



UNICAMP

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


**"Efeito do consumo do proteolizado do soro de leite
em parâmetros do estômago e coração de ratos jovens
exercitados"**

Iara Ribeiro Carvalho
Nutricionista

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
Orientador

PARECER

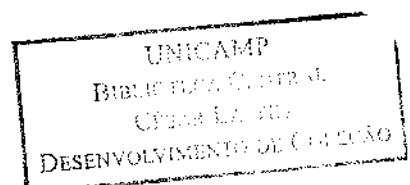
Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por por **Iara Ribeiro Carvalho** aprovado pela Comissão Julgadora em 25 de janeiro de 2008.


Campinas, 25 de janeiro de 2008.

Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição.

Campinas, janeiro de 2008.



UNIDADE 73C
Nº CHAMADA:
TIUNICAMP 053
V. _____ EX. _____
TOMBO BOCL 75689
PROC 16.129-08
C _____ D x
PREÇO 11,00
DATA 20-02-08
BIB-ID 424073

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C253e	Carvalho, Iara Ribeiro Efeito do consumo do proteolizado do soro de leite em parâmetros do estômago e coração de ratos jovens exercitados / Iara Ribeiro Carvalho. Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Jaime Amaya-Parfán Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos I. Soro do leite. 2. Glicogênio. 3. Pepsina. 4. Creatina-quinase. 5. Hidrolisados de proteína. I. Amaya-Parfán, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
-------	---

Título em inglês: Intake of whey hydrolysate by the exercising rat and its effects on stomach and heart parameters

Palavras-chave em inglês (Keywords): Milk whey proteins, Glycogen, Pepsin, Creatine kinase, Protein hydrolysates

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

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

Banca examinadora: Jaime Amaya-Parfán

Nelson Adami Andreollo

Miguel de Arruda

Erica Maria Marcondes Tassi Granja

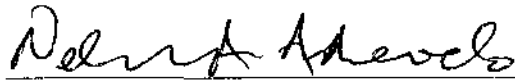
Data de defesa: 25-01-2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

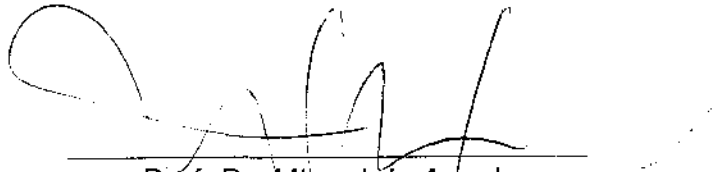
BANCA EXAMINADORA



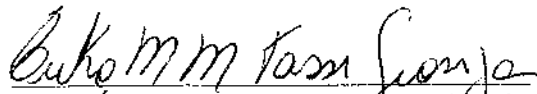
Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán
(Presidente) Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP



Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo
(Membro) Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP



Prof. Dr. Miguel de Arruda
(Membro) Faculdade de Educação Física/UNICAMP



Profª. Dra. Érika Maria Marcondes Tassi Granja
(Membro) Instituto de Biologia/UNICAMP

260802298

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios...

**Por isso, cante, ria, dance, chore e
viva intensamente cada momento de sua vida ...**

**Antes que a cortina se feche e
o espetáculo termine sem aplausos!”**

Charles Chaplin

Dedicatória

Pai... Um grande homem que muito lutou pela minha educação e formação de caráter... Sem sua ajuda eu não teria chegado até aqui... Saudade...

Mãe... Obrigada por tudo... Seu incentivo e sua força me ajudam a seguir...

Sérgio Henrique... Agradeço a grande influência de me trazer a essa realidade profissional e pelo incontestável amor, carinho e paciência...

Agradecimentos

Inicialmente a **DEUS** pela força nessa jornada e por tudo que tenho na vida.

Aos **meus pais** (José [*in memoriam*] e Odila), **minha irmã** (Janaína) e **meu cunhado** (Adriano) pelo apoio que sempre me deram.

À **Ana Cláudia Coelho Nery Diez** pelos momentos de alegria e também de dificuldade, pela amizade construída.

À **María Inés Abecia-Soria** pela parceria de trabalho e por toda ajuda dada nas mais diversas dúvidas durante o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán** pela orientação e grande colaboração em meu trabalho.

À **Carla Greggi** por todo o auxílio em procedimentos no laboratório.

Ao **Éder Multer** pela grande ajuda na eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência.

A **Elisvânia dos Santos** pela indispensável ajuda com o sacrifício dos animais.

À **Prof^a. Dra. Denise Vaz de Macedo** pelo empréstimo da esteira rolante para o treinamento dos animais (Labex-IB-Unicamp).

À **Prof^a. Dra. Teresa Dib Z. Atvars** pela autorização para utilizar o espectrofluorímetro em seu laboratório (IQ-Unicamp).

À mestranda **Raquel Domingues** pela ajuda com o espectrofluorímetro.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Aos companheiros de disciplinas: **Elisa Jackix, Pablo Christiano e Telma Faraldo**, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos colegas do laboratório de Fontes Protéicas (**mestrandos e doutorandos**) pela companhia e descontração durante as análises em laboratório.

À aluna de iniciação científica **Juliana** e aos estagiários (**Charles e Isabela**) que muito nos auxiliaram no ensaio biológico.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA.....	5
• Proteína do soro de leite.....	7
• Hidrolisados protéicos e suas propriedades funcionais.....	9
• Metabolismo de proteínas e aminoácidos.....	12
• Exercício Físico.....	15
• Metabolismo do miocárdio durante o exercício.....	20
• Glicogênio.....	22
• Exaustão.....	23
• Creatina Quinase.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO 2 – Proteína do soro do leite e exercício: regulação das reservas de glicogênio e da atividade enzimática da glicogênio sintase, glicogênio fosforilase e creatina quinase miocárdicas em ratos.....	37
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	41

2.1. INTRODUÇÃO.....	43
2.2. METODOLOGIA.....	46
2.2.1 Ensaio biológico.....	46
2.2.2 Treinamento e Teste de exaustão.....	49
2.2.3 Sacrifício dos animais.....	51
2.2.4 Determinações.....	51
a) Quantificação do glicogênio.....	51
b) Atividade da creatina quinase (fração MB).....	51
c) Atividade enzimática da glicogênio sintase.....	52
d) Atividade enzimática da glicogênio fosforilase.....	52
2.2.5 Análise estatística.....	53
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
• Consumo da dieta.....	54
• Creatina quinase.....	55
• Glicogênio do miocárdio.....	56
• Glicogênio sintase.....	59
• Glicogênio fosforilase.....	66
2.4. CONCLUSÃO.....	69
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

CAPÍTULO 3 – Atividade enzimática da pepsina e perfusão de peptídeos através do estômago de ratos Wistar alimentados com proteína pré-hidrolisada do soro de leite.....	77
RESUMO.....	79
ABSTRACT.....	81
3.1. INTRODUÇÃO.....	83
3.2. METODOLOGIA.....	85

3.2.1	Ensaio biológico.....	85
3.2.2	Treinamento e Teste de exaustão.....	87
3.2.3	Sacrifício dos animais.....	88
3.2.4	Determinações.....	89
	a) Atividade da pepsina (hemoglobina como substrato).....	89
	b) Aminoácidos e peptídeos no estômago.....	89
	• Eletroforese capilar.....	90
	• Análise de aminoácidos livres por cromatografia líquida.....	90
	• Análise de peptídeos por cromatografia líquida.....	91
3.2.5.	Análise estatística.....	91
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
	• Peso dos animais.....	92
	• Atividade enzimática da pepsina.....	94
	• Composição de aminoácidos.....	95
	• Resultados eletroforéticos.....	97
	• Resultados cromatográficos.....	101
3.4.	CONCLUSÃO.....	108
3.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
	 CONCLUSÃO GERAL.....	 115
	 APÊNDICE.....	 117

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

1.1.	Ciclo alanina-glicose.....	14
1.2.	ATP como fonte de energia.....	17
1.3.	Ação da creatina quinase.....	25

CAPÍTULO 2

2.1	Esquema da divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física.....	47
2.2	Média da atividade enzimática da creatina quinase miocárdial nos grupos experimentais.....	56
2.3	Média do conteúdo de glicogênio no miocárdio nos grupos experimentais em mg/g tecido.....	58
2.4	Interações entre dieta e atividade física, com relação à atividade da enzima glicogênio sintase no miocárdio dos grupos experimentais.....	61
2.5	Atividade da enzima glicogênio fosforilase miocárdica dos grupos experimentais.....	67

CAPÍTULO 3

3.1.	Esquema da divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física.....	86
3.2.	Médias de tempo de exaustão (minutos) nos grupos experimentais submetidos à prova.....	93
3.3.	Média da atividade enzimática da pepsina em mg tirosina/g nitrogênio nos grupos experimentais	95
3.4.	Perfil eletroforético do grupo ISX (estômagos de animais sedentários-exaustos que tinham consumido dieta com isolado e receberam infusão do isolado).....	97

3.5.	Perfil eletroforético do grupo HSX (estômagos de animais sedentários-exaustos que tinham consumido dieta com hidrolisado e receberam infusão do hidrolisado).....	98
3.6.	Perfil eletroforético do grupo ITX (estômagos de animais treinados-exaustos que tinham consumido dieta com isolado e receberam infusão do isolado).....	99
3.7.	Perfil eletroforético do grupo HTX (estômagos de animais treinados-exaustos que tinham consumido dieta com hidrolisado e receberam infusão do hidrolisado).....	100
3.8.	Perfil eletroforético dos fluídos obtidos, após água destilada ter sido infundida no estômago (branco).....	101
3.9.	Perfil de aminoácidos livres do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam a dieta com e a injeção do hidrolisado do soro de leite, segundo a sua distribuição por grupos de atividade física.....	102
3.10.	Perfil de aminoácidos totais e livres do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam dieta com e injeção do hidrolisado do soro de leite, pertencentes ao grupo TX.....	103
3.11.	Perfil de aminoácidos totais e livres do perfusado externo do estômago de ratos que receberam infusão de suspensão com hidrolisado do soro de leite do grupo TX.....	104
3.12.	Perfil de aminoácidos totais e livres do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam infusão de suspensão com isolado do soro de leite do grupo TX.....	104
3.13.	Perfil de aminoácidos totais e livres do perfusado externo do estômago de ratos que receberam infusão com suspensão do isolado do soro de leite do grupo TX.....	105
3.14.	Valores de aminoácidos do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam injeção de solução com hidrolisado e isolado do soro de leite do grupo TX.....	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

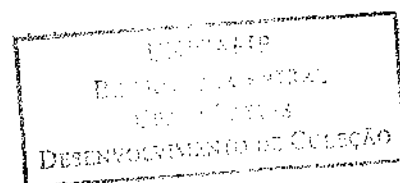
- 2.1. Composição centesimal média das dietas experimentais (base úmida) ... 49

CAPÍTULO 3

- 3.1. Comparação dos Aminoácidos Indispensáveis e Condicionalmente Indispensáveis das Fontes Protéicas Utilizadas nas Dietas Experimentais com FNB/IOM (mg/g proteína) 96

RESUMO

Estudos recentes sugerem que o consumo das proteínas do soro de leite, quando parcialmente hidrolisadas, resulta em efeitos fisiológicos diferentes daqueles produzidos pelas proteínas intactas. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi verificar as alterações metabólicas causadas nos tecidos do estômago e coração, e na resistência à exaustão, utilizando ratos Wistar alimentados com isolado do soro de leite, ou seu proteolizado enzimático, e submetidos a exercício físico. Foram investigadas possíveis alterações na atividade enzimática da pepsina, glicogênio sintase, glicogênio fosforilase, creatina quinase e glicogênio do miocárdio e a perfusão de peptídeos através do estômago. O ensaio biológico teve duração de 42 dias, com 120 ratos divididos em 12 grupos (n=10), sendo três fontes protéicas: caseína (C), proteína hidrolisada (H), proteína intacta do soro de leite (I) e quatro tipos de atividade física: treinado (T), treinado-exausto (TX), sedentário (S), sedentário-exausto (SX), em esteira rolante, por quatro semanas. Foram observados valores mais altos na atividade da enzima creatina quinase (sem diferença significativa) nos grupos T e TX, quando esses consumiram dieta H. Em relação ao treinamento, foram encontradas maiores quantidades de glicogênio miocárdico nos animais submetidos a menor atividade física. Em relação à dieta, as concentrações de glicogênio variaram aleatoriamente. Entretanto, os animais que consumiram a dieta H exibiram menor atividade da glicogênio sintase do que aqueles que receberam dieta I, e esses também menores que a dieta C. Na enzima glicogênio fosforilase, notou-se valores maiores de atividade enzimática nos grupos de animais do grupo T em relação



aos outros grupos, sendo que a dieta H mostrou resultados menores em comparação com as outras dietas. Quanto à exaustão, foram comparados os grupos H e I, sendo que os grupos que foram submetidos a treinamento prévio (TX) mostraram-se mais resistentes à exaustão do que aqueles que foram mantidos sedentários (SX). Na atividade enzimática da pepsina, os resultados entre grupos foram semelhantes, notando-se aumento no grupo sedentário que consumiu o hidrolisado, mas desaparecendo com a exaustão. Estudo da possibilidade de perfusão de peptídeos através da parede estomacal encontrou evidências de que, ao menos, um peptídeo rico em valina é detectado no perfusado externo ao cabo de duas horas. Foi observada maior quantidade de picos eletroforéticos no conteúdo do estômago dos animais dos grupos SX e TX que receberam infusão do hidrolisado e teores de aminoácidos livres mais elevados no grupo S do que nos demais. Associando os valores encontrados para aminoácidos livres com os valores de aminoácidos totais, no interior e exterior do estômago, pode-se afirmar que o conteúdo de peptídeos formados no estômago, no grupo que recebeu a infusão de hidrolisado, foi superior à que recebeu o isolado. Conclui-se que ambos o tipo de atividade física e a fonte protéica da dieta podem influenciar aspectos fisiológicos, tais como a atividade da pepsina, a facilidade com que peptídeos são gerados e acumulados no órgão, sendo que alguns peptídeos podem atravessar a parede estomacal. As implicações decorrentes destes fenômenos ainda aguardam maior investigação.

Palavras-chave: soro de leite, glicogênio, pepsina, creatina quinase, hidrolisado protéico.

ABSTRACT

Recent studies suggest that the consumption of milk whey proteins, if partially hydrolyzed, result in different physiological effect from those produced by the ingestion of the unbroken proteins. Therefore, the objective of the present work was to verify eventual metabolic alterations caused in the stomach and heart tissues of exercising Wistar rats fed an enzymatic milk whey hydrolyzate, as compared to cohorts receiving the unhydrolyzed proteins. The enzymatic activity of pepsin and those of glycogen synthase, glycogen phosphorylase, creatine kinase, as well as glycogen stores of the myocardium were thus investigated. Additionally, the perfusion of peptides through the stomach wall using capillary electrophoresis and liquid chromatography was also verified. The biological assay was conducted with 120 rats, during 42 days. The animals were divided into 12 groups (n=10), as follows: three protein sources: casein (C), protein hydrolyzate (H) and the unbroken whey protein (I), in addition to four types of physical activity: trained (T), trained-exhausted (TX), sedentary (S), sedentary-exhausted (SX) for four weeks. For creatine kinase, higher activities were observed (without significant difference) in groups T and TX, when these consumed diet H. With regard to myocardial glycogen, higher stores were found in the animals with lesser physical activity, while glycogen concentrations varied randomly in response to the diet. However, the animals that consumed diet H exhibited lower glycogen synthase activity in comparison to those that received diet I, which in turn were lower than those that received diet C. As for glycogen phosphorylase, higher values were noticed in the groups subjected to training (T) in relation to the other groups. Similarly, the

animals on diet H also responded with lower activities. With regard to exhaustion time, only those groups that underwent training (TX) appeared to be more resistant to exhaustion than those that remained sedentary (SX). The enzymatic activity of pepsin did not show significant differences among groups, except for the increase of the sedentary that consumed diet H. The increase, however, disappeared when the animals were brought to exhaustion. Study of the possibility of perfusion of whey protein peptides through the stomach wall suggested that at least one peptide rich in valine promptly perfused to the external fluid. A higher number of capillary electrophoretic peaks were also observed in the stomach contents of the animals of groups SX and TX that received the hydrolyzate infusion and, by liquid chromatography, it was possible to notice that the group S stomachs had greater levels of free amino acids than the other groups. Comparing the values found for free amino acids with the total amino acids, in both the inside and outside of the stomach, it could be stated that the content of peptides formed in the stomach was considerably greater in the group infused with the hydrolyzate than with the isolate. It is concluded that chronic consumption of the whey protein hydrolyzate as the only source of protein results in enzymatic changes consistent with a more efficient physiologic state, favorable to higher physical performance, such as higher myocardial creatine kinase and lower glycogen kinase and phosphorylase activities. No significant changes in pepsin activity in the rat stomach were observed, but the readiness with which the hydrolyzate peptides accumulate and traverse the organ wall was evident. Further data to provide a better understanding of the implications of consuming prehydrolyzed proteins await investigation.

Key-Words: milk whey proteins, glycogen, pepsin, creatine kinase, hydrolyzed protein.

O exercício físico produz alterações metabólicas no organismo, incluindo o sistema respiratório, cardíaco, muscular e gastrintestinal^{1,2}. Tais alterações podem influenciar as necessidades de aminoácidos e proteína e requerer a modificação da dieta e do consumo total de energia, de acordo com a intensidade da atividade, temperatura do ambiente, gênero e idade do indivíduo³.

Dessa forma, a nutrição adequada é um dos fatores fundamentais no desempenho físico, responsável pela formação de novos tecidos, reposição de perdas de vários nutrientes que ocorrem durante os exercícios, como também, reparo das células já existentes². Dentre esses nutrientes está a proteína que é requerida em 10 a 15% da energia total consumida diariamente. O leite é uma das principais fontes protéicas, sendo um dos mais importantes e um dos mais antigos produtos funcionais disponíveis para os humanos, por esse motivo, cientistas estão desenvolvendo estudos dos componentes do leite, incluindo o soro, e o impacto que eles podem ter na saúde e na doença⁴.

O soro do leite é um produto de alto valor nutricional, pois contém alto teor de aminoácidos essenciais, principalmente os de cadeia ramificada⁵. É extraído durante o processo de fabricação do queijo e é rico em vitaminas, sais minerais e α -lactalbumina^{6,7}, atualmente pesquisas têm mostrado aplicações tanto no esporte como na área clínica.

Como já comprovado em diversos estudos, as proteínas hidrolisadas do soro de leite têm um papel importante como ingrediente primário na formulação de dietas especializadas com indicação para diversas doenças e com aplicação

também na alimentação ou suplementação de indivíduos submetidos ao exercício físico⁸.

Estudo anterior em nossos laboratórios⁹ mostrou que o consumo de proteólisado do soro de leite, como única fonte protéica para ratos jovens submetidos ao exercício físico, mostrou-se superior à proteína intacta na performance do animal, segundo os parâmetros de lactato, albumina e proteínas séricas totais. Anteriormente¹⁰, ação semelhante em ratos exercitados já tinha sido sugerida em outro estudo com o hidrolisado da α -lactalbumina bovina.

As proteínas hidrolisadas têm sido pouco estudadas, com relação a seus benefícios para o organismo submetido ao exercício físico, desse modo, um dos interesses desse projeto foi estudar esses efeitos em ratos exercitados em relação aos sedentários e suas possíveis vantagens para a saúde humana. Tendo em vista os efeitos positivos observados no rato, foi considerado de interesse pesquisar alguns fenômenos bioquímicos que poderiam começar a explicar os achados anteriores.

