeos publicadas por Xiong *et al.* ⁽⁶⁴⁾ para Catalase, Glutathione Peroxidase, γ GCS e Zn-SOD.

3.7.4 RT-PCR quantitativa em tempo real

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, com um volume final de reação de 12 µL, foram pipetados 1 µL de cDNA (100ng), 0,5 µL de cada primer (forward e reverse, 10 µM), 6 µL de SYBR® Green Master Mix, o volume final foi ajustado com água livre de DNase. As reações foram realizadas nas seguintes condições, 50 °C por 2min, 95 °C por 10 min e então 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min (anelamento dos primers e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7300 (Applied Biosystems). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa *7000 System SDS Software* (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (CT comparativo ou $\Delta\Delta$ CT), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene controle endógeno GAPDH e uma amostra calibradora (grupo CS) foi utilizada como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de CT (threshold cycle), que corresponde

ao número de ciclos na fase exponencial do PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o ΔCT de cada amostra, de acordo com a equação 8, na qual o valor do CT do gene controle endógeno (GAPDH) foi subtraído do CT do gene alvo.

Equação 8: $\Delta C_T = C_T \text{ do gene alvo} - C_T \text{ do gene controle endógeno}$

Em seguida foram calculados os valores de $\Delta\Delta CT$, de acordo com a equação 9, na qual o valor do ΔCT da amostra calibradora (grupo C) foi subtraído do ΔCT das amostras teste (demais grupos experimentais).

Equação 9: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ da amostra teste} - \Delta C_T \text{ da amostra calibradora}$

Os valores do $\Delta\Delta CT$ obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por $2^{\Delta\Delta CT}$.

3.7.5 Curva de eficiência dos primers

Para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene controle endógeno foram construídas curvas padrões para cada amplicon, a partir de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. A análise de regressão linear dos valores de CTs em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a , em $y = ax+b$) que foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers, utilizando a equação 10.

Equação 10: $Ef = (10^{-1/\text{coeficiente angular}} - 1) \times 100$

3.8 Análises histológicas

O músculo gastrocnêmico dos animais foi removido no fim de cada experimento e fixado em formol tamponado a 4%. O órgão fixado foi cortado transversalmente e processado em série decrescente de alcoóis e posteriormente embebido em parafina. Secções parafinadas de

aproximadamente quatro micrometros foram obtidas em micrótomo semi-automático, montadas e coradas pela técnica Hematoxilina & Eosina (H&E).

As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera digital. As análises foram realizadas com auxílio do Software Leica QWin Plus Versão 3.0, sendo avaliadas a celularidade total dos tecidos, a presença ou ausência de necrose e inflamação, infiltração conjuntiva e/ou hipertrofia celular e morfometria.

3.9 Análises estatísticas

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Os dados que apresentaram distribuição normal foram testados pela análise de variância (two-way ANOVA), com pós teste de Tukey para determinar as diferenças específicas entre as médias, quando o valor de F for significativo. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. A diferença de $p < 0,05$ foi considerada significativa ⁽⁶⁵⁾. Para análise dos dados foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.00 para Windows (San Diego, California, USA).

4. Resultados

4.1 Capacidade Antioxidante *in vitro* contra o Radical DPPH

A capacidade de uma dada amostra em reduzir a absorvância do radical DPPH é indicativa de que a mesma consegue neutralizar os radicais livres. A habilidade de cinco concentrações diferentes das proteínas do soro do leite de neutralizar esse radical foi testada e nenhuma delas mostrou essa capacidade (Tabela 2). Sendo diferente do antioxidante padrão o Trolox, as PSL não possuem potencial antioxidante.

Tabela 2: Atividade sequestradora de radical DPPH das proteínas do soro do leite.

Atividade sequestradora do radical DPPH	% Inibição
Proteínas do Soro do Leite (mg/mL)	
0,2	-
0,4	-
0,6	-
0,8	-
1,0	-
Trolox (mg/L)	
50	28,3
75	40,3
100	47,1
125	58,5
150	68,1
175	85,3
200	94,0

4.2 Caracterização bioquímica e biométrica dos grupos controle sedentário (CS), controle exercitado (CE), proteínas do soro do leite sedentário (WS) e proteínas do soro do leite exercitado (WE)

A ingestão alimentar apresentou efeito da atividade física empregada ($p= 0,004$), assim os grupos exercitados foram os que tiveram menor ingestão alimentar em comparação aos grupos sedentários. Já no ganho de peso houve uma interação entre a dieta e a atividade física ($p= 0,025$), que resultou em um menor ganho de peso no grupo CE em comparação aos demais. É interessante destacar que a dieta com as proteínas do soro do leite (grupo WE) foi capaz de prevenir essa perda de peso ocasionada pelo treinamento.

No que se refere à eficiência alimentar, observou-se que a mesma sofreu influência da dieta ($p < 0,001$) e da atividade física ($p < 0,001$), mas não ocorreu interação desses dois fatores. Ou seja, os dois grupos que exercitados tiveram menor eficiência alimentar em comparação aos dois grupos sedentários e os grupos que receberam as PSL tiveram maior eficiência alimentar em comparação aos grupos que receberam caseína (Tabela 3).

Tabela 3: Dados de peso corporal inicial, ingestão alimentar, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos estudados*.

Variáveis	Grupos experimentais				ANOVA Two-way (p)		
	CS	CE	WS	WE	D	E	D x E
Peso Corporal Inicial (g)	114 ± 16	113 ± 9	114 ± 8	113 ± 9	0,957	0,933	0,975
Ingestão Alimentar (g/dia)	13,8 ± 1,19	11,9 ± 1,26	13,8 ± 1,07	13,1 ± 0,97	0,082	0,004	0,257
Ganho de Peso (g/dia)	3,47 ± 0,24 ^a	2,75 ± 0,17 ^b	3,81 ± 0,36 ^a	3,57 ± 0,4 ^a	<0,001	<0,001	0,025
Eficiência Alimentar **	25,3 ± 1,8	24,3 ± 1,0	28,4 ± 1,9	25,7 ± 1,9	<0,001	0,011	0,542

*Anova, análise de variância; CS, grupo controle sedentário; CE, grupo controle exercitado; WS, grupo proteína do soro do leite sedentário; WE, grupo proteína do soro do leite exercitado. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão. N de 6 a 8 animais por grupo. D e E corresponde à dieta e exercício, respectivamente. D x E é a interação entre os parâmetros correspondentes. Dentro de uma linha, os valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobscritas diferentes, quando uma interação significativa foi observada ($p < 0,05$).

**Eficiência Alimentar = (ganho de peso/ingestão alimentar)x100.

Com relação aos parâmetros bioquímicos (Tabela 4), verificou-se que a glicose sanguínea foi menor nos animais exercitados, sendo que os grupos que receberam PSL apresentaram as maiores concentrações de glicose e albumina séricas. A atividade das enzimas AST e ALA e a concentração de creatinina e de ureia foi igual entre todos os grupos estudados, sugerindo que não ocorreu insuficiência hepática e/ou renal.

Foi encontrado, também, que o exercício, assim como o tratamento com PSL, reduziu de forma significativa o colesterol total e as frações não-HDL. No entanto, somente o tratamento com PSL aumentou significativamente as concentrações de HDL sérico.

Diante do exposto, constatou-se que o exercício, juntamente com a ingestão de PSL, melhorou o perfil lipídico dos animais, reduzindo a concentração plasmática de colesterol total, assim como das frações não-HDL. Além disso, a combinação de exercício físico com a ingestão de PSL foi mais eficiente, em comparação com o exercício isolado, por melhorar a razão HDL/não-HDL e favorecer o ganho de peso.

Tabela 4: Valores de colesterol total sérico (CT), HDL colesterol (HDL), colesterol não HDL (não HDL), glicose, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina e concentrações de uréia dos grupos estudados*.

