

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

TESE DE DOUTORADO

GIOVANA ERMETICE DE ALMEIDA COSTA
Nutricionista e Educadora Física

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS NUTRICIONAIS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS DECORRENTES DO CONSUMO DE PROTEÍNAS DO LEITE
POR RATOS SEDENTÁRIOS E TREINADOS

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

Campinas – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C823c Costa, Giovana Ermetice de Almeida
Comparação dos efeitos nutricionais, bioquímicos e fisiológicos decorrentes do consumo de proteínas do soro do leite por ratos sedentários e treinados / Giovana Ermetice de Almeida Costa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

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

1. Atividade física. 2. Resistência. 3. Biomarcadores. 4. Proteínas do soro do leite. 5. Glutathione. I. Amaya-Farfan, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Comparison of the nutritional, biochemical and physiological effects due to milk protein consumption by sedentary and trained rats.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Endurance exercise, Biomarkers, Milk whey protein. Glutathione

Área de concentração: Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Jaime Amaya-Farfan

Lilia Zago Ferreira dos Santos

Luciano Bruno de Carvalho e Silva

Mário Roberto Maróstica Junior

Rodrigo Hohl

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

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

TESE DE DOUTORADO

GIOVANA ERMETICE DE ALMEIDA COSTA
Nutricionista e Educadora Física

COMPARAÇÃO DOS EFEITOS NUTRICIONAIS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS DECORRENTES DO CONSUMO DE PROTEÍNAS DO LEITE
POR RATOS SEDENTÁRIOS E TREINADOS

Tese apresentada ao Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

Campinas – SP

2010

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Giovana Ermetice de Almeida Costa aprovada pela Comissão Julgadora em 23/02/2010.

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
(Orientador)

Assinatura

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
FCA – UNICAMP

Assinatura

Profa. Dra. Lília Zago Ferreira dos Santos
UNIFESP

Assinatura

Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva
UNIFAL

Assinatura

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
FEA – UNICAMP

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
IB – UNICAMP

Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Hohl
IB – UNICAMP

Assinatura

Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene
PUC – CAMPINAS

Assinatura

Resolução

*É preciso deixar
que as rosas
floresçam abandonadas,
somente sol, chuva
e matas,
e que os espinhos
cresçam guerreiros
e carrascos,
somente dor, tristeza
e mágoas.
Porque é preciso deixar
de ser o modo de ser
dos outros.*

(Lúcia Narbot Ermetice)

*Àqueles que acompanharam a jornada para
elaboração desse trabalho - meus familiares e
meus queridos amigos, e que certamente sabem
a importância que têm em minha vida:*

Minha dedicação especial a vocês!

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO da LITERATURA	4
3. OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	64
8. OBSERVAÇÕES	65
9. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE I.....	80
APÊNDICE II.....	81

RESUMO

Comparação dos efeitos nutricionais, bioquímicos e fisiológicos decorrentes do consumo de proteínas do leite por ratos sedentários e treinados

A atividade física (AF) de resistência provoca diversas respostas fisiológicas, dentre elas a alteração dos padrões de células sanguíneas e atividade enzimática. Recursos alimentares são freqüentemente utilizados para aumentar o rendimento esportivo e minimizar os danos causados pelo exercício. O tipo de proteína e sua forma são determinantes dos efeitos que estas podem proporcionar. As proteínas do soro do leite (PSL) são fontes de aminoácidos indispensáveis, dentre eles, os de cadeia ramificada que estão envolvidos na sinalização da síntese protéica e no metabolismo energético, e os sulfurados que se destacam por serem precursores para a formação de glutatona. Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar os efeitos do consumo de dietas contendo proteínas do soro do leite, nas formas intacta e pré-hidrolisada, no desempenho, composição corporal e parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos submetidos à atividade física em esteira. Foram utilizados animais machos divididos em dois grupos de acordo com a prática (treinados) ou não (sedentários) de AF, sendo estes subdivididos em três grupos conforme o tipo de proteína (AIN-93M): caseína (controle), e PSL nas formas intactas ou pré-hidrolisadas como única fonte de proteínas, totalizando 6 grupos experimentais. Os ratos ativos correram cinco dias por semana, durante nove semanas consecutivas seguindo protocolo de treinamento com velocidade e tempo progressivos. O desempenho dos animais foi crescente ao longo do experimento em todos os grupos e a evolução de peso foi similar independentemente da dieta ou da prática de AF. Os resultados hematológicos e bioquímicos mostraram efeito redutor do treinamento sobre os parâmetros analisados sem interferência específica da dieta, à exceção da concentração de glutatona total em eritrócitos que foi significativamente superior em animais sedentários que consumiram PSL intactas. A composição química da carcaça revelou um perfil lipídico reduzido em animais treinados em comparação aos sedentários, com significância estatística somente em relação aos grupos que receberam PSL, mostrando ser um efeito positivo e dependente da ação conjunta da dieta e da AF. Dados de peso dos órgãos apontam possível influência das PSL sobre o fígado e pâncreas, mas o peso e o comprimento dos fêmures não mostraram alteração nem pelo tipo de dieta nem pelo treinamento. Assim, concluiu-se que os resultados obtidos nesse estudo são, em sua maioria, decorrentes do efeito do treinamento, e que as PSL ao nível oferecido na dieta (12%), mesmo apresentando diferente forma físico-química, não causaram variações hematológicas e bioquímicas significativas quando avaliadas, respectivamente, após 24 horas da última sessão de treino e passadas 48 horas do teste de desempenho final. Ressalta-se, entretanto, o potencial antioxidante dessas proteínas pelo incremento da glutatona intracelular.

Palavras-chave: Atividade física, resistência, biomarcadores, proteínas do soro do leite, glutatona

ABSTRACT

Comparison of the nutritional, biochemical and physiological effects due to milk protein consumption by sedentary and trained rats

Endurance exercise leads to many physiological responses, as changes in the blood cells and enzymatic activity. Food resources are often used to improve the sport performance and diminish injuries caused by exercise. The type and form of protein are determinant of the effects that they can provide. Milk whey proteins (MWP) are sources of indispensable amino acids, among them the branched-chain amino acids are involved in protein synthesis signaling and energetic metabolism, and sulfur ones point out in order to be precursors for glutathione formation. This work was conducted with the objective of verifying the effects of consuming diets containing MWP, in intact or pre-hydrolyzed forms over performance, body composition, biochemical and hematological parameters in rats undergoing a treadmill exercise. Male animals, segregated into two groups according to the practice (trained) or not (sedentary) of exercise, were used. They were sub-segregated into three groups regarding the type of protein in the diet (AIN-93M): casein (control), and intact or pre-hydrolyzed MWP as the only source of protein, for a total of 6 groups. Active rats run 5 d/wk, during nine consecutive weeks, following a progressive time and speed protocol. The performance of the animals increased for all groups along the experiment and weight evolution remained similar independent of the diet and exercise. Hematological and biochemical results showed that training had a diminishing effect over the analyzed parameters without specific interference of the diet, except for total glutathione concentration in erythrocytes that was significantly higher in the sedentary animals that consumed intact MWP. Carcass chemical composition revealed a decreased lipid profile in trained animals compared to sedentary, with statistical significance only related to the groups that received MWP showing a positive dependence from the combined action of diet and exercise. Analyses of organ weight data suggest a possible influence of MWP upon liver and pancreas, but weight and length of femurs did not show to be changed either by diet or exercise. Thus, it was concluded that outcomes obtained in this study are mostly due to training, and that MWP at the level offered in the diet (12%), even in different physical-chemical forms, did not cause significant hematological and biochemical variation when analyzed, respectively, 24 hours after the last training session and 48 hours from the final performance test. It should be noted, however, the antioxidant potential of these proteins by increased intracellular glutathione.

Keywords: Endurance exercise, biomarkers, milk whey protein, glutathione

ABREVIATURAS

AA	-	Aminoácidos
AF	-	Atividade Física
AG	-	Ácidos graxos
AIN	-	American Institute of Nutrition
ALT	-	Alanina aminotransferase
AST	-	Aspartato aminotransferase
BCAA	-	<i>Branched-chain amino acids</i>
CAS	-	Caseína
CHCM	-	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK	-	Creatina quinase
CS	-	Caseína Sedentário
CT	-	Caseína Treinado
FAO	-	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GPx	-	Glutathione Peroxidase
GR	-	Glutathione reductase
GSH	-	Glutathione reduzida
GSSG	-	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	-	Peróxido de hidrogênio
HCM	-	Hemoglobina Corpuscular Média
HS	-	Hidrolisado Sedentário
HT	-	Hidrolisado Treinado
Ig	-	Imunoglobulina
IS	-	Isolado Sedentário
IT	-	Isolado Treinado

LABEX	-	Laboratório de Bioquímica do Exercício
LDH	-	Lactato desidrogenase
MWP	-	Milk whey protein
PDCAAS	-	<i>Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score</i>
PSL	-	Proteínas do soro do leite
RDW	-	<i>Red blood cell distribution width</i>
S	-	Sedentários
T	-	Treinados
tGSH-GSSG	-	Glutathiona total
VCM	-	Volume Corpuscular Médio
VMP	-	Volume Médio de Plaquetas
VO ₂ máx	-	Volume de oxigênio máximo
WHO	-	World Health Organization
WPH	-	Whey protein hydrolysate
WPI	-	Whey protein isolate

ÍNDICE GERAL

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO da LITERATURA	4
2.1 - Conceitos de atividade física	4
2.2 - As Proteínas no Exercício Físico	5
2.3 - Proteínas do soro do leite (PSL).....	7
2.3.1 – Componentes protéicos do soro do leite	8
2.3.1.1 - Lactoferrina	8
2.3.1.2 - Imunoglobulinas	9
2.3.1.3 - β - lactoglobulina	10
2.3.1.4 - α - lactoalbumina	10
2.3.1.5 - Lactoperoxidase.....	10
2.3.1.6 - Glicomacropéptídeos	11
2.3.1.7 - Soro albumina	11
2.3.2 – Produtos do soro do leite	12
2.3.3 – Características dos produtos do soro leite	12
2.4 - O uso das PSL em Exercícios de Resistência (<i>Endurance</i>).....	14
2.5 - Glutathiona como agente antioxidante	17
2.6 - Marcadores biológicos.....	19
2.7 - Composição Corporal	21
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 - Animais	24
4.2 - Dietas.....	24
4.3 - Protocolo Experimental.....	26
4.4 - Evolução Ponderal e Consumo	26
4.5 - Teste de desempenho	29
4.6 - Coletas de sangue.....	30
4.7 Análise hematológica.....	30
4.8 - Análises bioquímicas	31
4.8.1 – Marcadores	31
4.8.1.1 - Creatina quinase (CK).....	31
4.8.1.2 - Lactato desidrogenase (LDH)	31

4.8.1.3 - Aspartato aminotransferase (AST).....	31
4.8.1.4 - Alanina aminotransferase (ALT)	32
4.8.1.5 – Creatinina	32
4.8.2 – Sistema antioxidante Glutaciona.....	32
4.8.2.1 - Determinação da Glutaciona Total (tGSH-GSSG)	33
4.8.2.2 - Determinação da Glutaciona Peroxidase (GPx).....	33
4.9 - Composição corporal.....	34
4.10 - Tratamento Estatístico.....	34
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	64
8. OBSERVAÇÕES.....	65
9. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE I	80
APÊNDICE II	81

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de recursos ergogênicos na atividade física é uma prática cada vez mais freqüente, e as publicações científicas dos últimos anos ressaltam a relação do consumo de proteínas e o exercício físico. Estes trabalhos demonstram que a participação de aminoácidos nas reações do organismo, é mais importante do que se pensava, tendo estes, ações importantes na sinalização da síntese protéica, formação de compostos envolvidos com o sistema antioxidante, modulação de células imunológicas, entre outros (ERIKSEN *et al.*, 2008; ANTHONY *et al.*, 2007, TIPTON e WITARD, 2007; HULMI *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2004a; GRIMM e KRAUS, 2001).

Devido à quantidade de variáveis encontradas nos estudos que avaliam o papel das proteínas na atividade física, torna-se mais complexa a produção de um consenso sobre o protocolo mais adequado quanto: a quantidade requerida de proteínas, o horário que devem ser administradas, o efeito fisiológico da combinação de proteínas com outros nutrientes, a fonte e as características estruturais da proteína ingerida; além de todas essas condições estarem diretamente relacionadas ao tipo de exercício físico praticado – de força, resistência ou intermitente.

A união e uniformização dos dados obtidos com as diversas investigações são as principais dificuldades encontradas para elaboração de diretrizes. A heterogeneidade dos protocolos de pesquisa envolvendo a prática da atividade física e o tratamento dietético utilizado, tanto em estudos com animais quanto com humanos, faz com que a obtenção de respostas seja um desafio aos pesquisadores. Contudo, as organizações engajadas com a nutrição e o esporte procuram se posicionar frente às novas descobertas. E com isso, a cada trabalho realizado, novas perspectivas são propagadas.

Campbell *et al.* (2007), representando a Sociedade Internacional de Nutrição Esportiva, afirmam que a quantidade de proteínas a serem ingeridas por um indivíduo é dependente do tipo e da intensidade do exercício, da qualidade da proteína ingerida, e da ingestão energética e de carboidratos. Além disso, esses

autores se posicionam favoravelmente ao uso de suplementos protéicos, dizendo serem estes métodos seguros e convenientes de se ingerir proteínas de alta qualidade.

O mercado acompanha a produção científica, e atualmente as proteínas do soro do leite bovino (PSL) têm sido um dos suplementos esportivos mais consumidos dentre os desportistas, fruto da ampla investigação da ação dessas proteínas sobre o organismo e por conseqüência no desempenho atlético, demonstrando serem mais vantajosas do que as demais proteínas até então estudadas, como a caseína e a albumina que já tiveram grande repercussão de consumo.

As PSL apresentam inúmeras propriedades biológicas que agregadas aos resultados práticos que elas proporcionam, como o aumento do rendimento esportivo, as colocam no topo da lista de venda dos suplementos protéicos. Dados da FAO¹ indicam que o volume anual da produção do soro aumentou cerca de 2% no período de 1995 a 2005, equiparando-se a produção do leite. Se há alguns anos as PSL eram consideradas um engodo as indústrias de laticínios, nos dias atuais alguma vantagem pode ser atribuída à venda do soro para subsequente tratamento ou beneficiamento na própria indústria (SMITHERS, 2008).

Muitas informações, entretanto, ainda permanecem contraditórias ou insuficientes. Uma delas é a possível superioridade de hidrolisados protéicos em comparação à proteína intacta, particularmente os do soro do leite bovino, apontados em alguns estudos como fonte de peptídeos bioativos (FIAT et al., 1993), e que poderiam conferir melhor rendimento aos praticantes de atividade física (BUCKLEY *et al.*, 2008; TIPTON, 2007, PIMENTA *et al.*, 2006; ABECIA-SORIA, 2003; RAMOS, 2001; TASSI, 1996). Os estudos ainda são inconclusivos e as pesquisas acerca desses compostos devem esclarecer suas ações e viabilidade de aplicação.

As questões apresentadas geram estímulo às novas pesquisas que procuram encontrar recursos que melhorem o desempenho e ainda proporcionem manutenção ou até melhoria da qualidade de vida dos indivíduos praticantes de atividade física (Gleeson, 2006). Diversos recursos são utilizados para a avaliação

do desempenho, dentre eles, o uso de marcadores biológicos – os ‘biomarcadores’ bioquímicos, fisiológicos e imunológicos, têm sido empregados com o intuito de monitorar as respostas ao treinamento, mantendo-as compatíveis com um estado de saúde adequado, além de propiciar incrementos no treino que levem os atletas/praticantes de atividade física a superar seus resultados e alcançar seus objetivos, os quais muitas vezes estão relacionados à busca constante da melhor forma física, com interesse em alcançar um corpo com baixo percentual de gordura e grande quantidade de massa muscular, seja para a prática esportiva ou para engajamento nos padrões atuais de beleza corporal.

Por razões éticas e viabilidade de execução dos estudos, as informações científicas são obtidas primeiramente por meio de pesquisas com animais. Assim, neste trabalho procurou-se investigar, em ratos, a ação das proteínas do soro do leite bovino na forma intacta ou pré-hidrolisada, em associação à atividade física de resistência (corrida em esteira), identificando os efeitos bioquímicos, hematológicos e anatômicos proporcionados por essas proteínas.

2. REVISÃO da LITERATURA

2.1 - Conceitos de atividade física

Buscando compreender o que a literatura apresenta a respeito das definições de treinamento, a afirmação de Bompa (2001) de que “quase todas as atividades físicas incorporam elementos de força, velocidade, duração e amplitude de movimentos”, ilustra a diversidade das variáveis encontradas que abrangem as características de uma modalidade esportiva.

Toda atividade física se distingue essencialmente por dois fatores principais: a intensidade e a duração. Esses fatores, entretanto, não são independentes, pois as atividades de alta intensidade não podem ser mantidas por um período prolongado sem que a fadiga as interrompa. Assim, essas atividades só podem ser realizadas executando-as por curto período e com intervalos de descanso para propiciar a recuperação. Ao contrário, as atividades de baixa intensidade podem se prolongar por muito tempo mostrando claramente a relação intensidade *versus* duração, sendo estas inversamente proporcionais (SIFFF e VERKHOSHANSKY, 2004).

As vias metabólicas demandadas durante a prática da atividade para suprimento energético são determinadas pelas características de cada modalidade esportiva. Existem atividades que envolvem predominantemente o metabolismo aeróbio, outras requerem energia por vias anaeróbias, e há ainda aquelas, denominadas intermitentes ou intervaladas, que alternam o mecanismo de mobilização metabólica entre esses dois tipos (BOMPA, 2001).

Os exercícios para superação da resistência² são os denominados exercícios de força, e a via anaeróbia é a principal para o fornecimento de energia. Já os exercícios de longa distância ou duração e/ou muitas repetições, são aqueles referidos como exercícios de resistência ou *endurance* em que a manutenção da atividade contrátil do músculo é mantida por vias aeróbias de obtenção de energia. A adaptação e o treinamento, todavia, de qualquer prática esportiva, são

2 - Esse tipo de exercício é muitas vezes traduzido erroneamente da língua inglesa. O termo utilizado *resistance exercise*, representa as atividades resistidas, geralmente com o uso de cargas (pesos).

condicionantes da utilização dos substratos energéticos utilizados (POWERS e HOWLEY, 2000).

Durante a realização de exercícios prolongados, o corpo cuidadosamente preza pelo balanço entre a disponibilidade e a utilização de substrato energético para manutenção da atividade contrátil muscular e níveis de glicose sanguíneos compatíveis com as necessidades dos órgãos e tecidos. A atividade de resistência resulta em alterações adaptativas da função metabólica muscular caracterizada por um decréscimo na utilização de carboidratos, apesar de sua contribuição significativa, e aumento na oxidação lipídica sendo essa resposta variável de acordo com o sexo – mulheres, segundo Carter *et al.* (2001), apresentam maiores taxas de oxidação de ácidos graxos do que os homens. É válido ressaltar que essas alterações são inerentes à adaptação ao exercício que é alcançada em resposta ao treinamento, pois em indivíduos destreinados, uma sessão de exercício de resistência provoca resultados metabólicos diferentes, com alto consumo de glicogênio e menor capacidade de oxidação dos ácidos graxos (SPRIET, 2002; HAWLEY, 2002; KLEIN *et al.* 1994; TURCOTTE *et al.* 1992).

A corrida, quando executada de forma contínua por um longo período de tempo, pode ser definida como sendo uma atividade de resistência aeróbia, em que a demanda de oxigênio é grande e constante para o fornecimento de energia para a contração muscular. Contudo, quando a corrida é executada com velocidade alternada, ou seja, oscilando entre uma velocidade mais rápida outra mais lenta, essa diferença ocasiona uma exigência muscular que a caracteriza como uma atividade intermitente, transitando entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio (O'BRIEN, *et al.*, 2008).

2.2 - As Proteínas no Exercício Físico

De modo geral, para praticantes de atividade física, recomenda-se uma maior quantidade de proteína devendo-se em grande parte à utilização de aminoácidos como fonte de energia, recuperação de microlesões, e aporte adicional para o ganho de massa magra. Segundo Lemon (1997), indivíduos

envolvidos com exercícios de força, potência e velocidade necessitam de 1,7 a 1,8g de proteína/kg de peso corpóreo/dia, enquanto que aqueles que realizam atividade de resistência precisam de 1,2 a 1,4g de proteína/kg de peso corpóreo/dia; o que corresponde, respectivamente, a valores 125% e 75% superiores à ingestão recomendada para indivíduos sedentários e saudáveis.

Em posicionamento publicado em 2000, organizações renomadas em estudos da nutrição e esporte – *American Dietetic Association*, *Dietitians of Canadá*, e *American College of Sports Medicine*, consideraram os valores de 1,6 a 1,7 e 1,2 a 1,4g de proteína/kg peso corpóreo/dia para atletas de força e resistência, respectivamente, suficientes e facilmente atingidos pela dieta (ACSM, 2000). Corroborando com esses dados, a '*International Society of Sports Nutrition*' (CAMPBELL *et al.*, 2007), considera que indivíduos fisicamente ativos precisam de aproximadamente 1,4 a 2,0 g de proteína por quilo de peso corporal por dia.