O objetivo do presente trabalho foi verificar as possíveis alterações metabólicas ocorridas nos tecidos do estômago e coração de ratos Wistar alimentados com dietas com isolado do soro de leite e seu proteólisado (grau de hidrólise ~ 11%) e submetidos ao exercício físico em esteira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) LANCHA JR., A.H. **Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
- 2) MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- 3) BOIRIE, Y., et al. Slow and fast dietary protein differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**, v.94, n.26, p.14930-14935, december 1997.
- 4) MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v.9, n.2, p.136-156, 2004.
- 5) HERMANSE, J.E.; OSTERSEN, S.; AAES, O. Effect of the levels of fertilizer, grass and supplementary feeds on nitrogen composition and renneting properties of milk from cows at pasture. **Journal Dairy Research**, v.61, n.2, p.179-189, may 1994.
- 6) HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades funcionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, jul/ago 2006.
- 7) JAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potencial functional ingredient for food industry. **Journal of Food Science Technology**, v.36, n.3, p.189-204, may 1999.

8) CALBET, I.A.L.; HOLST, J.J. Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. **European Journal of Nutrition**, v.43, n.3, p.127-139, June 2004.

9) PIMENTA, F.M.V., et al. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.984-991, September 2006.

10) TASSI, E.M.; AMAYA-FARFÁN, J.; AZEVEDO, I.R.M. Hydrolysed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**, v.18, n.5, p.875-881, May 1998.

**REVISÃO
DA
LITERATURA**

Proteína do Soro de Leite

As proteínas do leite são, há muito tempo, utilizadas na alimentação humana, pois seus efeitos têm grande interesse científico e comercial devido a estas serem de fácil digestão e de alto valor biológico. Essas proteínas contêm os aminoácidos essenciais em quantidade e proporções próximas do adequado para o organismo em crescimento, comparadas às várias fontes de proteína vegetal como soja, milho e glúten de trigo¹. Entre essas proteínas estão: a caseína, correspondendo a 80% das proteínas totais do leite e, as proteínas do soro (~20%), incluindo β -lactoglobulina, α -lactalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas e o glicomacropéptido^{2,3}.

Dentre as principais proteínas do soro do leite, a β -lactoglobulina, corresponde à metade do total de proteínas do soro (45-57%), representando no leite bovino cerca de 3,2 g/L, sendo resistente a ação de ácidos e enzimas proteolíticas presentes no estômago. Já a α -lactalbumina que corresponde a 15-25%, é rica em triptofano sendo muito utilizada na produção de fórmulas infantis devido a sua similaridade estrutural protéica com o leite materno humano. Essas duas proteínas são consideradas fontes de aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada^{3,4}.

Atualmente, estudos desenvolvidos focando alimentos com ações na saúde humana envolvem as proteínas solúveis retiradas do soro do leite. Embora ricas em aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano⁵, essas proteínas

solúveis do soro foram por muito tempo consideradas por ambientalistas e engenheiros de processos como resíduo de alto potencial poluidor da indústria de leite⁶, já que essas são extraídas da porção aquosa do leite, gerada durante o processo de fabricação do queijo⁴.

Diversas propriedades fisiológico-funcionais desempenhadas pelas proteínas do soro do leite são conhecidas e também, têm sido apontadas como nutrientes portadores de atividade funcional, como por exemplo, imunoglobulinas e peptídeos imunomodulares, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo animal, como a ação sobre o sistema imunológico⁷⁻¹².

Outra importante ação exercida pelo soro do leite é um efeito citoprotetor a partir da promoção da síntese de glutathione, por meio da conversão do aminoácido cisteína para glutathione, que é um potente antioxidante intracelular^{3,13}. Os aminoácidos precursores da glutathione disponíveis no soro podem aumentar a concentração desta em tecidos importantes, estimular a imunidade, e diminuir o potencial carcinogênico de compostos xenobióticos¹⁴. As enzimas do trato digestório têm importante papel na síntese de glutathione, pois é através dessas que os peptídeos são liberados e atuam como protetores contra lesões das células da mucosa gástrica pelo mecanismo de citoproteção¹⁵⁻¹⁷.

As proteínas do soro também têm apresentado efeito protetor contra a manifestação de infecções e processos inflamatórios, ação anticancerígena e estímulo da absorção e função intestinal. Além disso, algumas dessas proteínas possuem propriedades antioxidante, anti-hipertensiva, antitumor, hipolipidemiante, antiviral, antibacteriana, aumento da síntese de hormônios e da absorção de

minerais^{3,7-12}. Contudo, um estudo comparando a proteína do soro do leite com a caseína em relação à capacidade de promover o esvaziamento gástrico, mostrou que a proteína do soro do leite gerou uma porcentagem de radioatividade residual gástrica que correspondeu à metade da observada para a caseína após 60 minutos e menos da metade após 120 minutos¹⁸.

Hidrolisados Protéicos e Suas Propriedades Funcionais

A hidrólise de proteínas é realizada por muitas razões, entre elas a agregação de características nutricionais e retardo da deterioração. Com a hidrólise de proteínas são formados agregados de peso molecular variável, incluindo peptonas, misturas de peptídeos e aminoácidos livres. A hidrólise de proteínas pode ser executada por enzimas, ácido ou base, mas o uso de enzimas é o método preferido para a obtenção de hidrolisados para aplicações nutricionais¹⁹, pois o hidrolisado devido à clivagem específica de ligações peptídicas pelas enzimas tem em seu produto final mais peptídeos e aminoácidos livres³.

O processo de hidrólise com ácido ou base pode destruir a forma L dos aminoácidos e produzir a forma D, que é potencialmente tóxica¹⁹. Outra desvantagem importante desse processo é que a hidrólise com ácido oxida cisteína e metionina, destrói serina e treonina, e converte glutamina e asparagina em glutamato e aspartato, respectivamente, reduzindo a qualidade da proteína e o valor biológico²⁰.

O grau de hidrólise da proteína pode ser um fator importante que exerça influência em alguns parâmetros. Conforme verificado por Tassi, Amaya-Farfán e Azevedo (1998)²¹ que investigaram o efeito da alimentação com α -lactalbumina intacta e hidrolisada (~15%), encontraram vantagem na glicose e albumina séricas e no glicogênio muscular de ratos. Em contrapartida, Ramos (2001)²² utilizou proteína hidrolisada do soro do leite com grau de hidrólise ~31% e não encontrou vantagens na performance física ou nos parâmetros bioquímicos de ratos em relação a proteína intacta.

As proteínas hidrolisadas possuem várias propriedades funcionais, o que as torna atrativa como fonte de proteínas para a nutrição humana, tanto no uso de produtos médicos como em outros de uso geral²³. Estudos recentes^{24,25} sugerem que o hidrolisado das proteínas do soro do leite possui alta digestibilidade como suas precursoras intactas, mas são mais facilmente absorvidas devido a conter peptídeos de pequeno tamanho, di e tripeptídeos, além de terem as mesmas propriedades funcionais. Essa facilidade confere a essas proteínas uma grande vantagem na escolha de sua utilização na fabricação de produtos com características especiais em relação à caseína, visto que, essa precipita, formando pequenos fragmentos sólidos no estômago tendo assim uma menor cinética de absorção intestinal. Dessa forma, concentração plasmática de aminoácidos aumenta mais rapidamente com a ingestão de peptídeos hidrolisados do que após o consumo das proteínas completas correspondentes. Além disso, o esvaziamento gástrico e a absorção intestinal dos aminoácidos ocorrem mais rapidamente para os hidrolisados²⁵.

Devido ao mais rápido esvaziamento gástrico desses peptídeos hidrolisados no estômago, as proteínas do soro do leite têm sido utilizadas como uma boa alternativa para pacientes com intolerância de volume²⁶. Enquanto a caseína forma coágulos no estômago, passando vagarosamente para o intestino, as proteínas do soro do leite não coagulam em condições ácidas, sendo consideradas "proteínas rápidas", pois alcançam o jejuno rapidamente após entrarem no sistema gastrointestinal²⁷. Depois de alcançar o intestino, o hidrolisado do soro é mais lento do que a caseína, tendo assim melhor absorção³.

Outras aplicações no sistema gastrointestinal incluem atividades positivas para pacientes com doença de Crohn e a síndrome do intestino curto²³. Também foi encontrado que o consumo de hidrolisados de proteínas do soro tem significativo efeito insulínico²⁸, acentuando a resposta do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP)²⁵.

Outra característica relevante do hidrolisado do soro de leite, relacionada à saúde do sistema cardiovascular, está na ação inibitória da enzima ECA (enzima conversora de angiotensina). Essa ação está relacionada à inibição enzimática por competição, em virtude da estrutura e geometria molecular desses peptídeos. Assim, na presença de certos peptídeos derivados do soro do leite, a ECA não converte a angiotensina I em angiotensina II, uma molécula de alto potencial vasoconstritor, e inibe a ação da bradicinina, um vasodilatador, sendo esse um processo importante no controle da hipertensão^{3,4,29}.

Estudo *in vitro* de Pins e Keenan (2004)³⁰ avaliou o efeito de um hidrolisado de proteínas do soro e observaram que sua utilização reduziu significativamente a

pressão sanguínea, tanto sistólica como diastólica, via inibição da ECA e aumentou a atividade da bradicinina em humanos. Outro estudo observou que os voluntários apresentavam significativa elevação da concentração de HDL colesterol, redução da concentração de triacilgliceróis e diminuição do risco cardíaco³¹. O uso de hidrolisados protéicos do soro de leite tem se incrementado recentemente, não somente pelas propriedades funcionais tecnológicas que proteínas modificadas trazem para os produtos industrializados, mas, também pelos novos atributos relacionados à fisiologia animal.

Metabolismo de Proteínas e Aminoácidos

As principais substâncias digestivas secretadas pelas glândulas gástricas são o ácido clorídrico e o pepsinogênio. O ácido clorídrico ativa o pepsinogênio para formar pepsina, que é a enzima que inicia a digestão de proteínas³².

O pâncreas e o estômago secretam enzimas (zimogêneos) na forma de enzimas inativas que serão ativadas por uma seqüência de eventos em cascata. Inicialmente, a atividade da enzima pepsinogênio (secretada no estômago) é determinada pela sua conversão à pepsina por ação do ácido clorídrico. A mudança conformacional na estrutura da enzima faz com que seja iniciado o processo digestivo das proteínas e, simultaneamente, ativada as enzimas pancreáticas. A pepsina converte o tripsinogênio secretado pelo pâncreas no duodeno em tripsina, essa, por sua vez, ativa a quimotripsina e a elastase³³.

No intestino as proteínas chegam na forma de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos, sendo absorvidos primeiro os dipeptídeos, em seguida os tripeptídeos e por último os aminoácidos. A absorção desses e dos peptídeos de seqüência maior é processada nos enterócitos e posteriormente, alcançam a circulação êntero-hepática³⁴.

No exercício prolongado de intensidade moderada, a contribuição do metabolismo de proteínas para a produção de energia provavelmente não é maior do que cerca de 6% da demanda total de energia. Atualmente, não existem evidências de que a ingestão de quantidades superiores à necessidade estimule a incorporação dessa proteína excedente nos tecidos orgânicos, mesmo em exercícios de força, como por exemplo, fisiculturistas³⁵.

A liberação de aminoácidos pelo fígado é diretamente proporcional à intensidade do esforço, podendo atingir vários tecidos através da circulação sanguínea. No músculo, os aminoácidos, principalmente os de cadeia ramificada, são consumidos, gerando intermediários do ciclo de Krebs fornecendo seu grupamento amínico ao piruvato, convertendo-o em alanina. Esta, por sua vez, segue pelo sistema circulatório até o fígado, onde será desaminado e novamente convertido a piruvato. O piruvato atravessa a membrana mitocondrial, onde é convertido a oxaloacetato e estimula a enzima PEPCK (fosfoenol piruvato carboxiquinase), catalisando a reação de síntese do fosfoenolpiruvato. Esse ponto é reversível e pode promover a síntese de glicose hepática, completando o ciclo alanina-glicose. Esta via de produção de glicose tem sua origem no tecido muscular que, durante a atividade física, quebra a glicose gerando piruvato³³.

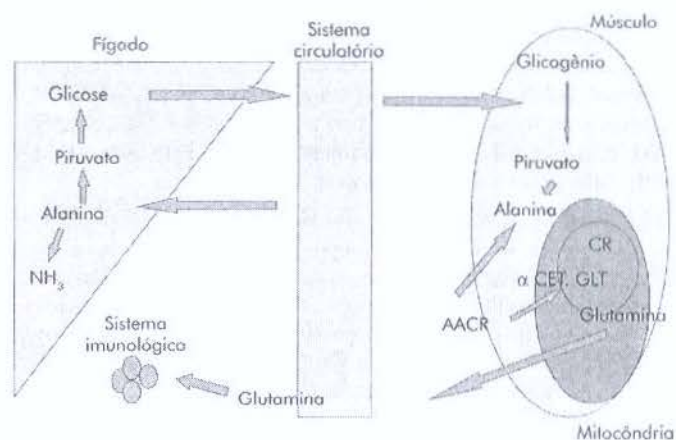


Figura 1. Ciclo Alanina-Glicose

(Onde: CK = Ciclo de Krebs; α CET. GLT = α Cetogluturato; AACR = Aminoácidos de Cadeia Ramificada).

Fonte: Lancha Jr., 2004³³.

O músculo possui uma capacidade limitada de oxidação dos aminoácidos, sendo os mamíferos capazes de oxidar alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, isoleucina e valina. Portanto, não existe um mecanismo de armazenamento do excesso de proteínas dietéticas no organismo, e qualquer aminoácido ingerido além da necessidade imediata é oxidado, e o nitrogênio é excretado³⁴.

Estudo mostrou que o estômago é um local altamente significante do trato gastrointestinal para absorção de peptídeos³⁵. Contudo, existem fortes evidências para a existência de múltiplos sistemas de transportadores de peptídeos, incluindo um tipo que é eletrogênico e que requer uma força próton-motiva e dois cotransportadores H^+ para cada peptídeo transportado. A taxa de absorção de

peptídeos pode ser responsiva ao nível de consumo dietético e quantidade de proteínas³⁶.

A velocidade de absorção dos aminoácidos provenientes da dieta pelo intestino varia conforme o tipo de proteína, podendo afetar a síntese protéica pós-prandial, quebra e depósito. Outros fatores que podem interferir são a motilidade gástrica e intestinal, digestão luminal e a absorção pela mucosa²⁷. Diversos tecidos como músculo, glândulas mamárias, fígado, rins, mucosa intestinal e outros têm suspeita ou comprovada habilidade para utilizar peptídeos como fonte de aminoácidos para suprir suas demandas celulares³⁵.

Exercício Físico

O exercício exerce alguns efeitos altamente específicos sobre o metabolismo protéico do organismo. Os exercícios de musculação resultam em aumento de massa muscular, indicando intensificação na formação de actina e miosina. Os exercícios de resistência elevam o conteúdo de proteínas musculares, principalmente aquelas envolvidas no metabolismo oxidativo possuindo também alguns efeitos imediatos sobre o metabolismo protéico³³.

Para a realização do exercício é necessária a integração coordenada de três importantes sistemas orgânicos: músculo-esquelético, cardiovascular e respiratório. Os três estão diretamente acoplados para prover troca gasosa homeostática entre o ambiente externo e as fibras musculares em atividade³⁶.

O corpo utiliza três sistemas de energia principais para a provisão da força muscular necessária ao exercício. O primeiro é o sistema do fosfagênio que armazena energia das ligações de alta energia do trifosfato de adenosina e da fosfocreatina, ambos encontrados no interior das fibras musculares, sendo que esse sistema permite surtos muito intensos de energia por períodos de 10 a 15 segundos. O segundo é o sistema glicogênio-ácido láctico, o qual libera energia pela conversão do glicogênio em ácido láctico, podendo suprir energia com intensidade de cerca da metade do sistema fosfagênio podendo assim sustentar a contração muscular máxima por períodos de 30 a 40 segundos. O último sistema é o aeróbico que libera energia pela metabolização dos carboidratos, das gorduras e das proteínas com oxigênio. Provedor energia com intensidade da ordem de um quarto da do sistema fosfagênio, mas sua duração é limitada, definida pela disponibilidade dos nutrientes apropriados³².

A intensidade e a duração do exercício são fatores determinantes na seleção do substrato energético para o corpo, para curta duração e alta intensidade o corpo utiliza os estoques de adenosina trifosfato (ATP) e creatina fosfato (CP) para o exercício prolongado, usa carboidratos, lipídeos e proteínas^{38,39}. O trifosfato de adenosina (ATP) é o único combustível que pode ser usado diretamente pelo músculo esquelético para a contração. Esse estoque no músculo é relativamente pequeno e por isso deve sofrer contínua ressíntese a partir de seus produtos de degradação: o difosfato de adenosina (ADP) e o monofosfato de adenosina (AMP).

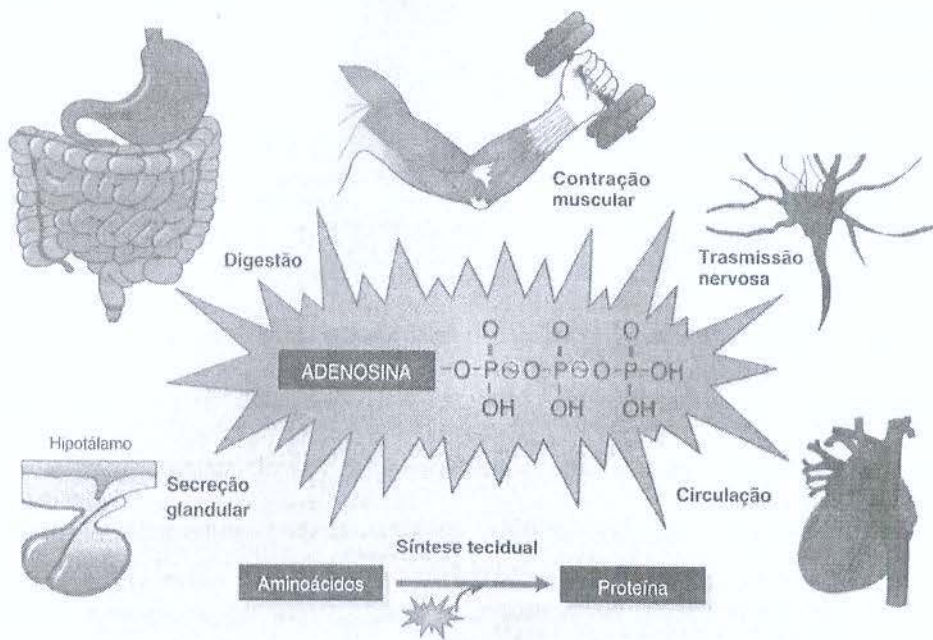


Figura 2: ATP como fonte de energia.

Fonte: Mcardle, 1998⁴⁰.

Segundo Carvalho et al (2003), a intensidade do exercício é proporcional à participação dos carboidratos como fonte de energia. A contribuição da gordura se torna expressiva quando a atividade se prolonga e se mantém em intensidade francamente aeróbia. Contudo, a proporção de energia provinda da gordura tende a diminuir quando a intensidade do exercício aumenta o que exige maior participação dos carboidratos. A proteína, com a maior duração do exercício, aumenta sua participação, o que contribui para a manutenção da glicose sanguínea, principalmente por meio da gliconeogênese hepática³⁷.

Em uma revisão, Hood e Terjung (1990)⁴¹, salientam o papel dos aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina e valina), glutamina, alanina e

aspartato no metabolismo durante o exercício. A contribuição da oxidação dos aminoácidos ramificados para o fornecimento de energia pode variar de 1 a 20% do total. Durante o exercício, há elevação semelhante nas concentrações plasmáticas de leucina, o que faz prever que a contribuição deste aminoácido, no fornecimento de energia possa estar proporcionalmente aumentada. Em outro estudo, Hood e Terjung (1987)⁴² demonstram que não ocorre alteração na capacidade de oxidação da leucina em músculos de animais treinados, comparados aos sedentários, sugerindo que outros tecidos, como o fígado, possam estar envolvidos na utilização da leucina no fornecimento de energia.