Variáveis	Grupos Experimentais				Anova Two-way (p)		
	CS	CE	WS	WE	D	E	D x E
CT (mg/dL)	86,5 ± 8,4	72,4 ± 9,7	78,6 ± 5,5	63,1 ± 3,1	0,004	<0,001	0,818
HDL (mg/dL)	55,8 ± 14,1	45,1 ± 2,6	63,0 ± 3,4	57,3 ± 3,1	<0,001	0,002	0,310
Não HDL (mg/dL)	33,8 ± 4,2	26,9 ± 8,6	15,6 ± 5,9	8,0 ± 4,1	<0,001	0,025	0,439
Glicose (nmol/dL)	9,0 ± 2,4	7,7 ± 1,1	10,7 ± 2,4	9,3 ± 1,3	0,019	0,049	0,949
Albumina (g/L)	25,3 ± 0,7	25,0 ± 0,8	27,5 ± 1,2	26,9 ± 0,9	<0,001	0,190	0,593
AST (U/mL)	87,2 ± 12,7	91,9 ± 18,5	75,8 ± 11,9	87,3 ± 17,3	0,154	0,134	0,521
ALT (U/mL)	45,2 ± 8,9	37,1 ± 5,5	37,6 ± 8,6	37,0 ± 4,9	0,145	0,074	0,120
Creatinina (µmol/L)	61 ± 2,4	63 ± 4,8	62 ± 1,9	60 ± 3,0	0,179	0,636	0,097
Uréia (mg/dL)	27,6 ± 3,2	26,8 ± 1,9	27 ± 1,9	26,9 ± 2,5	0,848	0,578	0,678

*Anova, análise de variância; CS, grupo controle sedentário; CE, grupo controle exercitado; WS, grupo proteína do soro do leite sedentário; WE, grupo proteína do soro do leite exercitado. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão. N de 6 a 8 animais por grupo. D e E corresponde à dieta e exercício, respectivamente. D x E é a interação entre os parâmetros correspondentes.

4.3 Biomarcadores do estresse oxidativo

As concentrações de proteínas carboniladas (PC) no músculo (Figura 1) apresentaram interação entre a dieta e o treinamento empregado, que resultou em uma maior concentração de PC no grupo CE e menor concentração nos grupos WE e CS. Esses resultados demonstram a habilidade das PSL em prevenir o aumento na concentração muscular de PC induzida pelo exercício.

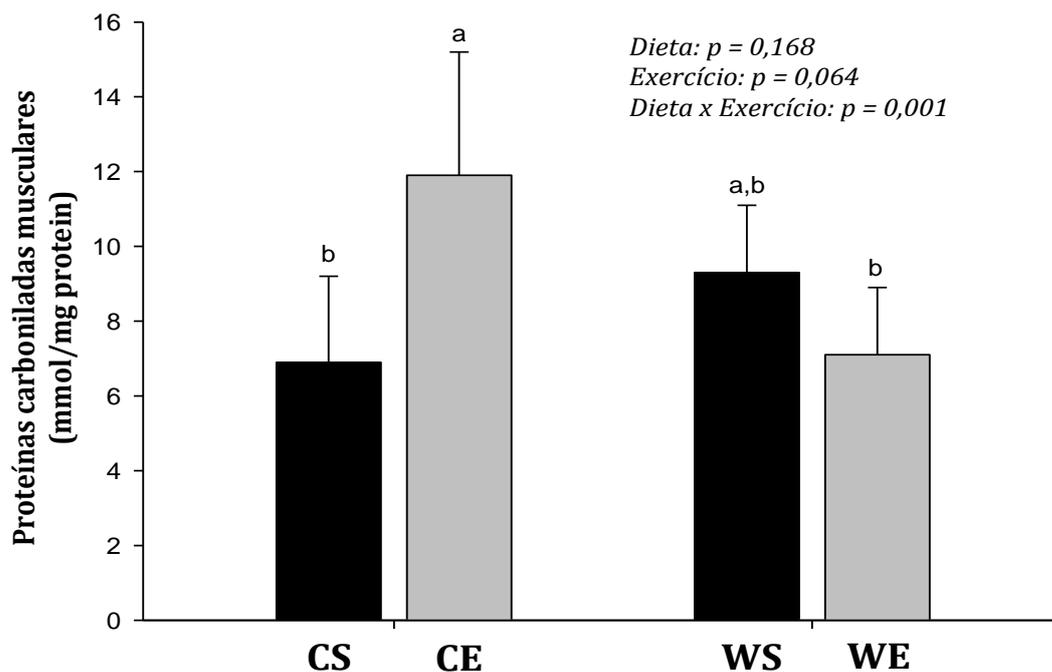


Figura 1 – Concentração muscular de proteínas carboniladas de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Os resultados estão expressos como média \pm DP; n = 6–8 por grupo. Valores estatisticamente diferentes estão marcados com letras diferentes apenas quando uma interação significativa foi observada.

Já aos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no músculo (Figura 2), tiveram efeito apenas da dieta, ou seja, os dois grupos que receberam as PSL (WS e WE) mostraram menor nível de TBARS com relação os grupos que receberam caseína (CS e CE).

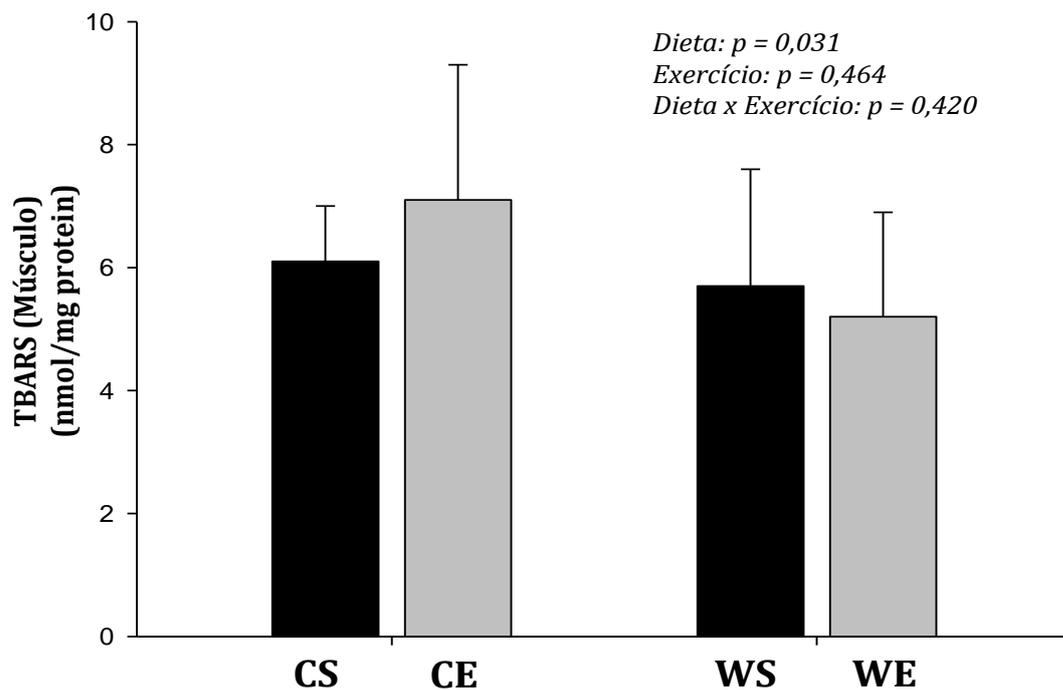


Figura 2 - Concentração muscular de TBARS de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Os resultados estão expressos como média \pm DP; n = 6–8 por grupo.

4.4 Atividade das enzimas de defesa antioxidante

A atividade da catalase (CAT) foi menor nos grupos que receberam as PSL ($p=0,023$) em comparação aos que receberam caseína (Figura 3). Ao mesmo tempo, observou-se que a atividade desta enzima também foi menor nos grupos que receberam treinamento físico ($p= 0,015$) em relação aos grupos sedentários. No entanto, não houve interação desses dois fatores ($p=0,935$).

Resultado semelhante foi observado na atividade da superóxido dismutase (SOD), onde também os dois grupos que receberam as PSL tiveram menores níveis de atividade desta enzima, em comparação aos grupos que receberam caseína. E os grupos que receberam atividade física tiveram menores níveis de SOD em relação aos grupos sedentários. Da mesma forma que na atividade da CAT, não houve interação desses dois fatores ($p=0,500$).