A necessidade de um aporte protéico maior para os praticantes de atividade física de força tanto quanto de resistência é bem aceita e, embora haja um posicionamento de especialistas acerca dos requerimentos de proteína para esportistas, um amplo segmento da população que pratica esporte ou fisiculturismo consome dietas hiperprotéicas, associadas a outros suplementos (MAUGHAN e BURKE, 2004; JUHN, 2003; SANTOS e SANTOS, 2002).

Aparentemente, o momento da ingestão de proteínas ao longo do dia seria pouco importante desde que os valores individuais diários fossem atingidos. No entanto, o consumo de proteínas quando realizado próximo a execução da atividade física – alguns minutos antes, durante ou após – parece ter efeitos metabólicos importantes na recuperação muscular e promoção de efeitos imunológicos (TIPTON, 2007; TIPTON *et al.*, 2004; TIPTON *et al.*, 2003; TIPTON *et al.*, 2001).

A qualidade da proteína é um quesito importante para as variadas respostas esperadas, sendo o perfil aminoacídico um dos principais determinantes dessa qualidade. A ingestão de aminoácidos estimula seu transporte para o interior das células musculares esqueléticas, e sua administração após o exercício aumenta a síntese protéica e reduz a quebra de proteínas (HOWARTH *et al.*, 2008; GAINÉ *et*

al., 2007; AOI *et al.*, 2006; PADDON-JONES *et al.*, 2004; SHORT *et al.*, 2004). De fato, a suplementação com aminoácidos é efetiva na redução dos danos musculares e aumento da recuperação de tais danos. Muitos estudos indicam que os BCAAs³ (aminoácidos de cadeia ramificada) são os principais responsáveis por essa gama de respostas, sendo a leucina o aminoácido que está mais relacionado a essa característica (BLOMSTRAND, 2006).

As fontes comuns de suplementos protéicos incluem o leite (caseína e o soro), o ovo (albumina), e os extratos de soja. Alguns aminoácidos isolados como os BCAA, também são comercializados. Todas essas proteínas são boas fontes de aminoácidos essenciais, porém as proteínas do soro do leite apresentam os valores mais elevados relativos aos índices de qualidade de proteínas (valor biológico, escore de aminoácido, digestibilidade, PDCAAS⁴). Considerando que essa seria uma vantagem às proteínas do soro, poderia se esperar melhores respostas fisiológicas ao utilizar essa fonte de proteína na dieta (HOFFMAN E FALVO, 2004).

Além da mais elevada qualidade nutricional conferida às proteínas do soro do leite, a forma físico-química que estas proteínas são ingeridas estão relacionadas a diferentes efeitos fisiológicos. Alguns peptídeos resultantes da hidrólise parcial de proteínas intactas podem ser considerados bioativos, estimulando o organismo de forma variada (SAINT-SAUVEUR *et al.*, 2008; GAUTHIER *et al.*, 2006). Assim a administração dos hidrolisados protéicos tem sido também uma estratégia para garantir a ingestão de aminoácidos essenciais e proporcionar seus benefícios funcionais.

2.3 - Proteínas do soro do leite (PSL)

Das proteínas do leite, o soro representa apenas 20% do total, sendo os 80% restantes correspondentes às caseínas. Por muito tempo o soro do leite – produto da manufatura do queijo e do processo de coalho – foi considerado um resíduo sem qualquer função. A descoberta de aplicações nutricionais para o soro do leite elevou seu conceito na produção queijeira como um co-produto para o

3 – Aminoácidos de Cadeia Ramificada = do inglês, *Branched-Chain Amino Acids* (BCAA)

4 – *Score* de aminoácidos corrigido pela Digestibilidade protéica = do inglês, *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score* (PDCAAS)

processamento e melhorando a qualidade de outros produtos (HOFFMAN e FALVO, 2004, MARSHALL, 2004).

O soro é um líquido translúcido amplamente reconhecido pelo valor de seus componentes que incluem especialmente as proteínas. Estas possuem propriedades nutricionais e biológicas importantes particularmente à promoção de saúde e prevenção de doenças. As proteínas que o compõe apresentam as seguintes características confirmadas em diversos estudos: a) atividade antimicrobiana e antiviral, b) propriedades imuno-estimulatórias, c) atividade anticarcinogênica; sendo a propriedade dessas proteínas em desempenhar tais funções, particular a cada uma delas (MADUREIRA *et al*, 2007).

Todos os constituintes das proteínas do soro do leite proporcionam altos níveis de aminoácidos indispensáveis e aminoácidos de cadeia ramificada quando comparados a várias fontes de proteínas vegetais e a bioatividade desses compostos podem conferir efeitos benéficos. Os aminoácidos encontrados no soro do leite são mais facilmente absorvidos e utilizados em comparação a soluções de aminoácidos livres. Além disso, apresentam maior concentração de aminoácidos de cadeia ramificada – leucina, isoleucina e valina – que são importantes para o crescimento e reparação de tecidos, sendo esse fator associado particularmente a leucina por ser uma “peça-chave” no metabolismo protéico durante a tradução e iniciação das vias de síntese protéica (HOFFMAN e FALVO, 2004).

As proteínas do soro do leite são também ricas em aminoácido sulfurados (cisteína e metionina), que em altas concentrações podem aumentar a função imune por meio da sua conversão a glutathiona (MARSHALL, 2005). Os principais componentes protéicos do soro do leite são apresentados a seguir.

2.3.1 – Componentes protéicos do soro do leite

2.3.1.1 - Lactoferrina

A lactoferrina – uma glicoproteína que se liga ao ferro – é um antioxidante não enzimático encontrado nas frações do soro do leite tal como no colostro. Os componentes da lactoferrina do soro do leite consistem em aproximadamente 689

resíduos de aminoácidos, enquanto a lactoferrina humana possui 691 resíduos (MARSHALL, 2004).

A lactoferrina do soro é composta por uma cadeia única de polipeptídeos com dois sítios de ligações para os íons férricos. Antes do processamento, a lactoferrina bovina é apenas 15 a 20% saturada com ferro. A lactoferrina depletada de ferro, como a encontrada no leite humano é definida como contendo quantidades inferiores a 5% de ferro e é denominada de apolactoferrina (STEIJNS e VAN HOOIJDONK, 2000)

A concentração de lactoferrina no leite e no colostro humano é de aproximadamente 2mg/mL e 7mg/mL respectivamente, alcançando a máxima concentração de 30mg/ml no colostro. Já no leite e no colostro bovino os valores encontrados são bem menores – por volta de 0,2mg/mL e 1,5mg/mL, respectivamente. A lactoferrina é um componente dominante da proteína do soro no leite humano, contudo a concentração de proteínas do soro em produtos comerciais é de apenas 0,35 a 2,0% do total de proteínas (KAITO, 2005; MARSHALL, 2004). Quando isolada essa glicoproteína parece apresentar efeitos satisfatórios na inibição do crescimento bacteriano e combate a vírus.

2.3.1.2 - Imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Ig) são anticorpos e podem ser encontrados em 5 classes – IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. As IgG constituem aproximadamente 75% dos anticorpos de um adulto e é transferida da mãe para o bebê, no útero via cordão umbilical e pelo aleitamento materno tornando-se a primeira linha de defesa referida como “imunidade passiva” (GUYTON, 2002).

A IgA que é secretada no processo de amamentação alcança o trato digestório do recém-nascido quando este ingere o leite materno, proporcionando-lhe maior imunidade em comparação à bebês que recebem leite de outras fontes como o leite de vaca e as fórmulas infantis (Nascimento e Issler, 2003).

O colostro apresenta quantidades significativamente maiores de imunoglobulinas do que o leite maduro, alcançando sua maior concentração nas primeiras 48 horas pós-parto. O soro do leite bovino apresenta 10 a 15% das suas

proteínas na forma de imunoglobulinas sendo que 0,6 a 0,9 mg/mL são encontradas na forma de IgG – a principal imunoglobulina desse composto (SGARBIERI, 2004)

2.3.1.3 - β - lactoglobulina

Essa proteína constitui cerca da metade das proteínas do soro do leite bovino e no leite humano ela não é encontrada. Pouco se sabe sobre sua ação fisiológica, contudo, além de ser ótima fonte de aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada, essa proteína carrega pequenas moléculas hidrofóbicas incluindo o ácido retinóico capazes de modular potencialmente as respostas linfáticas (MARSHALL, 2004). Há, entretanto certa controvérsia a respeito de suas propriedades fisiológicas sobre o possível efeito alergênico proveniente dessa proteína uma vez que não é encontrada no leite humano (RICHARDS, 2002).

2.3.1.4 - α - lactoalbumina

A α -lactoalbumina é umas das principais proteínas do leite humano e bovino perfazendo aproximadamente 50 e 25% do total das proteínas do soro, respectivamente, contendo uma ampla variedade de aminoácidos incluindo os essenciais e os de cadeia ramificada (SGARBIERI, 2004; VARNAM e SUTHERLAND, 1994).

A extração da α -lactoalbumina produz uma fração relativamente pura, a qual é comumente utilizada em fórmulas infantis por apresentar grande similaridade com a proteína do leite humano. Algumas indústrias, entretanto, visando redução de custos, utilizam técnicas mais simples, adicionando às fórmulas infantis, o soro do leite desmineralizado (MARSHALL, 2004).

2.3.1.5 - Lactoperoxidase

O soro do leite apresenta várias enzimas – hidrolases, transferases, liases, proteases, e lípases. A lactoperoxidase, uma enzima importante na composição do soro do leite, é a mais abundante e a maioria desaparece do soro com a

coagulação, no entanto não é inativada durante o processo de pasteurização. É encontrada na proporção de 0,25 a 0,5% do total de proteínas apresentando a capacidade de catalisar a formação de certas moléculas incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estas enzimas levam à peroxidação de tiocianato e algumas halidas (iodina e bromo) que por fim geram produtos que inibem e/ou matam uma série de espécies de bactérias (MARSHALL, 2004).

2.3.1.6 - Glicomacropéptídeos

Também referido como macropéptídeo da caseína, o glicomacropéptídeo (GMP) é uma proteína presente no soro do leite devido a ação da quimosina sobre a caseína no processo de formação de queijo sendo encontrado em concentrações de 10 a 15%. Esse composto somente é obtido quando utiliza-se a quimosina no processo, dessa forma, os queijos que não são fabricados com o uso da quimosina, não apresentam os GMP (MARSHALL, 2005; SGARBIERI,2004).

O GMP é altamente concentrado em aminoácidos de cadeia ramificada, mas é carente de aminoácidos aromáticos –fenilalanina, triptofano e tirosina, o que faz com que seja a única proteína naturalmente livre de fenilalanina e dessa forma segura para indivíduos com fenilcetonúria (MARSHALL,2004).

2.3.1.7 - Soro albumina

A soro albumina bovina compõe em torno de 10% das proteínas do soro e é rica em aminoácidos essenciais. Ela não é sintetizada na glândula mamária, mas é transportada passivamente para o leite via corrente sangüínea. Uma importante propriedade dessa proteína é inibir o crescimento de tumores e proteger lipídeos contra oxidação induzida por compostos fenólicos (MADUREIRA *et al.*, 2007).

2.3.2 – Produtos do soro do leite

O processamento do soro por variadas técnicas promove o rendimento de diferentes subprodutos que podem ser aplicados na indústria de alimentos no preparo de molhos, como emulsificantes, aplicação em fórmulas infantis, assim como no mercado esportivo por sua versatilidade e apelo: sabores variados, *shakes* na forma de pó, líquida, em barras e em variadas concentrações. Dentre os produtos comumente encontrados, citam-se:

- 1) Concentrados protéicos do soro do leite – pode ter diferentes concentrações dependendo da tecnologia aplicada, rendendo produtos com 35%, 50%, 65% ou até cerca de 80% de proteínas,
- 2) Isolados protéicos do soro do leite – representam a forma mais pura, contendo de 90 a 95% de proteínas,
- 3) Hidrolisados protéicos do soro do leite – obtido pela hidrólise parcial das proteínas contidas geralmente nos concentrados de maior teor protéico, portanto, apresentando também o teor médio de 80% de proteínas em sua composição.

2.3.3 – Características dos produtos do soro leite

Como a ação das proteínas do leite é facultativa à sua estrutura e composição de aminoácidos, deve-se considerar que as características físico-químicas dessas proteínas promovem diferentes respostas fisiológicas que são determinantes dos efeitos propostos. Segundo Boirie e colaboradores (1997), a velocidade de absorção pós-prandial das proteínas afeta sua síntese, quebra e deposição nos tecidos. Esses pesquisadores relatam que as proteínas do soro do leite induzem um aumento rápido da aminoacidemia por um curto período de tempo, enquanto as caseínas ao contrário, provocam um aumento prolongado, como um platô, porém de forma moderada, provavelmente devido ao seu lento esvaziamento gástrico.

De acordo com a velocidade de absorção das proteínas foi adotada a definição de “proteína rápida” ou “proteína lenta”. Assim, em estudo posterior conduzido pelo mesmo grupo (DANGIN *et al.*, 2001), foi constatado que uma

mistura de aminoácidos livres de mesma composição que a proteína intacta, apresenta mais rápida absorção, e que a estimulação da síntese protéica foi enfática e imediata após a ingestão de proteínas rápidas (PSL) enquanto que esse estímulo não foi prontamente evidenciado pela ingestão de proteínas lentas (caseína). Presume-se que uma proteína já considerada de rápida absorção como as PSL teriam sua absorção ainda mais rápida estimulando ainda mais a síntese protéica se esta fosse ingerida na sua forma hidrolisada, o que seria interessante na recuperação das proteínas teciduais.

Os benefícios da utilização de hidrolisados protéicos foram primeiramente relacionados ao seu caráter hipoalergênico. Na nutrição clínica, por exemplo, os hidrolisados protéicos do soro do leite vêm sendo utilizados como constituintes de formulações infantis para crianças com alergia às proteínas do leite de vaca (TERRACCIANO, 2002).

A hidrólise das proteínas provê frações protéicas – os peptídeos; que podem apresentar atividade imuno-moduladora. Esses peptídeos são parte da seqüência primária das proteínas ou podem estar naturalmente presentes no soro. São liberados durante a digestão no intestino e podem também ser obtidos por hidrólise enzimática *in vitro*. Contudo, a quantidade liberada no processo de digestão, segundo Gauthier (2006), é muito pequena para provocar efeitos significativos, abrindo espaço para a produção comercial em larga escala de concentrados de peptídeos bioativos usando a hidrólise enzimática e tecnologias de separação – uma realidade ainda pouco encontrada.

Apesar de atualmente os peptídeos serem considerados como potencial recurso terapêutico por modularem o sistema imune, não se pode deixar de mencionar que muitos estudos utilizando os concentrados do soro do leite bovino produziram resultados positivos nas pesquisas clínicas, que podem provavelmente estar associados às frações protéicas, mas que não deixaram de atribuir efeitos benéficos desses compostos mesmo em quantidades diminutas (MORENO *et al.*, 2006; RUTHERFURD-MARKWICK, 2005; DIAS, 2004; LOW *et al.*, 2003). Com isso, pode-se afirmar que muitos benefícios são encontrados com relação às PSL independentemente da forma com que elas são administradas, – concentrados, isolados ou hidrolisados – e que existe uma tendência em isolar os componentes

do soro, compreendendo individualmente sua ação no organismo (MADUREIRA *et al.*, 2007).

Os produtos do soro do leite são legalmente comercializados no Brasil de acordo com a Portaria n ° 222, de 24 de março de 1998 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), tendo esta, caracterizado os alimentos protéicos para atletas aqueles com, no mínimo, 65% de proteínas de qualidade nutricional equivalente às proteínas de alto valor nutricional, como as encontradas no leite e seus derivados.

2.4 - O uso das PSL em Exercícios de Resistência (*Endurance*)

A literatura científica acerca da utilização das PSL é bastante diversificada quanto aos seus efeitos em associação à atividade física. A primeira situação a ser identificada é o tipo de atividade física envolvida nos protocolos experimentais. Assim, serão considerados dois grandes grupos: os exercícios de força e os de resistência, independente da modalidade, mas atendo-se às características metabólicas dessas atividades. A revisão será enfocada na atividade de resistência por ter sido a utilizada no presente estudo.

Conforme a intensidade da atividade de resistência, a participação dos substratos energéticos para prover energia se modifica. Em exercícios de longa duração e alta intensidade ($\sim 85\% \text{VO}_{2\text{máx}}$) o glicogênio tem um papel mais enfático em suprir a demanda do que em atividades moderadas de menor requerimento de oxigênio ($\sim 60\% \text{VO}_{2\text{máx}}$). Entretanto, em ambos, a sua participação é importante para execução da atividade já que sua depleção está associada à fadiga e redução do desempenho. A suplementação com carboidratos promove a recuperação do glicogênio sendo sua utilização recomendada por especialistas (KERKSICK *et al.*, 2008).

Nos últimos tempos, os estudos com PSL têm demonstrado agregar qualidade na capacidade de recuperar, ou preservar, os níveis de glicogênio após o exercício. Morifuji *et al.* (2005b), por exemplo, avaliaram o efeito de dietas contendo proteínas do soro do leite em comparação à caseína e proteínas da soja

e verificaram que as PSL foram capazes de promover maiores estoques de glicogênio hepático em ratos treinados em esteira (25m/min, 30min/dia, 4x/sem). Os autores investigaram também, a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo hepático, constatando que aquelas envolvidas nas vias glicolítica e gliconeogênica eram diferentes entre os grupos com ingestão das diferentes proteínas: o grupo exercitado que recebeu PSL apresentou atividade mais elevada das enzimas desta segunda via, que os outros grupos. Adicionalmente, foi encontrado maior nível de alanina sérica com maior atividade da alanina aminotransferase hepática, sendo os resultados do estudo associados ao perfil aminoacídico das PSL que contém quantidades elevadas de BCAA. Esses aminoácidos, presentes em grande quantidade no músculo, teriam aumentado a degradação das proteínas musculares aumentando os seus níveis séricos e os disponibilizando para o metabolismo gliconeogênico. Embora não tenha sido evidenciado aumento na atividade da glicogênio sintase, segundo os autores, os precursores da síntese de glicogênio obtidos com a via gliconeogênica estimulada, poderiam ter resultado no aumento dos níveis de glicogênio hepático.

A preservação do glicogênio também foi constatada no estudo de Pimenta *et al.* (2006), ao avaliar ratos alimentados com PSL na forma intacta ou pré-hidrolisada em três condições experimentais: sedentários, treinados, e treinados submetidos a um teste de exaustão, verificando que passadas 48 horas após o exercício, os níveis de glicogênio, neste caso muscular, foram equivalentes em todos os grupos independentemente da dieta ou treino. Esse resultado foi avaliado como sendo positivo, indicando que mesmo havendo possível depleção do glicogênio muscular durante atividade, no período de recuperação, este voltou a níveis considerados normais já que foram similares aos níveis dos sedentários. Além disso, com o teste de exaustão aplicado aos animais, foi verificado que aqueles que receberam PSL hidrolisadas tiveram melhor desempenho permanecendo maior tempo em atividade. Os resultados dos níveis de albumina sérica elevados, e os de lactato diminuídos, também no mesmo grupo que mostrou melhor desempenho em comparação aos outros grupos, revelam uma possível superioridade dos hidrolisados protéicos do soro do leite em relação à forma intacta dessas proteínas.

Se o metabolismo de carboidratos é modificado pela ação conjunta da atividade física e das proteínas oferecidas na dieta como evidenciado nos trabalhos acima citados, pode-se esperar que outras fontes supram a demanda energética durante a atividade. A participação dos BCAA é reconhecida em atividades aeróbias, e o aumento da sua oxidação foi relacionado ao aumento concomitante da oxidação de ácidos graxos (AG) durante esse tipo de atividade, via ativação do complexo enzimático para o catabolismo de BCAA por ligantes, que nesse caso são os próprios AG, de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR α) que têm papel regulatório de genes envolvidos na captação e oxidação dos AG (SHIMOMURA *et al.*, 2004).

A participação conjugada dessas duas vias (catabolismo de AG e de BCAA) parece comandar a integração engenhosa das vias metabólicas que provêm os substratos energéticos requeridos durante a atividade, e as PSL se relacionam com esse cenário de forma a acentuar esse perfil, como relatado por Morifuji *et al.* (2005a), ao demonstrar aumento da oxidação dos AG propiciadas pela ingestão de tais proteínas. No estudo desses pesquisadores, a oxidação lipídica muscular foi verificada em ratos alimentados com PSL, os quais apresentaram maior atividade muscular das enzimas relacionadas à síntese de AG com paralela supressão de enzimas hepáticas e expressão de seus mRNA, do que os animais que receberam caseína como fonte protéica da dieta.