Por muito tempo, os efeitos do exercício nas necessidades dietéticas de proteínas têm motivado controvérsia⁴³. Os estudos científicos vêm demonstrando que a performance e a saúde de atletas podem ser beneficiadas com a modificação dietética³⁵ influenciando a resposta ao exercício de duas formas. Primeiro, o consumo inadequado de carboidratos causa depleção mais rápida do glicogênio muscular e hepático durante o exercício contribuindo para uma maior utilização de proteínas como substrato energético. Isto pode ativar uma enzima limitante na oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada, a cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada, quando os estoques de carboidratos são baixos. Segundo, o alto consumo de proteínas pode promover um balanço de nitrogênio positivo que pode oferecer condições para a síntese protéica⁴³.

A seleção de combustível para a prática de exercícios e, as interações que ocorrem entre muitos deles, tem interferência na utilização de fontes de energia fatores como: disponibilidade do substrato, status nutricional, dieta, modo,

intensidade e duração do exercício, tipo de composição da fibra muscular, treinamento físico, e também o efeito de treinamento, drogas, hormônios, exercícios e fatores ambientais como temperatura e altitude³⁴. Nas necessidades de proteínas para atletas, interferem a composição da dieta, energia total consumida, intensidade do exercício, duração e tipo de treinamento, temperatura do ambiente, sexo e idade²⁷. Estudo examinando saciedade de proteínas encontrou que as proteínas do soro exibem um alto nível pós-prandial de aminoácidos plasmáticos, comparadas com as da caseína⁴⁴. O perfil de aminoácidos do soro é adequado para a composição corporal, promovendo a síntese protéica e o acréscimo de massa muscular³. Estudos têm mostrado que somente os aminoácidos essenciais, especialmente a leucina, são necessários para estimular a síntese protéica^{45,46}.

Para indivíduos sedentários, recomenda-se o consumo diário de proteínas entre 0,8 e 1,2g/kg de peso/dia. Para praticantes de exercícios físicos tem sido constatada uma maior necessidade de ingestão, pois as proteínas contribuem para o fornecimento de energia⁴⁷ e também o fornecimento de energia em exercício de endurance, sendo, ainda, necessárias na síntese protéica muscular pós-exercício³⁷. Segundo Lemon (1995)⁴⁸, pessoas envolvidas em treinos de resistência necessitam de 1,2 a 1,4 g de proteína por quilograma de peso ao dia e atletas de força 1,6 a 1,7 g/kg peso/dia, sendo a ingestão após o exercício mais vantajoso para favorecer a recuperação e a síntese protéica muscular.

A elevação na ingestão protéica acima das necessidades diárias implica sobrecarga orgânica que resulta em déficit energético, exigindo elevação do

consumo calórico pelo metabolismo além de que o aporte proteínico elevado promove alteração da funcionalidade renal. As proteínas contribuem com menos de 10% do total energético da atividade motora, concluindo-se assim que a ingestão elevada é considerada desnecessária para este fim³⁵.

O exercício pode induzir alterações na função gastrointestinal, mas, os efeitos no pH gástrico são desconhecidos sendo que o esvaziamento gástrico pode ser alterado por alguns fatores como a composição e o volume da dieta consumida. O exercício intenso também induz uma elevação da concentração plasmática de catecolaminas, endorfinas, e todos os hormônios gastrointestinais, que podem afetar a motilidade intestinal⁴⁹.

Metabolismo no Miocárdio Durante o Exercício

Durante o exercício dinâmico, como corrida, natação ou ciclismo, a resposta cardiovascular ao exercício é iniciada por centros de comando mais elevados do cérebro, chamados de comando central. Com a continuidade do exercício, tanto os sinais mecânicos como os metabólicos do músculo esquelético ativo fornecem feedback aos centros cardiovasculares do cérebro para uma combinação precisa entre a liberação de oxigênio sistêmico e demanda metabólica⁵⁰.

A resistência vascular diminui para facilitar aumentos da perfusão muscular já o débito cardíaco, aumenta proporcionalmente à captação de oxigênio, o que permite a manutenção e até mesmo o aumento da pressão arterial média. O

exercício estático, por exemplo, levantamento de peso e exercício isométrico, é associado a aumentos menores na captação de oxigênio, no débito cardíaco e no volume-contracção do que o exercício dinâmico, mas com aumentos equivalentes na pressão sanguínea⁵⁰.

O coração utiliza a energia química armazenada no alimento para gerar o ATP que irá acionar o seu trabalho. Entretanto, o coração depende quase totalmente da energia liberada nas reações aeróbias, sendo que, o miocárdio humano possui uma capacidade oxidativa três vezes maior que o músculo esquelético. Já as fibras miocárdicas, possuem a maior concentração de mitocôndrias de todos os tecidos e são altamente adaptadas para o catabolismo lipídico como fonte primária de ressíntese do ATP⁴⁰.

O fluxo sanguíneo pode aumentar de até 25 vezes durante o exercício mais extenuante, fazendo assim com que o débito cardíaco aumente até 6 vezes. Durante o treinamento, as dimensões das câmaras cardíacas e da massa cardíaca aumentam cada um, 40% permitindo que no exercício máximo, o coração bombeie sangue a 90% de sua capacidade máxima³². Os substratos usados pelo coração para a obtenção de energia são: glicose, ácidos graxos e lactato circulante. A utilização percentual desses substratos varia com a intensidade e a duração do exercício⁴⁰.

Glicogênio

O glicogênio é um polímero de D-glicoses unidas por ligações $\alpha(1-4)$ em que, a cada 8 a 14 resíduos, existem ramificações cujas ligações glicosídicas são do tipo $\alpha(1-6)$. Ele tem a função de armazenar glicose para uso metabólico posterior, sendo esse um suprimento constante para tecidos como o cérebro e as células vermelhas do sangue⁵¹.

Os estoques de glicose na forma de glicogênio são fisicamente limitados, visto que são moléculas altamente hidratadas³³. A capacidade do fígado de estocar glicogênio é suficiente apenas para suprir o cérebro com glicose por um período de aproximadamente meio dia, ou seja, até 10% do glicogênio em peso e nas células musculares até 1-2 % do peso⁵¹. No miocárdio o glicogênio ocupa aproximadamente 2% do volume da célula no adulto e mais do que 30% no miocárdio fetal⁵².

Os níveis de glicogênio no coração são afetados pela variedade hormonal, dieta e exercício e pela prevenção da glicogenólise induzida por catecolaminas⁵³. O carboidrato tem eficiência comprovada na recuperação do glicogênio muscular pois contribui para a manutenção do peso corporal e a adequada composição corporal, maximizando os resultados do treinamento, contribuindo para a manutenção da saúde³⁷.

Os processos opostos de degradação e síntese do glicogênio são regulados reciprocamente, ou seja, um é acelerado, enquanto o outro é inibido. A

quebra do glicogênio, ou glicogenólise requer a glicogênio-fosforilase, que catalisa a fosforólise de glicogênio (clivagem da ligação pela substituição de um grupo fosfato) produzindo glicose-1-fosfato. Essa enzima libera uma unidade de glicose se esta estiver até no mínimo cinco unidades de um ponto de ramificação. Os inibidores alostéricos da fosforilase (ATP, glicose-6-fosfato e glicose) e seu ativador alostérico (AMP) interagem diferentemente com as formas fosforilada e desfosforilada da enzima⁵¹.

A glicogênio sintase participa da síntese do glicogênio onde a unidade glicosil do UDPG (uridinadifosfoglicose) é transferida para o grupo OH do C4 em uma das extremidades não redutoras do glicogênio, formando uma ligação glicosídica $\alpha(1-4)$. Uma molécula de UTP (uridina trifosfato) é clivada a UDP (uridina difosfato) para cada resíduo de glicose incorporado no glicogênio, sendo assim o consumo de UTP energeticamente equivalente ao consumo de ATP⁵¹.

Exaustão

A fadiga, ou exaustão pode ser definida como o conjunto de manifestações produzidas por trabalho, ou exercício prolongado, tendo como conseqüência a diminuição da capacidade funcional de manter, ou continuar o rendimento esperado⁵⁴. Sua etiologia tem despertado grande interesse, principalmente devido ao fato de seu caráter multifatorial³⁴ pode ser dividido em dois componentes: fadiga periférica e fadiga central. Essa divisão leva em conta fatores metabólicos interativos, que afetam os músculos (fadiga periférica), e o cérebro (fadiga central), durante a realização de trabalho físico intenso em atletas⁵⁵.

Na fadiga periférica ocorre depleção de fosfocreatina, acúmulo de prótons e depleção de glicogênio no músculo. Na fadiga central os fatores considerados são o decréscimo da concentração da glicose sanguínea e o aumento na proporção de concentração de triptofano para os aminoácidos de cadeia ramificada na corrente sanguínea⁵⁶.

O estresse do exercício pode resultar numa adaptação bioquímica muscular que aumenta as necessidades nutricionais, com a maior utilização e/ou perda de micronutrientes³⁷. O exercício que requer mais do que a capacidade normal do corpo causa alterações agudas que temporariamente reduzem a capacidade geradora de potência do músculo, resultando em fadiga. Os mecanismos responsáveis pela fadiga dependem de fatores como intensidade, tipo e duração do exercício; atividade contrátil, composição fibrosa do músculo em contração; e nível de condicionamento do indivíduo⁵⁰.

Normalmente, a frequência cardíaca, a respiração, a temperatura corporal, a atividade enzimática e a função neuroendócrina retornam aos níveis de repouso em minutos ou horas após um período intenso e agudo de exercício⁵⁷. Por outro lado, a reposição de reservas de carboidratos e o reparo no tecido muscular danificado podem demorar dois dias ou mais. Após a fase de restauração, diversas células, tecidos e sistemas orgânicos perturbados durante o treinamento sofrem mudanças na estrutura e função, denominada fase de adaptação permitindo ao atleta exercitar-se subsequente durante mais tempo na mesma taxa de trabalho absoluta antes do aparecimento da fadiga⁵⁰.

Creatina Quinase

A creatina quinase é uma enzima citosólica que catalisa a fosforilação reversível da creatina pelo ATP sendo responsável pela síntese, transporte e utilização do ATP e creatina fosfato (CP) no músculo cardíaco^{58, 59}.

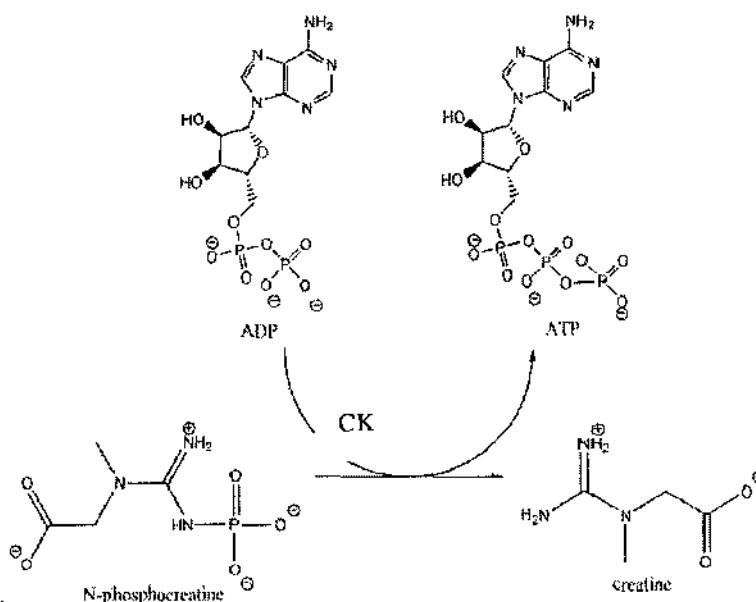


Figura 3. Ação da Creatina Quinase (CK)

É uma proteína que existe como uma família de quatro isoformas: CK-BB predominantemente no cérebro, CK-MB no músculo cardíaco, CK-MM no músculo esquelético e CK-Mt nas mitocôndrias^{59,60}, as isoenzimas são discretamente diferentes, mas com a mesma especificidade de substrato³⁴. No músculo esquelético há uma reserva relativamente grande de fosfocreatina, sendo que a utilização desta ocorre imediatamente no início da contração, para tamponar o acúmulo rápido de ADP resultante da hidrólise do ATP. A elevação momentânea

da concentração de ADP é o estímulo principal da hidrólise da fosfocreatina pela reação da creatina quinase³⁴.

A reação da creatina quinase é de equilíbrio e reversível, ocorrendo após o exercício, quando a carga energética da célula encontra-se aumentada e quando há energia suficiente disponível para refosforilar a creatina³⁴. A medida precisa das isoenzimas no sangue tem sido um importante diagnóstico de doenças cardiovasculares (CK-MB), doenças musculares (CK-MM) e neurológicas (CK-BB)⁶¹.

Estudos têm demonstrado níveis de atividade da creatina quinase diminuídos e com a distribuição das isoenzimas alteradas no miocárdio do diabético^{62, 63}. Outro estudo⁶⁴, utilizando ratos adultos imobilizados, mostrou a CK-MM diminuída e as isoenzimas MB e BB aumentadas quando comparados com animais intactos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) WALZEM, R.L.; DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, n.4, p.353-375, july 2002.
- 2) WONG, D.W.S.; CAMIRANT, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.8, p.807-844, december 1996.
- 3) MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v.9, n.2, p.136-156, 2004.
- 4) HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades funcionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, jul/ago 2006.
- 5) HERMANSE, J.E.; OSTERSEN, S.; AAES, O. Effect of the levels of fertilizer, grass and supplementary feeds on nitrogen composition and renneting properties of milk from cows at pasture. **Journal Dairy Research**, v.61, n.2, p.179-189, may 1994.
- 6) JAYAPRAKASHA, H.M.; BRUECKNER, H. Whey protein concentrate: a potencial functional ingredient for food industry. **Journal of Food Science Technology**, v.36, n.3, p.189-204, may 1999.

- 7) BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clinical and Investigative Medicine**, v.14, n.4, p.296-309, august 1991.
- 8) BOUNOUS, G.; et al. Whey proteins as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clinical and Investigative Medicine**, v.16, n.3, p.204-209, june 1993.
- 9) MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LEU, P.K. Whey protein as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, v.8, n. 5-6, p.425-434, may 1998.
- 10) FONSECA, L.M.; FONSECA, C.S.P.; BRANDÃO, S.C.C. Propriedades anticarcinogênicas de componentes do leite. **Indústria de Laticínios**, v.21, p.31-34, mai/jun 1999.
- 11) BRINK, W. Fighting cancer with whey. **Life Ext Report**, v.12, p.13-15, 1997.
- 12) SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n. 1-2, p.7-19, 1999.
- 13) PACHECO, M.T.B., et al. Efeito de um hidrolisado de proteínas do soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.1, p.47-55, jan/fev 2006.
- 14) BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. **Anticancer Research**, v.20, p.4785-4792, 2000.
- 15) LOGUERCIO, C. et al. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfidryl compounds in human. **Gut**, v.34, n.2, p.161-165, february 1993.

- 16) HIROISHI, H., et al. Role of anti-oxidant defenses against ethanol-induced damage in cultures of rat gastric epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v.289, n.1, p.103-109, april 1999.
- 17) ROBERT, A.; EBERLE, O.; KAPLOWITZ, N. Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. **American Journal of Physiology: gastrointestinal and liver physiology**, v.247, p.296-304, september 1984.
- 18) FRIED, M.D., et al. Decrease in gastric emptying time and episodes of regurgitation in children with spastic quadriplegia fed a whey-based formula. **The Journal of Pediatrics**, v.120, n.4, p.569-572, 1992.
- 19) LAHL, W.I.; BRAUN, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, v. 48, n.10, p.68-71, october 1994.
- 20) BUCCI, I.R.; UNLU, I. Protein and amino acid supplements in exercise and sport. In: **Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition**. Eds: Wolinsky, I.; Driskell, J.A.; Boca Raton, F.L.: CRC Press, p.191-212, 2000.
- 21) TASSI, E.M.; AMAYA-FARFÁN, J.; AZEVEDO, I.R.M. Hydrolysed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**, v.18, n.5, p.875-881, may 1998.
- 22) RAMOS, A.G. **Utilização das Proteínas do Soro Lácteo pelo Rato Jovem**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

- 23) FROKJAER, S. Use of Hydrolysates for Protein Supplementation. **Food Technology**, v.48, n.10, p.86-88, october 1994.
- 24) GRIMBLE, R.F.; BRIMBLE, G.K. Immunonutrition: Role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. **Nutrition**, v.14, n.7-8, p.605-610, july 1998.
- 25) CALBET, I.A.L.; HOLST, J.J. Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. **European Journal of Nutrition**, v.43, n.3, p.127-139, june 2004.
- 26) KHOSHOO, V.; BROWN, S. Gastric emptying of two whey-based formulas of different energy density and its clinical implication in children with volume tolerance. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, n.7, p.656-658, july 2002.
- 27) BOIRIE, Y., et al. Slow and fast dietary protein differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American**, v.94, n.26, p.14930-14935, december 1997.
- 28) MANNINEN, A.H. Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. **Journal of Sports Science and Medicine**, v.3, p.60-63, june 2004.
- 29) SILVA, S.V.; MALCATA, F.X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v.15, n.1, p.1-15, january 2005.
- 30) PINS, J.J.; KEENAN, J.M. The effects of a hydrolyzed whey protein supplemente (Biozate ® 1) on ACE activity and bradykinin. In: **Proceeding of 64th**

Annual Scientific Sessions of the American Diabetes Association. Orlando, Florida, 2004.

31) KAWASE, M.; et al. Effects of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.2, p.255-263, february 2000.

32) GUYTON, A.V. Tradução: Alcyr Kraemer et al. **Tratado de Fisiologia Médica.** 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

33) LANCHETA JR., A.H. **Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora.** São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

34) MAUGHAN, R., GLEESON, M., GREENHAFF, P.L. **Bioquímica do Exercício e do Treinamento.** São Paulo: Editora Manole, 2000.

35) WEBB JR, K.E.; DIRIENZO, D.B.; MATTHEWS, J.C. Recent Development in Gastrintestinal Absorption and Tissue Utilization of Peptides: A Review. **Journal Dairy Science**, v.76, n.1, p.351-361, january 1993.

36) WEBB JR, K.E.; DIRIENZO, D.B.; MATTHEWS, J.C. Peptide Absorption: A Review of Current Concepts and Future Perspectives. **Journal of Animal Science**, v.70, n.10, p.3248-3257, october 1992.

37) CARVALHO, T. et al. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comparação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.9, n.2, p. 57-68, mar/abr 2003.

- 38) LAYMAN, D.K. Energy and protein metabolism during exercise. **Cereal Foods World**, v.32, n.2, p.178-181, february 1987.
- 39) BROOKS, G.A. Amino acid and protein metabolism during exercise and recovery. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.19, n.5, p.S157-S165, october 1987.
- 40) MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- 41) HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L. Amino acid metabolism during exercise and following endurance training. **Sports Medicine**, v.9, n.1, p.23-30, 1990.
- 42) HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L. Effect of endurance training on leucine metabolism in perfused rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v.253, p.E648-E656, december 1987.
- 43) LEMON, P.W.R. Effect of exercise on protein requirements. **Journal of Sports Sciences**, v.9, n.1, p.53-70, january 1991.
- 44) HALL, W.L., et al. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrintestinal hormone secretion and appetite. **British Journal of Nutrition**, v.89, n.2, p.239-248, february 2003.
- 45) KIMBALL, S.C. Regulation of global and specific mRNA translation by aminoacids. **Journal of Nutrition**, v.132, n.5, p.883-886, may 2002.