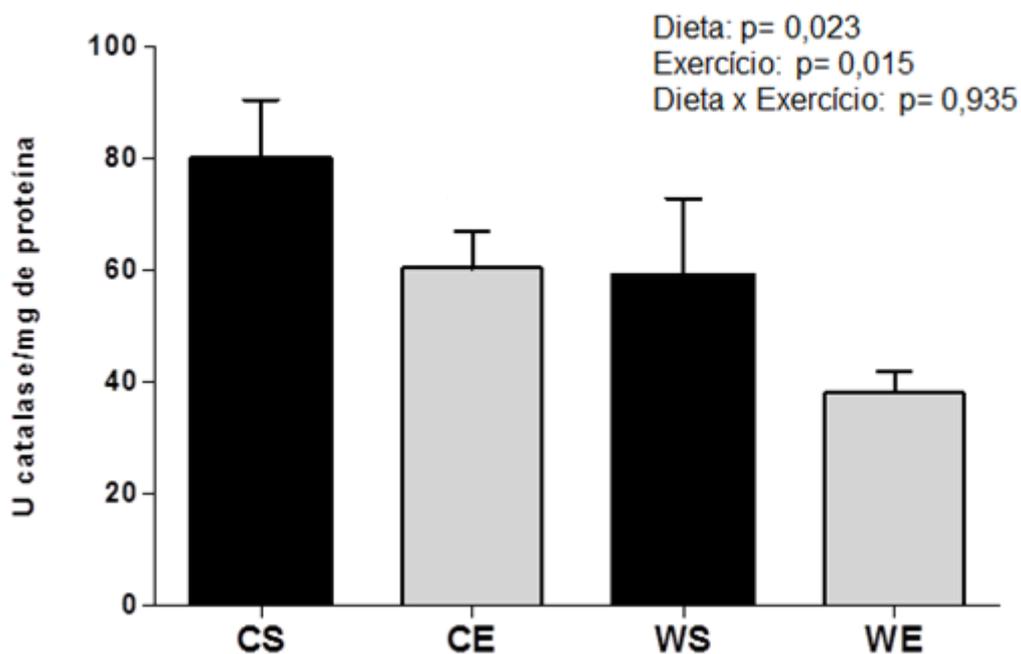


Figura 3 – Atividade da enzima catalase em tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Os resultados estão expressos como média \pm DP; n = 6–8 por grupo.

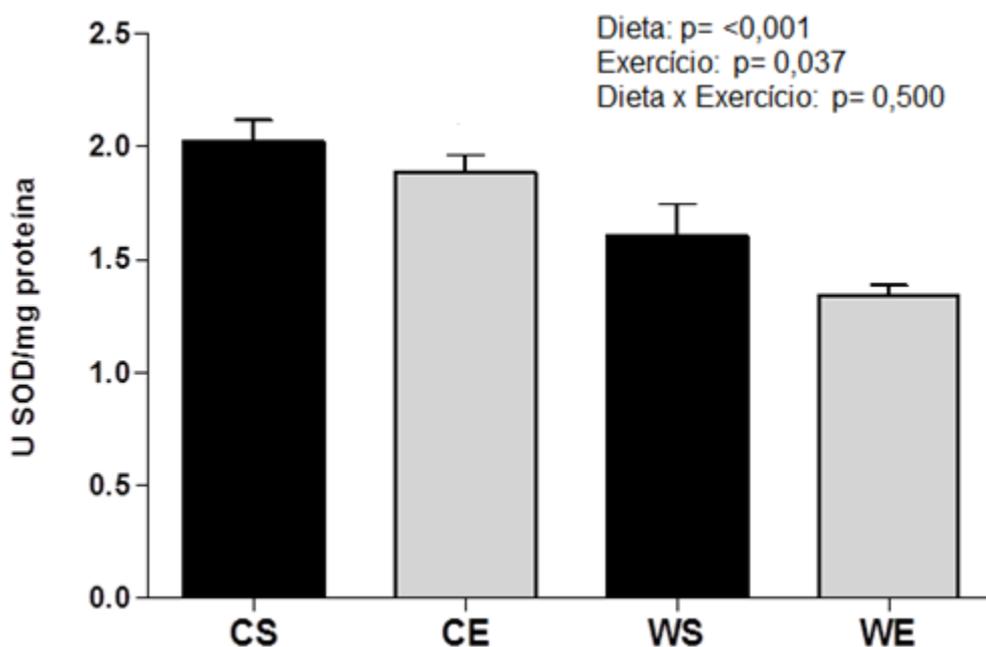


Figura 4 – Atividade da enzima superóxido dismutase em tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Os resultados estão expressos como média \pm DP; n = 6–8 por grupo.

Já a glutatona total (Figura 5), ao contrário das enzimas supracitadas, teve sua concentração aumentada significativamente nos grupos que receberam as PSL (WS e WE) em comparação aos que receberam caseína (CS e CE). Dessa forma, somente as proteínas do soro tiveram influência no aumento da concentração da glutatona ($p=0,036$), não havendo interação das duas variáveis juntas ($p=0,106$).

Diante do exposto, supõe-se que as PSL podem ter induzido mudanças adaptativas nas defesas antioxidantes, a fim de compensar a maior geração de radicais livres durante o exercício. Tal fato pode ser reforçado pelo aumento da concentração da glutatona total nos grupos que receberam proteínas do soro do leite. Assim, o aumento de glutatona pode ter gerado uma redução das espécies reativas, que por sua vez diminuiu a indução da atividade da catalase e da superóxido dismutase.

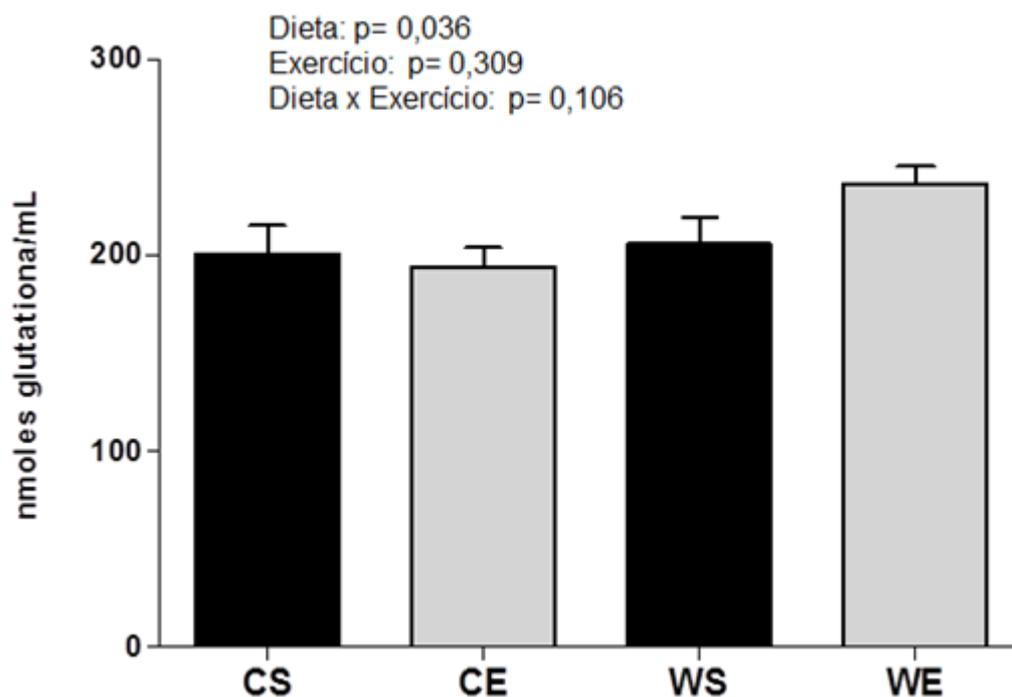


Figura 5 – Concentração de glutatona total no tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Os resultados estão expressos como média \pm DP; $n = 6-8$ por grupo.

4.4 Ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real

Resultado semelhante ao da atividade da CAT foi encontrado no ensaio de RT-PCR quantitativa em tempo real (Figura 6), no qual houve interação da

dieta com o treinamento ($p=0,028$), resultando em menor razão de expressão dessa enzima nos grupos que receberam esses dois tratamentos, sendo maior apenas no grupo CS.

Já razão de expressão da SOD citosólica (Figura 7), teve influência apenas da atividade física, sendo menor nos grupos que receberam o treinamento em comparação aos grupos sedentários. Não havendo, assim, interação do treinamento físico com a dieta ($p=0,595$). O que corrobora com os resultados de atividade dessa enzima.