As características das PSL quanto à composição de seus aminoácidos, parecem ser a principal justificativa para as respostas metabólicas obtidas quando da sua utilização em associação a AF – elas provêm os BCAA em quantidades elevada (~25% do total de AA), e estes poderão ser oxidados durante o esforço exercendo um papel importante no metabolismo de carboidratos e ainda estão envolvidos na sinalização da síntese protéica (BLOMSTRAND *et al.* 2006; HOLECEK, 2002; ANTHONY *et al.*, 2001; BORGES *et al.*, 2001; HOOD *et al.*, 1990). Além disso, outras características dessas proteínas ainda não tão exploradas em atividades de resistência também indicam que elas podem ser benéficas para o organismo. Em recente estudo, foi demonstrado que PSL hidrolisadas diminuíram a atividade intestinal da glutaminase em ratos submetidos a exaustão em corrida de esteira, enquanto que o treinamento por si só, tendeu a

aumentá-la. Os resultados são consistentes com a conclusão de que o consumo de hidrolisados protéicos do soro do leite leva a pequena ou nenhuma modificação do sistema digestivo proteolítico, e que a diminuição da atividade da glutaminase deve estar associada a um efeito anti-estresse (NERY-DIEZ *et al.*, 2009). A ação imunomoduladora é outro exemplo do peculiar aproveitamento dessas proteínas e essa atividade está intrinsecamente relacionada ao conteúdo de glutathione intracelular (SMITHERS, 2008; MADUREIRA *et al.*, 2007; MARSHALL, 2004). Esse tripeptídeo será explorado a seguir, dada a relevância de sua atuação.

2.5 - Glutathione como agente antioxidante

A compreensão da atividade antioxidante promovida pelas proteínas do lactosoro é particularmente primordial para entender o modo pelo qual o soro do leite provê atividade imunoestimulatória. O fornecimento de proteínas ricas em cisteína auxilia a síntese de glutathione e esta é composta de glicina, glutamato, e cisteína. Tanto a cisteína quanto a glutamina são fundamentais na coordenação das respostas de células T de macrófagos e linfócitos (MARSHALL, 2004; WONG e WATSON, 1995). Durante a inflamação os macrófagos transportam a cisteína para o tecido afetado. A cisteína pode ser sintetizada a partir da metionina no fígado de indivíduos adultos ou pode ser obtida pela ingestão de proteínas que a contenham (GRIMM e KRAUS, 2001)

A glutathione atua na depuração do peróxido de hidrogênio que é uma espécie não radicalar que pode ser precursora do radical hidroxila – um dos radicais livres mais reativos no organismo. Quando há estresse oxidativo esta é depletada, o que geralmente ocorre na doença, infecção, trauma, medicação, cirurgia, e na atividade física; foco de estudo desse trabalho. Os antioxidantes são bem documentados por exercer papel vital na manutenção da saúde e prevenção de doenças (WU *et al.*, 2004a).

As moléculas de cisteína com suas ligações covalentes, quando estas apresentam forma íntegra, não desnaturadas, são a base para produção de glutathione na produção intracelular, tornando-se um aminoácido crítico por sua

necessidade (MARSHALL, 2005). A glutathiona é naturalmente encontrada em todas as células de mamíferos, sendo a principal defesa contra o estresse oxidativo. Os níveis de glutathiona diminuem com a ingestão insuficiente de nutrientes em virtude do metabolismo aumentado no caso de doenças ou na desnutrição protéica oriunda da falta de alimentos. A cisteína na sua forma combinada com a glutamina (glutamilcisteína) é o passo limitante para a produção de glutathiona, sendo assim a ingestão de proteínas com baixo teor de cisteína e/ou glutamina, limita a obtenção e disponibilidade de glutathiona (GRIMBLE e GRIMBLE, 1998).

Os aminoácidos glutamina e arginina são importantes para a síntese protéica de células imunocompetentes podendo ser caracterizados como aminoácidos condicionalmente indispensáveis em casos de doença e infecção (WHO, 2002). A arginina pode ser sintetizada a partir da citrulina no rim do adulto, mas uma carga adicional parece ser necessária durante estados hipercatabólicos e aumento do *turn over* protéico. Os linfócitos dependem da arginina para manter um crescimento celular normal (GRIMM e KRAUS, 2001). Já a glutamina é a mais importante fonte de nitrogênio no corpo humano e representa cerca de 20% do total de aminoácidos no plasma e 60% nos músculos. Apesar de quase todas as células processarem a glutamina sintetase para obtenção de glutamina a partir de glutamato, ainda assim é um aminoácido condicionalmente indispensável. O principal responsável pelo fornecimento endógeno da glutamina é o tecido muscular esquelético e em situações de hipercatabolismo é transportada do *pool* intracelular de aminoácidos livres para a corrente sanguínea para suprir outras demandas fazendo com que as concentrações dentro da célula diminuam requerendo a quebra de outras proteínas para sintetizar a glutamina a partir de outros aminoácidos (GRIMM e KRAUS, 2001; GRIMBLE e GRIMBLE, 1998).

O soro do leite não desnaturado é um bom precursor natural para a síntese de glutathiona, constituindo grandes quantidades de cisteína e glutamina não desnaturadas (MARSHALL, 2004) representando uma alternativa para aumentar os níveis de glutathiona.

2.6 - Marcadores biológicos

De acordo com Gleeson (2002), para um marcador ser considerado eficiente ele deve preencher os seguintes critérios: deve ser sensível a carga de treinamento, e de preferência não ser afetado por outros fatores como a dieta. As mudanças ocorridas nos marcadores devem ser detectadas antes de se atingir o estado de *overtraining*, onde ocorre um decréscimo do desempenho, e as alterações decorrentes da resposta aguda ao exercício devem ser diferenciadas das mudanças crônicas. Além disso, idealmente os marcadores devem ser fáceis de serem medidos e não muito caros.

O impacto causado pelo exercício nos níveis hematológicos é conhecido. Há relatos de aumento nos níveis de hemoglobina após o exercício devido primariamente à hemoconcentração pela perda de água, aumento no número de plaquetas circulantes, alterações em leucócitos elevando seus valores imediatamente após o exercício e permanecendo elevados ao longo de dias (WARDYN *et al.*, 2008). A relação dessas alterações fisiológicas com o comprometimento do desempenho em associação a diferentes fontes de proteínas na dieta ainda é pouco conhecida.

Contudo, o desempenho está também relacionado à indução de danos musculares pelo exercício, sendo um forte candidato para a diminuição temporária da *performance*. Sabe-se que atletas envolvidos com treino pesado apresentam elevação de proteínas musculares, como as enzimas creatina quinase (CK) e a lactato desidrogenase (LDH). Essas enzimas fornecem uma indicação do grau de adaptação metabólica do músculo esquelético ao treinamento físico. Ambas estão envolvidas no metabolismo muscular e suas concentrações são geralmente baixas, aumentando consideravelmente após exercício intenso e miopatia. A intensidade e a duração da atividade física são sugeridas como fatores relacionados aos danos musculares na dependência da sua quantidade (BRANCACCIO *et al.*, 2008; BRANCACCIO *et al.*, 2006; BRANCACCIO *et al.*, 2007).

O músculo não é o único tecido que reflete as mudanças provocadas pelo exercício físico. Enzimas hepáticas também apresentam alterações em suas atividades, sendo as aminotransferases comumente mensuradas para avaliar o dano hepático causado em decorrência ao treinamento físico intenso, bem como em doenças que acometem esse órgão. A alanina aminotransferase (ALT), produzida principalmente no fígado que, entre outros tecidos, catalisa a transferência de grupos amino entre L-alanina e L-glutamato. Já a enzima aspartato aminotransferase (AST), envolvida com a conversão de aspartato e α -ceto-glutarato em oxalacetato e glutamato, é encontrada no fígado em quantidades diminutas em relação a ALT, e está presente em tecidos como músculo, coração, rins, cérebro e pulmões. A ALT é um marcador considerado mais específico ao tecido hepático do que a AST, no entanto, a mensuração de ambas tem seu valor na distinção de hepatites e outras lesões do parênquima celular de demais tecidos que não o hepático (BESSA, 2008; SHIMOMURA, 2006a; SHIMOMURA 2006b; ARAÚJO, 2006). Considerando o grande trabalho muscular durante a atividade física, com enfática demanda energética, a participação das proteínas no metabolismo aumenta e o catabolismo de aminoácidos se intensifica. O teste de creatinina, que é um produto da degradação da fosfocreatina, pode ser utilizado para acompanhar alterações da massa muscular já que a obtenção desse produto é proporcional à sua utilização e em situação de normalidade da função renal seus valores são constantes.

Devido ao fato da atividade física intensa poder provocar aumento da produção de radicais livres, condição esta, que em desequilíbrio com os recursos antioxidantes do organismo leva ao estresse oxidativo, os compostos envolvidos nesse sistema funcionam como marcadores e podem evidenciar o dano muscular induzido pelo exercício. Como os eritrócitos são altamente expostos ao estresse mecânico e oxidativo, assim como a mudanças no pH extracelular e citosólico, induzidos pela atividade física, e devido a sua grande exposição a altas taxas de fluxo de oxigênio e altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, estes parecem ser mais vulneráveis às reações de óxido-redução durante o exercício intenso (PETIBOIS e DÉLÉRIS, 2005). A determinação de glutathione em eritrócitos e da enzima glutathione peroxidase envolvida no sistema antioxidante e

que catalisa a reação de oxidação da GSH com o peróxido de hidrogênio, podem ser uma estratégia para avaliar o nível de estresse oxidativo.

2.7 - Composição Corporal

As características de tamanho, forma, proporção e composição revelam que cada indivíduo apresenta uma determinada forma física. As variações individuais passaram a ser consideradas para melhor avaliação do perfil corporal já que este tem mudado ao longo dos últimos anos em virtude da crescente presença da obesidade (ELLIS, 2000). No âmbito esportivo, a avaliação antropométrica feita periodicamente pode auxiliar no acompanhamento da resposta adaptativa do organismo aos estímulos do treinamento físico, além de caracterizar as proporções corporais dos atletas, servindo até como ferramenta de distinção do perfil atlético para engajamento em determinada modalidade esportiva (HEYWARD e STOLARCZYK, 2000).

Diversas técnicas têm sido usadas desde o início dos primeiros estudos para análise da composição corporal, que se baseiam em duas formas de avaliar o corpo: uma delas é através de 'componentes químicos', que considera que somos compostos de água, gordura, proteínas e minerais; e a outra usa modelos de compartimento corporal, isto é, componentes definidos conforme o método empregado o qual não necessariamente coincide com estruturas anatômicas específicas. Os modelos de compartimento são classificados em simples, de dois, até modelos mais complexos, de vários compartimentos (multi-compartimental). No modelo clássico de dois compartimentos, o corpo é dividido em duas partes: uma consiste na gordura corporal e a outra, em todos os outros tecidos remanescentes sendo definida como massa livre de gordura, mais conhecida como 'massa magra'. Modelos que abarcam maior número de partes corporais distinguem os componentes da massa livre de gordura em conteúdo mineral ósseo e não ósseo, água e fluidos, e componentes viscerais (HENCHE e PELLICO, 2005; ELLIS, 2000).

Basicamente, existem dois tipos de acesso à composição corporal: métodos diretos e indiretos. O método direto é feito através da dissecação de cadáveres, já os métodos indiretos realizados *'in vivo'*, consideram variáveis químicas e estimativas das características teciduais (HENCHE e PELLICO, 2005). O estudo da carcaça de animais é um método direto de avaliação da composição química das estruturas moleculares corpóreas podendo traduzir as alterações ocasionadas pela alimentação e atividade física.

Embora os exercícios de força promovam com eficiência a hipertrofia muscular, nas atividades de resistência quando o trabalho é submáximo (60-70% do VO_2 máximo), a mobilização de lipídeos dos adipócitos ocorre de forma acentuada. A presença de ácidos graxos livres no sangue pode aumentar sua oxidação sendo estes então utilizados como substrato energético durante a atividade física, o que poderia assim reduzir a gordura corporal quando o gasto calórico superasse a ingestão calórica alimentar (SIFF e VERKHOSHANSKY, 2004; IKEDA *et al.*, 2002; CARTER *et al.*, 2001; POWERS e HOWLEY, 2000). Dessa forma, ambas podem modificar o perfil corporal, porém por diferentes vias.

Se por um lado as proteínas de alto valor biológico são genericamente recomendadas para aumentar a massa magra, por outro, o uso de proteínas específicas como as do soro do leite bovino que apresentam compostos bioativos e podem agir sinergisticamente com o cálcio lácteo, vêm sendo associadas à redução da massa de gordura corporal (ZEMEL, 2004), podendo ser uma estratégia interessante para obtenção de alterações da composição corporal já que esses dois benefícios podem ser concomitantemente desejados.

Dentre os efeitos das PSL, ao menos dois deles estão diretamente relacionados às alterações da massa magra (síntese protéica muscular) e da massa de gordura (lipólise) que caracterizam a composição corporal. Em associação à atividade física de resistência que proporciona maior mobilização de lipídeos dos adipócitos, essa união parece ser propícia ao manejo da gordura corporal.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar os efeitos do consumo de dietas contendo proteínas do soro do leite, nas formas intacta e pré-hidrolisada, no desempenho, composição corporal e parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos submetidos à atividade física em esteira.

Objetivos específicos

- ✓ Verificar o efeito das PSL em leucócitos, eritrócitos e plaquetas.
- ✓ Avaliar a capacidade antioxidante das PSL.
- ✓ Investigar a capacidade de proteção ao dano muscular.
- ✓ Avaliar o impacto das PSL sobre a composição corporal dos ratos.
- ✓ Comparar o estado sedentário *versus* treinado, quanto aos parâmetros analisados.
- ✓ Analisar os efeitos das PSL em comparação à caseína

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em três momentos, procurando-se seguir criteriosamente as mesmas condutas a fim de minimizar diferenças provocadas por fatores externos. A opção por fazer três experimentos foi pautada na viabilização de desempenhar as tarefas relativas ao protocolo experimental, uma vez que estas deveriam ser compatíveis com a capacidade de execução dos participantes engajados na pesquisa, além de utilizar maior número de animais quando os recursos para a análise permitissem, melhor caracterizando assim os resultados e tornando-os mais fidedignos. Portanto, a descrição dos métodos apresentada a seguir, é referente ao conjunto de análises realizadas, independentemente do ensaio em questão.

4.1 - Animais

Ratos Wistar machos com 21 a 23 dias de vida e peso de $58,7 \pm 6,8$ g foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Eles foram alojados em ambiente com temperatura controlada (21-23°C), umidade relativa de 50 a 60%, e ciclo claro-escuro invertido de 12 horas. Para cada ensaio, foram utilizados de 6 a 8 animais em cada grupo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (Protocolo nº 1235-1)

4.2 - Dietas

As dietas experimentais foram elaboradas de acordo com o protocolo do American Institute of Nutrition para ratos em manutenção – AIN 93-M (Reeves et al., 1993). Foram utilizadas como fontes protéicas, a caseína (CAS) obtida de fornecedor local, e as PSL doadas pela *Hilmar Ingredients* (Califórnia-USA) nas formas intacta (WPI 9400) ou pré-hidrolisada (WPH 8360), com grau de hidrólise

de 12,5% de acordo com dados do fabricante. O conteúdo de proteínas das fontes, calculado como concentração de nitrogênio usando-se como fator de conversão para produtos lácteos o valor de 6,38, foi mensurado pelo método Kjeldahl (AOAC,1995). Quando os resultados das análises das fontes protéicas foram superiores ou inferiores ao proposto no protocolo AIN- 93M, estes foram compensados pela adição ou subtração de carboidratos em quantidades proporcionais aos três tipos que devem compor a dieta (sacarose, amido de milho e amido dextrinizado), visando manter todas as dietas experimentais isoenergéticas e com valores protéicos semelhantes. Os valores utilizados para cada ingrediente da dieta estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/kg de dieta) conforme protocolo AIN93-M

	DIETAS		
	CAS ¹	WPI ²	WPH ³
Caseína	143,27	-	-
WPI ²	-	135,07	-
WPH ³	-	-	140,06
Amido de Milho	463,58	468,87	465,66
Sacarose	99,54	100,68	99,99
Amido Dextrinizado	154,30	156,06	154,98
Mix Mineral	35	35	35
Mix Vitamínico	10	10	10
Óleo de soja	40	40	40
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
Celulose	50	50	50
L-cistina	1,8	1,8	1,8
<i>tert</i> -butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008

1 - CAS: caseína

2 - WPI: proteínas do soro do leite intactas

3 - WPH: proteínas do soro do leite hidrolisadas

Os valores das fontes protéicas correspondem à quantidade necessária para obter o nível de 12% de proteína, recomendado no protocolo AIN 93-M.

4.3 - Protocolo Experimental

Todos os animais tiveram livre acesso à água e dieta comercial (Labina, Purina, Brasil) por 5 semanas até atingirem dois meses de vida. Nas duas últimas semanas desse período de crescimento, eles foram submetidos a uma adaptação à atividade física, sendo colocados para andar na esteira a 12m/min, por 10 minutos, cinco vezes na semana. Para cada um dos três experimentos realizados, utilizou-se inicialmente o dobro de ratos necessários para totalizar ao menos 6 ratos por grupo. Essa adaptação permitiu selecionar os animais que andavam espontaneamente, daqueles que se recusavam a andar, sendo estes últimos rejeitados e encaminhados a outros estudos. Os animais selecionados, considerados aptos a executar o protocolo de atividade física, foram aleatoriamente separados em dois grupos – sedentários (S) ou treinados (T) – e estes foram então subdivididos em outros três que receberam um dos tipos de dieta experimental (Figura 1). Os ratos que foram destinados a serem exercitados perfizeram um protocolo em esteira de 5 dias de atividade na semana, com velocidade e tempo progressivos até completarem 9 semanas (Figura 2), conforme proposto por pesquisadores do Laboratório de Bioquímica do Exercício – LABEX do Instituto de Biologia da UNICAMP. A recente publicação (HOHL *et al.*, 2009) de resultados obtidos com esse modelo, evidencia a opção em manter os animais até a nona semana de treinamento, pois nesse período estariam plenamente adaptados.

4.4 - Evolução Ponderal e Consumo

Os ratos foram pesados periodicamente a cada mudança de fase do treinamento e o consumo médio de dieta foi mensurado de acordo com a diferença da quantidade de dieta oferecida e a quantidade rejeitada.

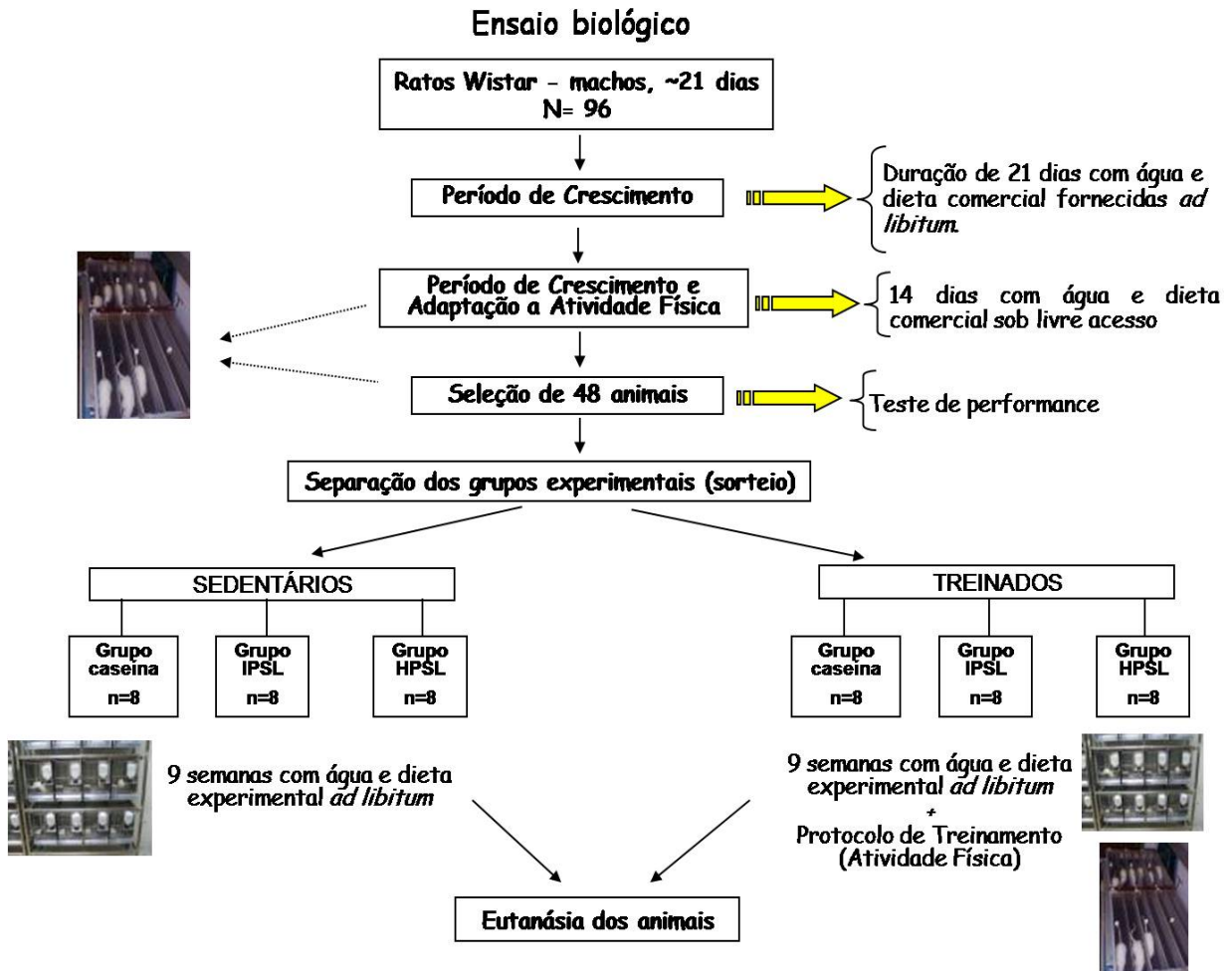


Figura 1. Desenho Experimental Geral utilizado para execução dos ensaios

A divisão dos grupos é correspondente ao tipo de proteína oferecida na dieta:

1 - Caseína, 2 - IPSL: Isolado protéico do soro do leite, ou 3 - HPSSL: Hidrolisado protéico do soro do leite

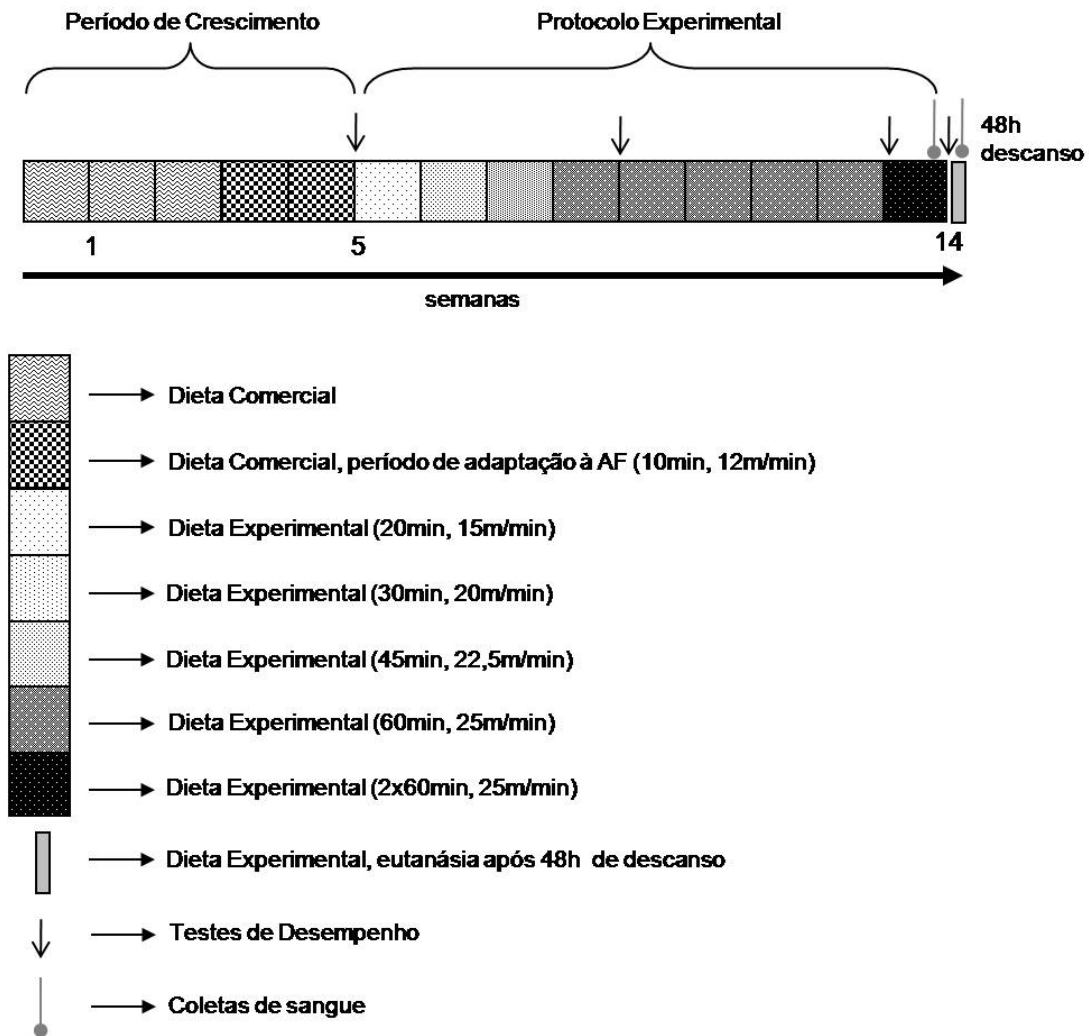


Figura 2. Diagrama esquemático do ensaio: tratamento dietético, protocolo de atividade física (AF), testes de desempenho e coletas de sangue.

* Os valores entre parênteses correspondem ao tempo e velocidade da AF

4.5 - Teste de desempenho

O desempenho dos animais foi avaliado 4 vezes durante o protocolo: após as duas semanas de adaptação à atividade física e ao final da 4^a, 8^a e 9^a semanas. Esse teste consistiu em manter os animais correndo, aumentando progressivamente a velocidade da esteira, pelo máximo tempo que conseguissem, sendo considerados exaustos e retirados do teste se permanecessem por até 30 segundos na base elétrica da esteira. A Tabela 2 contém as características de velocidade e tempo adotados para execução do teste.

Tabela 2: Protocolo do teste de desempenho.

Tempo (min)	Velocidade (m/min)	
Início	12	
2	13	
4	14	
6	15	Incremento de 1 m/mim a cada 2 minutos
8	16	
10	17	
12	18	
14	19	
16	20	
18	22	Incremento de 2 m/mim a cada 3 minutos ATÉ EXAUSTÃO
21	24	
24	26	
27	28	
30	30...	

4.6 - Coletas de sangue

Realizadas em dois momentos:

- Análise hematológica – 24 horas após o último treino da 9ª semana
- Análise bioquímica – 48 horas após o teste de desempenho realizado ao final da 9ª semana

Os momentos de coleta de sangue dos animais foram executados visando avaliar o efeito crônico da utilização das PSL sobre os parâmetros hematológicos, em uma condição em que os ratos estariam adaptados à atividade física. Já as análises bioquímicas foram realizadas 48 horas após a condição de esforço máximo, por ser esse o período em que a maioria das enzimas analisadas estaria em seu pico de concentração. Em ambas situações, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina e sedados com cloridrato de xilazina, e o sangue coletado do plexo retro-orbital.

4.7 Análise hematológica

Foi realizada contagem automatizada completa, em sangue coletado em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e analisados no aparelho Sysmex 9500 counter, identificando quantitativamente os seguintes parâmetros:

	Série Branca	Série Vermelha	Plaquetas
	Leucócitos	Eritrócitos	Plaquetas
<i>Diferencial</i>	Linfócitos	Hemoglobina	VMP ⁵
	Neutrófilos	Hematócrito	
	Monócitos	VCM ¹	
	Eosinófilos	HCM ²	
	Basófilos	CHCM ³	
			RDW-CV ⁴

1-Volume Corpuscular Médio, 2-Hemoglobina Corpuscular Média, 3-Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, 4- *Red blood cell distribution width*: amplitude de distribuição das células vermelhas, 5-Volume Médio de Plaquetas

4.8 - Análises bioquímicas

4.8.1 – Marcadores

As concentrações séricas dos marcadores bioquímicos foram obtidas usando kits comerciais e suas recomendações de procedimento. O espectrofotômetro DU 640 Coulter (Beckman –USA), foi utilizado para leitura das análises.

4.8.1.1 - Creatina quinase (CK)

LABORLAB[®], CK-NAC método cinético, CAT N° 06100 – 20µL de amostra foram adicionados a 1 mL de reagente (imidazol pH 6,7, 100mmol/L; creatina fosfato, 30mmol/L; glicose 20mmol/L; n-acetilcisteína, 20mmol/L; acetato de magnésio, 10mmol/L; EDTA, 2mmol/L; ADP, 2mmol/L; AMP, 5mmol/L; di(adenosina-5) pentafofato, 10 µmol/L; NADP, 2mmol/L; glicose-6-fosfato desidrogenase, >1,5 kU/L; hexoquinase, >2,5 kU/L). A absorbância foi lida 4 vezes, a 340nm: a primeira leitura 3minutos após a mistura, e as outras três com 1 minuto de intervalo entre elas. Os resultados, expressos em U/L foram obtidos usando a seguinte equação:

$$CK (U/L) = \Delta A/\text{min} \times 8095.$$

4.8.1.2 - Lactato desidrogenase (LDH)

LABORLAB[®], LD método cinético, UV, CAT N° 02400. Foram adicionados 50µL de amostra a 1 mL do reagente contendo tampão fosfato pH 7,5 e NADH. A absorbância foi lida 4 vezes a 340 nm: a primeira leitura 1 minuto após a elaboração da mistura, e as outras três, a cada um minuto de intervalo. O resultado, expresso em U/L, foi obtido usando a equação:

$$LD (U/L) = \Delta A/\text{min} \times 3333.$$

4.8.1.3 - Aspartato aminotransferase (AST)

LABORLAB[®], AST método cinético - UV, CAT N° 00300 – 200µL da amostra foi adicionado a 1mL do reagente (Tris 80 mmol/L pH=7,8; 30°C); L-aspartato 240mmol/L; NADH 0,18 mmol/L; malato desidrogenase ≥420 U/L; lactato desidrogenase ≥600 U/L; 2-

oxoglutarato 12mmol/L. A absorbância foi lida 4 vezes a 340 nm: a primeira 3 minutos após a elaboração da mistura e as outras três com 1 minuto de intervalo entre elas. O resultado expresso em U/L foi obtido usando a equação:

$$\text{AST (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 952$$

4.8.1.4 - Alanina aminotransferase (ALT)

LABORLAB[®], ALT método cinético - UV, CAT N° 00200 – 200µL de amostra foram adicionados a 1 ml do reagente (Tris 100mmol/L pH=7,5; L-Alanina, 500mmol/L; NADH, 0,18mmol/L; Lactato Desidrogenase \geq 1200U/L; 2-oxoglutarato, 15mmol/L). A absorbância foi lida 4 vezes a 340 nm: a primeira 3 minutos após a elaboração da mistura e as outras três com 1 minuto de intervalo entre elas. O resultado expresso em U/L foi obtido usando a equação:

$$\text{ALT U/L} = \Delta A/\text{min} \times 1159.$$

4.8.1.5 – Creatinina

LABORLAB[®], Creatinina Fast método cinético, CAT N° 08700 – 100µL de amostra foi adicionado a 1 ml de reagente (Solução de ácido pícrico 25 mmol/L, solução de glicina - NaOH 0,2mol/L). A absorbância foi lida duas vezes a 500 nm: a primeira, em 30 segundos após a mistura e a outra, 60 segundos após a primeira leitura. O resultado foi obtido usando a seguinte equação:

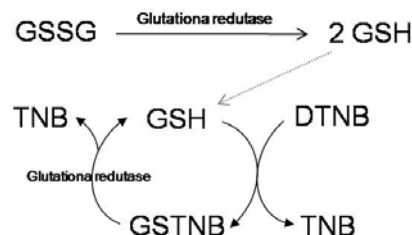
$$\text{Creatinina mg/dL} = (A2 - A1)_{\text{amostra}} \times f, \quad \text{onde} \quad f = 2(\text{mg/dL}) / (A2 - A1)_{\text{padrão}}$$

4.8.2 – Sistema antioxidante Glutaciona

Para determinação da glutaciona total e da enzima glutaciona peroxidase foi utilizado lisado de eritrócitos centrifugando o sangue coletado em tubos com anticoagulante, por 10 minutos a 4°C (700-1000xg). A camada superior (plasma) e a intermediária (leucócitos) foram desprezadas para essa análise. O remanescente foi acrescido de água com quatro vezes o seu volume para ruptura dos eritrócitos. Posteriormente foi centrifugado, e o sobrenadante utilizado para as análises de glutaciona total (tGSH) e da enzima glutaciona peroxidase (GPx).

4.8.2.1 - Determinação da Glutathiona Total (tGSH-GSSG)

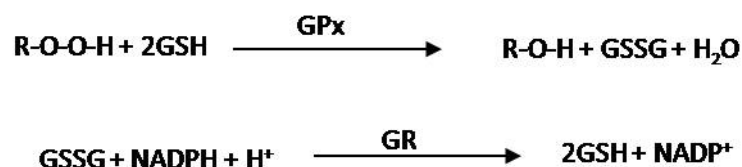
O método para determinação da glutathiona total foi realizado por Kit comercial da Cayman (Glutathione Assay Kit/ Catalog No. 703002), o qual utiliza um método enzimático, com glutathiona redutase (GR) para a quantificação da glutathiona reduzida (GSH). O grupo sulfidríla da GSH reage com DTNB, produzindo um ácido amarelo na reação – ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). O dissulfeto GSTNB, produzido concomitantemente na reação é reduzido pela glutathiona redutase para ressintetizar a GSH e produzir mais TNB:



A taxa de produção de TNB é diretamente proporcional a reação de ressíntese que é por sua vez proporcional a concentração de GSH na amostra. A medida da absorbância em 404 ou 414 nm produz uma estimativa acurada da GSH na amostra, porém, devido ao uso da Glutathiona redutase nesse método, tanto a GSH quanto a GSSG são determinadas no ensaio refletindo a glutathiona total.

4.8.2.2 - Determinação da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A GPx foi determinada por método enzimático utilizando o kit comercial da Cayman (Catalog. N.703102). A GPx catalisa a redução de hidroperóxidos incluindo os peróxidos de hidrogênio na presença de glutathiona reduzida (GSH). Esse ensaio mede a atividade da GPx de forma indireta por reação acoplada a glutathiona redutase (GR). A produção de glutathiona oxidada (GSSG), pela redução de hidroperóxidos pela ação da GPx é reciclada a seu estado reduzido pela GR e NADPH:



A oxidação do NADPH a NADP⁺ é acompanhada de um decréscimo da absorvância a 340nm. Em condições em que a atividade da enzima é limitada, a taxa de decréscimo em A₃₄₀ é diretamente proporcional a atividade da GPx na amostra.

4.9 - Composição corporal

Os ratos, após serem anestesiados para a coleta de sangue, foram submetidos à eutanásia por destroncamento cervical, suas vísceras foram seccionadas e pesadas a fresco. Os fêmures utilizados como parâmetro para avaliar a ossatura, foram separados do tecido muscular e tendões até ficarem parcialmente limpos. Após essa limpeza prévia, foi usada a técnica de maceração, onde os ossos foram submersos em água não filtrada e ali permanecendo para ação de bactérias sobre os tecidos a qual tornava a água levemente turva. A água foi trocada periodicamente para evitar o odor desagradável. Alguns pedaços de tecido aderidos ao osso foram retirados manualmente a cada troca, com ajuda de um bisturi. Esse procedimento foi repetido várias vezes até que a água permanecesse limpa, indicando que a ação bacteriana havia terminado. Os ossos limpos e secos foram pesados em balança analítica digital e o comprimento foi medido usando-se um paquímetro.

As carcaças dos ratos sem as vísceras foram secas em estufa e posteriormente trituradas para determinação de lipídios, proteínas e cinzas totais utilizando-se os seguintes métodos: proteína bruta pelo método semimicro Kjeldahl, considerando 6,25 como fator de conversão de nitrogênio para proteína (AOAC, 1995); lipídeos totais (BLIGH e DYER, 1959); cinzas e umidade (AOAC,1995).

4.10 - Tratamento Estatístico

Os resultados foram submetidos a análise de variância de uma via (One-way ANOVA) e pós-teste de Tukey (MATLAB – Version 7.0), considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre médias. Em alguns

casos, após verificar a distribuição da amostra, utilizamos teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Gráficos do tipo *boxplot* foram utilizados na exposição de alguns resultados, por acreditarmos ser mais fácil a visualização das diferenças e clareza do fenômeno observado. As informações nele contidas abarcam a mediana e a variação do grupo em quartis, além de apontar os dados considerados *outliers*, que são classificados como fora do padrão, quando estes estavam presentes. No teste ANOVA esses valores foram considerados.

A comparação dos resultados entre cada grupo individualmente, permitiu ser verificado que havia um comportamento freqüente que parecia ser inerente ao treinamento e não à dieta. Então, foram considerados dois grupos de animais: os sedentários e os treinados, independentemente da dieta oferecida, para verificar se haveria diferença estatística confirmando o que havia sido identificado na análise individual.

5. RESULTADOS

Durante o protocolo experimental, acompanhou-se o peso e a ingestão de dieta dos animais. A evolução ponderal, demonstrada na Figura 3, mostra que os animais tiveram ganho de peso similar independentemente da fonte protéica oferecida ou da prática de atividade física. Os pontos apresentados que se referem aos momentos de mensuração do peso, foram baseados no protocolo de AF, pois seriam possíveis fatores de influência no ganho de peso, já que haveria maior recrutamento metabólico. Contudo, os animais mostraram boa adaptação à exigência física que lhes foi requerida, visto o ganho de peso equiparado aos sedentários.

Foi identificada diferença estatística entre os grupos HS e IT no início da adaptação e posteriormente, no início do treinamento entre CS e IS, e, CT e HT que não perpetuou nas mensurações subseqüentes. Ressalta-se que o peso após a oitava semana de treino não apresentou alterações importantes quando comparado com as mensurações feitas após a nona semana de treino e o peso pré-morte dos animais desse ensaio. Esse resultado nos leva a crer que o crescimento dos animais com 16 semanas de vida teria chegado ao seu limite, passando a partir dessa fase a se manter estável quando da ingestão adequada de dieta e sem demais alterações no treinamento além da qual já tinha sido executada – dois treinos ao dia na nona semana.

A média de consumo diário de cada grupo é mostrada na Figura 4. Apenas o grupo CS se destacou quanto ao consumo de dieta ao longo do experimento, com ingestão levemente superior e com divergência estatística aos demais grupos, com exceção do grupo IT. Apesar desse maior consumo, os animais desse grupo não apresentaram ganho de peso que fosse enfático a ponto de se diferenciarem dos outros animais, como visto no gráfico da evolução ponderal. A presença de *outliers* evidencia que determinados animais não se enquadram no padrão de consumo encontrado, no entanto, seus dados foram considerados na análise estatística. Assim, como se considera as médias das amostras para execução das análises, talvez as variações dos resultados tenham sido suficientes para

apresentar diferença para esse grupo, mas que não permite ser feita a associação simplista, de que aqueles que ingerem mais dieta são os que apresentam maior ganho de peso.

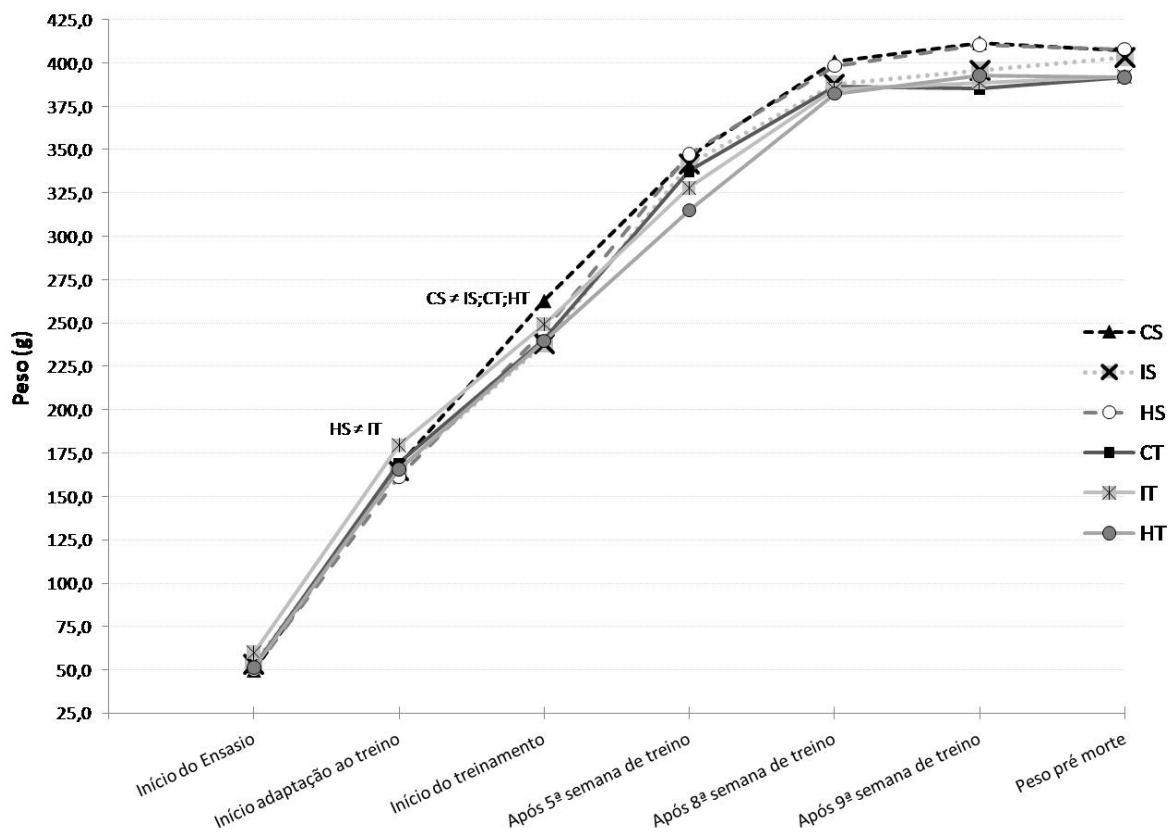


Figura 3. Média da evolução ponderal dos ratos (n=21-23/grupo) sedentários (S) e treinados (T) alimentados com três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H). Diferenças estatisticamente significante entre os grupos ($P < 0,05$), estão demonstradas acima dos pontos referentes a cada marca de escala.