- 46) ANTHONY, J.C.; et al. Signaling pathways involved in translation control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **Journal of Nutrition**, v.131, n.3, p.856s-860s, march 2001.
- 47) CUKIER, C.; MAGNONI, D.; ALVAREZ, T. **Nutrição baseada na fisiologia dos órgãos e sistemas**. São Paulo: Sarvier, 2005.
- 48) LEMON, P.W.R. Do athletes need more dietary protein an aminoacids? **International Journal of Sport Nutrition**, v.5, p.S39-61, 1995.
- 49) NIEUWENHOVEN, M.A.V.; BROUNS, F.; BRUMMER, R-J.M. The effect of physical exercise on parameters of gastrointestinal function. **Neurogastroenterology and Motility**, v.11, n.6, p.431-439, december 1999.
- 50) THOMPSON, P.D. **O Exercício e a Cardiologia do Esporte**. Barueri, São Paulo: Manole, 2004.
- 51) VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. New York : J. Wiley, 1990.
- 52) TAEGTMEYER, H.. Glycogen in the heart – an expanded view. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**; v.37, n.1, p.7-10, july 2004.
- 53) SCHEUER, J.M.D.; STEZOSKI, W. Protective role of increased myocardial glycogen stores in cardiac anoxia in the rat. **Circulation Research**, v.27, n.5, p.835-849, november 1970.
- 54) ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Revista Paulista de Educação Física**, v.13, n.1, p.67-82, jan/jun 1999.

- 55) LEHMANN, M.; FOSTER, C.; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, n.7, p.854-862, july 1993.
- 56) PARRY-BILINGS, M., et al. A communicational link between skeletal muscle, brain, and cells of the immune system. **International Journal of Sports Medicine**, v.11, n.2, p.S122-S128, 1990.
- 57) FITTS, R.H. Cellular mechanisms of muscle fatigue. **Physiological Reviews**, v.74, n.1, p.49-94, january 1994.
- 58) LOTT, J.A.; ABBOT, L.B. Creatine kinase isoenzyme. **Clin Lab Med**, v.9, p.643-654, 1989.
- 59) INGWALL, J.S., et al. The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. **The New England Journal of Medicine**, v.313, n.17, p.1050-1054, october 1985.
- 60) DAWSON, D.M.; EPPENBERGER, H.M.; KAPLAN, N.O. Creatine kinase: evidence for a dimeric structure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.21, n.4, p.346-353, november 1965.
- 61) ANBARASÍ, K., et al. Creatine kinase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: Protective effect of Bacoside A. **Vascular Pharmacology**, v.42, p.57-61, january 2005.
- 62) SAVABI, F. Mitochondrial creatine phosphokinase deficiency in diabetic rat heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.154, n.1, p.469-475, july 1988.

63) POPOVICH, B.K.; BOEHELER, K.R.; DILLAMAN, W.H. Diabetes decreased creatine kinase enzyme activity and mRNA levels in rat heart. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.257, p.E573-E577, october 1989.

64) DAVYDOV, V.V.; SHVETS, V.N. Different changes in the cytosole creatine kinase isoenzymes from heart of adult and old rats during stress. **Experimental Gerontology**, v.34, p.885-888, august 1999.

Proteína do soro do leite e exercício: regulação das reservas de glicogênio e atividades da glicogênio sintase, glicogênio fosforilase e creatina quinase miocárdicas no rato

Milk whey proteins and exercise: regulation of myocardial glycogen and activity of glycogen synthase, glycogen phosphorylase and creatine kinase in the rat

Carvalho, I.R.¹

(1) Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

A proteína do soro do leite tem mostrado possuir importantes funções para o atleta. Com o intuito de verificar o efeito do consumo da proteína hidrolisada do soro de leite na regulação do glicogênio no miocárdio, durante o exercício físico, determinaram-se (24-h pós-exaustão) as reservas de glicogênio, as atividades enzimáticas da glicogênio sintase (GS) e glicogênio fosforilase (GF) miocárdicas, assim como a atividade da creatina quinase (CQ) miocárdica em ratos machos Wistar, segregados em grupos de sedentários, treinados, sedentários-exauridos e treinados-exauridos. O ensaio biológico teve a duração total de 42 dias, sendo 7 de adaptação ambiental em dieta comercial e água *ad libitum*, 7 de adaptação à dieta e 28 de treinamento em esteira rolante. As dietas experimentais foram elaboradas utilizando como fontes de proteína (12%) o isolado e o hidrolisado do soro do leite (GH 11%), e caseína. Nem a dieta nem o treinamento tiveram efeito na atividade da creatina quinase miocárdica. Já o glicogênio miocárdico mostrou elevação no grupo sedentário que consumiu o hidrolisado e, foi depois submetido à exaustão (HSX). A enzima GS não mostrou ter sido afetada pelo treinamento, nos animais que consumiram o hidrolisado, mas, quando a dieta continha a caseína ou o isolado, a atividade enzimática diminuiu. O treinamento, seguido de exaustão provocou uma diminuição da síntese de glicogênio miocárdico no grupo que consumiu o isolado (ITX). Nos animais sedentários que consumiram o hidrolisado (HSX), porém, a exaustão fez com que a atividade enzimática aumentasse. Por sua vez, o treinamento mostrou ter a capacidade de aumentar a atividade da enzima GF. Conclui-se que as diferenças metabólicas provocadas no

glicogênio do miocárdio pelo efeito combinado das várias proteínas da dieta e o exercício físico, sugerem que o hidrolisado não seja responsável por incrementar os estoques de glicogênio, nem a atividade das duas principais enzimas que regulam os estoques desta reserva energética no miocárdio, diferente ao já relatado para o músculo esquelético gastrocnêmio do rato. Consumo crônico do hidrolisado, entretanto, parece predispor o tecido miocárdico a sintetizar glicogênio mais rapidamente, em comparação ao isolado ou à caseína. Isto foi evidenciado pela resposta nula da GS ao exercício e corroborado no caso em que o animal sedentário foi levado subitamente à exaustão física, situação na qual, o consumo do hidrolisado resultou em aumento da atividade da GS e maior acúmulo de glicogênio, sem reflexos na atividade da enzima creatina quinase.

Palavras-chave: creatina quinase, glicogênio, sintase, fosforilase, soro de leite, proteolizados, peptídeos, exercício.

ABSTRACT

Milk whey proteins have shown to possess important functions for the athlete. We wished to verify here the effect of consuming hydrolyzed whey protein on the regulation of the myocardial glycogen stores in the rat myocardium, during physical exercise, the enzymatic activities of glycogen synthase (GS), glycogen phosphorylase (GP) miocárdicas, as well as the activity of the creatine kinase (CK) in male Wistar rats, determined 24-h post-exhaustion. The animals were segregated in sedentary, trained, and sedentary-exhausted and trained-exhausted. The biological assay had the total duration of 42 days; 7 of ambient adaptation on commercial diet and water *ad libitum*, 7 of diet adaptation and 28 of training in the treadmill. The experimental diets were elaborated using as protein sources (12%) either whey protein isolate, or its hydrolyzate (GH 11%), or casein. Nor the diet nor the training had had an effect in the activity of myocardial creatine kinase. The myocardial glycogen, however, showed an increase in the sedentary group that consumed the hydrolyzate and was later submitted to exhaustion (HSX). The GS did not show to have been affected by the training in the animals that had consumed the hydrolyzate, but, when the diet contained either casein or the isolate, the enzymatic activity diminished. The training, followed by exhaustion provoked a reduction of the synthesis of myocardial glycogen in the group that consumed the isolate (ITX). In the sedentary animals that had consumed the hydrolyzate (HSX), however, exhaustion made the enzymatic activity increase. In turn, the training showed to have the capacity to increase the activity of the enzyme GF. It could be concluded that the differences produced in myocardial

glycogen metabolism from the combined use of some dietary proteins and physical exercise, suggest that consumption of the hydrolyzate may not be responsible for augmenting the glycogen stores, nor the activity of the two main enzymes that regulate the supplies of this energy reserve of the heart, different from what has been observed to occur with the skeletal muscle gastrocnemius in the rat. Chronic consumption of the hydrolyzate, however, may predispose the heart tissue to synthesize glycogen more readily, in comparison to either the isolate or casein. This became clear when training did not have an effect on synthesis and when the sedentary animal was suddenly submitted to physical exhaustion, situation in which, the consumption of the hydrolyzate would result in an increase of the activity of GS and a greater accumulation of glycogen, without consequences in the activity of creatine kinase.

Keywords: creatine kinase, glycogen, synthase, phosphorylase, whey.

2.1 Introdução

O exercício físico tem efeitos abrangentes sobre os parâmetros fisiológicos como: frequência cardíaca, débito cardíaco, respostas hormonais, metabolismo da glicose, sistema imunológico, entre outros. No início de um exercício, quando ocorre uma necessidade energética aumentada, a creatina fosfato é essencial durante as transições súbitas de baixa para alta demanda energética. Ela é produzida através da transferência da ligação fosfato de alta energia do ATP para a creatina por intermédio da enzima creatina quinase. E durante o exercício de intensidade moderada à intensa, de curta duração, o principal substrato energético envolvido é o carboidrato, estocado sob a forma de glicogênio¹.

O glicogênio é uma estrutura compacta de alto peso molecular constituída por moléculas de glicose conectadas por ligações glicosídicas 1→4 e ramificações 1→6. O fígado e o músculo são os maiores depósitos desta importante reserva de energia², seguido do coração que tem um armazenamento de 2% do seu volume total, embora a sua significância na saúde não esteja completamente entendida³. A síntese e a degradação do glicogênio são reguladas por várias enzimas, entre elas, a glicogênio fosforilase, que libera uma unidade de glicose pela fosforólise do glicogênio e a glicogênio sintase que incorpora a unidade glicosila do UDPG (uridinaglicosedifosfato) na extremidade não redutora do glicogênio⁴.

A enzima glicogênio sintase, responsável pela gliconeogênese, é regulada pelo exercício e sua ativação ocorre imediatamente após esse, promovendo repleção de glicogênio pelos mecanismos independentes de insulina⁴. O estoque

de glicogênio muscular é rapidamente depletado durante o exercício e essa depleção em níveis críticos está associada à fadiga¹.

Estudos mostraram que a combinação de carboidrato e proteína foi mais eficaz do que o carboidrato sozinho na recuperação do glicogênio muscular durante as primeiras quatro horas imediatamente após o exercício^{5,6}. Com isso, suplementos com essa combinação e que possuam aminoácidos livres além de proteínas do soro do leite, vêm ganhando posição cada vez mais forte no mercado, devido aos trabalhos que confirmam seus efeitos na nutrição esportiva.

As proteínas do soro de leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvíveis pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e de outros tecidos. Além disso, contêm quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que se encontra em quantidades suficientes para atender às recomendações para todas as idades⁷.

Estudo anterior em nosso laboratório⁸ apresentou resultados relevantes da proteína hidrolisada no desempenho físico em animais treinados evidenciado pela maior resistência à exaustão em relação à dieta com proteína de soro íntegra. Entretanto, seria desejável responder a questão de se diferentes tipos de proteínas na dieta ou a forma de apresentação de qualquer proteína alimentar teriam algum efeito no conteúdo de glicogênio ou na atividade das enzimas glicorregulatórias nos tecidos⁹.

Portanto, estudar a ação da proteína hidrolisada do soro do leite no metabolismo do glicogênio, juntamente com o fator exercício físico, foi o objetivo

do presente trabalho, visto que o glicogênio tem um importante papel no fornecimento de glicose para o miocárdio e há maior utilização de aminoácidos com finalidade energética durante o metabolismo acelerado do exercício físico.

2.2. Metodologia

2.2.1 Ensaio biológico

Teve a duração total de 42 dias e foram utilizados 120 ratos machos da linhagem Wistar SPF (*specific pathogen free*), recém-desmamados, com 21 dias e pesando \approx 45g, procedentes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) - Instituto de Biologia - IB, Unicamp, sob protocolo nº 841-1/2005.

Na primeira fase do ensaio (7 dias) foram mantidos em gaiolas individuais em laboratório de crescimento, com ciclo claro-escuro e temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Neste período de adaptação, os animais foram alimentados com dieta comercial não purificada (Labina) e água *ad libitum*.

Utilizaram-se grupos de 10 animais divididos em 12 diferentes tratamentos de treinamento e dieta (Figura 2.1). As dietas experimentais oferecidas foram elaboradas conforme AIN 93-G¹⁰, exceto a proteína, que foi no teor de 12%¹¹, sendo as fontes protéicas utilizadas nas dietas: isolado (ALACEM-895) e hidrolisado (ALATAL-817) do soro do leite, ambos da NZMPTM (Wellington, N.Z.), e a caseína, que foi usada como controle. Todos os grupos foram submetidos a 35 dias de ensaio, no qual a 1ª semana foi de adaptação às dietas experimentais (hidrolisado [H], caseína [C] e isolado [I]). Nos três últimos dias dessa adaptação foi realizada a coleta das fezes e urina, em gaiolas metabólicas, para verificar o

consumo e a excreção da dieta oferecida, através da determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl¹².

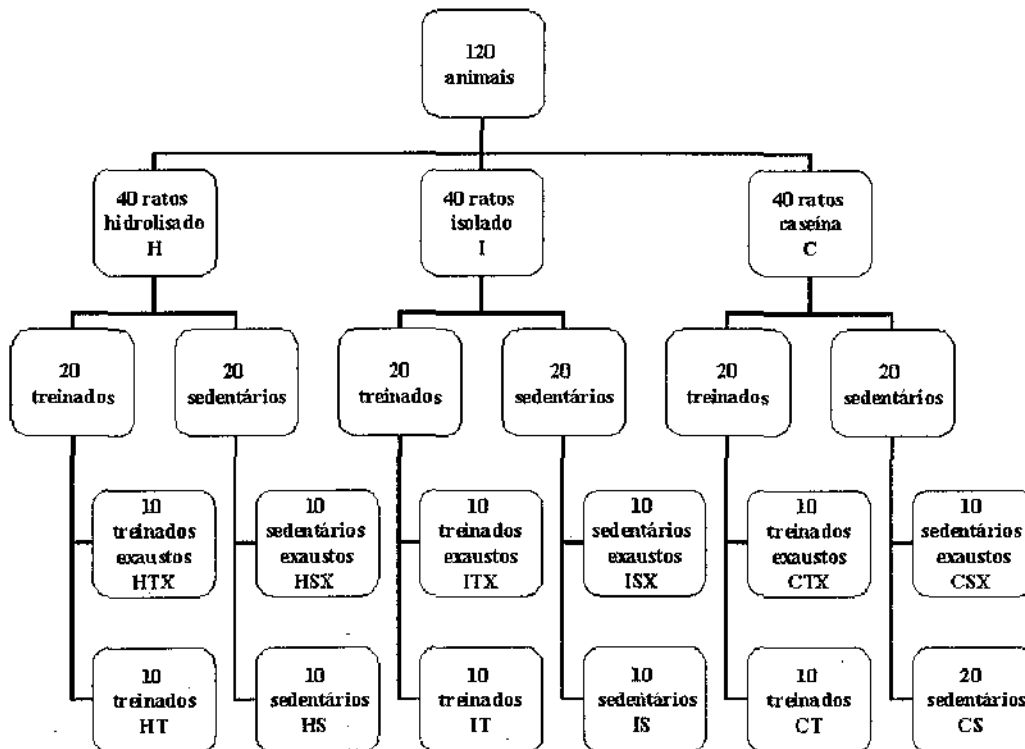


Figura 2.1 - Esquema da divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física

O grau de hidrólise do hidrolisado do soro do leite utilizado na preparação da dieta foi de ~11%, segundo o método do TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico), o qual determina a concentração de grupos amina primários por ensaio espectrofotométrico, segundo Adler-Nissen (1979)¹³. As dietas experimentais

tiveram sua composição centesimal determinada por: umidade, cinzas, proteínas, fibras¹², lipídeos^{12, 14} e carboidratos por diferença.

O teor de proteína das dietas experimentais foi reduzido para próximo de 14%, em base seca, ou seja, um nível sub-ótimo para crescimento na condição sedentária. A Tabela 2.1 caracteriza a composição das dietas em termos de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos. A dieta C apresentou um maior teor de umidade que as dietas I e H. Enquanto a dieta I teve conteúdo glicídico e energético maior, em contrapartida, a dieta H mostrou maior teor de lipídeos e cinzas, sendo esses estatisticamente diferentes das outras dietas. As dietas experimentais possuíam o teor protéico próximo de 12%, em base úmida (ou seja, ~14% em base seca, sem diferença estatística; $p=0,3$), caracterizando-se como isoprotéicas, sem apresentar diferença estatística entre si.

Tabela 2.1 - Composição centesimal média das dietas experimentais (base úmida).

Componente	Caseína	Isolado	Hidrolisado
	(C)	(I)	(H)
<i>Energia kcal/100g</i>	382,82 ± 1,71 ^b	390,73 ± 0,40 ^a	389,71 ± 1,43 ^a
<i>Carboidratos (%)</i>	64,98 ± 0,42 ^a	65,66 ± 0,19 ^a	64,98 ± 0,29 ^a
<i>Lipídeos (%)</i>	8,02 ± 0,07 ^c	8,51 ± 0,01 ^b	8,81 ± 0,25 ^a
<i>Proteínas (%)</i>	12,67 ± 0,16 ^a	12,62 ± 0,12 ^a	12,88 ± 0,38 ^a
<i>Cinzas (%)</i>	2,63 ± 0,02 ^b	2,57 ± 0,01 ^b	2,89 ± 0,06 ^a
<i>Umidade (%)</i>	8,98 ± 0,40 ^a	7,67 ± 0,06 ^b	7,60 ± 0,15 ^b
<i>Fibras (%)</i>	2,72 ± 0,07 ^b	2,97 ± 0,10 ^a	2,84 ± 0,05 ^{ab}

Valores: média ± desvio padrão. Letras diferentes minúsculas na horizontal representam diferença significativa ($p < 0,05$).

2.2.2 Treinamento e Teste de Exaustão

Tendo em vista que o metabolismo pode ser alterado pela dieta e pelo nível de atividade física, e o objetivo era avaliar o efeito da dieta no desempenho físico, foi necessário então introduzir o fator treinamento. A atividade física iniciou-se, após o período de adaptação à dieta, onde os três grupos de 40 ratos, separados em função da dieta e do tipo de treinamento, foram transferidos para laboratório de bioquímica do exercício, onde foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais),

onde permaneceram até o final do experimento e, do qual os grupos de animais treinados eram levados diariamente para a sala de exercício físico em esteira, por 28 dias. O treinamento consistiu inicialmente em um teste de aptidão física mínima, antes de serem distribuídos em grupos de treinados e sedentários. Esse teste teve duração de 5 minutos a uma velocidade de 10m/min, terminando com a exclusão daqueles animais que se recusaram a correr.

A esteira rolante que é composta de uma plataforma inclinável, dotada de um choque elétrico na extremidade de partida para evitar a interrupção da atividade física. O treinamento foi realizado no período da manhã, de segunda a sábado, seguindo sempre a mesma seqüência de animais. A duração do treinamento foi de 28 dias, sendo que os 7 primeiros serviram como adaptação ao exercício físico.

O grupo de animais treinados seguiu um protocolo de treinamento, adaptado de Smolka et al (2000)¹⁵, onde a adaptação ao exercício foi feita de forma que nos dois primeiros dias, a rotina consistiu em corrida a 10m/min, durante 20 minutos e, nos cinco dias restantes, manteve-se a mesma velocidade, com aumento do tempo para 40 minutos.