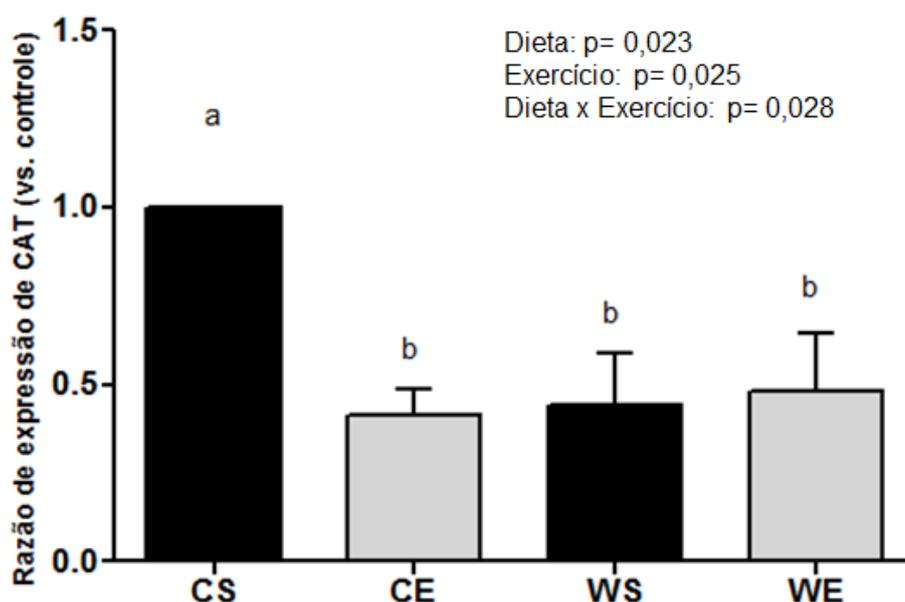


Figura 6 – Razão de expressão da Catalase no tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Valores estatisticamente diferentes estão marcados com letras diferentes apenas quando uma interação significativa foi observada.

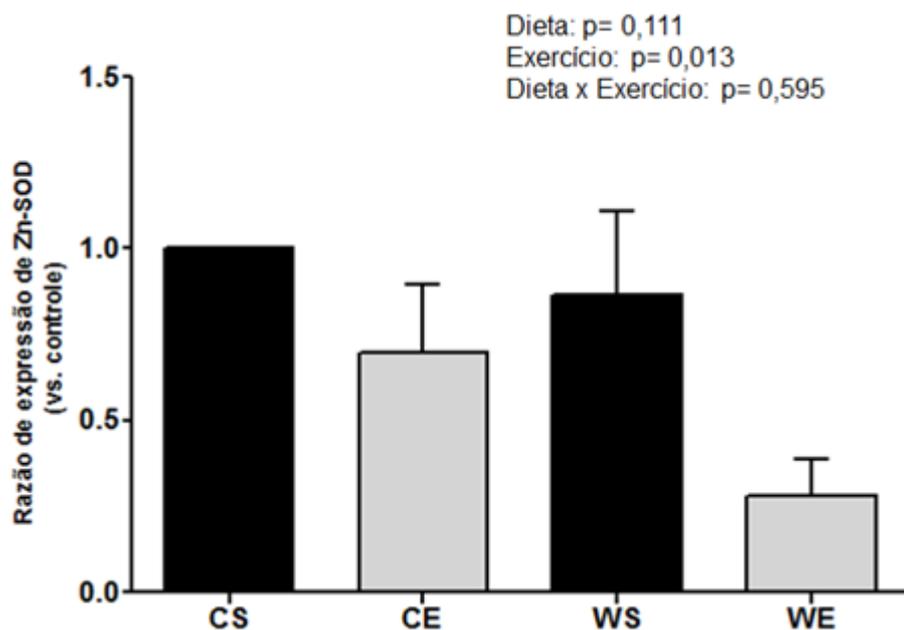


Figura 7 – Razão de expressão de Superóxido dismutase citosólica no tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE).

O aumento da concentração total de glutathiona foi confirmado pela razão de expressão das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e γ - glutamilcisteína sintetase (γ GCS). Na qual a expressão de GPx (Figura 8) teve influencia da dieta ($p= 0,019$). Dessa forma, os grupos que receberam as PSL apresentaram maior expressão dessa enzima em relação aos grupos que receberam a caseína. E na razão de expressão de γ GCS (Figura 9), houve a interação entre a dieta e a atividade física empregada, resultando em maior expressão dessa enzima no grupo WE e menor expressão no grupo CE.

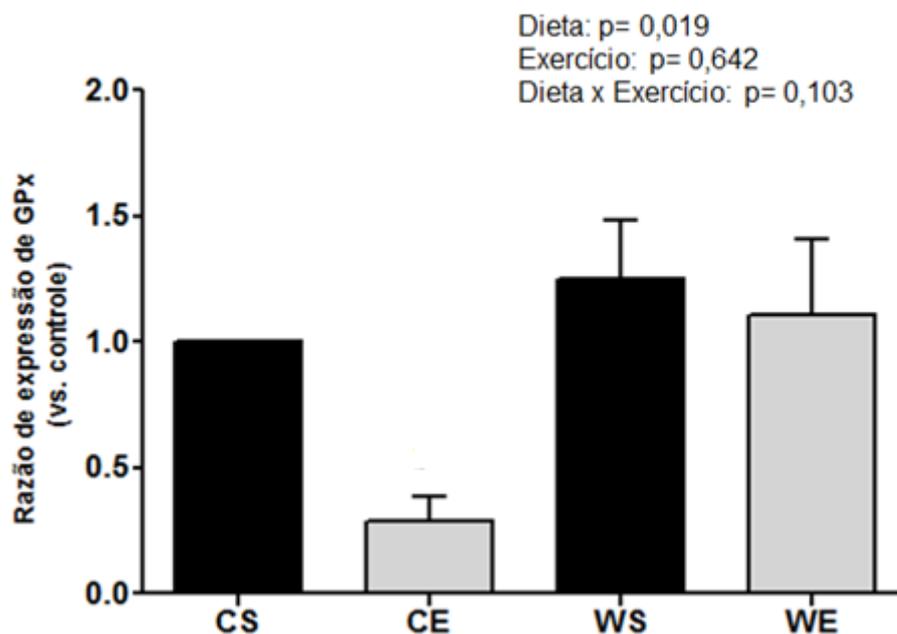


Figura 8 – Razão de expressão da Glutaciona peroxidase no tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE).

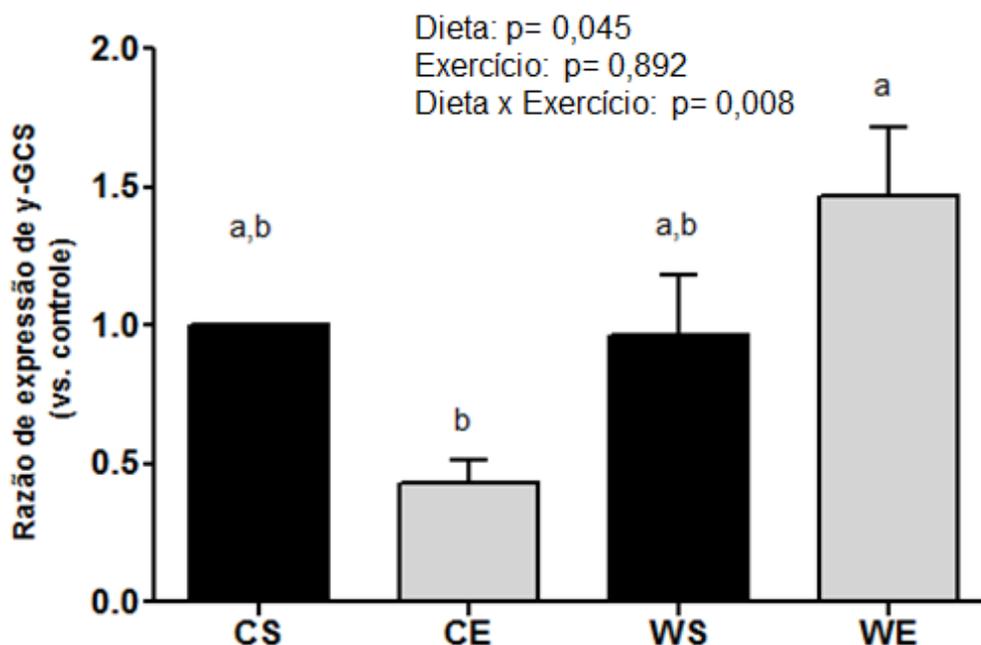


Figura 9 – Razão de expressão da γ - glutamilcisteína sintetase no tecido muscular de ratos sedentários (barras pretas) ou exercitados (barras cinza) alimentados com dieta controle (CS e CE) ou PSL (WS e WE). Valores estatisticamente diferentes estão marcados com letras diferentes apenas quando uma interação significativa foi observada.