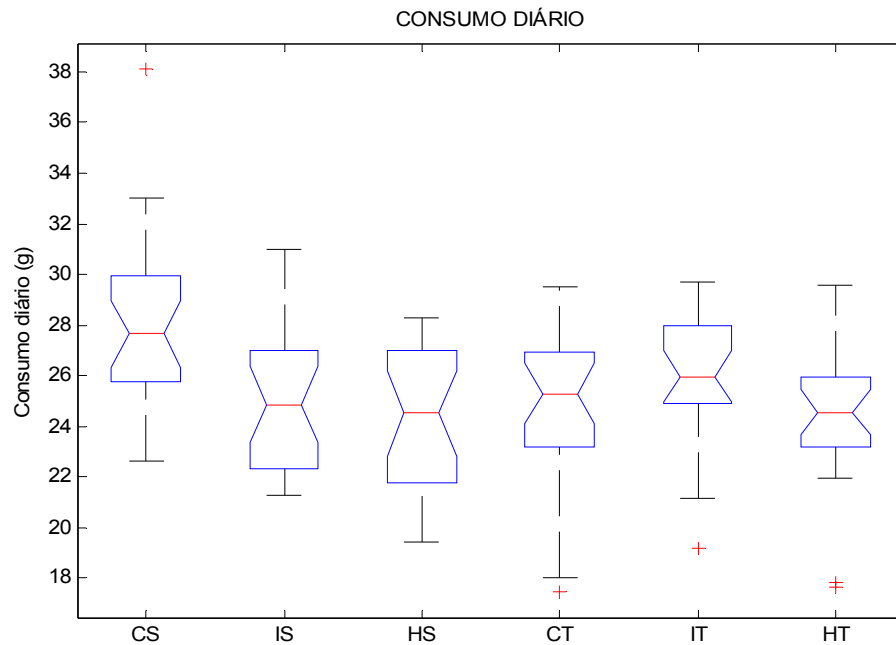


Figura 4. Consumo médio de dietas experimentais por ratos sedentários (S) ou treinados (T) alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H) (n=8/grupo). De acordo com o teste ANOVA, CS é significativamente diferente dos demais grupos com exceção do grupo IT ($p < 0,05$). (+: outliers)

Com o teste de desempenho foi possível verificar que os animais tiveram uma adaptação ao treinamento: a cada teste executado houve incremento de tempo (Figura 5). Entretanto, nota-se que da 4^a para a 8^a semana, período em que os animais já haviam alcançado o máximo tempo e velocidade proposto no protocolo, não houve diferença estatística significativa. Já após um novo desafio ter sido imposto – o aumento na frequência diária de treino – pôde-se observar que o grupo IT mostrou melhora no rendimento.

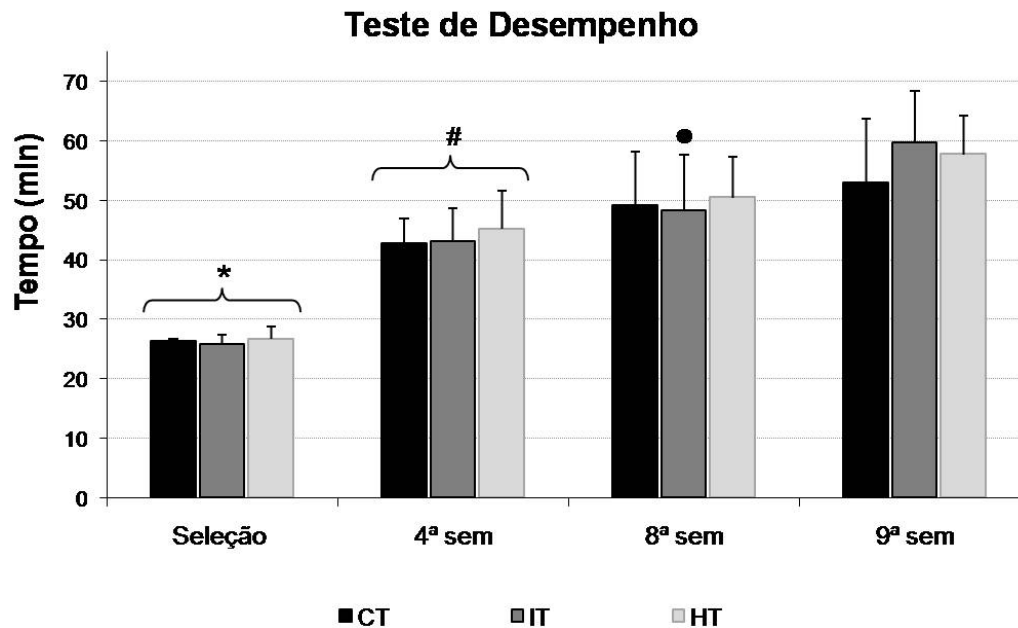


Figura 5. Apresentação dos testes de desempenho realizados ao longo do protocolo experimental, executados pelos grupos treinados (T) e alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H). (n=21-23). Não houve diferença estatística entre os grupos no mesmo teste. O teste ANOVA mostrou significância de um teste para outro: * significativamente diferente de seus pares a cada teste e para todos os testes ($p < 0,001$), # significativamente diferente de seus pares para o teste da 9ª semana ($p < 0,05$; 0,001 e 0,01 respectivamente aos grupos CT, IT e HT), ● significativamente diferente de seu par para o teste da 9ª semana ($p < 0,05$).

Se alguma vantagem pode ser associada ao tipo de proteína da dieta, esta seria então vinculada às PSL intactas, já que o único grupo a apresentar evolução do tempo do teste da 8ª para a 9ª semana foi o grupo IT. Porém, ao passo que a adaptação ao treinamento foi presente em todos os grupos de forma homogênea, ou seja, todos os grupos apresentaram aumento do tempo do primeiro teste realizado após início do protocolo de treinamento (4ª semana) em comparação ao último (9ª semana), a fonte protéica oferecida na dieta, se de fato justificar a diferença, parece influenciar o rendimento dos ratos apenas quando há um maior desafio, como o ocorrido na 9ª semana.

Os resultados hematológicos foram primeiramente analisados grupo a grupo e posteriormente quanto à condição de atividade física, agrupando animais sedentários *versus* treinados, desconsiderando o tipo de proteína. Esse agrupamento foi feito devido ao fato de ter sido encontrado um padrão repetitivo dos resultados, em que os animais treinados independente do grupo em que estavam inseridos, apresentavam valores ligeiramente inferiores aos sedentários, mostrando ser esse um fenômeno decorrente do treinamento e não da dieta ingerida. Ao reunir os dados em somente dois grupos, já que as proteínas pareciam não ter influenciado os resultados, viu-se que de fato o treinamento exercia influência sobre os parâmetros e com significância estatística. Um exemplo ilustrativo dos resultados dessa análise pode ser visto com os dados de leucócitos nas Figuras 6 e 7. Os demais parâmetros foram analisados dessa mesma forma e os resultados são apresentados na Tabela 3. Os dados estatísticos, em que foram incluídos os *outliers*, são referentes ao teste ANOVA, tendo sido apontadas apenas as diferenças com significância estatística em que foram comparados os resultados dos animais pertencentes à mesma condição de atividade física (sedentários ou treinados) analisando a influência da fonte proteica da dieta, e entre aqueles que receberam a mesma dieta, verificando o efeito do treino. Os valores médios e o desvio-padrão de cada grupo e parâmetro podem ser visualizados no Apêndice I.

Com as informações contidas na Tabela 3, nota-se que os animais que receberam dieta contendo PSL intactas apresentaram diferença com significância estatística na análise individual, mostrando que o treinamento influenciou os valores da série vermelha e o volume de plaquetas (VMP) já que sedentários se diferiram dos treinados. O único parâmetro que mostrou ser influenciado pela dieta foi o RDW-CV, em que ratos treinados que receberam caseína se diferenciaram daqueles que receberam as PSL intactas. Já com o agrupamento dos dados, vê-se que tanto a série branca quanto a vermelha, mostra diferenças entre sedentários e treinados. Salienta-se que os valores de animais treinados foram inferiores aos sedentários, com exceção dos parâmetros RDW-CV e VMP.

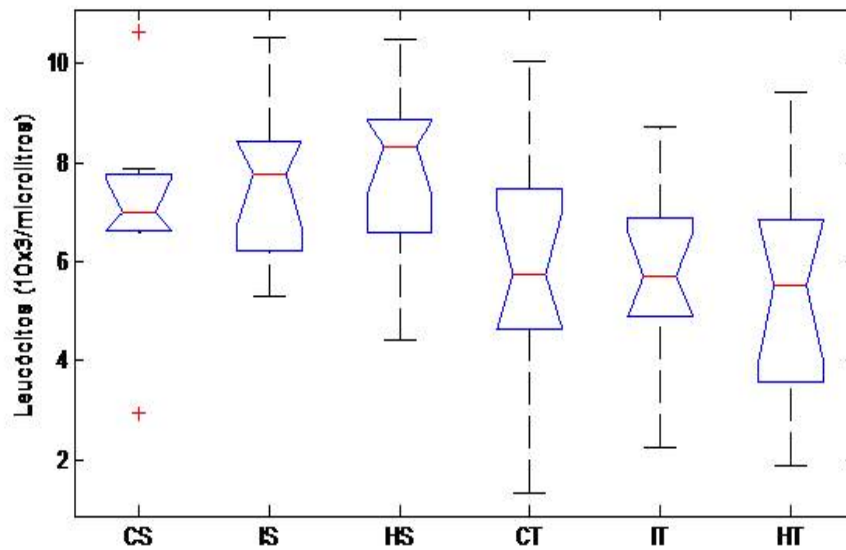


Figura 6. Valores de leucócitos de ratos sedentários (S) e treinados (T) alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H) (n=10-12/grupo). De acordo com o teste ANOVA, não houve diferença entre nenhum grupo.

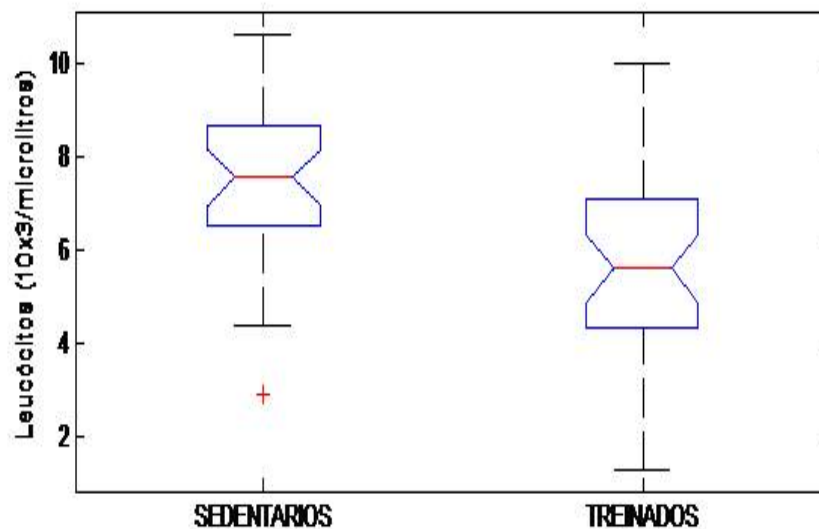


Figura 7. Valores de leucócitos de ratos sedentários (S) ou treinados (T). (n=30 e 35, respectivamente). De acordo com o teste ANOVA, os grupos são diferentes ($p < 0,0007$).

Tabela 3. Perfil hematológico de ratos com 16 semanas de vida, submetidos ou não à atividade física.

PARÂMETRO	Análise Individual	Análise Agrupada		Valor de p
	Comparação entre os 6 grupos (n=10-12/grupo)	Sedentários (n=30)	Treinados (n=35)	
Leucócitos	Nd	>	<	0.0007
Linfócitos	Nd	>	<	0.0004
Neutrófilos	Nd	Nd	Nd	
Eosinófilos	Nd	>	<	0.0017
Monócitos	Nd	Nd	Nd	
Basófilos	*	*	*	
Hematócrito	IS ≠ IT (0.0052)	>	<	0.0006
Eritrócitos	IS ≠ IT (0.0118)	>	<	0.0006
Hemoglobina	Nd	>	<	0.0305
RDW-CV ¹	IS ≠ IT (0,0009)	<	>	0.0004
	CT ≠ IT (0,0018)			
VCM ²	Nd	Nd	Nd	
HCM ³	Nd	Nd	Nd	
CHCM ⁴	Nd	Nd	Nd	
Plaquetas	Nd	>	<	0.0233
VMP ⁵	IS ≠ IT (0.0002)	<	>	0,0001

1-Red blood cell distribution width: amplitude de distribuição das células vermelhas, 2-Volume Corpuscular Médio, 3-Hemoglobina Corpuscular Média, 4-Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, 5-Volume Médio de Plaquetas

Na coluna de comparação entre os 6 grupos, quando houve diferença estatística, os grupos que se diferiram são mostrados com o sinal de diferente (≠), e valor de p entre parênteses.

Nd = não diferiu; os grupos não apresentaram diferença entre eles

> = houve diferença e o resultado foi maior

< = houve diferença e o resultado foi menor

* Não foi possível realizar a análise

Os valores das concentrações séricas dos marcadores bioquímicos, determinados em sangue coletado após 48 horas do último teste de desempenho estão demonstrados na Tabela 4. Tal como na Tabela 3, foram apontadas somente as diferenças com significância estatística da comparação dos resultados dos animais pertencentes à mesma condição de atividade física, permitindo avaliar a influência da fonte protéica da dieta, e também entre aqueles que receberam a mesma dieta, verificando o efeito do treino. Os valores médios e desvio-padrão de cada grupo e parâmetro podem ser visualizados no Apêndice II.

Como pode ser visto na coluna em que estão expostos os resultados de comparação individual, foi evidenciada diferença significativa entre grupos que receberam a mesma dieta em condições diferentes de atividade física: sedentários *versus* treinados, nas análises de AST, ALT, LDH e creatinina. Somente os resultados de tGSH-GSSG apresentaram significância estatística quanto à comparação de dietas, apontando diferença entre os grupos CS e IS. Reforçando o que foi encontrado na análise individual e seguindo o modelo de agrupamento dos animais de acordo com a prática ou não de atividade física, constatamos mais uma vez que o treinamento foi o principal fator para provocar alterações nesses marcadores.

Tabela 4. Marcadores bioquímicos de ratos submetidos ou não à atividade física

PARÂMETRO	Análise Individual		Análise Agrupada		Valor de p
	Comparação entre os 6 grupos (n=10-12/grupo)		Sedentários (n=30)	Treinados (n=35)	
AST	CS ≠ CT (0,0001)		>	<	0,0001
	HS ≠ HT (0,0001)				
ALT	CS ≠ CT (0,0062)		>	<	0,0023
CK	Nd		>	<	0,0006
LDH	IS ≠ IT (0,018)		>	<	0,0072
Creatinina	HS ≠ HT (0,0091)		>	<	0,0111
tGSH-GSSG	CS≠IS (0,0049)		Nd	Nd	
GPx	Nd		Nd	Nd	

Na coluna de comparação entre os 6 grupos, quando houve diferença estatística, os grupos que se diferiram são mostrados com o sinal de diferente (≠), e valor de p entre parênteses

Nd = não diferiu; os grupos não apresentaram diferença entre eles

> = houve diferença e o resultado foi maior

< = houve diferença e o resultado foi menor

A atividade física mostrou-se eficiente na alteração da composição corporal. Na Figura 8 estão representados os dados da composição centesimal da carcaça de ratos, em base seca. Pode-se notar que o perfil de lipídeos é alterado do estado sedentário para o treinado: em animais submetidos ao treinamento verifica-se diminuição dos lipídeos com significância estatística para os grupos IS *versus* IT, e HS *versus* HT. A redução dos lipídeos leva a um conseqüente aumento proporcional das proteínas, mas este não foi estatisticamente evidenciado. Apesar de ter havido modificação da composição centesimal em decorrência ao treino, constatou-se que as dietas não promoveram qualquer alteração que fosse significativa nem em animais sedentários, nem em treinados. Salienta-se a observação de que as PSL apresentaram significância na redução de lipídeos em animais treinados que não foi vista com a dieta contendo caseína, e talvez este seja um diferencial dessas proteínas. O agrupamento dos animais enfatiza a diferença entre sedentários e treinados quanto ao teor de lipídeos e proteínas, caracterizando o efeito do treino sobre esses parâmetros (Figura 9).

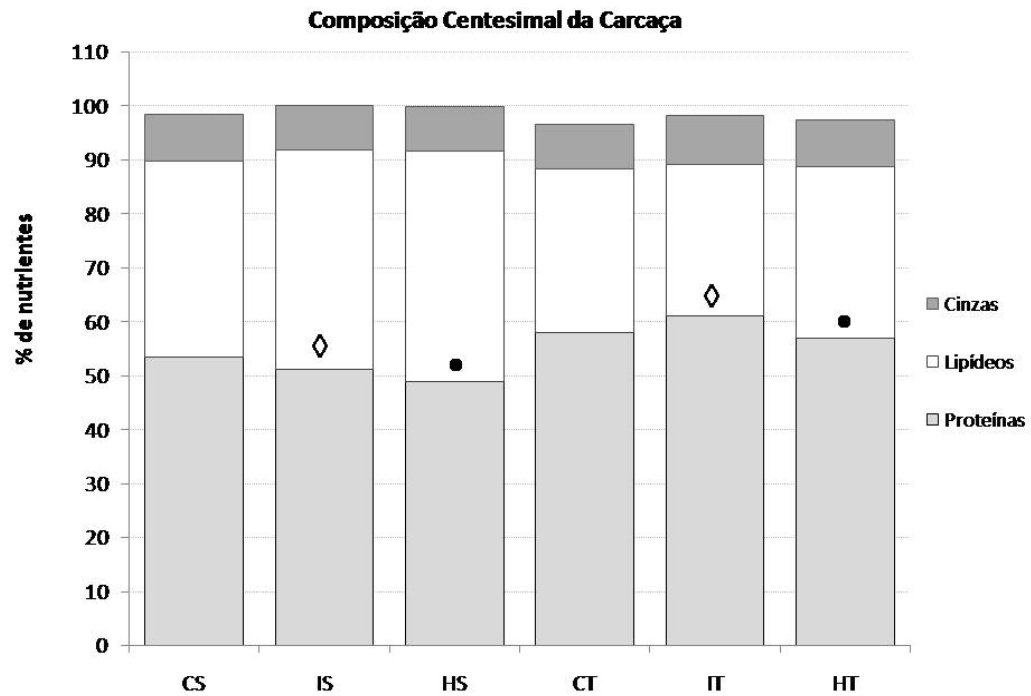


Figura 8. Composição centesimal da carça de ratos sedentários (S) e treinados (T) alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H) (n=8/grupo). Os símbolos iguais no interior da barra indicam que houve diferença de acordo com o teste ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

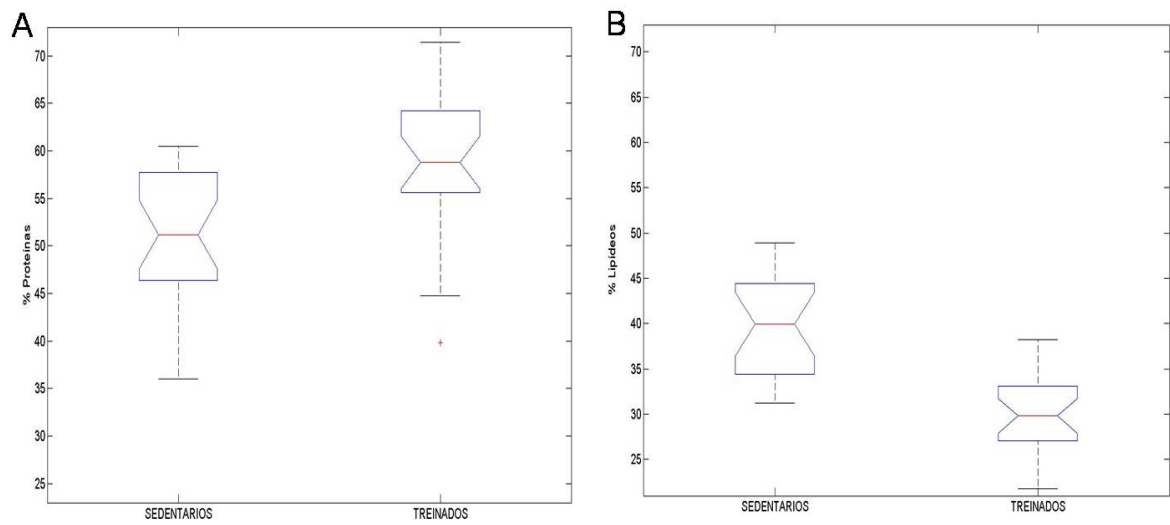


Figura 9. Porcentagem de Proteínas (A) e Lipídeos (B) da carcaça de ratos sedentários (S) ou treinados (T) (n=24/grupo). De acordo com o teste ANOVA e pós-teste de Tukey, os grupos são diferentes ($p < 0,001$).

Os dados dos órgãos e fêmures são apresentados nas Tabelas 5 e 6. Verifica-se que os fígados dos animais sedentários alimentados com dieta contendo caseína são mais pesados que a maioria dos demais grupos, se equiparando somente ao grupo IS. As duas dietas que continham PSL não mostraram diferenças entre si tanto em animais sedentários quanto em treinados, e o treinamento também não levou a alterações de peso deste órgão nos ratos que receberam essas dietas.