O treinamento propriamente dito teve duração de mais 21 dias, durante os quais, na primeira semana, os animais alcançaram a velocidade de 15m/min, por 40 minutos. Na segunda semana, 25m/min correndo por 50 min e na última semana por 60 min, na velocidade de 25m/min.

No final do treinamento, os grupos escolhidos (seis grupos de 10 animais) para exaustão foram submetidos à prova, correndo na velocidade de 25m/min até

atingirem 32,5m/min. O tempo de exaustão foi determinado no momento em que o animal não conseguia mais se afastar do choque elétrico.

2.2.3 Sacrifício dos Animais

Ao término da exaustão, amostras de sangue caudal foram extraídas para determinação do lactato sérico e os animais deixados em repouso de 24 horas. No dia seguinte, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sendo o órgão (coração) coletado e armazenado em nitrogênio líquido até realização das análises. Antes de cada análise os órgãos foram desintegrados em almofariz com nitrogênio líquido.

2.2.4 Determinações

a) Quantificação do Glicogênio

O glicogênio do miocárdio foi determinado em amostras de ~35mg de tecido utilizando solução de KOH a 30%, saturada com Na₂SO₄ e etanol para precipitar o glicogênio do digerido alcalino e então quantificados pelo ácido sulfúrico e fenol, seguindo o método de Lo et al. (1970)¹⁶.

b) Atividade da Creatina Quinase (fração MB)

A atividade dessa enzima foi determinada pelo kit comercial CK-MB (NAC), baseado na inativação total da creatina quinase (isozima CKMB). É um método cinético com utilização de absorção no UV, da Laborlab S/A produtos para laboratórios (Guarulhos, S/P). O cálculo da atividade foi feito pela diferença de absorbância (ΔA), subtraindo o A1 (absorbância após exatos 5 minutos) do A₀

(absorbância inicial) e multiplicando por 1350, conforme instruções da bula de procedimentos. A leitura das amostras foi feita contra água desionizada no espectrofotômetro Beckman DU-70 com controlador de temperatura Beckman a 30°C.

c) Atividade Enzimática da Glicogênio Sintase

A enzima glicogênio sintase teve sua atividade determinada por fluorimetria mediante a quantificação de UDP e NAD⁺ formados, conforme descrito por Passonneau e Lowry (1993)¹⁸. Após a preparação da amostra, foi acrescentado o primeiro reagente (contendo imidazol, UDPG, glicogênio, EDTA, NaF, ditioneitol e BSA), e incubado por 1 hora, a 38°C. A essa mistura foi adicionado H₂O₂ em NaOH, seguido de incubação por 30 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado o terceiro reagente que continha imidazol, KCl, MgCl₂, fosfopiruvato, NADH, piruvato quinase, lactato desidrogenase, catalase e BSA. A leitura da fluorescência foi feita após 20 minutos no espectrofluorômetro ISS-PC1 *Photon Counting Spectrofluorometer*, Champaign, IL, USA, modelo H10-450. A excitação foi fixada em 290nm e a emissão em 361nm.

d) Atividade Enzimática da Glicogênio Fosforilase

A atividade da enzima glicogênio fosforilase foi determinada espectrofotometricamente pelo método adaptado de Childress e Sacktor (1970)¹⁷ e Passonneau e Lowry (1993)¹⁸, onde a amostra é homogeneizada e centrifugada, e posteriormente equilibrada em banho a 30°C para ser acrescentado 1 mL da solução de enzimas. A leitura foi feita a cada 30 segundos, durante 5 minutos, no

espectrofotômetro Beckman DU-70, com controlador de temperatura Beckman, a 30°C.

2.2.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão e submetidos à análise estatística usando o programa SPSS (Statistical Package for Social Science) para ambiente Windows, versão 15.0, onde as diferenças entre médias foram avaliadas, usando o teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$.

2.3 Resultados e Discussão

- *Consumo de dieta*

Os animais receberam a dieta experimental durante 35 dias, apresentando um consumo médio diário de $17,46 \pm 0,16$ g nos grupos da caseína, $15,83 \pm 0,09$ g nos grupos do isolado e $15,68 \pm 0,11$ g nos grupos do hidrolisado do soro de leite, apresentando diferença estatística do grupo da caseína em relação aos demais grupos. A assimilação da proteína das dietas pode ser avaliada através da comparação do balanço nitrogenado de cada dieta experimental com a dieta padrão (caseína), que é a relação da ingestão protéica com sua excreção, sendo eles: $0,87 \pm 0,15$ g N/dia nos grupos da caseína, $0,81 \pm 0,17$ g N/dia nos grupos do isolado e $0,83 \pm 0,17$ g N/dia nos grupos do hidrolisado, sendo a diferença pequena, mas significativa. Os dados comprovam o bom aproveitamento da proteína das dietas experimentais pelo organismo.

O treinamento iniciou-se após a adaptação à dieta experimental e teve a duração de 28 dias. Durante esse período os animais seguiram o protocolo de treinamento e, no último dia, os grupos TX e SX foram submetidos à exaustão. Este procedimento foi realizado com o intuito de avaliar a forma em que a atividade física e a duração desta poderiam afetar a utilização dos estoques de glicogênio dos ratos desses dois grupos, pois o tecido muscular consome primeiramente ATP e creatina-fosfato, prosseguindo sucessivamente com a mobilização da glicose circulante e a degradação do glicogênio muscular e hepático¹⁹.

- *Creatina quinase*

A atividade enzimática da creatina quinase na fração MB foi avaliada por ser uma enzima chave no fornecimento de energia durante o exercício. Na Figura 2.2, pode-se observar que a atividade da enzima creatina quinase mostrou-se superior quando a fonte protéica utilizada foi o hidrolisado, conjuntamente com o treinamento (grupos HT e HTX), porém, sem diferenças significativas ($p=0,145$). No grupo SX, a dieta que mais influenciou a elevação da atividade foi a que continha caseína, enquanto no grupo S, foi o isolado do soro de leite.

Os resultados apresentados na Figura 2.2 sugerem que o fator exercício, aliado ao consumo de proteína hidrolisada do soro de leite, aumenta a atividade da creatina quinase fração MB provavelmente em consequência do desgaste muscular e estresse físico pelo qual o animal era submetido com o treinamento. Segundo Cardinet (1997)²⁰, a creatina quinase é a enzima amplamente utilizada para determinação de alterações musculares, e é considerado um indicador altamente sensível e específico de lesão muscular, já que as fibras musculares são particularmente ricas nessa enzima.

Quando comparados aos efeitos da dieta e/ou do treinamento pelo qual o animal foi submetido, os dados apresentados na Figura 2.2 não apresentaram diferença significativa ($p=0,145$). Os valores de CK-MB encontrados nesse trabalho estão próximos daqueles relatados por Kurata et al. (2007)²¹, que analisaram a atividade da enzima no miocárdio de ratos machos com 7 semanas de idade ($26,2 \pm 18,1$ U/L).

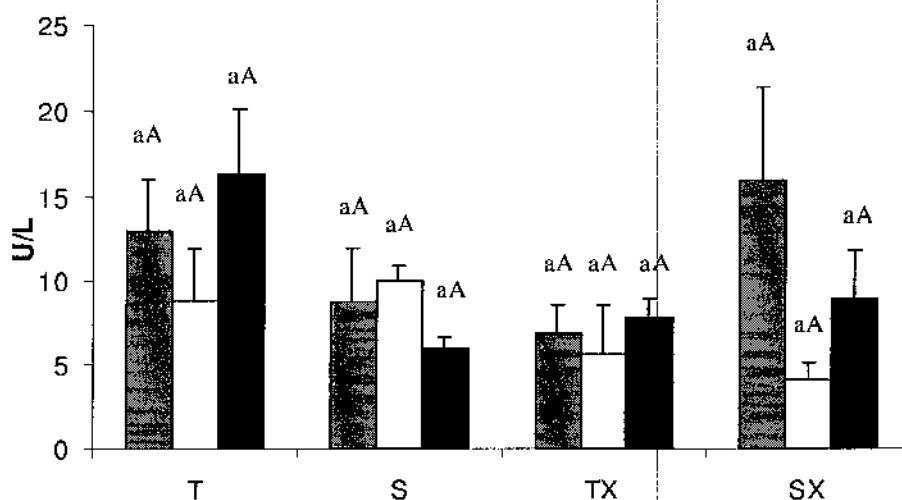


Figura 2.2 - Média da atividade enzimática da creatina quinase miocárdial nos grupos experimentais, nas dietas: ■ caseína, □ isolado e ■ hidrolisado. Médias de 3 animais.

Valores: média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as dietas e dentro de cada grupo de atividade. As maiúsculas se referem às diferenças entre os níveis de atividade física ($p < 0,05$).

- *Glicogênio do Miocárdio*

O conteúdo de glicogênio do miocárdio, após 24 horas de repouso, nos animais do grupo sedentário-exausto (SX), dependendo da dieta recebida, respondeu significativamente diferente ao consumo do hidrolisado, como pode ser observado na Figura 2.3-a e Figura 2.3-c. Assim, o hidrolisado levou a um aumento da reserva de glicogênio no grupo sedentário, quando este foi submetido à exaustão (SX; Figura 2.3-c), sugerindo que durante o escasso esforço físico despendido pelo sedentário, excesso de glicogênio pode ter sido sintetizado para

durar mais que 24 horas, sem haver gasto. Isto poderia ser comparado a um "treinamento" de choque com efeitos diferenciados para o caso em que a proteína consumida foi a hidrolisada. Comparando esse grupo (SX) com TX (Figura 2.3-c), pode-se notar que houve diferença quando o consumo foi de hidrolisado e foram realizados tipos de treinamento diferentes, o mesmo ocorrendo quando se relacionaram os grupos S e SX (Figura 2.3-a). Entretanto, nos grupos experimentais T, S e TX não foram encontradas diferenças significativas, após 24 horas de repouso, que pudessem comprovar o efeito da dieta ou do exercício físico realizado nesses grupos, Figura 2.3-b e 2.3-d.

Estes resultados podem diferir daqueles obtidos para o músculo esquelético^{8,22}, pelos quais se esperaria que os estoques no miocárdio também pudessem estar mais elevados nos grupos que consumiram a proteína hidrolisada. Mediante estas observações, pode se concluir que a resposta do miocárdio não segue o mesmo comportamento do músculo esquelético.

As determinações de glicogênio no miocárdio neste trabalho mostraram que o valor mais elevado foi $3,53 \pm 0,50$ mg/g tecido, correspondente ao grupo sedentário que foi levado à exaustão (SX) e consumiu a proteína hidrolisada. Comparando os dados de glicogênio do miocárdio encontrados no presente estudo (média = 2,1mg/g tecido) com os dados relatados na literatura para ratos Wistar normalmente alimentados com a dieta normal AIN 73 (5,8 mg/g tecido)²³, os valores de todos os grupos (excetuando o HSX) são 64% inferiores. Em não havendo qualquer explicação metodológica para esta diferença, os dados podem sugerir algum efeito relacionado às diferenças na composição das dietas, como

são o menor teor de proteína e o uso da formulação AIN 93-G do presente experimento.

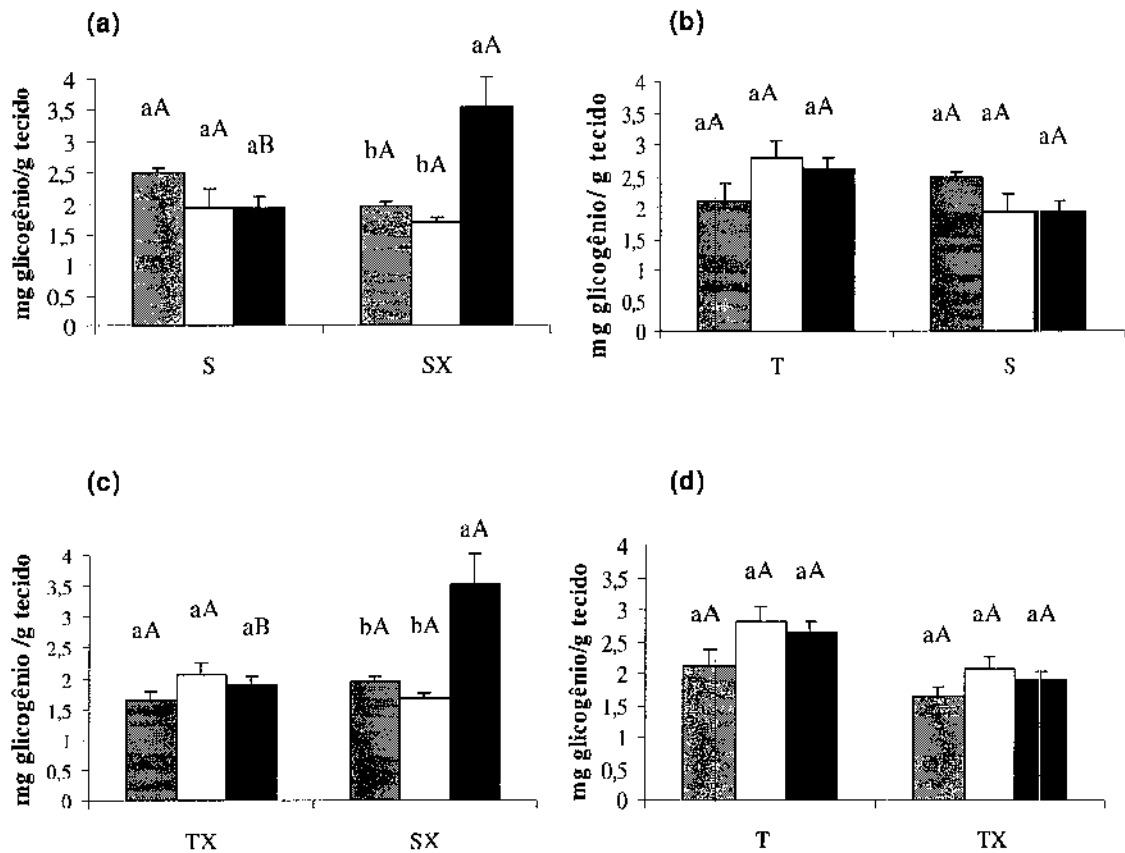


Figura 2.3 - Média do conteúdo de glicogênio no miocárdio nos grupos experimentais em mg/ g tecido. **(a)** Comparação entre treinado e sedentário. **(b)** Comparação entre treinado-exausto e sedentário-exausto. **(c)** Comparação entre treinado e treinado-exausto. **(d)** Comparação entre sedentário e sedentário-exausto, nas dietas: ■ caseína, □ isolado e ■ hidrolisado. Médias de 3 animais.

Valores: média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as dietas e dentro de cada grupo de atividade. As maiúsculas se referem às diferenças entre os níveis de atividade física ($p < 0,05$).

Foi relatado por Tassi et al (1998)²² que, enquanto os níveis de glicogênio hepático não foram afetados pela administração de dieta a base de α -lactalbumina hidrolisada, com relação a outra contendo a mesma proteína não hidrolisada, o glicogênio muscular foi poupado nos animais submetidos ao exercício exaustivo, como foi visto logo no final da exaustão. Já no caso de animais alimentados com dietas elaboradas com proteína total do isolado de soro do leite, em comparação a outros alimentados com a proteína hidrolisada, os animais exauridos e deixados em recuperação por 48 horas não mostraram diferenças nos estoques de glicogênio do músculo esquelético⁸.

Se realmente o exercício físico altera a atividade das enzimas reguladoras do metabolismo do glicogênio, seria então possível observar diferenças nos efeitos destas entre os animais treinados e sedentários. Esse fato tem sido atribuído à capacidade da proteína do soro do leite de modular a atividade de enzimas glicolíticas e gliconeogênicas⁹, assim como ao poder de certos aminoácidos estimularem a atividade desse tipo de enzimas²⁴.

- *Glicogênio sintase*

Contudo, a atividade da enzima glicogênio sintase alterou-se em resposta às duas variáveis: atividade física e dieta (Figura 2.4). Quando a dieta continha o hidrolisado, o treinamento não mostrou nenhum efeito, mas, quando a dieta era a caseína ou o isolado, a atividade enzimática diminuiu com o treinamento (Figura 2.4-b), de forma coerente com o deslocamento do metabolismo de uma fase anabólica para outra catabólica. Já quando a exaustão foi efetuada nos animais

treinados, somente a dieta contendo o isolado resultou em diminuição da síntese de glicogênio no miocárdio (Figura 2.4-d), embora sem produzir queda significativa nos estoques de glicogênio.

Com relação ao grupo sedentário, que foi onde se notaram as maiores diferenças entre as dietas, a exaustão fez com que a caseína e o isolado diminuíssem a atividade da glicogênio sintase, enquanto o hidrolisado fez a atividade aumentar, de forma leve, mas significativamente (Figura 2.4-a). Esta maior atividade, entretanto, causou um aumento dramático nos estoques de glicogênio miocárdico nesse grupo de animais, sendo que suas conseqüências fisiológicas deveriam ser estudadas mais em profundidade.

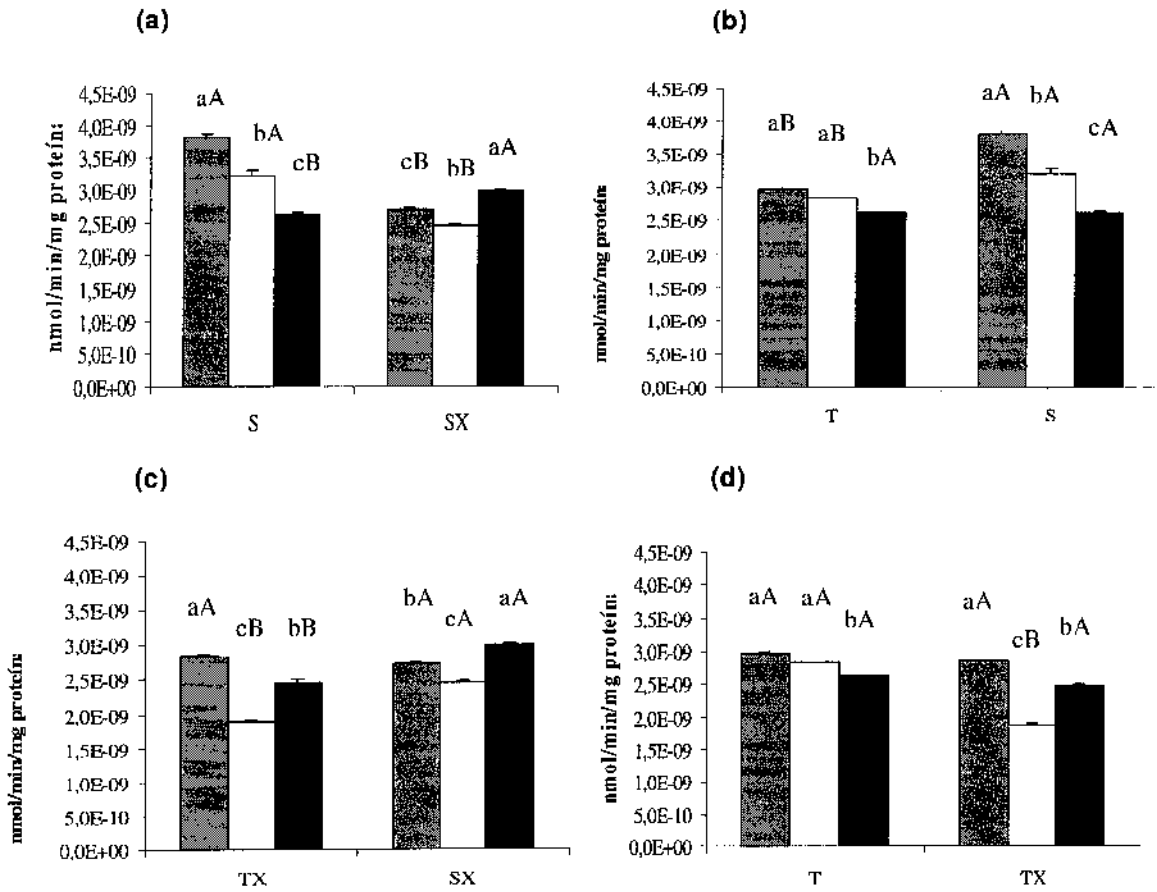


Figura 2.4 - Interações entre dieta e atividade física, com relação à atividade da enzima glicogênio sintase no miocárdio dos grupos experimentais: **(a)** treinado e sedentário. **(b)** treinado-exausto e sedentário-exausto **(c)** treinado e treinado-exausto. **(d)** sedentário e sedentário-exausto,

nas dietas ■ caseína, □ isolado e ■ hidrolisado. Médias de 3 animais.