4.5 Análises histológicas

Por meio da avaliação histopatológica verificou-se que o exercício físico de alta intensidade não gerou nenhum dano ao tecido muscular. A única variação observada foi o aumento do número de células inflamatórias no tecido muscular dos animais que receberam apenas o treinamento (Figura 10b), em comparação aos grupos sedentários. Sendo que o grupo que recebeu tanto o treinamento físico quanto as proteínas do soro do leite, não apresentou este aumento no número de células inflamatórias. Dessa forma, presume-se que as PSL foram capazes de reduzir a inflamação muscular ocasionado pela atividade física de alta intensidade (Figura 10).

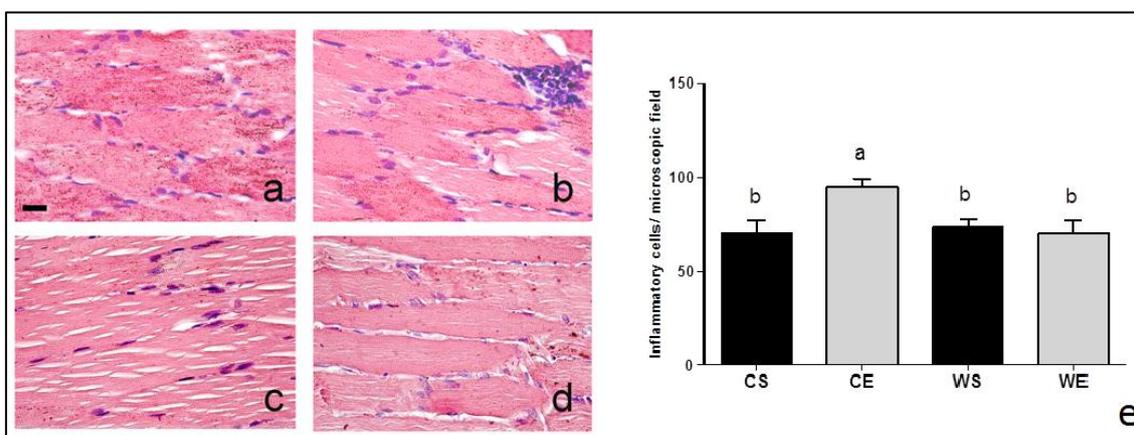


Figure 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos de músculo. (a) grupo controle sedentário (CS) apresentou aspecto histológico normal, com poucas células inflamatórias. (b) O grupo controle exercitado (CE) mostrou aspecto histológico normal com aumento do número de células inflamatórias (infiltrado inflamatório). (c) grupo sedentário que recebeu dieta com proteínas de soro de leite (WS) mostrou aspecto histológico normal com um pequeno número de células inflamatórias. (d) grupo exercitado que recebeu dieta com proteínas de soro de leite (WE) revelou uma aparência normal histológica com um pequeno número de células inflamatórias. Hematoxilina & eosina. Bar = 50 uM. E Figura - Número de células inflamatórias no tecido muscular de ratos do grupo controle sedentário (CS), o número de células inflamatórias no tecido muscular de ratos do grupo controle exercitado (CE), número de células inflamatórias no tecido muscular de ratos do grupo sedentário que recebeu proteínas do soro do leite (WS), número de células inflamatórias no tecido muscular de ratos do grupo exercitado que recebeu proteínas do soro do leite (WE). Os valores são média \pm desvio padrão (n = 8). Os dados foram analisados por análise de variância. As diferenças estatísticas são apresentadas por letras sobrescritas.

5. Discussão

As proteínas do soro do leite (PSL) contêm altas concentrações de aminoácidos de cadeia ramificada, que são metabolizadas diretamente no músculo esquelético promovendo a maior síntese e inibição da degradação de proteínas nesse órgão ⁽⁶⁶⁾. Além disso, as PSL são facilmente digeridas e absorvidas, o que resulta em um rápido aumento da concentração de aminoácidos no sangue. Dessa forma, é crescente o uso da suplementação de PSL por atletas para promover e manter o crescimento e a força muscular ⁽⁶⁷⁾. A ingestão dessas proteínas também proporciona maior captação de glicose no músculo esquelético, quando comparada com a caseína ⁽⁴⁷⁾.

No presente estudo, o tratamento com as PSL resultou em maiores concentrações da glicose de jejum. Os aminoácidos de cadeia ramificada, além de auxiliar na síntese de proteínas, também podem ser utilizados como fonte de energia no tecido muscular ⁽⁶⁸⁾. A remoção do nitrogênio desses aminoácidos no músculo estimula a síntese de alanina e glutamina, que são importantes no equilíbrio da glicemia, em uma via conhecida como o ciclo da alanina-glicose. O ciclo alanina-glicose é um caminho importante para reposição de glicose durante o exercício prolongado e após o jejum ⁽⁶⁹⁾. Assim, esses achados indicam que as PSL representam uma fonte de substrato para eficaz homeostase da glicemia em jejuns prolongados e/ou durante a noite, tal como indicado pelas elevadas concentrações de glicose no soro.

Tanto o exercício quanto a ingestão das PSL foram capazes de reduzir significativamente o colesterol total (CT) no soro e o colesterol não HDL. No entanto, apenas o tratamento com as PSL foi capaz de aumentar significativamente a concentração de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) independentemente da atividade física. Embora alguns autores tenham relatado que o exercício de alta intensidade pode aumentar a concentração de HDL ⁽⁷⁰⁾, o resultado deste trabalho, foi de uma melhoria do estado do CT e das frações não HDL, sugerindo que esse tipo de atividade física pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

Na literatura existem relatos de que a ingestão de PSL pode melhorar o perfil lipídico, em certos modelos animais ^(71, 72). Além disso, estudos têm mostrado um efeito dependente entre a idade do animal e a adição das PSL na

dieta, sobre o metabolismo lipídico ^(73, 74). Estes autores descrevem que as PSL podem causar uma redução no CT em ratos adultos (8-9 meses de idade), mas não em animais jovens (3-4 semanas de idade).

Em se tratando do ganho de peso verificamos que os animais do grupo controle exercitado (CE) apresentaram menor ganho de peso corporal comparados com os demais grupos, o mesmo foi observado em outros estudos que avaliaram atividade física de alta intensidade em animais ^(47, 75). De alguma forma, as PSL amenizaram os efeitos promovidos pelo exercício de alta intensidade, de perda de peso, resultando em ganho de peso corporal semelhante ao encontrado nos grupos controle sedentário (CS) e proteínas do soro do leite sedentário (WS). Esse achado pode ser parcialmente explicado pelas diferenças entre a caseína e as PSL de composição aminoacídica e de digestão e absorção ^(44, 55, 67).

Nesse sentido, o fato das PSL serem ricas em leucina, pode estar corroborando com os nossos resultados. Esse aminoácido de cadeia ramificada vem recebendo maior destaque por ser secretagogo da insulina e por ser muito eficaz em estimular a síntese proteica, reduzir a proteólise e, portanto, favorecer o balanço nitrogenado positivo. Esses efeitos acontecem, pois a leucina é capaz ativar as proteínas alvo da rampamicina em mamíferos (mTOR), a qual ativa uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que culmina na fosforilação de proteínas envolvidas na etapa de tradução proteica ^(76, 77).

Norton et al. ⁽⁷⁸⁾ avaliaram o efeito das proteínas do soro do leite em estimular a síntese proteica. Para isso foram utilizados ratos machos que receberam, durante cinco dias, três refeições contendo 20% de PSL, 50% de carboidrato e 30% de gordura. Esses autores verificaram que as PSL ricas em leucina estimularam a síntese proteica pós-prandial e isso se deve ao papel chave desse aminoácido em estimular as proteínas envolvidas no mecanismo de anabolismo muscular.