Em relação aos pesos dos corações, nota-se que a dieta contendo caseína proporcionou maiores valores do que as PSL intactas em animais sedentários, e também em relação aos animais treinados que a receberam. Entretanto, as dietas com PSL foram semelhantes entre si, independentemente da prática de atividade física.

Os pesos dos órgãos intestino, baço, rins e pulmão mostram que o tratamento dietético resultou em valores estatisticamente semelhantes entre os grupos sedentários ou entre grupos treinados, e que apenas o peso do pâncreas de animais treinados que receberam PSL hidrolisadas foi menor e diferiu dos grupos com outros tratamentos dietéticos. Além disso, o treinamento parece ter incidido de alguma forma sobre o intestino dos animais que receberam PSL hidrolisadas, mostrando valores superiores em comparação aos sedentários que receberam a mesma dieta.

Os pesos dos fêmures dos ratos foram estatisticamente semelhantes em todos os grupos e o comprimento foi diferente somente entre dois, dos três grupos sedentários: aqueles que receberam dietas contendo caseína ou PSL hidrolisadas. Observa-se uma correlação positiva moderada entre os pesos dos ossos e os respectivos comprimentos, indicando que a variável 'peso' pode apresentar seus valores relacionados também a outros fatores que não só o comprimento.

Tabela 5 – Peso dos órgãos dos ratos sedentários (S) e treinados (T) alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H)

	Fígado (g)	Coração (g)	Intestino (g)	Baço (g)	Rins (g)	Pâncreas (g)	Pulmão (g)
CS	14,46±1,66 ^a	1,43±0,24 ^a	1,20±0,10 ^{ab}	0,95±0,06 ^a	2,51±0,19 ^a	0,87±0,13 ^{ab}	1,57±0,18 ^a
IS	12,91±1,09 ^{ab}	1,03±0,23 ^b	1,05±0,34 ^{ab}	0,90±0,07 ^a	2,30±0,30 ^{ab}	0,82±0,11 ^{ab}	1,64±0,19 ^a
HS	11,91±1,76 ^{bc}	1,23±0,11 ^{ab}	0,89±0,14 ^b	0,93±0,08 ^a	2,25±0,15 ^{ab}	0,68±0,11 ^b	1,53±0,11 ^a
CT	10,07±0,72 ^c	1,06±0,02 ^b	1,05±0,17 ^b	0,82±0,09 ^a	2,11±0,09 ^{ab}	0,97±0,05 ^a	1,37±0,14 ^a
IT	11,57±1,80 ^{bc}	1,10±0,09 ^b	1,03±0,13 ^{ab}	0,85±0,17 ^a	1,94±0,56 ^b	0,98±0,24 ^a	1,44±0,20 ^a
HT	10,91±0,73 ^{bc}	1,22±0,07 ^{ab}	1,33±0,23 ^a	0,75±0,20 ^a	2,21±0,09 ^{ab}	0,68±0,18 ^b	1,46±0,16 ^a

Valores na mesma coluna que não apresentam letras sobrescritas iguais indicam diferença estatística ($p < 0,05$) de acordo com o teste ANOVA e pós-teste de Tukey. Mais de uma letra significa que o valor referente àquele grupo pode ser estatisticamente diferente de um determinado grupo e igual a outro. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n=10-14$).

Tabela 6. Médias dos pesos e comprimentos dos fêmures direito de ratos sedentários (S) e treinados (T) alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H)

Dieta	Peso dos fêmures (g)	Comprimento dos Fêmures (g)	Coefficiente de Correlação r
CS	0,62±0,06	3,64±0,18 [*]	0,8842 (0,0036)
IS	0,65±0,07	3,74±0,11	0,8598 (0,0062)
HS	0,69±0,05	3,83±0,07 [*]	0,8485 (0,0091)
CT	0,64±0,07	3,81±0,10	0,7633 (0,0275)
IT	0,66±0,05	3,78±0,09	0,7040 (0,0513-NS)
HT	0,64±0,08	3,76±0,12	0,8784 (0,0048)

O símbolo (*) acima do valor indica que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre tais grupos de acordo com o teste ANOVA e pós-teste de Tukey. Na coluna dos coeficientes de correlação são mostrados entre parênteses os valores de p desta análise; NS= não significativo. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n=10-14$).

6. DISCUSSÃO

As proteínas do soro do leite e as caseínas são fontes protéicas conhecidas por seu alto valor biológico, e apesar de ambas serem consideradas proteínas completas no que se refere ao perfil de aminoácidos indispensáveis, as PSL se destacam por apresentarem maior teor desses compostos (SMITHERS, 2008). Os resultados de ganho de peso e desempenho comprovam que as proteínas utilizadas no estudo foram capazes de promover crescimento ainda que em níveis recomendados para manutenção de animais adultos – 12% da dieta (REEVES *et al.*, 1993) e em condição de maior recrutamento metabólico como a que ocorre em virtude do treinamento. Em outros trabalhos, o perfil de crescimento foi satisfatório quando proteínas do soro do leite foram utilizadas como fonte de proteínas exclusiva da dieta em comparação à caseína (MORIFUJI *et al.*, 2005a; MORIFUJI *et al.*, 2005b) e ainda promoveram igualmente a síntese protéica quando comparadas à soja (ANTHONY *et al.* 2007). Embora nesses estudos tenha sido administrado maior teor de proteínas (~20%) aos animais, com o presente resultado observou-se que mesmo havendo uma transição da dieta comercial contendo no mínimo 23% de proteínas, para uma dieta contendo níveis inferiores desse nutriente, mas de alta qualidade, o desenvolvimento deles não é afetado.

Uma vez que a atividade física aumenta a necessidade de ingestão protéica devido principalmente à maior participação das proteínas no metabolismo energético durante o exercício prolongado e extenuante (LEMON, 1997; MAUGHAN e BURKE, 2004; PADDON-JONES *et al.*, 2004) perfazendo até 10% do aporte energético total necessário para o trabalho físico muscular (POWERS e HOWLEY, 2002), não seria surpreendente que animais submetidos a um protocolo de exercício contínuo com duração de 1 hora e percurso total de 1,5Km, apresentassem evolução ponderal levemente inferior aos animais sedentários já que parte das proteínas estaria sendo usada no exercício como proposto na literatura, ou que ao menos buscassem através da maior ingestão de dieta os subsídios para suprir suas necessidades energéticas. Mas isso não aconteceu.

Animais treinados ganharam peso e consumiram dieta tal como os sedentários, e ainda adaptaram-se ao treinamento.

Se por um lado, é um resultado positivo, o fato das três fontes de proteínas terem proporcionado respostas adequadas ao crescimento dos animais, por outro, constatamos que a ingestão de PSL, não levou à uma diferenciação enfática do desempenho, já que todos os grupos apresentaram evolução similar nos testes. Entretanto, na avaliação do desempenho ao final da 8ª e da 9ª semanas – período em que houve aumento na frequência diária de treino e, portanto maior exigência de adaptação ao estímulo – verifica-se que os animais que receberam PSL intactas apresentaram rendimento mais proeminente dado o maior tempo de permanência no teste, diferenciando-se significativamente de uma avaliação para outra, o que não ocorreu com os demais grupos apesar de também ter havido incremento de tempo. Esse poderia ser então um indício de que as PSL oferecem certa vantagem para obter-se melhor desempenho, mas que contradiz os resultados do estudo de Pimenta *et al.* (2006) segundo o qual concluiu-se que ratos alimentados com PSL hidrolisada apresentaram maior resistência para atingir a exaustão em teste de esteira, com tempo 2,5 vezes maior do que o grupo que recebeu dieta contendo PSL na forma intacta.

Nos últimos tempos, os hidrolisados não só das proteínas do leite, mas de outras fontes como a soja e o arroz, têm recebido especial atenção na área clínica no tratamento de indivíduos com alergia ao leite de vaca, por serem eficientes no fornecimento de aminoácidos na substituição de proteínas intactas, diminuindo ou até erradicando o potencial alergênico inerente às proteínas (TERRACCIANO *et al.*, 2002). Por apresentarem ainda absorção mais rápida do que proteínas intactas e aminoácidos livres (CYNOBER, 2002; BOIRIE *et al.* 1997) sendo um recurso ergogênico promissor, sua aplicação estendeu-se ao campo esportivo e hoje em dia reconhece-se, ao menos em praticantes de exercício de força que a forma previamente hidrolisada das proteínas pode conferir mais rápida recuperação muscular que proteínas intactas (BUCKLEY *et al.*, 2008) na dependência do tempo, próximo da prática do exercício, em que é administrada (TIPTON, 2007). Contudo, ainda não é consenso que hidrolisados superem a eficácia das proteínas

intactas, mas admite-se que possa ser tão eficiente quanto e reconhece-se que há diferenças importantes na resposta fisiológica causada por hidrolisados principalmente no tocante à ação insulínica (MANNINEN, 2004).

No presente estudo, não foram obtidos resultados relevantes que apoiem a superioridade dos hidrolisados, e ainda observamos uma tendência das PSL intactas se diferenciarem dos demais tratamentos. Na comparação individual da análise hematológica (Tabela 3), por exemplo, nota-se que os dados da série vermelha do sangue foram diferentes entre ratos sedentários e treinados que receberam essa fonte protéica, ao passo que as outras fontes não apresentaram tal diferença, mas todos os valores estão de acordo com as referências padrão (BAKER *et al.*, 1979). Interpretando esses dados, poderia ser considerado que esse efeito foi decorrente meramente do treinamento, no entanto, se assim fosse, deveriam ser observado resultados significativos em todos os grupos. A explicação para esse fenômeno não nos é óbvia e tampouco a literatura suporta de forma esclarecedora o motivo pelo qual as PSL intactas apresentaram significância que não é encontrada pelas demais fontes estudadas com relação a esses parâmetros.

Todavia, é de amplo reconhecimento científico, o impacto fisiológico que o exercício em diferentes intensidades e duração pode ocasionar. A contagem de células vermelhas, o nível de hemoglobina, e o hematócrito ao serem avaliados antes e após o exercício em ultra-maratonistas revelam que a atividade física na intensidade e duração (24 horas) investigada, leva a uma diminuição significativa desses parâmetros após 2 dias da prática permanecendo reduzida por 9 dias, mas que não é identificada quando mensurada imediatamente após a corrida (WU *et al.* 2004b). Bessa *et al.* (2008) também identificaram que durante prova de ciclismo realizada ao longo de 23 horas, divididas em 4 sessões de 50km e coletas de sangue a cada sessão, esses mesmos parâmetros não foram alterados nos atletas. Os resultados desse estudo indicam que o treinamento causou redução dos índices eritrocitários, corroborando com os dados encontrados em ultra-maratonistas, e as PSL intactas reiteram esse perfil por ser a única fonte que mostrou diferença significativa entre sedentários e treinados analisados

individualmente. Talvez a avaliação longitudinal dos ciclistas estudados por Bessa *et al.* (2008) em dias consecutivos à prova revelasse um comportamento eritrocitário semelhante ao obtido nesse estudo em 24 horas após a última sessão de treino, e que Wu *et al.* (2004b) observaram em ultra-maratonistas, caracterizando a condição esperada de destruição das células vermelhas, associada ao freqüente quadro de anemia esportiva transiente, em atletas de resistência, ao qual esses autores associam esses resultados, afirmando ainda que essa redução é também conseqüência do dano oxidativo nessas células.

Wardyn *et al.* (2008) analisaram o perfil do hemograma de homens e mulheres, treinados ou não, submetidos ao teste cardiopulmonar em esteira em que o esforço é monitorado considerando o limiar de lactato dos indivíduos, e ao contrário dos autores acima citados, observaram que os valores médios de hemoglobina e hematócrito mensurados 30 minutos após o teste foram maiores que os valores no pré-teste coletado 30 minutos antes da sua realização. Porém, vale ressaltar que alguns participantes dessa pesquisa (21% do total), segundo os autores, apresentaram redução desses parâmetros e não aumento como identificado no cômputo médio dos valores, salientando a variabilidade individual. A intensidade do exercício é determinante para a resposta fisiológica, e o desempenho de ultra-maratonistas em 24 horas de prova é indubitavelmente extenuante, ultrapassando muitas vezes o limite de esforço, enquanto que o teste cardiopulmonar é cessado quando este é alcançado. Além disso, a hemoconcentração ocasionada por alterações da volemia em virtude do aumento da perda de água pela respiração e sudorese durante a atividade, podem também representar resultados agudos que divergem daqueles encontrados em estudos que avaliaram os efeitos hematológicos crônicos (CONVERTINO, 2007). Os resultados MCV, MCH e MCHC, de nosso estudo, indicam não ter havido hemoconcentração já que não se alteraram nem na análise individual nem na agrupada, mas é intrigante a redução vista de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em decorrência do treinamento em contraste ao aumento dos valores de RDW-CV que está relacionado ao tamanho das células vermelhas.

Até o momento não foi encontrado na literatura qualquer relação das PSL com alterações nos níveis de eritrócitos e tampouco ao tamanho dessas células, contudo o aumento da capacidade antioxidante promovida por essas proteínas e proporcionada pelo incremento dos níveis intracelulares de glutathiona, é relatado em diversos trabalhos (MARSHALL *et al.*, 2004; MARIOTTI *et al.*, 2004; LANDS *et al.*, 1999). A biodisponibilidade de glutathiona tem sido relatada como redutora do estresse oxidativo e este, por sua vez, tem sido apontado como um fator potencial das mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorridas durante o exercício, que são induzidas por um aumento no consumo de oxigênio em particular pelo tecido muscular, mas que acontece em todo o corpo e está relacionado ao conseqüente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ji, 2008). Os eritrócitos contêm hemoglobina que transporta oxigênio e são extremamente suscetíveis à oxidação, por isso o sistema antioxidante dessas células deve ser bastante eficiente. Embora não tenhamos identificado diferenças entre as dietas com relação aos níveis de eritrócitos, a concentração de glutathiona total no interior dessas células foi maior em ratos sedentários que receberam dieta com PSL intactas em comparação à caseína (Tabela 4) e mesmo não se diferenciando estatisticamente, os hidrolisados das PSL apresentaram valor absoluto, também mais elevado (Apêndice 2), o que pode sugerir que essas proteínas promovam uma boa defesa antioxidante, apesar de não terem se diferenciado da caseína nos animais treinados.

A oxidação da GSH a GSSG é um marcador de estresse oxidativo, e a atividade da enzima GPx que catalisa essa reação não mostrou diferenciar-se nem em virtude das proteínas e nem do exercício (Tabela 4). Entretanto, alguns estudos indicam que a atividade da GPx diminui imediatamente após a atividade física e retorna a níveis basais em algumas horas. O exercício exaustivo de prova de ciclismo de montanha, por exemplo, induziu a um decréscimo da atividade dessa enzima imediatamente após a prova, em 8 atletas profissionais e retornaram aos níveis obtidos no pré-exercício, em 3 horas permanecendo inalterados até a última avaliação feita após 15 horas do término (AGUILÓ *et al.*, 2005). Por outro lado, Neubauer *et al.*, (2008) mostraram não ter havido diferença na atividade da GPx mensurada imediatamente após prova de triatlón (*ironman*) e

nas avaliações subseqüentes realizadas de 1 a 19 dias após a competição, embora outros marcadores do estresse oxidativo tenham aumentado temporariamente. Petibois e Déléris (2005) estudando a adaptação do eritrócito ao estresse oxidativo gerado pelo treinamento de resistência observaram melhoria do sistema de defesa antioxidante plasmático acessado por outros marcadores que não a GPx, identificando adaptações provocadas pelo treinamento que melhoram a defesa dos eritrócitos. Como a atividade da GPx parece retornar a níveis basais dentro de algumas horas após a prática de exercício, é possível que os nossos resultados, os quais não mostraram alteração, possam ser justificados por esse perfil. Contudo, não podemos deixar de observar que a concentração intracelular de tGSH-GSSG se manteve equiparada a níveis de animais sedentários, mostrando que mesmo diante de um possível quadro de estresse oxidativo provocado pelo exercício, esse sistema de defesa antioxidante se restabelece rapidamente ou é poupado.

O exercício também pode induzir mudanças em leucócitos. Segundo Gleeson (2007), a atividade física tem grande impacto na resposta imune, no entanto os efeitos causados pelo exercício dependem da intensidade e da duração. O exercício moderado e regular é associado a incidência reduzida de infecções comparado com um completo estado sedentário, enquanto que sessões prolongadas de exercícios extenuantes causam depressão temporária de vários aspectos da função imune. Há relatos de que ocorre aumento de leucócitos imediatamente após o exercício, permanecendo elevado por variado período de tempo e este é o quadro mais freqüente encontrado em resposta à AF (BESSA *et al.*, 2008; SKENDERI *et al.*, 2006; NATALE *et al.*, 2003). A literatura, entretanto, não é unânime; o resultado da contagem de leucócitos antes e após teste de esforço máximo em indivíduos de ambos os sexos praticantes ou não de AF, mostrou-se inalterado (WARDYN *et al.*, 2008). O aumento de leucócitos circulantes é relacionando à resposta inflamatória temporária provocado pelo esforço físico (REID *et al.*, 2004), tal como visto em muitas situações clínicas, mas em nosso estudo, no entanto, os dados desse parâmetro diminuíram do estado sedentário para o treinado, sem qualquer diferença ocasionada pelas proteínas.

As PSL foram estudadas em diversas doenças e situações comprometedoras do sistema imune, tendo sido seus benefícios amplamente divulgados no meio científico conforme apresentado em revisões sobre o assunto (SMITHERS, 2008; MADUREIRA *et al.*, 2007; SGARBIERI, 2004; HA e ZEMEL, 2003). As investigações atuais se voltam para a identificação dos componentes responsáveis por tais efeitos. Mercier *et al.* (2004), mostraram que PSL intactas microfiltradas aumentaram a proliferação de linfócitos em uma concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mas a digestão dessas proteínas pode ser deletéria para o estímulo imune uma vez que de acordo com os autores o composto digerido é vinte vezes menos ativo do que a forma não hidrolisada. Eles também revelam que os peptídeos resultantes do fracionamento do produto hidrolisado avaliado em concentração ótima, estimulam a proliferação de linfócitos tanto quanto a forma intacta, sendo considerados os componentes ativos das PSL. Embora não tenham sido identificadas diferenças entre os grupos por terem recebido proteínas em diferentes formas, nota-se que o grupo HT apresentou os menores níveis de linfócitos, talvez em ação sinérgica de dieta e adaptação ao treinamento.

O potencial imunomodulador das PSL também é agregado à sua composição aminoacídica com altos teores de cisteína – precursora de glutathione, e peptídeos bioativos presentes nas proteínas que quando digeridas permitem sua liberação, absorção e ação. Como a disponibilidade de glutathione é relacionada ao potencial antioxidante, sua natural presença em todas as células de mamíferos a qualifica como o principal agente de defesa contra as conseqüências ocasionadas por este desequilíbrio óxido-redutor. Ao agir como um doador de cisteína, nos é revelado no estudo de Mariotti *et al.* (2004) que a administração de α -lactoalbumina previamente a uma sessão de exercício exaustivo em ratos, aumentou as concentrações de GSH hepática. Como a atividade física é um agente estressor, é desejável a obtenção de um melhor aparato de defesa antioxidante, e uma vez que produção de radicais livres e aumento da resposta inflamatória contribuem para o prejuízo da atividade imune, determinados componentes das PSL podem favorecer esse sistema de defesa e fortalecer as células imunológicas (ROBSON-ANSLEY *et al.*, 2007; TAULER *et al.*, 2006; POWERS *et al.*, 2004). Lands *et al.*

(1999), observaram aumento da biossíntese de glutathiona intracelular em linfócitos de adultos jovens submetidos a um teste de esforço em bicicleta e suplementados com 20g diárias de um produto contendo concentrado de PSL e o correlacionaram positivamente com o aumento da performance. Com a concentração aumentada de GSH em linfócitos resultante da suplementação de PSL nesse estudo, pode-se inferir que, estas por sua vez contribuem para o funcionamento adequado dessas células preservando a capacidade imunológica dos sujeitos analisados, embora isso não tenha sido investigado.

Se por um lado o aumento da presença de GSH intracelular é relatado na literatura como sendo um efeito comprovado na reversão do estresse oxidativo que implica em melhor resposta imunológica geral, por outro, a teoria que envolve os peptídeos como agente imunomodulador, ainda não é muito clara. Segundo Pihlanto *et al* (2006), o leite contém vários fatores antioxidantes, dentre eles os peptídeos gerados pela digestão das proteínas compostos por 5 a 11 aminoácidos incluindo os hidrofóbicos, prolina, histidina, tirosina e triptofano. Esses autores revelam que a relação da atividade-estrutura e os mecanismos antioxidantes dos peptídeos, ainda não são completamente compreendidos, mas que a atividade antioxidante verificada pelos hidrolisados parece ser inerente à seqüência característica dos aminoácidos gerados pela digestão.