Valores: média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as dietas e dentro de cada grupo de atividade. As maiúsculas se referem às diferenças entre os níveis de atividade física ($p < 0,05$).

Isso ocorre porque a síntese de glicogênio é afetada diretamente pelo tipo, duração e intensidade do exercício realizado, devido às alterações enzimáticas e adaptações agudas ao exercício estressante²⁵. Esses resultados contrariam os achados de York et al (1975)²⁶, que avaliaram o glicogênio do miocárdio em ratos machos, jovens, submetidos à natação durante 16 semanas. Esse trabalho relatou não haver diferença no conteúdo de glicogênio, assim como na atividade da fosfofrutoquinase do mesmo tecido, quando os animais treinados foram comparados com os sedentários, quer sob o regime de alimentação, quer em jejum. Esses autores concluíram que, aparentemente, o jejum afetou a variação dos níveis de glicogênio na direção oposta às mudanças na atividade da fosfofrutoquinase, sugerindo, portanto que o glicogênio não variou como resultado do exercício físico prolongado, e sim como resultado de certo estresse metabólico.

Tomando o caso dos animais sedentários, pode se observar que a caseína produziu níveis mais elevados de atividade da enzima glicogênio sintase no miocárdio do que as demais proteínas (Figuras 2.4-a e 2.4-b). Já quando esses animais foram levados à exaustão, a atividade produzida pela dieta de caseína diminuiu, ficando menor do que a do hidrolisado. Esta última, por sua vez não superou em mais que 10% a atividade mostrada antes da exaustão.

Nessa mesma Figura (2.4-a), ainda, pode ser visto que a dieta elaborada com o isolado também mostrou diminuir a atividade após a exaustão. Dessa forma, apenas a dieta com o hidrolisado não resultou em diminuição, senão em aumento significativo, embora discreto, da atividade da sintase. Tais resultados são consistentes, embora não exatamente proporcionais, com a elevação dos estoques de glicogênio, vistos na Figura 2.3-a.

Já no caso dos animais que passaram pelo protocolo do treinamento regular (T e TX; Figura 2.4-d), as atividades da sintase não tiveram alteração com a exaustão, a não ser para a dieta com o isolado. Isto sugere que a taxa de síntese de glicogênio diminuiu para este grupo de dieta e a sua correspondente reserva de glicogênio deveria ser inferior à dos outros grupos de dieta. Entretanto e, embora as diferenças entre todos os grupos tenham sido não significativas (Figura 2.3-d), deve ser levado em conta o fato de que os animais que consumiram o isolado despenderam uma energia (trabalho) média numericamente inferior aos animais do grupo alimentado com o hidrolisado. Em função disso, não seria surpreendente que os estoques de glicogênio do grupo ITX tenham sido ligeiramente superiores aos do que o HTX, por exemplo.

É claramente notado nos gráficos da Figura 2.4, que quando o animal é submetido à exercícios físicos até alcançar a exaustão, com exceção dos animais do grupo sedentário, a atividade da enzima glicogênio sintase diminui, o que parece ser razoável, considerando que no exercício físico, há uma maior necessidade de glicose na corrente sanguínea. Essas observações são opostas às relatadas em estudo⁹ anterior, que mostrou que a atividade total da enzima glicogênio sintase hepática não é afetada pelo treinamento de animais em esteira, contrariando também os dados obtidos por outro trabalho²⁷, no qual pode-se observar que a atividade dessa enzima era significativamente mais alta no músculo esquelético de animais treinados com natação e alimentados com proteína do soro do leite em relação aos que receberam dieta com caseína.

Morifuji et al. (2005)⁹ desenvolveram estudo no qual foram ensaiadas as sete principais enzimas conhecidas no metabolismo do glicogênio, comparando a

influência da natureza da proteína da dieta (caseína, proteína do soro do leite – sem definição– e proteína de soja) e o exercício físico em ratos. Embora não tenham estes autores levado em consideração os efeitos separados do exercício e das diferentes dietas, eles relatam não ter encontrado diferença entre a atividade da glicogênio sintase produzida pela dieta a base de caseína e a produzida pela proteína do soro de leite. Com relação às demais enzimas indiretamente envolvidas (glucoquinase, 6-fosfofrutoquinase, piruvato quinase, glicose-6-fosfatase, frutose 1,6-difosfatase, e fosfoenolpiruvato carboxiquinase), as diferenças observadas foram mínimas.

Nota-se na Figura 2.4-b e 2.4-d que há, nos grupos sedentário, treinado e treinado-exausto, uma tendência de maior atividade enzimática nos animais que receberam a dieta com caseína. Isso pode ser devido a uma maior liberação de insulina, tendo em conta que esta proteína tem efeito nas células β do pâncreas, agindo como ativador da enzima glicogênio sintase. Comparando o efeito da dieta entre os animais que receberam a proteína isolada e a hidrolisada, nota-se que houve um efeito no sentido de o hidrolisado produzir maior atividade enzimática do que o isolado, excetuando-se o caso, porém, dos animais simplesmente treinados.

É pertinente ressaltar também a possibilidade de ter havido maior liberação de insulina devido ao maior conteúdo de aminoácido livre no hidrolisado, embora, em menor proporção que na caseína. Esse efeito de estimulação sinérgica de liberação insulínica a partir de ingestão de proteína e aminoácidos foi observado pela primeira vez nos anos 60²⁸⁻³⁵ e confirmado posteriormente por Nuttall et al^{36,37}. Tem sido sugerido que essa estimulação se deve a um aumento de

lançamento de secretagogos originários do trato gastrointestinal²⁸. Outro trabalho sugere que esta liberação de insulina pelas células pancreáticas β se deva a um aumento da atividade do ácido tricarbóxico e do consumo de oxigênio promovido por alguns aminoácidos presentes na proteína, em especial a leucina³⁸.

A consequência disso é que no músculo cardíaco, ocorre uma relação inversa entre a ação da atividade da enzima glicogênio sintase e o conteúdo de glicogênio, sendo que o maior conteúdo de glicogênio pode ter ocorrido pela ação exclusiva da insulina³⁹. As taxas de acúmulo do glicogênio no coração podem ser aumentadas mesmo sem haver elevação na captação de glicose, desde que um combustível alternativo esteja disponível para permitir o redirecionamento da glicose para a enzima glicogênio sintase, mecanismo este que é importante para manter e repletar o glicogênio miocárdico durante e após o exercício⁴⁰. A conversão do glicogênio de volta para glicose pelas células do fígado e a liberação do produto no sangue ocorrerá quando os níveis de insulina circulantes forem diminuídos.

A indução do aumento de atividade da enzima glicogênio sintase pela insulina ocorre mediante o deslocamento da relação entre a forma "I" (ativa) e o nível de glicogênio nos tecidos³⁹, pois a insulina aumenta os níveis de glicose-6-fosfato, diminuindo a inibição da enzima glicogênio sintase por ATP, ADP e P_i . A glicose-6-fosfato, por sua vez, ativa a forma "I" através da transformação da forma "D" em "I".

Outro estudo observou que a adição de proteína do soro do leite ao suplemento de carboidrato, resultava em aumento do estoque de glicogênio

muscular durante um período de recuperação de 4 horas, atribuindo esse efeito à maior resposta da insulina causada pela ingestão da proteína do soro do leite⁵. Com o treinamento, as estruturas musculares passariam a consumir maior proporção de aminoácidos, conseqüentemente poupando os estoques de glicogênio e, aumentando a resistência ao esforço⁴¹. Outra possível explicação para o aumento da atividade da enzima glicogênio sintase durante o tratamento com dieta protéica é oferecido pelo aumento da disponibilidade de precursores gliconeogênicos provindos das proteínas⁵.

Porém, os resultados da Figura 2.4 indicam que a maior atividade da enzima glicogênio sintase foi obtida para os animais com a dieta a base de caseína, ao contrário do ocorrido com os animais com dieta hidrolisada. Se realmente a maior atividade da enzima glicogênio sintase nos animais alimentados com caseína do presente trabalho se deve a uma ação da insulina, seria possível encontrar uma maior concentração deste hormônio nesses animais. Coerente com a possibilidade de que o consumo do hidrolisado resulte em aumento da insulinemia, van Loo et al. (2000)³⁸ encontraram concentrações plasmáticas de insulina 25% maiores em pessoas alimentadas com bebidas à base de proteínas hidrolisadas do que em pessoas alimentadas com caseína.

- *Glicogênio fosforilase*

Nos dados sobre a glicogênio fosforilase apresentados na Figura 2.5, pode-se observar um aumento na atividade devido ao treinamento, sempre que os animais não foram levados à exaustão, sendo essa afirmação válida para todas as

dietas. Por sua vez, pode ser notado também um efeito do tipo de dieta na resposta na atividade da enzima, mas somente para os animais treinados.

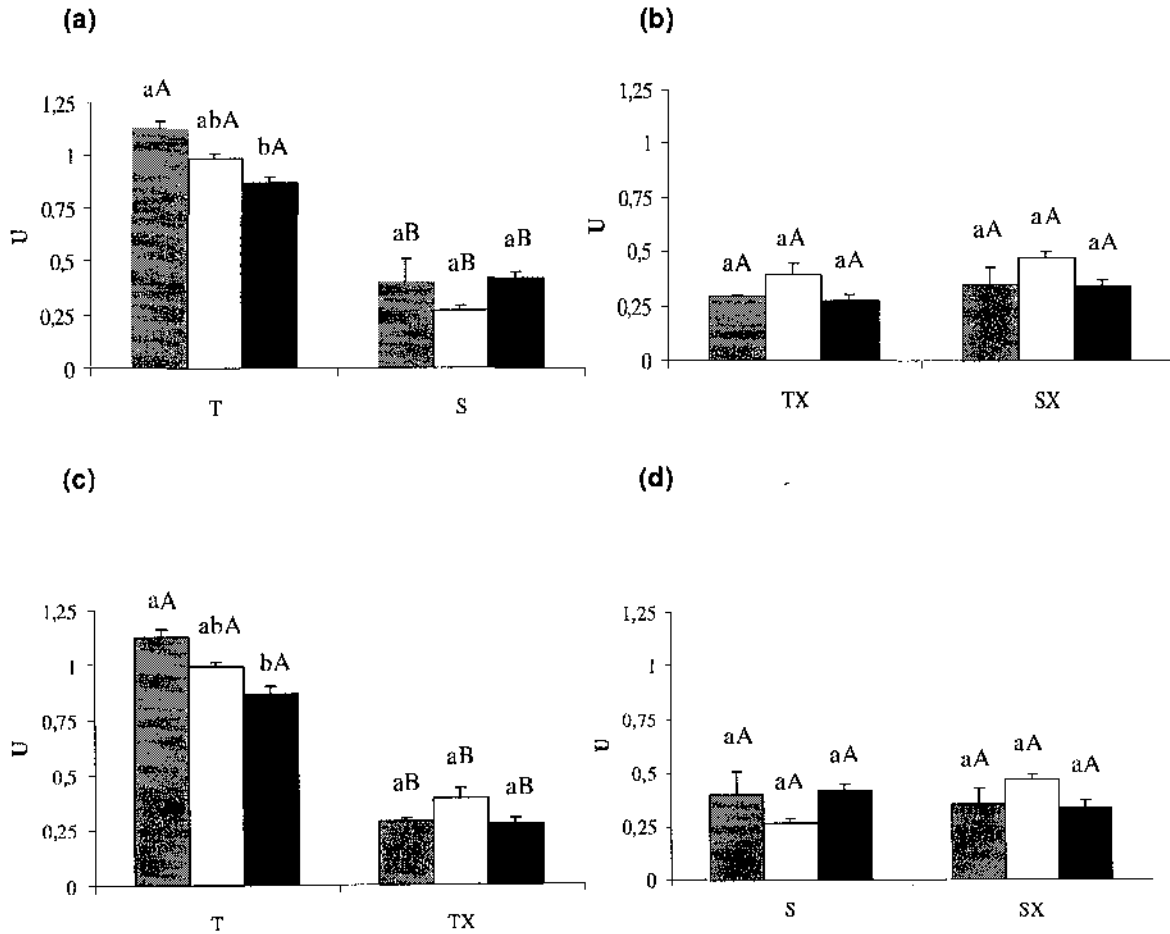


Figura 2.5 - Atividade da enzima glicogênio fosforilase miocárdica dos grupos experimentais: **(a)** treinado e sedentário. **(b)** treinado-exausto e sedentário-exausto **(c)** treinado e treinado-exausto. **(d)** sedentário e sedentário-exausto, nas dietas ■ caseína, □ isolado e ■ hidrolisado. Médias de 3 animais.

Valores: média ± erro padrão. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as dietas e dentro de cada grupo de atividade. As maiúsculas se referem às diferenças entre os níveis de atividade física ($p < 0,05$).

Após um período de recuperação de 24 horas, pós-exaustão (Figura 2.5-b), as diferenças de atividade registradas entre as dietas ($p=0,07$) não mostraram significância pelo critério padrão, porém, evidenciou-se que o treinamento produziu uma ativação de mais do que 100% da glicogênio fosforilase, sugerindo uma adaptação diária do organismo ao exercício rotineiro moderado. Uma vez que no animal treinado ou sedentário, quando submetido à exaustão, os níveis de atividade voltam a se adaptar a um estado de baixo estoque de glicogênio, para o qual a fosforilase não é mais exigida. Comparados com os dados obtidos por Kondrat'ev et al (2005)⁴², os valores aqui relatados são da mesma ordem de grandeza.

Segundo Adolfsson et al (1972)³⁹, a insulina aumenta a quantidade de glicose-6-fosfato que, por sua vez, reduz a atividade da enzima glicogênio fosforilase por diminuir a conversão, da forma B da enzima para A (ativa), através do AMP. Os valores de atividade enzimática encontrados para a glicogênio fosforilase podem então ser relacionados com a previsão e/ou manutenção do nível de exercício, de tal forma que a atividade da enzima glicogênio fosforilase se ajuste à utilização do glicogênio, em função das variações na disponibilidade de outros substratos energéticos, como os ácidos graxos⁴⁰. As correlações opostas da atividade da enzima glicogênio sintase e fosforilase com a concentração de glicogênio sugerem que mudanças na atividade dessas duas enzimas sejam dependentes das mudanças na concentração de glicogênio: com um aumento nos estoques de glicogênio opera-se uma inibição na atividade da sintase e estimula-se a fosforilase. Isso é compatível com o mecanismo de regulação mediado pela mobilização de glicose e glicogênio⁴³.

2.4 Conclusão

Os resultados das atividades enzimáticas da glicogênio sintase e a glicogênio fosforilase mostraram que, enquanto o treinamento físico sistemático e moderado teve influência no sentido de aumentar a atividade da fosforilase para o organismo enfrentar um maior dispêndio previsível de glicogênio, as dietas não tiveram qualquer influência sobre esta variável. Houve, porém, efeito da dieta elaborada com o hidrolisado para os animais sedentários, no sentido de aumentar a atividade da sintase, quando estes foram submetidos à exaustão. Esse aumento se refletiu em maiores estoques do glicogênio miocárdico. Resta saber se no tempo zero da recuperação dos exauridos, ou seja, no final da exaustão, seria possível observar algum outro efeito da dieta que explicasse os resultados de experiências anteriores que mostram um diferencial vantajoso nas reservas de glicogênio muscular esquelético, tanto no final da exaustão, quanto durante a fase de recuperação.

A atividade da enzima glicogênio sintase induzida pela dieta com o isolado mostrou tendência a ser menor do que aquela induzida pela caseína e, até pelo hidrolisado, com exceção dos grupos sedentário e treinado.

Passadas 24 horas desde o final da exaustão, as reservas de glicogênio no tecido do miocárdio também não revelaram diferenças entre as dietas, exceto para o caso dos animais sedentários que consumiram o hidrolisado e foram posteriormente submetidos à exaustão. Estes animais mostraram maiores reservas de glicogênio do que todos os demais grupos, provavelmente devido à ativação da sintase, acoplada a uma diminuição da fosforilase. Aumento da

atividade da sintase foi de fato confirmada no grupo sedentário-exausto, ao passo que diminuição da atividade da fosforilase se confirmou em todos os grupos que passaram pela exaustão.

Finalizando, as diferenças observadas no metabolismo do glicogênio do miocárdio, face às alterações provocadas na proteína da dieta e o exercício físico, não revelam que, após 24-h de recuperação da exaustão, o hidrolisado seja responsável por incrementar os estoques de glicogênio no miocárdio, seja por aumento da síntese ou poupança da hidrólise, de forma análoga ao anteriormente relatado para o músculo esquelético (gastrocnêmio) do rato, nem nas atividades das duas principais enzimas que regulam os estoques desta reserva energética e nem na atividade da enzima creatina quinase.

2.5 Referências

- 1) MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- 2) SALWAY, J.G. **Metabolism at a glance**. London: Blackwell; Oxford: Four dragons, 1994.
- 3) TAEGTMEYER, H.. Glycogen in the heart – an expanded view. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**; v.37, n.1, p.7-10, july 2004.
- 4) NIELSEN, J.N.; WOJTASZEWSKI, F.P. Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, n.2, p. 233-237, may 2004.
- 5) ZAWADZKI, K.M.; YASPELKIS, B.B.; IVY, J.L. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.72, n.5, p.1854-1859, may 1992.
- 6) IVY, J.L.; et al. Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.3, p.1337-1344, march 2002
- 7) SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, dezembro 2004.

- 8) PIMENTA, F.M.V., et al. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.984-991, september 2006.
- 9) 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**, v.230, n.1, p.23-30, january 2005.
- 10) REEVES, P.G.; NIELSEN, F.R.; 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 -76 rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, november 1993.
- 11) PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. **Nutritional Evaluation of Protein Foods**. Tokyo: The United Nations University; 1980.
- 12) AOAC. **Official Methods of Analysis**, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC; 1990.
- 13) ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262, november 1979.
- 14) ATHERTON, H.V.; NEWLANDER, J.A. **Chemistry and testing of dairy products**. 4ª edição. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut; 1981.
- 15) SMOLKA, M.B., et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of**

Physiology; Regulatory Integrative and Comparative Physiology, v.279, p.R1539-1545, november 2000.

16) LO, S.; RUSSELL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, v.28, n.2, p.234-236, february 1970.

17) CHILDRESS, C.C.; SACKTOR, B. Regulation of glycogen metabolism in insect flight muscle. **Journal of Biology Chemistry**, v.245, n.11, p.2927-2936, june 1970.

18) PASSONNEAU, J.V.; LOWRY, O.H. **Enzymatic Analysis: a practical guide**. Human Press: Totowa, NJ, 1993, p.264-271.

19) HULTMAN, E. Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with special reference to exercise and diet. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.19, n.94, p.1-63, 1967.

20) CARDINET, T.G.H. Skeletal muscle function. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 5th ed. London: Academic Press, 1997, p.407-440.