É bem esclarecido que a atividade física de alta intensidade pode acelerar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), excedendo a capacidade do sistema de defesa antioxidante e, conseqüentemente, resultando em estresse oxidativo. Além disso, o aumento significativo de ERO

pode causar disfunção contrátil, ocasionando fraqueza e fadiga muscular ^(13, 26, 79).

Em nossa pesquisa, constatamos que as PSL foram capazes de impedir a oxidação das proteínas musculares induzida pelo treino de alta intensidade através da redução dos níveis de proteína carbonilada (PC). E também, mantiveram mais baixos os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em comparação com a caseína. Sugerindo as PSL foram capazes de reduzir o estresse oxidativo.

Elia *et al.* ⁽³⁸⁾, em estudo com o objetivo de investigar o efeito da suplementação das PSL e da soja em parâmetros redox no músculo esquelético de animais submetidos a treinos de natação, observaram que essas suplementações apresentaram efeito antioxidante no músculo. Esses autores também encontraram que as PSL reduziram os níveis de TBARS e a concentração de radicais livres nos animais que receberam treinamento.

Considerando o exposto acima, questionamos se as PSL possuem efeito antioxidante. Para isso realizamos a análise de DPPH. Nessa dosagem, a habilidade da amostra em reduzir a absorvância do DPPH é indicativa de sua capacidade de neutralizar radicais livres. Este é um dos métodos químicos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de um composto por ser considerado prático, rápido e estável ⁽⁸⁰⁾. Dessa forma, foi possível constatar que as PSL não possuem esse efeito sobre o estresse oxidativo, uma vez que não ocorreu diminuição da absorvância em nenhuma das cinco concentrações avaliadas.

Diferentemente, Gad *et al.* ⁽⁸¹⁾ ao fazerem a análise de DPPH em um concentrado de proteína do soro do leite, contendo 80% de proteína adquirida pela *Davisco Foods International* (Eden Prairie, MN, EUA), observaram que as PSL foram capazes de reagirem com o radical DPPH, sugerindo que as mesmas possuem capacidade de doar elétrons. Uma vez que, a metodologia da dosagem utilizada no presente estudo foi à mesma que no trabalho dos autores supracitados, acredita-se que essa diversidade de resultados pode ser devido à composição das PSL utilizadas, pois apesar das PSL que utilizamos também apresentam 80% de proteína, são de marcas diferentes (Isoprowhey, Probiótica, Brasil).

Por meio desse resultado, de que as PSL não possuem potencial antioxidante, questionamos então, se as mesmas atuam na atividade e expressão das enzimas de defesa antioxidantes. Com isso obtivemos que as PSL foram capazes de aumentar a concentração de glutariona total e a razão de expressão das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e γ -glutamylcysteine synthetase (γ GCS).

A biossíntese da glutathione (GSH) ocorre no meio intracelular pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutâmico e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamylcysteine synthetase, levando à γ -L-glutamyl-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathione synthetase. A γ -glutamylcysteine synthetase sofre regulação pela GSH através de um feedback negativo, o que previne a produção excessiva desta ou o acúmulo do intermediário γ -glutamylcisteína. ^(82, 83).

Em condições fisiológicas normais, a taxa de síntese de GSH é largamente determinada pela disponibilidade do aminoácido cisteína, dependente do fornecimento dietético, e pela a atividade da enzima γ -glutamylcysteine synthetase ^(82, 84, 85, 86). Sendo que a atividade de γ GCS é um fator limitante para a velocidade da síntese de GSH ⁽⁸⁶⁾. O estresse oxidativo é um importante modulador para maiores níveis celulares de GSH, da atividade e dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de transcrição de γ -glutamylcysteine synthetase ⁽⁸⁷⁾.

Níveis de GSH, bem como a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes podem ser específicos de órgãos, mas também podem ser modulados pelas exigências metabólicas do tecido ⁽⁸⁸⁾. Corroborando com os nossos resultados, estudos demonstraram que as PSL atuam como um doador de cisteína, proporcionando o aminoácido limitante para a produção de glutathione intracelular, aumentando assim a síntese da mesma ^(37, 54, 89, 90, 91, 92, 93).

Kent; Harper; Bomser ⁽⁹¹⁾, em estudo realizado in vitro com células humana do epitélio da próstata, testaram a hipótese de que as PSL podem proporcionar cisteína necessária para aumentar a síntese de GSH e proteger contra a morte celular induzida por oxidantes. Estes autores constataram que o tratamento com as PSL hidrolisadas durante 48 horas na concentração de 500

mg/mL elevou o nível de GSH significativamente em 64%, em comparação aos controles. Assim, os autores sugerem que o consumo de PSL na dieta pode fornecer uma estratégia útil para elevar o nível intracelular de GSH e proteger as células da próstata contra o dano induzido por ERO.

Encontramos, também, que as PSL foram capazes de reduzir a atividade e a razão de expressão da catalase (CAT). Esta enzima de defesa antioxidante atua da mesma forma que a glutathione peroxidase, reduzindo o H_2O_2 , convertendo-o a oxigênio e água. Embora elas façam o mesmo trabalho, parece que não trabalham em condições idênticas. A CAT atua quando a concentração de H_2O_2 está muito acima dos níveis fisiológicos, como no estresse oxidativo. Já a GPx usa diferentes substratos, além do H_2O_2 , e funciona mesmo para pequenas variações de suas concentrações. Nesse sentido, a atividade da GPx representa a primeira resposta protetora para pequenas concentrações de H_2O_2 , em condições fisiológicas normais ^(94, 95).

A partir do exposto acima, acreditamos que o aumento da expressão de GPx e de γ GCS, e da concentração de glutathione total, esteja envolvido com a menor expressão e atividade da catalase, que foi observada nos animais que receberam as PSL.

Do mesmo modo, as PSL também diminuíram a atividade e razão de expressão da superóxido dismutase (SOD). A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é uma molécula bastante estável e invasiva, sendo que sua acumulação pode levar ao aparecimento do radical hidroxil ($\cdot OH$), que é muito agressivo. Este último, por sua vez, reage com componentes celulares como os lipídios de membranas, proteínas, hidratos de carbono, bem como os ácidos nucleicos, e em última análise pode conduzir à morte celular ⁽⁹⁴⁾.

O sistema glutathione é especialmente importante para a defesa celular contra ERO. A GSH reage diretamente com radicais em reações não enzimáticas e é doadora de elétrons na redução de peróxidos catalisadas pela GPX. O produto da oxidação de GSH é a glutathione dissulfeto ou oxidada (GSSG). A GSH é regenerada a partir de GSSG no interior das células, numa reação catalisada pela enzima glutathione redutase (GR). Esta enzima regenera GSH através da transferência de equivalentes da redução de NADPH

(nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) a GSSG (ciclo redox da glutathiona) (96, 97, 98).

Assim, a redução da atividade e expressão de SOD por ser devido a essa ação direta da GSH sobre as ERO, de forma não enzimática. E também, pode ser uma resposta adaptativa ao treinamento, pois o exercício físico quando praticado de forma regular induz uma adaptação da atividade do sistema de defesa antioxidante, protegendo o músculo esquelético do ataque de ERO, em situações de repouso ou durante a prática do exercício ⁽¹⁵⁾.

Realizamos também a análise histológica do tecido muscular, para verificarmos os danos teciduais e a resposta inflamatória ocasionada pela atividade física de alta intensidade. Por meio da mesma constatamos que as PSL foram capazes de reverter o aumento do número de células inflamatórias promovido pelo treinamento físico empregado. Tal efeito pode ter sido causado pelo aumento da concentração da glutathiona total e da expressão de GPx e de γ GCS, gerado pelas PSL.

A GSH possui papel anti-inflamatório não só inibindo a resposta inflamatória, mas também é essencial para certas funções do sistema imune, estando relacionada com a proliferação de linfócitos T, com a atividade fagocítica de neutrófilos, na apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APC), além disso, pode melhorar as funções de células NK, atua como uma molécula transportadora de óxido nítrico e reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α e IL-6) ^(99, 100, 101).

Portanto, GSH desempenha um papel vital controlando diretamente infecção por micobactérias, bem como melhora as defesas do hospedeiro, tais como a melhoria das funções imunológicas das células e restaura a função dos macrófagos, reduzindo a IL-6 ⁽¹⁰⁰⁾. Este papel essencial da GSH na imunidade tem sido explicado pelo fato de em muitas doenças, como na AIDS, DPOC, fibrose cística, a diminuição dos níveis de GSH está associada com um aumento da susceptibilidade à infecção ⁽⁹⁹⁾.