Os esforços empregados para controlar os efeitos deletérios da atividade física nem sempre são suficientes para revertê-los e em resposta ao exercício extenuante algum dano pode ocorrer. A atividade física prolongada e extenuante pode causar elevadas concentrações séricas de enzimas que estão relacionadas ao aumento da permeabilidade da membrana celular e a mensuração da atividade dessas enzimas após o exercício pode ser uma ferramenta eficiente para o controle das sessões de treinamento, já que, conforme relatado por Gleeson (2002), o dano muscular pode ser o fator que predispõe indivíduos a queda de *performance* temporária como visto em atletas submetidos a treinamento pesado. A intensidade e duração são sugeridas como fatores responsáveis pelos danos musculares em uma interação dose-resposta; se o esforço é demasiado, lesões musculares ocorrem em maior escala.

Os resultados de CK, LDH, AST e ALT obtidos de animais treinados, foram mais baixos que os de animais sedentários tanto na análise agrupada com relação a todos esses marcadores, quanto na análise individual, em que foram mostradas diferenças inerentes ao treinamento relativas especificamente a algumas dietas (Tabela 4). Ratos que receberam caseína como fonte protéica apresentaram diminuição de AST e ALT do estado sedentário para o treinado. Já aqueles que receberam PSL intactas mostraram que o treinamento levou a diminuição somente da LDH. E ainda os que receberam PSL hidrolisadas tiveram redução da AST. Os valores de CK não se mostraram alterados na análise individual. Todos esses resultados avaliados em conjunto nos levam a crer que o treinamento foi primordial para as alterações de redução dos parâmetros do estado sedentário para o treinado e nos permite afirmar que o treinamento que realizamos nos animais não foi excessivo, e tal como visto nos testes de desempenho (Figura 5), houve boa adaptação.

Antunes Neto (2003) em protocolo de treinamento igual ao usado nesse estudo porém sem intervenção dietética, encontraram níveis de CK após a 9ª semana estatisticamente iguais aos animais controle sedentários, e ainda verificaram que a estabilização da carga de treinamento da 5ª para a 8ª semana promoveu uma queda notável nos níveis de CK ao avaliar seus níveis após esse período. Entretanto, relatou-se que na 4ª semana de treinamento após as 4 semanas iniciais de sobrecarga, os dados de CK foram mais elevados do que nas avaliações realizadas após a 8ª e 9ª semanas, bem como em comparação aos animais sedentários, demonstrando que há um efeito adaptativo e sugerindo que alterações lesivas na célula muscular são dependentes da elevação do estímulo. A importância das cargas de treinamento fica evidente com os resultados desse estudo uma vez que oscilações da intensidade, duração e frequência são estratégias empregadas nos treinos com vistas a alcançar a adaptação do organismo frente às exigências.

É válido ressaltar que mensurações realizadas em momentos de competição ou testes de esforço máximo, não coincidem com as avaliações feitas após treinamento crônico. Em provas de resistência de longa duração, que atualmente

tomaram grande repercussão no cenário esportivo, assim como corridas de competição de menor duração em que o empenho em realizá-las é reforçado, e o desafio ainda maior do que aquele requerido durante o treinamento, o perfil aumentado dos biomarcadores durante ou logo após a prova, revela um comportamento similar ao desequilíbrio gerado em sessões de treinamento. Ou seja, com a alta demanda, há maior alteração da permeabilidade celular indicando que houve ruptura severa da estrutura muscular em decorrência da carga de trabalho, com conseqüente extravasamento para a circulação sangüínea. Nesses tipos de provas, o aumento proeminente desses marcadores é enfaticamente relatado principalmente logo após seu término, mas que perdura por dias mesmo em repouso. CK, LDH e AST são os marcadores que melhor representam essa maior elevação, caracterizando o modelo de lesão muscular, ao passo que a ALT em virtude de ser um marcador mais específico de danos hepáticos e com alterações menos enfáticas demonstram que se há dano hepático, esse ocorre em menor magnitude (KIM *et al.*, 2007; SKENDERI *et al.*, 2006; SPIROPOULOS E TRAKADA, 2003; FALLON *et al.*, 1999).

Wu *et al.* (2004b), relataram que houve substancial aumento nos níveis de AST e ALT imediatamente após 24 horas de corrida de ultra-resistência diminuindo do segundo ao nono dia mas não aos níveis iniciais de repouso, e Bessa *et al.* (2008), afirmam que os níveis de CK e LDH aumentaram em até 300% em ciclistas em teste de 200km. Já Hohl *et al.* (2009) que testaram o efeito do treinamento em ratos em protocolo semelhante ao nosso mas ainda mais extenuante, não encontraram diferenças no valor de LDH mensurado após 60 horas de teste de desempenho máximo, em amostra do músculo gastrocnêmio. O dado dessa pesquisa é interessante, pois poderia ser inferido que os teores inalterados de LDH no próprio músculo, também não levariam a variações sangüíneas mesmo com a ruptura celular.

Ao que se pode extrair de informações a respeito do treinamento e da dieta no presente estudo, percebe-se que o protocolo utilizado causou uma adaptação dos animais que mesmo com um maior nível de exigência física demandado na última semana (9ª) não mostrou elevar as concentrações dos biomarcadores.

Tampouco as dietas apresentaram diferença significativa quanto a esses marcadores, não aparentando relação direta com eles. Considerando a avaliação dos marcadores dos animais sedentários como basais, seria razoável esperar aumento dos níveis, mas contrário a essa expectativa, eles diminuíram. Esse fato parece estar relacionado às características fisiológicas ocasionadas pelo treinamento que em longo prazo se diferenciam das de um organismo sedentário.

Os resultados da composição centesimal da carcaça dos ratos (Figuras 8 e 9) mostraram que a dieta não causou diferenças no teor de lipídeos tanto com relação à comparação dos valores entre os grupos sedentários, quanto entre os grupos treinados. Já o treinamento influenciou os teores de lipídeos corporais vistos os mais altos valores em animais sedentários que mostraram maior acúmulo de lipídeos que os treinados. Contudo, apenas os animais que receberam PSL mostraram diferença estatística; os animais que receberam caseína como fonte protéica também tiveram o teor lipídico diminuído, mas sem significância estatística. Assim, a redução da gordura corporal dos animais que receberam PSL parece ser vinculada ao efeito combinado do treinamento e dessas proteínas.

O teor de proteínas foi igual tanto entre grupos sedentários quanto em treinados. Aparentemente, pode-se dizer que, embora sem diferença estatística, os valores de proteínas de animais treinados foram ligeiramente superiores aos animais sedentários, acompanhando a redução do teor de lipídeos vista nos animais submetidos ao treinamento. Com relação ao teor de cinzas, não foram identificadas diferenças nos testes estatísticos entre nenhum dos grupos.

Estudos indicam que as PSL podem melhorar a composição corporal, aumentando o teor de massa livre de gordura (massa magra) e diminuindo a massa de gordura. A obesidade tem sido um assunto de grande investigação nos últimos anos, e a incorporação de compostos como as PSL à dieta, que possam auxiliar a reduzir a gordura corporal tem sido promissora. No estudo de Morifuji *et al.* (2005a), que investigou a atividade de enzimas lipogênicas em ratos exercitados, foi verificado que as PSL são capazes de inibir a síntese de lipídeos no fígado e aumentar a atividade da enzima ácido graxo sintase no músculo, podendo propiciar diminuição de acúmulo de gordura no corpo por sua maior

oxidação durante a atividade. No presente estudo, observou-se redução de forma significativa da gordura total de ratos submetidos ao treinamento físico e que receberam as PSL. A discussão a respeito dos efeitos das PSL sobre o metabolismo de lipídeos e sua repercussão na gordura corporal, é controversa. Resultados de pesquisa em camundongos que receberam PSL ou proteínas da soja, ambas na forma intacta ou hidrolisada, mostraram que as proteínas da soja foram mais eficientes em diminuir a gordura corporal do que as PSL. Entretanto, esse estudo não considerou a prática de atividade física, sendo somente observado que o tratamento de ratos geneticamente obesos submetidos à dieta hiperprotéica restrita em energia, teve melhores respostas na redução de lipídeos corporais com as proteínas da soja do que com as PSL (AOYAMA *et al.*, 2000). Talvez a associação de dieta e treinamento possa gerar respostas diferentes daquelas quando só um fator é avaliado.

O papel do cálcio na redução da obesidade também tem sido explorado. Zemel (2004) relata que as fontes de cálcio de origem láctea apresentam maiores efeitos do que as fontes de alimentos fortificados ou de suplementos. Ressalta também, que apesar de haverem fortes evidências teóricas sobre o mecanismo de ação do cálcio no metabolismo dos adipócitos e estoque de lipídeos, a via pela qual as PSL aumentam esses efeitos, ainda não é totalmente compreendida. Especula-se que a alta concentração de BCAA em derivados do leite, incluindo as PSL, esteja vinculada a essa característica de reduzir os lipídeos corporais em um remanejamento da energia proveniente dos alimentos, do tecido adiposo para o tecido muscular. Essa teoria corrobora com os resultados de Morifuji *et al.* (2005a) de que há aumento da ácido graxo sintase muscular pela ingestão de PSL. Siddiqui *et al.*, (2008) também relatam o potencial redutor das PSL sobre a gordura corporal de ratos, ressaltando a redução do acúmulo de gordura e aumento da massa magra bem como o aumento de mRNA de receptores de insulina muscular nos animais que receberam dieta contendo PSL, vitamina D e cálcio com altos teores de gordura e carboidrato em comparação à dieta isenta de PSL e com teores de cálcio e vitamina D sub-ótimos. Ainda, em recente estudo realizado com 25 indivíduos eutróficos, foi mostrado que as PSL apresentam maior efeito supressor do apetite em relação às proteínas de soja e à caseína, relacionado ao relativo

aumento sérico dos aminoácidos leucina, lisina, triptofano, isoleucina e treonina, e respostas enfaticamente aumentadas de insulina e peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (VELDHORST *et al.*, 2009). O efeito inibidor do apetite pode estar relacionado à presença de glicomacropéptídeos (GMP), como exposto no trabalho de Lan *et al.*, (2009) que avaliou a saciedade de 50 voluntários ao ingerirem refeições contendo ou não PSL com concentração natural dos GMP ou adicional.

O leite e derivados são também associados a benefícios na manutenção óssea pelo seu teor elevado de cálcio de boa biodisponibilidade, e atualmente as proteínas do leite ganham espaço nessa discussão. Os ossos fazem parte da massa livre de gordura quando avalia-se em compartimentos, a composição corporal. As alterações na massa e resistência óssea são alvo de investigação freqüente, principalmente envolvendo os casos de osteoporose. Ratas ovariectomizadas receberam dieta contendo um concentrado de proteínas do leite e foi observado que esta proporcionou melhores resultados quanto à ressorção óssea prevenindo a perda óssea, do que aquelas que receberam a dieta controle contendo apenas caseína (TOBA *et al.*, 2000). A fonte de cálcio pode ter influência na absorção mineral nos ossos; Toba *et al.*, (1999) afirmam que a biodisponibilidade de cálcio é aumentada quando administrada em conjunto com proteínas do leite, em ratos em crescimento.

Os resultados de peso ósseo foram semelhantes entre os grupos. Já com relação ao comprimento houve diferença entre os grupos CS e HS. Os dados de correlação desses dois parâmetros são considerados moderados (LEVIN, 1978) e demonstram que não só por possuírem maior comprimento necessariamente os ossos são mais pesados; outros fatores devem estar associados (Tabela 6).

É escassa a literatura acerca das variações anatômicas dos órgãos de ratos em função da ingestão de PSL desconsiderando a presença de doenças. Poucas variações significativas que pudessem ser associadas ao efeito da dieta foram observadas. No entanto nos chamou a atenção a diferença do peso dos fígados dos animais que receberam caseína e do peso do pâncreas dos animais que receberam PSL hidrolisadas (Tabela 5).

O fígado é um órgão extremamente responsivo às alterações metabólicas. Assim como houve diferença no peso desses órgãos mostrando que ratos sedentários com ingestão de dietas contendo caseína tinham valores de fígados mais pesados que os treinados com mesma dieta, a atividade da ALT sérica também foi significativamente maior nos animais não exercitados. A atividade enzimática mais elevada desse grupo parece estar relacionada à maior extensão tecidual e não a outros efeitos metabólicos, mas de qualquer forma é um dado interessante visto que trabalhos como o de Kume *et al.* (2005) ressaltam o efeito hepato-protetor das PSL. Com relação aos valores de peso dos pâncreas pode-se ressaltar uma possível tendência das PSL hidrolisadas em conferir menor peso desses órgãos aos animais. A influência disso nas respostas pancreáticas não é evidente, mas talvez haja certa correlação da eficiência da forma físico-química dessas proteínas. Certamente essas são observações especulativas podendo ser apenas fruto da variabilidade biológica e, assim, outros dados precisam ser explorados para confirmá-las.

7. CONCLUSÃO

O intuito desse trabalho originalmente foi verificar se haveria diferença entre as variáveis estudadas decorrentes do consumo de proteínas do soro do leite em suas formas intacta ou pré-hidrolisadas por ratos treinados ou sedentários. Essa diferença não foi encontrada. As três fontes protéicas apresentaram resultados semelhantes em quase todos os parâmetros avaliados.

Apesar de não ter havido diferença significativa entre as dietas, pudemos ver um forte efeito do treinamento sobre o desempenho que foi crescente ao longo do experimento em todos os grupos, e também na constituição corporal dos animais a qual revelou um perfil lipídico reduzido em animais treinados em comparação aos sedentários com significância estatística vista somente em relação aos grupos que receberam PSL, o que mostra ser um efeito positivo e dependente da ação conjunta da dieta e da AF.

As alterações anatômicas parecem ser inerentes à variabilidade biológica individual dos animais, mas ressaltamos possível influência das PSL sobre o peso de fígado e pâncreas.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos diminuídos em ratos treinados em comparação aos sedentários indicam que houve boa adaptação ao treinamento.

A concentração de glutathiona total em eritrócitos, que foi significativamente superior em animais sedentários que consumiram PSL intactas, sugere maior eficiência antioxidante proporcionada por essas proteínas. Embora entre os grupos de ratos treinados não tenha havido diferença estatística, os valores de glutathiona total foram equiparados aos teores encontrados em sedentários, podendo-se inferir que houve preservação desse sistema ou grande capacidade de reconstituição mesmo com a alta demanda gerada pelo exercício físico.

Concluiu-se com esses dados que existe um potencial modulador das PSL, mas que talvez aos níveis ingeridos pelas dietas (12%) este não foi enfaticamente evidenciado.

8. OBSERVAÇÕES

No início do trabalho de doutorado buscamos nos engajar nas pesquisas sobre nutrigenômica. Realizamos um estudo piloto utilizando protocolo de dieta e exercício semelhante ao apresentado nessa tese. Foi feito um 'pool' com os fígados dos animais e o RNA total foi extraído para subsequente comparação da expressão de genes usando a técnica de microarranjos de cDNA em 'chips' contendo 1152 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis naquela ocasião. Verificou-se que em comparação à dieta controle contendo caseína, os animais que receberam a dieta com PSL hidrolisadas apresentaram aumento da expressão de 64 e diminuição de 43 ESTs. Já os resultados obtidos dos animais que receberam a dieta com PSL intactas revelaram efeito diminuído na expressão de 93 ESTs. As seqüências identificadas eram referentes a genes codificantes de componentes da cadeia respiratória mitocondrial que no caso das PSL hidrolisadas estavam reprimidos e em PSL intactas estavam estimulados. Assim como também foram encontrados genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos (enzima AST) com expressão reduzida pelas PSL hidrolisadas, e de síntese de proteínas do genoma mitocondrial aumentados por PSL intactas. Os resultados desse estudo indicam que as proteínas alteram a função hepática, possivelmente, por mudanças na expressão gênica, e que as PSL mostram efeitos bem diferentes quando comparadas à caseína.

Não pudemos, contudo, dar continuidade a esse trabalho em virtude da falta de recursos. O pedido de auxílio à pesquisa nos foi negado e tivemos que optar em realizar outras análises que deram origem a presente tese. Mas salientamos a importância da pesquisa nessa área visto que os resultados preliminares são no mínimo intrigantes. Com o avanço do conhecimento, hoje já encontramos o genoma completo de ratos, embora o custo dos *chips* ainda seja um obstáculo para sua utilização em grande escala. Aos pesquisadores interessados, com subsídios e possibilidades, acompanhar os passos da evolução da ciência será sempre um desafio gratificante.

9. REFERÊNCIAS

ABECIA-SORIA, M.I. **Efeito da alimentação sub-crônica do hidrolisado das proteínas do lactosoro em ratos sedentários e exercitados**. Campinas, 2003. 141p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

ACSM. Joint Position Statement: Nutrition and Athletic Performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 12, p. 2130-2145, 2000.

AGUILÓ, A.; TAULER, P., FUENTESPINA, E.; TUR, J.A.; CÓRDOVA, A.; PONS, A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. **Physiology and Behavior**, v.84, p.1 –7, 2005.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine. **The Journal of Nutrition**, v.131, n.3, 2001.

ANTHONY; T.G.; McDANIEL, B.J.; KNOLL, P.; BUNPO, P.; PAUL, G.L.; McNURLAN, M.A. Feeding meals containing soy or whey protein after exercise stimulates protein synthesis and translation initiation in the skeletal muscle of male rats. **The Journal of Nutrition**, 137: 357-362, 2007.

ANTUNES NETO, J.M.F. **Estudo da relação entre estresse oxidativo e síntese de proteínas de estresse HSP70 no sangue de animais submetidos a diferentes níveis de exercício físico**. (Tese). Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

ARAUJO JR.; J.A.; FALAVIGNA, G.; ROGERO, M.M.; PIRES, I.S.O.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; DONATO JR., J.; TIRAPEGUI, J. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. **Life Sciences**, v.79, p.1343–1348, 2006.

AOI, W.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Exercise and functional foods. **Nutrition Journal**, v.5, n.15, 2006, doi:10.1186/1475-2891-5-15

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official Methods of analysis**. 16. ed., CUNNIFF, P.A., ed., Washington D.C, AOAC, p.55, 1995.

AOYAMA, T.; NAKAMORI, T. FUKUI, K.; HASHIMOTO, Y.; YAMAMOTO, T.; TAKAMATSU, K.; SUGANO, M. Effects of soy and milk whey protein isolates and their hydrolysates on weight reduction in genetically obese mice. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v.64, n.12, p. 2594-2600, 2000.

BAKER, H.J.; LINDSEY, J.R.; WEISBROTH, S.T. The laboratory rat. Volume I. Biology and diseases. Copyright by Academic Press, Inc., Orlando/Florida, 1979.

BESSA, A; NISSENBAUM, M; MONTEIRO, A; GANDRA, P.G.; NUNES, L.S.; BASSINI-CAMERON, A; WERNECK-DE-CASTRO, J.P.S.; VAZ DE MACEDO, D; CAMERON, L-C. High-intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. **British Journal of Sports Medicine**, v.42, p.589–593, 2008.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BLOMSTRAND, E.; ELIASSON, J.; KARLSSON, H.K.R.; KÖHNKE. Branched-Chain Amino Acids Activate Key Enzymes in Protein Synthesis after Physical Exercise. **The Journal of Nutrition**, v.136, p. 269S–273S, 2006.

BOMPA. T. A periodização no treinamento esportivo. São Paulo: Manole, 2001. 257p.

BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.; MAUBOIS, J.; BEAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.14930–14935, 1997.

BORGES, P.F.Z.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; PACHECO, M.T.B.; JACOBUCCI, H.B.; BALDINI, V.L.S. Produção Piloto de Concentrados de Proteínas de Leite Bovino: Composição e Valor Nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.4, p.1-8, 2001.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; BUONAURO, R.; LIMONGELLI, F.M. Serum Enzyme Monitoring in Sports Medicine. **Clinics in Sports Medicine**, v.27, n.1, p. 1-8, 2008.

BRANCACCIO, P.; LIMONGELLI, F.M; MAFFULLI, N. Monitoring of serum enzymes in sport. **British Journal of Sports Medicine**, v.40, p.96–97, 2006.

BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; LIMONGELLI, F.M Creatine kinase monitoring in sport medicine. **British Medical Bulletin**, v.81/82, p. 209–230, 2007.

BUCKLEY, J.D; THOMSON, R.L.; COATES, A.M.; HOWE, P.R.C.; DENICHILO, M.O.; ROWNEY, M.K. Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. **Journal of Science and Medicine in Sport**, 2008. [doi:10.1016/j.jsams.2008.06.007](https://doi.org/10.1016/j.jsams.2008.06.007)

CAMPBELL, B.; KREIDER, R.B.; ZIEGENFUSS, T.; LA BOUNTY, P.; ROBERTS, M.; BURKE, D.; LANDIS, J.; LOPEZ, H. ANTONIO, J. International Society of Sports Nutrition position stand: protein and exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 4, n.8, 2007.

CARTER, S.L.; RENNIE, C.; TARNOPOLSKY, M.A. Substrate utilization during endurance exercise in men and women after endurance training. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.280, p.898-907, 2001.

CYNOBER, L.A. Plasma Amino Acid Levels With a Note on Membrane Transport: Characteristics, Regulation, and Metabolic Significance. **Nutrition**, v.18, p.761–766, 2002.

CONVERTINO, V.A. Blood Volume Response to Physical Activity and Inactivity, **The American Journal of Medical Sciences**, v.334, n.1, p.72–79, 2007.

DANGIN, M.; BOIRIE, Y.; GARCIA-RODENAS, C.; GACHON, P.; FAUQUANT, J.; CALLIER, P.; BALLÈVRE, O.; BEAUFRÈRE, B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, n.280, p.E340–E348, 2001.