21) KURATA, M.; et al. Correlation among clinicopathological parameters of myocardial damage in rats treated with isoproterenol. **Experimental Animals**, v.56, n.1, 57-62, january 2007.

22) TASSI, E.M.; AMAYA-FARFÁN, J.; AZEVEDO, I.R.M. Hydrolysed α -lactalbumin as a source of protein to the exercising rat. **Nutrition Research**, v.18, n.5, p.875-881, may 1998.

- 23) FREMINET, A.; et al. Comparison of glycogen store in two strains of rat and guinea-pig under fed and fasted conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology part A: Physiology**, v.79, n.1, p.53-59, january 1984.
- 24) AOYAMA, Y.; et al. Activities of some regulatory enzymes of carbohydrate metabolism in the liver of rats fed a histidine-excess diet. **Comparative Biochemistry and Physiology part A: Physiology**, v.104, n.2, p.381-388, february 1993.
- 25) VAN LOO, L.J.G.; et al. Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mistures. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.7, p.106-111, july 2000.
- 26) YORK, J.W.; PENNEY, D.G.; OSCAL, L.B. Effects of physical training on several glycolytic enzymes in rat heart. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.381, n.1, p.22-27, january 1975.
- 27) MORIFUJI, M.; et al. Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.4, p.439-445, april 2005.
- 28) PALLOTTA, J.A.; KENNEDY, P.J. Response of plasma insulin and growth hormone to carbohydrate and protein feeding. **Metabolism**, v.17, n.10, p.901-908, october 1968.
- 29) RABINOWITZ, D.; et al. Patterns of hormonal release after glucose, protein, and glucose plus protein. **Lancet**, v.2, p.454-456, 1966.

- 30) FLOYD, J.C.Jr.; et al. Stimulation of insulin secretion by aminoacids. **Journal of Clinical Investigation**, v.45, p.1487-1502, 1966.
- 31) FLOYD, J.C.Jr.; et al. Evidence that insulin release is the mechanism for experimentally induced leucine hypoglycemia in man. **Journal of Clinical Investigation**, v.42, p.1714-1719, 1963.
- 32) FLOYD, J.C.Jr.; et al. Secretion of insulin induced by amino acids and glucose in diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.28, n.2, p.266-76, february 1968.
- 33) FLOYD, J.C.Jr.; et al. Synergistic effect of essential amino acids and glucose upon insulin secretion in man. **Diabetes**, v.19, p.109-115, 1970.
- 34) FLOYD, J.C.Jr.; et al. Synergistic effect of certain amino acid pairs upon insulin secretion in man. **Diabetes**, v.19, p.102-108, 1970.
- 35) FAJANS, S.S.; et al. The experimental induction in man of sensitivity to leucine hypoglycemia. **Journal of Clinical Investigation**, v.42, p.216-229, 1962.
- 36) NUTTALL, F.Q.; et al. Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. **Diabetes Care**, v.7, n.5, p.465-470, 1984.
- 37) NUTTALL, F.Q.; et al. Plasma glucose and insulin profiles in normal subjects ingesting diets of varying carbohydrate, fat, and protein content. **Journal of the American College of Nutrition**, v.4, n.4, p.437-450, august 1985.

- 38) VAN LOON, L.J.C.; et al. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.7, p.96-105, July 2000.
- 39) ADOLFSSON, S.; ISAKSSON, O.; HJALMARSON, O.A. Effect of insulin on glycogen synthesis and synthetase enzyme activity in the perfused rat heart. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.279, n.1, p.146-156, January 1972.
- 40) LAUGHLIN, M.R.; et al. Non-glucose substrates increase glycogen synthesis in vivo dog heart. **American Journal of Physiology**, v.267, n.1, p.H217-H223, July 1994.
- 41) BERGSTROM, J.; HULTMAN, E. A study of the glycogen metabolism during exercise in man. **Scandinavian Journal Clinical Laboratory Investigation**, v.19, p.218-228, 1967.
- 42) KONDRAT'EV, B. Y.; et al. Metabolic alterations in rat myocardium in experimental acute atrial fibrillation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.140, n.4, p.397-399, 2005.
- 43) HARGREAVES, M. Skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise. IN: **Exercise Metabolism**, M. Hargreaves ed., Human Kinetics Publishers Inc., Champaign, 1995, p. 41-72.

**Atividade enzimática da pepsina e perfusão de peptídeos através
do estômago de ratos Wistar alimentados com proteína pré-
hidrolisada do soro de leite**

*Enzymatic activity of pepsin and peptide perfusion from the stomach of
Wistar rats fed prehydrolyzed whey protein*

Carvalho, I.R.¹

(1) Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Caixa Postal 6121,
CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

As proteínas são importante fonte de energia para o organismo humano e se recomenda que contribuam com cerca de 15% do valor calórico total. As proteínas do soro do leite são ricas em aminoácidos indispensáveis, principalmente os de cadeia ramificada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da fonte protéica utilizada na dieta (isolado ou hidrolisado do soro de leite; GH 11%) em parâmetros de exaustão, atividade enzimática da pepsina e perfusão de peptídeos através da parede estomacal de ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos (n=10), a saber: sedentário (S), sedentário-exausto (SX), treinado (T), e treinado-exausto (TX). O ensaio biológico teve duração de 42 dias, sendo que o treinamento foi realizado durante quatro semanas em esteira rolante. Na exaustão, foi possível observar que os animais previamente treinados tiveram maior resistência à exaustão, independente da dieta recebida. Avaliando o efeito das variáveis na pepsina, notou-se que, alternativamente, o treinamento ou o hidrolisado, aumentam a atividade péptica, enquanto a exaustão a diminui. Para o animal que recebeu somente treinamento, essa diminuição ocorreu independente do tipo de dieta, enquanto, para o sedentário, obviamente, a diminuição se registrou, 48 horas mais tarde, apenas no animal que recebia o hidrolisado (HSX). A perfusão de peptídeos foi avaliada em estômagos de ratos que tinham sido alimentados com o isolado ou o hidrolisado. Após duas horas de incubação estomacal, o perfil eletroforético do conteúdo remanescente mostrou maior quantidade de picos (peptídeos) quando o hidrolisado foi o material infundido (grupos SX e TX). Já no perfusado externo, não foi possível a detecção de picos.

Em relação ao branco (infusão de água destilada), observou-se que neste havia alguns picos que podem corresponder a peptídeos oriundos do próprio estômago, nos conteúdos interno e externo, um achado que merece investigação. Quanto à produção de aminoácidos livres durante a incubação, o grupo S apresentou valores mais elevados para todos os aminoácidos do que os outros três grupos experimentais. Avaliando o perfil aminoacídico no perfusado externo do grupo TX, infundidos com isolado e hidrolisado, não foi possível observar a passagem de aminoácidos através da parede estomacal, com exceção do aminoácido valina, que se apresentou em quantidade notavelmente elevada nessa análise. Concluiu-se que o consumo do hidrolisado pode mostrar uma resposta vantajosa no parâmetro tempo de exaustão, em relação ao isolado do soro de leite, enquanto a atividade enzimática da pepsina, não foi influenciada pela exaustão e sim pelo consumo crônico de proteína hidrolisada. Nas análises de perfusão das proteínas do soro de leite através do estômago, os resultados sugerem que um peptídeo, ou peptídeos, contendo elevada quantidade do aminoácido de cadeia ramificada valina, se transfunde através da parede estomacal, enquanto que o consumo de hidrolisado resulta em quantidade mais elevada de peptídeos ou fragmentos no interior do estômago, em relação ao isolado. Com relação ao mecanismo de transporte e utilização desses aminoácidos e peptídeos, assim como as suas influências na atividade precisam ser elucidadas.

Palavras-chave: proteínas do soro de leite, peptídeos, pepsina, exaustão.

ABSTRACT

Proteins are also an important energy source for the human organism and it is recommended that they contribute with about 15% of the total caloric value. The milk whey proteins are rich in indispensable amino acids, mainly of branched chain type. The objective of the present work was to evaluate the influence of the protein source used in the diet (milk whey isolate or hydrolyzate; GH 11%) on such parameters as time of exhaustion, enzymatic activity of pepsin and perfusion of peptides through the stomach wall of male Wistar rats, divided in four groups (n=10x4): sedentary (S), sedentary-exhausted (SX), trained (T), and trained-exhausted (TX). The biological assay lasted 42 days, including four weeks for the actual training in the treadmill. Regardless of the diet received, the trained rats displayed a greater mean resistance to exhaustion, than the sedentary animals. Evaluating the effect of the variables on pepsin, it was noted that both training and the hydrolyzate made the enzyme's activity to increase, but the activity returned to the sedentary levels 48 hours after bringing the animal to exhaustion. Such a decrease, obviously, was evident only in the sedentary animals that were fed the hydrolyzate and were later brought to exhaustion (HSX). The perfusion of peptides was evaluated in stomachs of rats that had been fed with either the isolate or the hydrolyzate. After two hours of stomach incubation, the electrophoretic profile of the remaining contents showed a greater amount of peaks (peptides) in the stomachs that were infused with the hydrolyzate (groups SX and TX). Meanwhile, no peaks were detected in the external perfusate. From the peptide profile of the blank infusion (distilled water), it was possible to observe, both internal and

externally, a couple of peaks that could correspond to peptides derived from the very stomach tissue is something that merits further investigation. With regard to the free amino acid production during incubation, group S exhibited the highest values for all the amino acids. Evaluating the amino acid profile in the external perfusate of group TX that were infused with isolated and hidrolisado, it was not possible to observe the amino acids traverse the stomach wall, with the exception of valine, that was found in notably high amounts. It can be concluded that consumption of the hydrolyzate can elicit an advantageous response in terms of exhaustion time, against the isolate, while the enzymatic activity of pepsin does not seem to be influenced by exhaustion, but by the chronic ingestion of the hydrolyzed protein. Analyzing the perfusion of digested milk whey proteins through the stomach, the results suggest that a peptide, or peptides, it is apparent that a high amount of the branched-chain amino acid valine, traverses the stomach wall, while consumption of the hydrolyzate results in higher amounts of peptides or fragments in the interior of the stomach, in comparison to the isolate. In as much as any mechanism of transport or use of these amino acids and peptides, as well as their influence on physical performance, the issue needs to be elucidated.

Keywords: whey protein, hydrolysis, peptide absorption, pepsin, exhaustion.

3.1 Introdução

As proteínas do soro do leite são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese protéica nos tecidos ao ponto de serem consideradas como proteínas de metabolização rápida, adequadas para situações de estresse metabólico em que a reposição de proteínas no organismo se torna crítica¹.

A digestão de proteínas inicia-se no estômago dos mamíferos, sob a influência do ácido clorídrico estomacal e a endopeptidase pepsina, que é uma protease de atividade bastante inespecífica. Após deixar o estômago, as peptonas produzidas são hidrolisadas pelas enzimas pancreáticas e peptidases intestinais, resultando na produção de pequenos peptídeos e aminoácidos livres. Os di e tripeptídeos, assim como e os aminoácidos livres podem entrar no enterócito e serem degradados até aminoácidos, os que por sua vez, seguem para a circulação sanguínea. Alternativamente, os peptídeos podem ser translocados para o sangue, via transportadores intestinais². No trato digestório dos mamíferos, porém, pequenos peptídeos são ainda absorvidos pelo sistema de transporte de peptídeos, acoplado ao transporte de íons H^+ . Segundo Ogihara (1996)³, um meio de transporte, o PepT1, cotransportador de peptídeo/ H^+ , foi detectado no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), mas não no esôfago, estômago, cólon ou reto.

A atividade física provoca uma elevação da demanda por energia no organismo, podendo levar a um aumento na geração de energia, da ordem de 120 vezes na atividade intensa. Para alcançar tal objetivo, o organismo se vale de

diversas estratégias e da utilização de diferentes substratos energéticos, como o sistema creatina-fosfato, glicogênio e ácidos graxos^{4, 5}.

O uso de hidrolisados protéicos tem se incrementado recentemente, não somente pelas propriedades funcionais tecnológicas que as proteínas modificadas conferem aos produtos industrializados, mas também pelos novos atributos relacionados à fisiologia animal.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a resposta do tecido estomacal do rato jovem ao consumo de dieta contendo proteína isolada do soro de leite e seu proteólise enzimático parcial, em combinação com um protocolo de exercício físico em esteira. Utilizando-se para tanto da análise da atividade enzimática pepsina e pela determinação do perfil eletroforético e cromatográfico dos peptídeos e aminoácidos livres injetados no estômago do animal e coletados do lado externo da parede estomacal.

3.2 Metodologia

3.2.1 Ensaio biológico

Teve a duração total de 42 dias e foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar SPF (*specific-pathogen free*), recém-desmamados, com 21 dias e pesando \approx 45g, procedentes do Centro Multidisciplinar de Investigações Biológicas (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB, Unicamp, sob protocolo nº 841-1/2005.

Na primeira fase do ensaio (7 dias) foram mantidos em gaiolas individuais em laboratório de crescimento, com ciclo claro-escuro e temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Neste período de adaptação, os animais foram alimentados com dieta comercial não purificada, da marca Labina (Purina do Brasil), e água *ad libitum*.

Utilizaram-se grupos de 10 animais divididos em 8 diferentes tratamentos de treinamento e dieta (Figura 1). As dietas experimentais oferecidas foram elaboradas conforme AIN 93-G⁶, exceto a proteína, que foi no teor de 12%⁷, com substituição da caseína pelas fontes protéicas experimentais: isolado (ALACEM-895) e hidrolisado (ALATAL-817) do soro do leite, ambos da NZMPTM (Wellington, New Zealand). Todos os grupos foram submetidos a 35 dias de ensaio, no qual a 1ª semana foi de adaptação às dietas experimentais (hidrolisado [H] e isolado [I]). Nos três últimos dias dessa adaptação, foi realizada a coleta das fezes e urina, em gaiolas metabólicas, para verificar o consumo e a excreção da dieta oferecida, através da determinação do nitrogênio pelo método de Kjeldahl⁸.

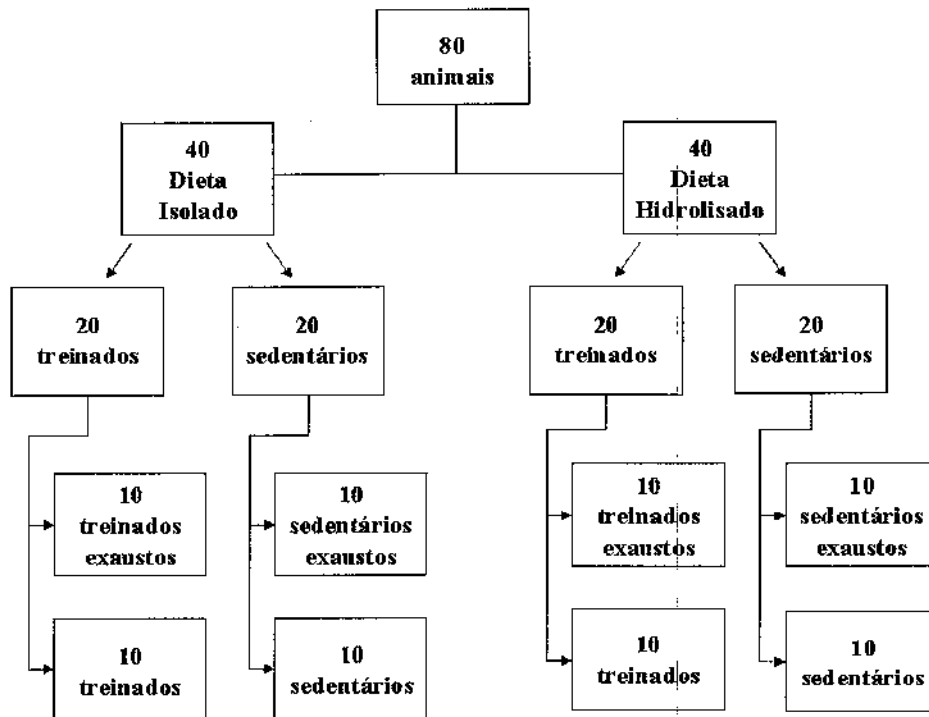


Figura 3.1. Esquema da divisão dos animais por dieta e tipo de atividade física

O grau de hidrólise do hidrolisado do soro do leite utilizado na preparação da dieta foi de ~11%, segundo determinação pelo método do TNBS (ácido trinitrobenzenosulfônico), o qual quantifica o aumento de grupos amina primários por ensaio espectrofotométrico, segundo Adler-Nissen (1979)⁹.

O perfil aminoacídico das fontes protéicas utilizadas nas dietas experimentais foi determinado por cromatografia líquida^{10,11}.

3.2.2 *Treinamento e Teste de Exaustão*

Tendo em vista que o metabolismo pode ser alterado pela dieta e pelo nível de atividade física, e o objetivo era avaliar o efeito da dieta no desempenho físico, foi necessário então introduzir o fator treinamento. A atividade física iniciou-se, após o período de adaptação à dieta, onde os três grupos de 40 ratos, separados em função da dieta e do tipo de treinamento, foram transferidos para laboratório de bioquímica do exercício, onde foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais). Os grupos de animais treinados eram levados diariamente para a sala de exercício físico em esteira, durante as quatro semanas. O treinamento consistiu inicialmente em um teste de aptidão física mínima, antes de serem definidos em grupos de treinados e sedentários. Esse teste teve duração de 5 minutos a uma velocidade de 10m/min, terminando com a exclusão daqueles animais que tiveram dificuldade em aceitar o exercício.

A esteira rolante que é composta de uma plataforma inclinável, dotada de um choque elétrico na extremidade da partida para evitar a interrupção da atividade física. O treinamento foi realizado sempre no período da manhã, de segunda a sábado, seguindo a mesma seqüência de animais. A duração do treinamento foi de 28 dias, sendo que os 7 primeiros serviram como adaptação ao exercício físico.

O grupo de animais treinados seguiu um protocolo de treinamento, adaptado de Smolka et al (2000)¹², onde a adaptação ao exercício foi feita de forma que nos dois primeiros dias, a rotina consistiu em corrida a 10m/min,

durante 20 minutos e, nos cinco dias restantes, manteve-se a mesma velocidade, com aumento do tempo para 40 minutos.

O treinamento propriamente dito teve duração de mais 21 dias, durante os quais, na primeira semana, os animais alcançaram a velocidade de 15m/min, por 40 minutos. Na segunda semana, 25m/min, correndo por 50 min e na última semana por 60 min, na velocidade de 25m/min.

No final do treinamento, os grupos escolhidos (quatro grupos de 10 animais) para exaustão foram submetidos à prova, correndo na velocidade de 25m/min, até atingirem 32,5m/min. O tempo de exaustão foi determinado no momento em que o animal não conseguia mais se afastar do choque elétrico.

3.2.3 *Sacrifício dos Animais*

Ao término da exaustão, amostras de sangue caudal foram extraídas para determinação do lactato sérico e os animais deixados em repouso de 24 horas. No dia seguinte, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sendo os estômagos coletados e armazenados em nitrogênio líquido, até realização da análise, exceto para as determinações de perfusão de peptídeos e aminoácidos livres, que foram realizadas imediatamente após o sacrifício dos animais.