As PSL têm sido apontadas como nutriente com atividade funcional, com eficácia no aumento da resposta imunomoduladora, aumento no combate a infecções e processos inflamatórios, ação antibacteriana e antiviral, estímulo da absorção e função intestinal, além de efeito citoprotetor a partir da promoção de glutathiona ⁽¹⁰²⁾. A sua suplementação tem sido apontada como estratégia

para o tratamento de pacientes com doenças relacionadas com o sistema imunológico ⁽¹⁰³⁾. Sgarbieri ⁽⁴⁰⁾ afirma que o poder imunomodulador das proteínas do soro do leite se deve à grande concentração de imunoglobulinas, que oferecem efeito protetor. Além disso, o autor se refere à capacidade das proteínas do soro do leite em estimular a síntese de glutathione, que por sua vez estimula os linfócitos, que produzem imunoglobulinas.

6. Conclusão

Por meio dos nossos resultados foi claramente demonstrado que as PSL inibem a oxidação de proteínas musculares induzidas pelo exercício e mantêm baixos os níveis de peroxidação de lipídios em animais exercitados e sedentários. Além disso, por serem doadoras de cisteína, as PSL agem aumentando a concentração total de GSH e expressão de GPX e de γ GCS. Tal aumento resulta na diminuição do estresse oxidativo e do número de células inflamatórias no tecido muscular de ratos submetidos à atividade física de alta intensidade.

Dessa forma, concluímos que as PSL mostraram-se benéficas no exercício físico de alta intensidade ao agir de forma indireta na redução do estresse oxidativo.

No entanto, os mecanismos de ação de como o aumento de GSH diminui a atividade e a expressão de CAT e SOD não estão bem esclarecidos. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados com as PSL com o intuito de se verificar as vias que envolvem esses processos.

Além disso, não podemos deixar de destacar que no modelo animal que estudamos, observamos que não foi necessário aumentar a quantidade de proteína da dieta desses animais, para obtermos efeitos positivos das PSL na atividade física. Sabendo do uso em larga escala dessas proteínas por praticantes de atividade física, enfatizamos a necessidade da realização de estudos com humanos. Principalmente devido aos efeitos deletérios relacionados ao consumo do suplemento proteico em doses superiores à recomendação, como os problemas hepáticos e renais, além da contaminação por esteroides sem indicação nos rótulos.

Acreditamos que a incorporação das PSL na dieta dos praticantes de atividade física, sem ultrapassar a recomendação diária de proteínas, possa trazer benefícios ao desempenho físico, sem risco de danos a saúde dos mesmos. Por isso, muito há que se pesquisar sobre os verdadeiros mecanismos de ação dessas proteínas e peptídios e das quantidades que devem participar da dieta para produzir seus efeitos benéficos.

7. Referências

1. Berra CM, Menck CFM, Mascio PD. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*. 2006; 29(6): 1340-4.
2. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000; 153: 83–104.
3. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006; 29(1): 113-23.
4. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. 2004; 10(4); 308-13.
5. Barbosa KBF, *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*. 2010; 23(4): 629-43.
6. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*. 2003; 16(4): 433-41.
7. Dalle-Donne I, *et al.* Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*. 2006; 52(4): 601–23.
8. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997; 43(1): 61-8.
9. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*. 2004; 567: 1–61.
10. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes*. 2004; 53(1): 110-18.
11. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic Exercise and Oxidative Stress: A Review. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 2004; 29(3): 245-63.

12. Bloomer RJ, Fry AC, Falvo MJ, Moore CA. Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2007; 10: 411-7.
13. Ramel A, Wagner K-H, Elmadfa I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *European Journal of Nutrition*. 2004; 43: 2–6.
14. Uchiyama S, Tsukamoto H, Yoshimura S, Tamaki T. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *European Journal Physiology*. 2006; 452: 109–16.
15. Ferreira F, Ferreira R, Duarte JA. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*. 2007; 7(2): 257–75.
16. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. Role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. 2009; 674: 137–47.
17. PETRY ÉR, *et al.* Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. *Revista brasileira de Ciência e Movimento*. 2010; 18(4): 90-9.
18. Souza Jr TP, Oliveira PR, Pereira B. Exercício físico e estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. 2005; 11(1): 91-6.
19. Abd Hamid NA, Hasrul MA, Ruzanna RJ, Ibrahim IA, Baruah PS, Mazlan M, *et al.* Effect of vitamin E (Tri E®) on antioxidant enzymes and DNA damage in rats following eight weeks exercise. *Nutrition Journal*. 2011; 10(37) 1-7.
20. ZOPPI CC, *et al.* Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Revista paulista de educação física*. 2003; 17(2): 119-30.
21. Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. 2007; 13(5): 336-42.
22. Elokda AS, Nielsen DH. Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2007; 14(5): 630-7.
23. Lucena CF. Antioxidantes em exercícios aeróbios: papel do selênio e glutatona peroxidase. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*. 2010; 9(1): 54-61.

24. Silva LA, *et al.* Comparação do treinamento físico de quatro e oito semanas sobre atividade da cadeia transportadora de elétrons e marcadores de estresse oxidativo em fígado de camundongos. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte.* 2010; 16(2): 126-9.
25. Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *Journal of Applied Physiology.* 1992; 72: 549-54.
26. Nikolaidis MG, *et al.* The Effect of Muscle-Damaging Exercise on Blood and Skeletal Muscle Oxidative Stress. *Sports Med.* 2008; 38 (7): 579-606.
27. Bryer SC, Goldfarb AH. Effect of High Dose Vitamin C Supplementation on Muscle Soreness, Damage, Function, and Oxidative Stress to Eccentric Exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2006; 16: 270-80.
28. Silva LA, *et al.* Aspectos bioquímicos do exercício excêntrico e a suplementação de antioxidantes. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte.* 2007; 6(1): 13-25.
29. Paschalis V, *et al.* The effects of muscle damage following eccentric exercise on gait biomechanics. *Gait & Posture.* 2007; 25: 236–42.
30. Hellsten Y, *et al.* Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free radical biology & medicine.* 2001; 31(11): 1313–22.
31. Nunes LAS, *et al.* Efeitos da Suplementação com Panax ginseng Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e Lesão Muscular Induzidos por Exercício Exhaustivo Agudo em Ratos. *Revista Ciências em Saúde.* 2011; 1(1).
32. Reid MB. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2001; 33(3): 371-6.
33. Ji LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002; 959: 82-92.
34. Rebelatto JR, *et al.* Antioxidantes, Atividade Física e Estresse Oxidativo em Mulheres Idosas. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte.* 2008; 14(1): 8-11.
35. Terada LC, Godoi MR, Silva TCV, Monteiro TL. Efeitos metabólicos da suplementação do whey protein em praticantes de exercícios com pesos. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva.* 2009; 3(16): 295-304.

36. Haraguchi FK, Pedrosa ML, Paula H, Santos RC, Silva ME. Evaluation of biological and biochemical quality of whey protein. *Journal Medecine Food*. 2010; 13: 1–5.
37. Lands LC, Grey VL, Smoutas AA. Effect of supplementation with cysteine donor on muscular performance. *Journal of Applied Physiology*. 1999; 87(4): 1381-5.
38. Elia D, Stadler K, Horváth V, Jakus J. Effect of soy and whey protein-isolate supplemented diet on the redox parameters of trained mice. *European Journal of Nutrition*. 2006; 45(5): 259-66.
39. Borges PFZ, Sgarbieri VC, Dias NFGP, Jacobucci HB, Pacheco MTB, Baldini VLS. Produção Piloto de Concentrados de Proteínas de Leite Bovino: Composição e valor nutritivo. *Brazil Journal Food Technology*. 2001; 4(1): 1-8.
40. Sgarbieri, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*. 2004; 17(4): 397-409.
41. 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: 251–8.
42. Marshall K. Therapeutic Applications of Whey Protein. *Alternative Medicine Review*. 2004; 9(2): 136 – 56.
43. Hayes A, Cribb PJ. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2008; 11: 40–4.
44. Boirie Y, *et al.* Slow and fast dietary proteins differently modulate post-prandial protein secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94(26): 14930-5.
45. Ivy JL, Goforth HWJ, Damon BM, Mccauley TR, Parsons EC, Price TB. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *Journal of Applied Physiology*. 2002; 93: 1337–44.
46. Aoi W, Takanami Y, Kawai Y, Morifuji M, Koga J, Kanegae M, et al. Dietary whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: A comprehensive protein analysis. *Nutrition*. 2011; 27: 687–92.
47. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *British Journal of Nutrition*. 2005; 93: 439–45.