DIAS, N.F.G.P. **Propriedades Imunoestimulatórias e antitumoral de concentrados protéicos do soro de leite bovino, de caseína e de um isolado protéico de soja** (Tese). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ERIKSEN, E.K.; VEGARUD, G.E.; LANGSRUD, T.; ALMAAS, H.; LEA, T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses. **Small Ruminant Research**, v. 79, n.31, p. 29-37, 2008.

ELLIS, K.J. Human Body Composition: In Vivo Methods. **Physiological Reviews**, v.80, n.2, p.649-680, 2000.

FALLON, K.E.; SIVYER, G.; SIVYER, K.; DARE, A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. **British Journal of Sports Medicine**, v.33, p.264-26, 1999.

FIAT, A-M.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; JOLLÈS, P. Biologically Active Peptides from Milk Proteins with Emphasis on Two Examples Concerning Antithrombotic and Immunomodulating Activities. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.301-310, 1993.

GAINÉ, P.C.; PIKOSKY, M.A.; BOLSTER, D.R.; MARTIN, W.F.; MARESH, C.M.; RODRIGUEZ, N.R. Postexercise Whole-Body Protein Turnover Response to Three Levels of Protein Intake. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.39, n.3, p. 480-486, 2007.

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

GLEESON, M. Biochemical and immunological markers of overtraining. **Journal of Sports Science and Medicine**, v.1, p. 31-41, 2002.

GLEESON, M. Can Nutrition Limit Exercise-Induced Immunodepression? **Nutrition Reviews**, Vol. 64, No. 3, 2006.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.103, p. 693–699, 2007.

GRIMBLE, F.R.; GRIMBLE, G.K. Immunonutrition: Role of Sulfur Amino Acids, and Polyamines. **Nutrition**, v.14, n. 7/8, 1998.

GRIMM, H.; KRAUS, A. Immunonutrition – supplementary amino acids and fatty acids ameliorate immune deficiency in critically ill patients. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 386, p. 369-376, 2001.

GUYTON, A.C. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A., 2002.

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

HAWLEY, J.A. Effect of increased fat availability on metabolism and exercise capacity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.34, n.9, p.1485-1491, 2002.

HOFFMAN, J.R.; FALVO, M.J. Protein – which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3 p. 118-130, 2004.

HOHL, R ; FERRARESSO, R. L. ; BUSCARIOLLI,R.; LUCCO, R. ; BREZIKOFER, R. ; MACEDO, D V . Development and Characterization of an Overtraining Animal Model. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n.5, p. 1155-1163, 2009.

HOLECEK M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. **Nutrition**, v.18, n.2, p.130-133, 2002.

HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L. Amino acid metabolism during exercise and following endurance training. **Sports Medicine**, v.9, n.1, p. 23-35, 1990.

HOWARTH, K.R.; MOREAU, N.A.; PHILLIPS, S.M.; GIBALA, M.J. Co-ingestion of protein with carbohydrate during recovery from endurance exercise stimulates skeletal muscle protein synthesis in humans. **Journal of Applied Physiology**, 2008.

HEYWARD, V.H.; STOLARCZYK, L.M. Avaliação da Composição Corporal Aplicada. São Paulo: Manole, 2000.

HENCHE, S.A.; PELLICO, L.G. Body composition: evaluation methods. **European Journal of Anatomy**. v.9, n.2, p.117-124, 2005.

HULMI, J.J.;VOLEK. J.S.; SELANNE, H.; MERO, A.A. Protein Ingestion Prior to Strength Exercise Affects Blood Hormones and Metabolism. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.37, n.11, p. 1990-1997, 2005.

JI, L.L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine** v.44, p.142–152, 2008.

JUHN, M.S. Popular Sports Supplements and Ergogenic Aids. **Sports Medicine**, v.33, n.12, p. 921-939, 2003.

IKEDA, S.; MIYAZAKI, H.; NAKATANI, T.; KAI, Y.; KAMEI, Y.; MIURA, S. TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKIA, O. Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.296, p.395–400, 2002.

KAITO, M. Use of lactoferrin for chronic hepatitis C. **Hepatology Research**, v. 32, n.4, p.200-201, 2005.

KERKSICK, C.; HARVEY, T.; STOUT1, J.; CAMPBELL, B.; WILBORN, C.; KREIDER, R.; KALMAN, D.; ZIEGENFUSS, T.; LOPEZ, H.; LANDIS, J.; IVY, J.L.; ANTONIO, J. International Society of Sports Nutrition position stand: Nutrient Timing. **Journal of the International Society of Sports Nutrition.**, n.5, v.17 doi:10.1186/1550-2783-5-17, 2008.

KIM, H.J.; LEE, Y.H; KIM, C.K. Biomarkers of muscle and cartilage damage and inflammation during a 200 km run. **European Journal of Applied Physiology**, 99:443–447, 2007.

KLEIN, S.; COYLE, E. F.; WOLFE, R. R. Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.267, p. E934-E940, 1994.

KUME, H.; OKAZAKI, K.; SASAKI, H. Hepatoprotective effects of whey protein on D-galactosamine-induced hepatitis and liver fibrosis in rats. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v.70, n.5, 1281-1285, 2006.

LAM, S.M.S.C.C.; MOUGHAN, P.J.; AWATI, A.; MORTON, H.R. The influence of whey protein and glycomacropeptide on satiety in adult humans **Physiology and Behavior**, v.96, n.1, p. 162-168, 2009

LANDS, L. C.; GREY, V. L.; SMOUNTAS, A. A. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. **Journal of Applied Physiology**. v.87, n.4, p. 1381–1385, 1999.

LEMON, P.W.R.. Dietary protein requirements in athletes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.8, p.52, 1997.

LEVIN, J. Estatística Aplicada a Ciências Humanas. Harper & Row, São Paulo. p.211, 1978.

LOW, P.P.L.; RUTHERFURD, K.J.; GILL, H.S., CROSS, M.L. Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. **International Immunopharmacology**, v.3, p. 393-401, 2003.

MADUREIRA, A.R.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.P.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v.40, p.1197–1211, 2007.

MANNINEM, A.H. Protein Hydrolysates in Sports and Exercise; a Brief Review. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, p. 60-63, 2004

MARIOTTI, F.; SIMBELIE, K.L.; MAKARIOS-LAHHAM, L.; HUNEAU, J.; LAPLAIZE, B.; TOME´, D.; EVEN, P.C. Acute Ingestion of Dietary Proteins Improves Post-Exercise Liver Glutathione in Rats in a Dose-Dependent Relationship with their Cysteine Content. **Journal of Nutrition**, v.134, p.128–131, 2004.

MARSHALL, D. Whey Protein Report: Current Concepts on Whey Protein Usage, Prepared for The Cleveland Eye Clinic (2005). Disponível em: http://www.wellwisdom.com/research_WPCreport.php

MARSHALL, K. Therapeutic Applications of Whey Protein. **Alternative Medicine Review**, v.9, n.2. p.136-156, 2004.

MAUGHAN, R.J.; BURKE, L.M. *Nutrição Esportiva*. Porto Alegre: Artmed, 2004. 190p.

MERCIER, A.; GAUTHIER, S.F; FLISS, I. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. **International Dairy Journal**, v.14, p.175–183, 2004.

MORENO, Y. F.; SGARBIERI, V.C.; SILVA, M. N.; TORO, A.A.D.C.; VILELA, M. M. S. Features of Whey Protein Concentrate Supplementation in Children with Rapidly Progressive HIV Infection. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 52, p. 34-38, 2006.

MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SANBONGI, C.; SUGIURA, K. Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. **Nutrition**, n.21, p.1052–1058, 2005a.

MORIFUJI, M.; SAKAI, K.; SUGIURA, K. Dietary Whey Protein Modulates Liver Glycogen Level and Glycoregulatory Enzyme Activities in Exercise-Trained Rats. **Experimental Biology and Medicine**, 230:23–30, 2005b.

NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas**, V.58, n.1, p.49-60, 2003.

NERY-DIEZ, A.C.C.; CARVALHO, I.R.; AMAYA-FARFAN, J.; ABECIA-SÓRIA, M.I.; MYASAKA, C.K.; FERREIRA, C.S. Prolonged ingestion of prehydrolyzed whey protein induces little or no changes in digestive enzymes, but decreases glutaminase activity in exercising rats. **Journal of Medicinal Food** (in press), 2009.

NATALE, V.M.; BRENNER, I.K.; MOLDOVEANU, A.I.; VASILIOU, P.; SHEK, P.; SHEPHARD, R.J. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. **Sao Paulo Medical Journal**, v.121, n.1, p.9-14, 2003.

NEUBAUER, O.; KONIG, D.; KERN, N.; NICS, L.; WAGNER, K. No Indications of Persistent Oxidative Stress in Response to an Ironman Triathlon. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.40, n.12, p. 2119-2128, 2008.

O'BRIEN, B.J.; WIBSKOV, J.; KNEZ, W.L.; PATON, C.D.; HARVEY, J.T. The effects of interval—exercise duration and intensity on oxygen consumption during treadmill running. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v.11, p.287—290, 2008.

PADDON-JONES, D.; SHEFFIELD-MOORE, M.; ZHANG, X.; VOLPI, E.; WOLF, S.E.; AARSLAND, A.; FERRANDO, A.A.; WOLFE, R.R. Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.286, p. E321-328, 2004.

PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS, G. Erythrocyte Adaptation to Oxidative Stress in Endurance Training. **Archives of Medical Research**, v.36, p. 524–531, 2005.

PIMENTA, F.M.V.; ABECIA-SORIA, M.I.; AULER, F.; AMAYA-FARFAN, J. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, p.984–991, 2006.

POWERS, S.K.; DERUISSEAU, K.C.; QUINDRY, J.; HAMILTON, K.L. Dietary antioxidants and exercise. **Journal of Sports Sciences**, v.22, p.81–94, 2004.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. Fisiologia do Exercício. 1ª. Ed. São Paulo: Manole, 2000. 527p.

RAMOS, A.G.. **Utilização das proteínas do soro lácteo pelo rato jovem.** Campinas, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

REID, V.L.; GLEESON, M.; WILLIAMS, N.; CLANCY, R.L. Clinical investigation of athletes with persistent fatigue and/or recurrent infections. **British Journal of Sports Medicine**, v.38, p. 42-45, 2004.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro lácteo – Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. **Food Ingredients**, v.17, p.20-27, 2002.

ROBSON-ANSLEY, P.J.; BLANNIN, A.; GLEESON, M. Elevated plasma interleukin-6 levels in trained male triathletes following an acute period of intense interval training. **European Journal of Applied Physiology**. v.99, p.353–360, 2007.

RUTHERFURD-MARKWICK, K.J., JOHNSON, D.; CROSS, M.L., GILL, H.S. Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey protein concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. **Nutrition Research**, v.25, p. 192–203, 2005.

SAINT-SAUVEUR, D.; GAUTHIER, S.F.; BOUTIN, Y.; MONTONI, A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. **International Dairy Journal**, v.18, p. 260–270, 2008.

SANTOS, M.A.A.; SANTOS, R.P. Uso de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academias de ginástica. **Revista Paulista de Educação Física**, n.16, v. 2, p.174-185, 2002.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, V.17, n.4, p. 397-409, 2004.

SHIMOMURA Y, MURAKAMI T, NAKAI N, NAGASAKI M, HARRIS RA. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. **Journal of Nutrition**, n.134, p.1583S–1587S, 2004.

SHIMOMURA, Y; HONDA, T; SHIRAKI, M. MURAKAMI, T; SATO, J.; KOBAYASHI, H.; MAWATARI, K.; OBAYASHI, M;. HARRIS, R.A. Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Exercise and Liver Disease. **Journal of Nutrition**, n.136, p.250S–253S, 2006a.

SHIMOMURA, Y; YAMAMOTO, Y; BAJOTTO, G; SATO, J; MURAKAMI, T; SHIMOMURA, N; KOBAYASHI, H; MAWATARI, K. Nutraceutical Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. **Journal of Nutrition**, n.136, p. 529S–532S, 2006b.

SHORT, K.R.; VITTONI, J.L.; BIGELOW, M.L.; PROCTOR, D.V.; NAIR, K.S. Age and anaerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, 286:E92-E101, 2004.

SIDDIQUI, S.M.K.; CHANG, E.; LI, J.; BURLAGE, C.; ZOU, M.; BUHMAN, K.K.; KOSER, S.; DONKIN, S.S.; TEEGARDEN, D. Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats. **Nutrition Research**, v.28, n.11, p.783-790, 2008.

SIFF, M.; VERKHOSHANSKY, Y. Superentrenamiento. Barcelona: Paidotribo, 2004. 563p.

SKENDERI, K.P.; KAVOURAS, S.A.; ANASTASIOU, C.A.; YIANNAKOURIS, K.; MATALAS, A. Exertional rhabdomyolysis during a 246-Km continuous running race. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.38, n.6, p.1054-1057, 2006.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins – From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v.18, p.695– 704, 2008.

SPIROPOULOS, K.; TRAKADA, G. Hematological and biochemical laboratory parameters before and after a marathon race. **Lung**, v.181, p. 89-95, 2003.

SPRIET, L.L. Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.34, n.9, p. 1477-84 (S), 2002.

STEIJNS, J.M.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **The British Journal of Nutrition**, v. 84, supp1, p. S11-17, 2000.

STEIJNS, J.M.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **The British Journal of Nutrition**, v. 84, supp1, p. S11-17, 2000.

TASSI, E.M.M. **Desenvolvimento de dietas para o desempenho físico. Comparação de oligopeptídeos de α -lactoalbumina com a proteína intacta como fonte protéico-energética no rato.** Campinas, 1996. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

TAULER, P.; SUREDA, A.; CASES, N., AGUILO, A.; RODRI´GUEZ-MARROYO, J.A.; VILLA, G.; TUR, J.A.; PONS, A. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, n. 10, p.665-671, 2006.

TERRACCIANO, L.; ISOARDI, P.; ARRIGONI, S.; ZOJA, A.; MARTELLI, A. Use of hydrolysates in the treatment of cow’s milk allergy. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v.89, p.86–90S, 2002.

TIPTON, K.D. Role of Protein and Hydrolysates Before Exercise. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.17, S77- S86, 2007.

TIPTON, K.D., B.B. RASMUSSEN, S.L. MILLER Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.281, p. E197-E206, 2001.

TIPTON, K.D.; BORSHEIM, E.; WOLF, S.E.; SANFORD, A.P.; WOLFE, R.R. Acute response of net muscle protein balance reflects 24-h balance after exercise and amino acid ingestion. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.284, p.76-89, 2003.

TIPTON, K.D.; ELLIOTT, T.A.; CREE, M.G.; WOLF, S.E.; SANFORD, A.P.; WOLFE, R.R. Ingestion of Casein and 1 Whey Proteins Result in Muscle Anabolism after Resistance Exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.36, n.12, p. 2073-2081, 2004.

TIPTON, K.D.; WITARD, O.C. Protein Requirements and Recommendations for Athletes: Relevance of Ivory Tower Arguments for Practical Recommendations. **Clinics in Sports Medicine**, v.26, p. 17–36, 2007.

TOBA, Y.; TAKADA, Y.; TANAKA, M.; AOE, S. Comparison of the effects of milk components and calcium source on calcium bioavailability in growing male rats **Nutrition Research**, v.19, n. 3, p. 449-459, 1999.

TOBA, Y.; TAKADA, Y.; YAMAMURA, J.; TANAKA, M.; MATSUOKA, Y.; KAWAKAMI, H.; ITABASHI, A.; AOE, S.; KUMEGAWA, M. Milk Basic Protein: A Novel Protective Function of Milk Against Osteoporosis. **Bone**, v.27, n.3, p.403–408, 2000.

TURCOTTE, L. P.; RICHTER, E. A.; KIENS, B. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. **The American Journal of Physiology**, v.262, p.E791-9, 1992.

VARNAM, Allan H.; SUTHERLAND, Jane P. Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology. London: Chapman & Hall, 1994. 451p.

VELDHORST, M.A.B.; NIEUWENHUIZEN, A.G.; HOCHSTENBACH-WAELEN, A.; VUGHT, A.J.A.H.V.; WESTERTERP, K.R.; ENGELEN, M.P.K.J.; R.M. BRUMMER, DEUTZ, N.E.P.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S. Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. **Physiology and Behavior**, v.96, n. 4-5, p. 675-682, 2009.

WARDYN, G.G.; RENNARD, S.I.; BRUSNAHAN, S.K.; MCGUIRE, T.R., CARLSON, M.L., SMITH, L.M., MCGRANAGHAN, S.; SHARP, J.G. Effects of exercise on hematological parameters, circulating side population cells, and cytokines. **Experimental Hematology**, v.36, p.216–223, 2008.

WHO - World Health Organization. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland. 2002.

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

WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **Journal of Nutrition**, v. 134, p.489–492, 2004a.

WU, H.; CHEN, K.; SHEE, B.; CHANG, H.; HUANG, Y.; YANG, R. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.18, p.2711-2714, 2004b.

ZEMEL, M.B. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.907S–12S, 2004.

APÊNDICE I

Perfil hematológico de ratos sedentários (S) e treinados (T), alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H), após 24h da última sessão de treino da 9ª semana

	SEDENTÁRIOS			TREINADOS		
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
Eritrócitos (10 ⁶ /μL)	8,62± 0,19	8,97±0,27	8,82±0,26	8,51±0,44	8,45±0,60	8,42±0,44
Hematócrito (%)	45,5±1,83	46,02±1,25	45,6±0,95	44,87±2,08	43,16±2,62	44,06±1,97
Hemoglobina (g/dL)	15,44±0,39	15,82± 0,35	15,52± 0,47	15,46±0,76	14,7±1,66	15,12±1,01
VCM ¹ (fL)	52,80±2,37	51,36±2,05	51,74±1,37	52,74±1,88	51,13±1,91	52,37±1,65
HCM ² (pg)	17,93± 0,46	17,65±0,62	17,61±0,29	18,16±0,47	17,4±1,58	17,95±0,70
CHCM ³ (g/dL)	33,99±1,33	34,40±0,74	34,03± 0,68	34,45±0,79	34,02±2,87	34,31±1,39
RDW-CV ⁴ (%)	15,97±0,91	16,85± 1,10	17,16±0,56	16,93±1,31	18,88±1,39	17,94±0,72
RDW-SD ⁴ (fL)	26,34±2,82	26,35±1,94	26,97±1,28	27,96±3,03	30,25±2,83	29,31±1,67
Plaquetas (10 ³ /μL)	669,0± 146,35	610,1±85,76	580,0±95,5	481,1±168,89	536,0±209,71	569,7±126,27
VMP ⁵ (fL)	7,74±0,15	7,65±0,22	7,73±0,18	8,07±0,38	8,11±0,30	8,07±0,37
Leucócitos (10 ³ /μL)	7,01±2,27	7,50±1,53	7,74±1,71	6,42±2,02	5,85± 1,78	5,38±2,28
Linfócitos (10 ³ /μL)	6,30±2,11	6,51±1,42	6,56±1,73	5,09±2,09	4,66±1,76	4,12±2,11
Neutrófilos (10 ³ /μL)	0,62±0,27	0,75±0,56	0,87±0,24	0,87±0,41	0,66±0,38	0,83±0,49
Eosinófilos (10 ³ /μL)	0,07±0,01	0,07±0,09	0,06±0,02	0,05±0,07	0,02±0,02	0,04±0,06
Monócitos (10 ³ /μL)	0,02±0,02	0,07±0,07	0,09±0,08	0,06±0,04	0,13±0,18	0,07±0,09

Valores são referentes a media (± desvio-padrão) de 10 a 12 animais por grupo

1-Volume Corpuscular Médio, 2-Hemoglobina Corpuscular Média, 3- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, 4- *Red blood cell distribution width*: amplitude de distribuição das células vermelhas, 5-Volume Médio de Plaquetas

APÊNDICE II

Marcadores bioquímicos determinados em sangue de ratos sedentários (S) e treinados (T), alimentados com dietas contendo uma das três fontes protéicas: Caseína (C), Isolado protéico do soro do leite (I), e Hidrolisado protéico do soro do leite (H), após 48h do último teste de desempenho

Marcador	Sedentários			Treinados		
	CS	IS	HS	CT	IT	HT
AST (U/L)	67,16±20,42	55,78±13,97	62,77±11,54	37,89±11,96	44,93±13,90	39,29±11,38
ALT (U/L)	23,88±10,59	15,44±2,58	21,13±7,02	16,01±8,68	16,05±5,92	14,09±4,56
CK (U/L)	311,42±242,68	515,28±349,38	395,51±265,17	194,66±104,58	265,53±209,69	208,45±147,39
LDH (U/L)	560,48±190,03	731,51±164,89	606,35±166,72	562,72±176,94	479,26±257,43	459,86±237,04
Creatinina (mg/dL)	0,50±0,12	0,63±0,11	0,63±0,19	0,55±0,14	0,50±0,16	0,46±0,14
tGSH-GSSG (μM)	295,72±131,75	619,13±190,66	522,10±137,97	443,18±190,97	516,73±158,91	545,63±119,96
GPx (nmol/min/ml)	* 149,03±101,95	144,47±66,02	100,38±45,88	169,01±140,06	131,64±82,06	33,64±9,62

Valores são referentes a media (± desvio-padrão) de 10 a 12 animais por grupo

* essa análise foi realizada com 5 animais/grupo