48. Cribb PJ, *et al.* Effects of Whey Isolate, Creatine, and Resistance Training on Muscle Hypertrophy. *Medicine & Science In Sports & Exercise*. 2007; 39(2).
49. Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JR. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & Metabolism*. 2010; 7(51): 1-11.
50. Buckley JD, *et al.* Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2010; 13: 178–81.
51. Cooke MB, *et al.* Whey protein isolate attenuates strength decline after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2010; 7(30): 1-9.
52. Walker TB, Smith J, Herrera M, Lebeque B, Pinchak A, Fischer J. The Influence of 8 Weeks of Whey-Protein and Leucine Supplementation on Physical and Cognitive Performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2010; 20: 409-17.
53. Haraguchi FK, Abreu WC, Paula H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr.* 2006; 19(4): 479-488.
54. Pacheco MTB, Sgarbieri VC. Effect of Different Hydrolysates of Whey Protein on Hepatic Glutathione Content in Mice. *Journal of medicinal food*. 2005; 8(3): 337–42.
55. Haraguchi FK, Silva ME, Neves LX, dos Santos RC, Pedrosa ML. Whey protein precludes lipid and protein oxidation and improves body weight gain in resistance exercised rats. *European Journal of Nutrition*. 2011; 50(5): 331-9.
56. Hamad EM, Taha SH, Dawood A-GIA, Sitohy MZ, Abdel-Hamid M. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10(57): 1-7.
57. Van Dael P, Kastenmayer P, Clough J, Jarret AR, Barclay D V, Maire JC. Substitution of Casein by α -Casein or of Whey Protein Isolate by α -Lactalbumin Does Not Affect Mineral Balance in Growing Rats. *J. Nutr.* 2005; 135: 1438–43.
58. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 1995; 28: 25-30.
59. Reeves FG, Nielsen FH, Fahey JCJ. 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 Nutrition*. 1993; 123: 1939-51.
60. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 346-57.
 61. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978; 52: 302-10.
 62. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem*. 1951; 193: 265-75.
 63. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-6.
 64. Xiong Q, Xie P, Li H, Hao L, Li G, Qiu T, Liu Y. Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats. *J.Biochem.Mol.Toxicol*. 2010; 24: 361-7.
 65. CALLEGARI-JAQUES, S.M. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
 66. Hayes A, Cribb PJ. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2008; 11(1): 40-4.
 67. Dangin M, *et al*. The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *Journal of Physiology*. 2003; 549(2): 635-44.
 68. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Köhnke R. Branched chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *Journal of Nutrition*. 2006; 136(1): 269-73.
 69. Layman DK. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *Journal of Nutrition*. 2003; 133(1): 261-267.
 70. Leite RD, *et al*. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009; 34(6): 1079-86.
 71. Lovati MR, West CE, Sirtori CR, Beynen AC. Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rabbits. *Br J Nutr*. 1990; 64(2): 473-85.
 72. Zhang X, Beynen AC. Lowering effect of dietary milk whey protein v. casein on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Brit J Nutr*. 1993; 70(1): 139-46.

73. Choi YS, Ikeda I, Sugano M. The combined effects of dietary proteins and fish oil on cholesterol metabolism in rats of different ages. *Lipids* 1989; 24(6): 506-10.
74. Minehira K, Inoue S, Nonaka M, Osada K, Yamada K, Sugano M. Effects of dietary protein type on oxidized cholesterol-induced alteration in age-related modulation of lipid metabolism and indices of immune function in rats. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1483(1): 141-53.
75. Barauna VG, Batista ML Jr, Costa Rosa LF, Casarini DE, Krieger JE, Oliveira EM. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; 32(4): 249-54.
76. Kimball SR, Jefferson LS. Signaling Pathways and Molecular Mechanisms through which Branched-Chain Amino Acids Mediate Translational Control of Protein Synthesis. *Journal of Nutrition.* 2006; 136: 227–31.
77. Donato JJ, *et al.* Effects of leucine and phenylalanine supplementation during intermittent periods of food restriction and refeeding in adult rats. *Life Sciences.* 2007; 81: 31–9.
78. Norton LE, *et al.* The Leucine Content of a Complete Meal Directs Peak Activation but Not Duration of Skeletal Muscle Protein Synthesis and Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Rats. *Journal of Nutrition.* 2009; 139: 1103–9.
79. Deminice R, Sicchieri T, Payão PO, Jordão AA. Blood and Salivary Oxidative Stress Biomarkers Following an Acute Session of Resistance Exercise in Humans. *Int J Sports Med* 2010; 31: 599–603.
80. Espin J C, Soler-Rivas C, Wichers HJ, Garcia-Viguera C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J.Agric.Food Chem.* 2000; 48: 1588-92.
81. Gad AS, *et al.* Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition.* 2011; 27: 582–9.
82. Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutation Research.* 2005; 579: 58–80.
83. Huber PC, Almeida WP, Fátima A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova.* 2008; 31(5): 170-9.
84. Sen CK. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutritional Biochemistry.* 1997; 8: 660-72.
85. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine.* 1999; 27(9/10): 922–35.

86. Lu SC. REGULATION OF GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1/2): 42–59.
87. Liu RM, Gao L, CHOI J, FORMAN HJ. g-Glutamylcysteine synthetase: mRNA stabilization and independent subunit transcription by 4-hydroxy-2-nonenal. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998; 275: 861-9.
88. Jurado J, *et al.* Absolute Gene Expression Patterns of Thioredoxin and Glutaredoxin Redox Systems in Mouse. 2003; 278(46): 45546–54.
89. Bounous P, GOLD P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med.* 1991; 14(4): 296-309.
90. Grey V, Mohammed SR, Smountas AA, Bahloul R, Lands LC. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2003; 2: 195–8.
91. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicology in Vitro.* 2003; 17: 27–33.
92. Tseng YM, *et al.* Effects of Alcohol-Induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Pretreated Whey Protein Concentrate (WPC) on Oxidative Damage. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 8141–7.
93. Peng X, Xiong YL, Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry.* 2009; 113: 196–201.
94. DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2006; 250: 70–9.
95. Shih CK, *et al.* b-Carotene and canthaxanthin alter the pro-oxidation and antioxidation balance in rats fed a high-cholesterol and high-fat diet. *British Journal of Nutrition.* 2008; 99: 59–66.
96. Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxic Pathol.* 1996; 48: 439-46.
97. Chaudieá JR, FERRARI-ILIOU R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology.* 1999; 37: 949-62.
98. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 4912-6.
99. Ghezzi P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *International Journal of General Medicine.* 2011; 4: 105–13.

100. Morris D, et al. Glutathione and infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.012>, How to Cite or Link Using DOI.
101. Roth E, *et al.* Regulative Potential of Glutamine—Relation to Glutathione Metabolism. *Nutrition*. 2002; 18(3): 217-21.
102. Pacheco MTB, et al. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. *Revista de Nutrição*. 2006; 19(1): 47-55.
103. Gill HS, F. Rutherford DKJ, Cross ML. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*. 2000; 84(1): 111-7.

8. Trabalhos publicados durante o mestrado

- Resumo

TEIXEIRA, K. R., et al. Physical Activity Effect in Anaerobic Activity of Defense Antioxidant Enzymes in Animals. In: XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society in the Convention Center of the Rafain Palace Hotel, on May 19 to 22, 2012, in Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.

- Artigo

TEIXEIRA, K. R., et al. Whey Protein Improves HDL/non-HDL Ratio and Body Weight Gain in the Rats Subjected to the Resistance Exercise. Braz. Arch. Biol. Technol. v.55 n.6: pp. 945-952, Nov/Dec 2012.

- Trabalho submetido

TEIXEIRA, K. R., et al. Whey protein increase glutation level and expression mRNA of GPx and γ GCS in resistance-exercised rats. In: European Journal of Nutrition.