3.2.4 Determinações

a) Atividade da Pepsina (Hemoglobina como Substrato)

Segundo o método de Anson (1938)¹³, que utiliza a hemoglobina como substrato, as amostras de estômago (25 mg) são homogeneizadas com tampão fosfato (pH 6,9). A partir desse ponto, foi seguida a metodologia descrita e as absorbâncias foram lidas contra água desionizada em espectrofotômetro Beckman-Coulter DU-640, a 280nm. Sendo a concentração de produtos hidrolisados pela pepsina proporcional à absorbância do sobrenadante, foram utilizadas soluções-padrão de pepsina, com concentrações conhecidas, para a construção de uma curva de calibração e a atividade enzimática da pepsina, calculada em equivalentes de 1×10^{-3} mol de tirosina.

b) Aminoácidos e Peptídeos no Estômago

Conforme método adaptado por Brennan et al (1975)¹⁴, o estômago, após ser retirado do animal, foi mantido em solução tampão à temperatura de 37°C. Este órgão teve suas aberturas vedadas com barbante, após o qual foi injetado um mL da solução de proteína em teste (isolado ou hidrolisado do soro de leite) em água desionizada, na concentração 37,5 mg/mL. O órgão foi mantido em solução tampão (20 mL), em banho, por 2 horas para simular condições fisiológicas. Em seguida, os líquidos, interno e externo foram coletados e armazenados em freezer (-18°C) para análise posterior em eletroforese capilar e cromatografia líquida.

- *Eletroforese Capilar*

Os perfis eletroforéticos foram determinados por eletroforese capilar, em sistema eletrolítico apropriado^{15,16}. As amostras foram diluídas em água ultra-pura e homogeneizadas, filtradas em membrana de acetato celulose 22 μm e injetadas durante 7s, com pressão de 40 mBar, usando capilar de sílica fundida (51,5 cm x 75 μm , d.i.). A solução de eletrólitos de corrida usada foi fosfato de sódio 900 mM, pH 1,85 e fluxo de corrente do cátodo para o ânodo. Entre as análises, o capilar foi pós-condicionado com 1,5 min de água e 1 min de solução de hidróxido de sódio 1N e mais 2 min de água. Em seguida, foi passado tampão de corrida por 2,5 min. As corridas foram realizadas em eletroforetógrafo Hewlett Packard-3DCE (Agilent, Waldbronn, Alemanha), na temperatura de 30 °C, com tensão mantida em 25,5 kV e a absorbância monitorada em 191 nm.

- *Aminoácidos Livres por Cromatografia Líquida*

Para a análise aminoacídica do conteúdo dos líquidos internos e externos^{10,17}, o *input* e *output* foram primeiramente hidrolisados com ácido clorídrico 6M, a 110°C, com proteção de fenol, durante 24 horas. Os aminoácidos produzidos foram reagidos com fenilisotiocianato (PITC), separados por HPLC em fase reversa, detectados e quantificados pela sua absorbância UV, a 254nm, em cromatógrafo Thermo Separation Products-Pickering (EUA), adaptado. A quantificação foi feita por calibração interna multi-nível, com auxílio do ácido α -aminobutírico (AAAB) como padrão interno.

Em seguida, as amostras foram desproteinizadas com metanol 99% (grau HPLC), na proporção de uma parte de metanol para uma parte de amostra e depois centrifugada. Os aminoácidos dissolvidos no sobrenadante foram reagidos com fenilisotiocianato (PITC), e separados por HPLC em fase reversa, sendo a detecção efetuada em 254 nm e a quantificação realizada por calibração interna multi-nível, com auxílio do ácido α -aminobutírico (AAAB), como padrão interno.

- *Peptídeos por Cromatografia Líquida*

O procedimento cromatográfico para mensuração dos peptídeos foi realizado de forma análoga à descrita no item anterior, usando coluna Luna 5u C₁₈ (100 μ m), 250 x 4,6mm I.D. A separação foi obtida mediante o uso de gradiente linear entre uma fase A móvel (ácido-água trifluoracético, 0,11%), e fase B (0,1% ácido trifluoracético, em acetronitrila e água – 60:40). O fluxo foi de 1mL/min, o gradiente de acetronitrila de 1,2%, com a temperatura na coluna em 30°C, e a detecção em UV, a 254nm¹⁸.

3.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm erro padrão e submetidos à análise estatística usando o programa SPSS (Statistical Package for Social Science) para ambiente Windows, versão 15.0, onde as diferenças entre médias foram avaliadas, usando o teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

3.3 Resultados e Discussão

- *Peso dos animais e exaustão*

O peso dos animais foi acompanhado durante todo o experimento. Os ratos eram pesados a cada dois dias em balança eletrônica, antes de receberem o treinamento e a dieta do dia. O ganho de peso total médio em 42 dias nos grupos que consumiram dieta com isolado foi $184,47 \pm 3,27$ g e $199,77 \pm 3,28$ g, para os grupos que consumiram o hidrolisado do soro de leite. Esses valores médios foram estatisticamente diferentes ($p= 0,002$).

Findo o protocolo de treinamento, os animais dos grupos TX e SX, foram submetidos à exaustão e, 24 horas mais tarde, sacrificados, rendendo os tempos de exaustão registrados na Figura 3.2. Pode ser observado que o grupo TX rendeu tempos significativamente superiores aos encontrados para os grupos SX, independente do tipo de dieta, obviamente mostrando o efeito do treinamento. Houve superioridade numérica do tempo médio de exaustão dos animais que consumiram o hidrolisado, com relação aos que receberam o isolado.

Entretanto, como aparece na Figura 3.2, os animais que consumiram o hidrolisado mostraram média numericamente maior de resistência à exaustão do que os que consumiram o isolado, embora a diferença não tenha sido considerada como significativa ($p=0,13$). Ou seja, o consumo do hidrolisado resultou em aumento da resistência à exaustão dentro do mesmo nível de atividade apenas em termos absolutos. Trabalho anterior realizado por Pimenta et al (2006)¹⁹ havia verificado que o consumo da proteína hidrolisada conferia um desempenho

superior em termos dos tempos de exaustão, em comparação à proteína intacta do soro de leite (156 ± 18 e 60 ± 13 min, respectivamente); resultados esses próximos do encontrado nesse trabalho para o grupo HTX (121 ± 14 min) (Figura 3.2). Já Bejma (2000)²⁰ analisou o tempo de exaustão e outros parâmetros em ratos adultos jovens (8 meses) e adultos idosos (24 meses) da linhagem Fischer que praticaram atividade física em esteira rolante e verificou que os ratos adultos jovens, correndo a 25m/min, atingiram a exaustão em $55,4\pm 2,7$ min, enquanto os ratos idosos, a 15m/min, conseguiram alcançar $58,0\pm 2,7$ min. Pode-se notar que a prática de atividade física regular leva ao retardo da fadiga, quando analisado em ratos jovens.

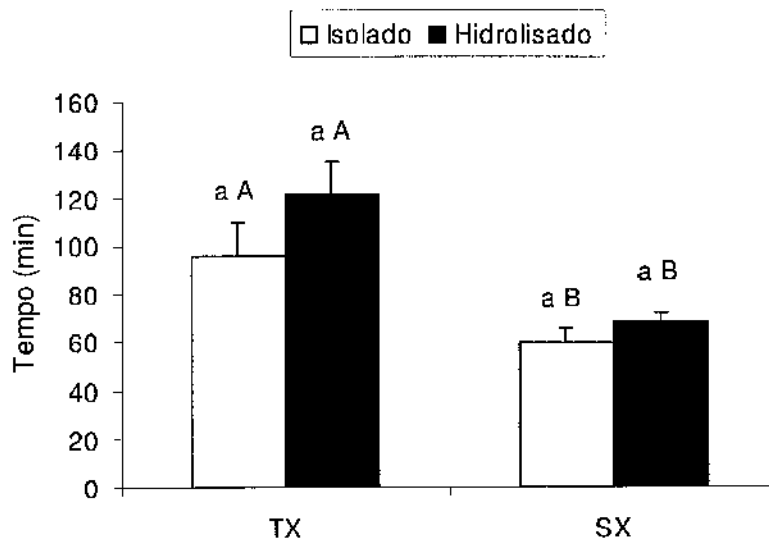


Figura 3.2. Médias de tempo de exaustão (minutos) nos grupos experimentais submetidos à prova. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as dietas e dentro de cada grupo de atividade. As maiúsculas se referem às diferenças entre os níveis de atividade física ($p = 0,13$). Médias (\pm erro padrão) de 10 animais.

- *Atividade enzimática da pepsina*

Os resultados encontrados neste trabalho (Figura 3.3) são superiores aos relatados por Coppi, Bonardi e Gaetani (1971)²¹, que mostraram atividade de pepsina de $27,5 \pm 1,7$ mg tirosina/g N em ratos Sprague-Dawley, com peso de 160-170g. Já os valores relatados por Di Palma et al (1991)²² para atividade de pepsina na mucosa gástrica de humanos (crianças e adultos), mostrou valores superiores no corpo do estômago em relação ao antro, sendo o valor mais alto encontrado de aproximadamente 450 IU/mg proteína.

A atividade enzimática da pepsina apresentou diferença significativa somente entre os grupos sedentário e sedentário-exausto (HS e HSX), que consumiram dieta com hidrolisado do soro de leite como fonte protéica. Os outros grupos apresentaram resultados semelhantes entre si, considerando o critério padrão de significância. Entretanto, seria meritório e cientificamente estimulador definir um critério arbitrário de significância mais amplo, neste caso, tendo em vista o valor da probabilidade encontrada ($p=0,06$), assim como a variabilidade e a heterogeneidade de resposta dos animais.

Não há dúvida de que o consumo crônico da proteína pré-hidrolisada promove uma tendência a incrementar a atividade da pepsina nos animais sedentários e de que este aumento é perdido rapidamente após a exaustão física. De forma semelhante, a exaustão também parece ter sido responsável pela redução da atividade nos animais treinados.

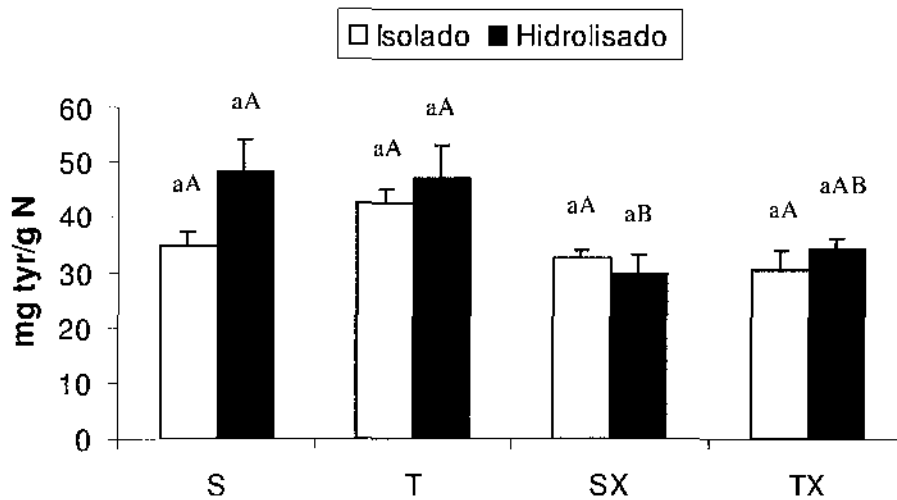


Figura 3.3. Média da atividade enzimática da pepsina em mg tirosina/g nitrogênio nos grupos experimentais. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre as dietas e dentro de cada grupo de atividade. As maiúsculas se referem às diferenças entre os níveis de atividade física ($p = 0,06$). Médias (\pm erro padrão) de 3 animais.

- *Composição de aminoácidos*

A composição aminoacídica das fontes protéicas utilizadas nas dietas experimentais administradas aos animais durante o ensaio biológico está na Tabela 3.3, onde se pode notar que, em relação à recomendação do FNB/IOM (Food Nutrition Board/Institute of Medicine)²³, as quantidades de aminoácidos presentes nas duas fontes protéicas são inferiores, exceto em isoleucina, leucina, lisina, treonina e valina. A combinação dos aminoácidos fenilalanina+tirosina mostrou-se limitante nas fontes protéicas.

Tabela 3.1. Comparação dos Aminoácidos Indispensáveis e Condicionalmente Indispensáveis das Fontes Protéicas Utilizadas nas Dietas Experimentais com FNB/IOM²³ (mg/g proteína)

<i>Aminoácidos/ Fontes Protéicas</i>	Isolado	Hidrolisado	FNB/IOM
His	10,3±0,15	11,2±0,46	18,0
Ile	57,1±0,60	47,7±2,19	25,0
Leu	122,5±0,61	104,0±4,20	55,0
Lis	103,5±0,84	89,6±4,06	51,0
Met + Cys	27,4±11,12	16,7±4,35	25,0
Phe + Tyr	37,8±0,86	37,8±4,61	47,0
Thr	45,7±0,42	41,0±0,26	25,0
Trp	3,0±0,03	2,7±0,03	7,0
Val	50,8±0,17	47,7±1,82	32,0

Onde: His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Lis: lisina; Met + Cys: metionina + cisteína; Phe + Tyr= fenilalanina + tirosina; Thr: treonina; Trp: triptofano; Val: valina.

Valores: média (n=3) ± erro padrão.

Tendo em vista a superioridade das proteínas experimentais no conteúdo de muitos dos aminoácidos indispensáveis, foram feitas análises para verificar se essa seria mantida após o treinamento dos animais. Além dos aminoácidos, tanto totais quanto livres, foram feitas também análises de peptídeos, a fim de verificar a presença desses no conteúdo estomacal.

• *Resultados eletroforéticos*

Para avaliar a presença de peptídeos nos conteúdos interno e externo dos estômagos que foram infundidos com o isolado e o hidrolisado neste experimento, foi utilizada a técnica de eletroforese capilar, a qual apresenta como uma das suas vantagens analíticas sobre a cromatografia a sua maior eficiência²⁴. Comparando os eletroferogramas obtidos para os animais do grupo sedentário-exausto, cujos estômagos foram infundidos com cada uma das fontes protéicas, nota-se uma diferença entre perfil obtido para o isolado (ISX – Figura 3.4) e o do hidrolisado (HSX – Figura 3.5). O primeiro demonstra uma quantidade menor de picos (peptídeos) no conteúdo interno (a) do que quando o material infundido foi o hidrolisado. O conteúdo externo, em ambos os casos, não apresentou quantidade perceptíveis na diluição de trabalho (b).

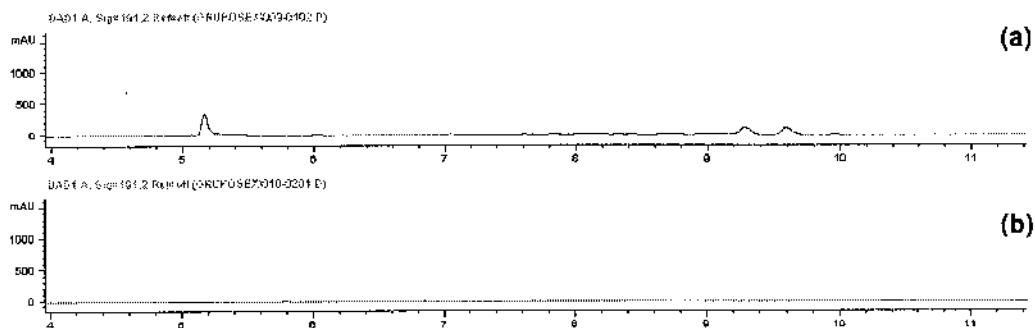


Figura 3.4 Perfil eletroforético do grupo ISX (estômagos de animais sedentários-exaustos que tinham consumido dieta com isolado e receberam infusão do isolado). Eixo x é o tempo em minutos e y, mili-unidades de absorbância, sendo (a) conteúdo interno; (b) perfusado externo.

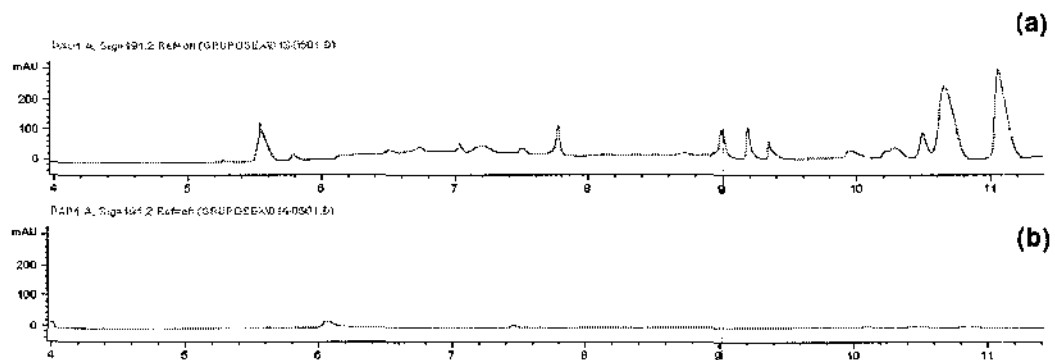


Figura 3.5 Perfil eletroforético do grupo HSX (estômagos de animais sedentários-exaustos que tinham consumido dieta com hidrolisado e receberam infusão do hidrolisado). Eixo x é o tempo em minutos e y, mili-unidades de absorvância, sendo (a) conteúdo interno; (b) perfusado externo.

É pertinente lembrar que os resultados apresentados nesta e nos eletroferogramas seguintes referem-se aos resíduos de uma proteína inteira ou pré-hidrolisada que tinha permanecido no interior do estômago durante duas horas; isto é, os picos corresponderiam a produtos da hidrólise estomacal que permaneceram no interior do órgão. Considerando que cada estômago foi infundido com o mesmo tipo de proteína que foi consumida durante cinco semanas, e que os estômagos do grupo ISX continham menor concentração de peptídeos, após duas horas de incubação, os resultados sugerem que o consumo da proteína inteira induziu maior atividade péptica latente no estômago.

Já no grupo treinado e submetido à exaustão (TX), pode-se observar a incidência de uma dupla de picos, em torno dos 10 minutos, para as duas dietas, I e H (Figura 3.6 (a) e Figura 3.7 (a)). Estes picos, porém, estava em maior concentração quando os animais consumiram dieta com hidrolisado. No perfusado

externo ao estômago, novamente, não houve quantidade suficiente para detecção de peptídeos em ambos os grupos.

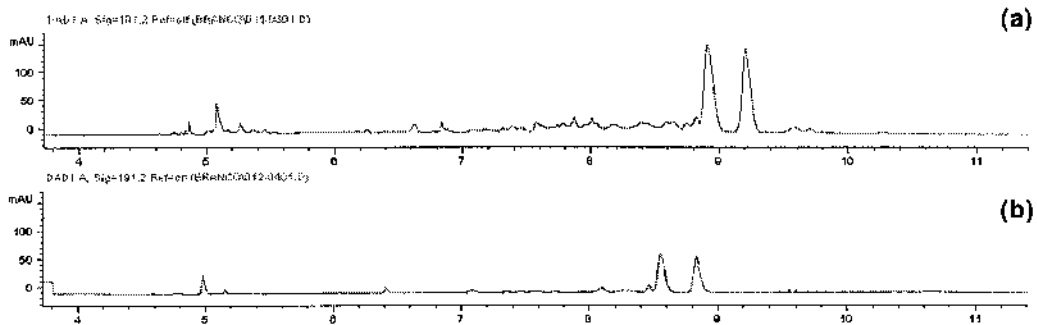


Figura 3.6 Perfil eletroforético do grupo ITX (estômagos de animais treinados-exaustos que tinham consumido dieta com isolado e receberam infusão do isolado). Eixo *x* é o tempo em minutos e *y*, mili-unidades de absorvância, sendo **(a)** conteúdo interno; **(b)** perfusado externo.

Considerando que a quantidade de fragmentos ou peptídeos encontrados no interior destes estômagos foi menor do que no caso dos animais sedentários, os resultados são consistentes com a observação feita acima, de que o treinamento promove maior atividade enzimática digestiva do que o sedentarismo. Ainda, como consequência lógica, as alturas dos picos sugerem novamente que o consumo crônico do hidrolisado resulta em menor atividade enzimática.

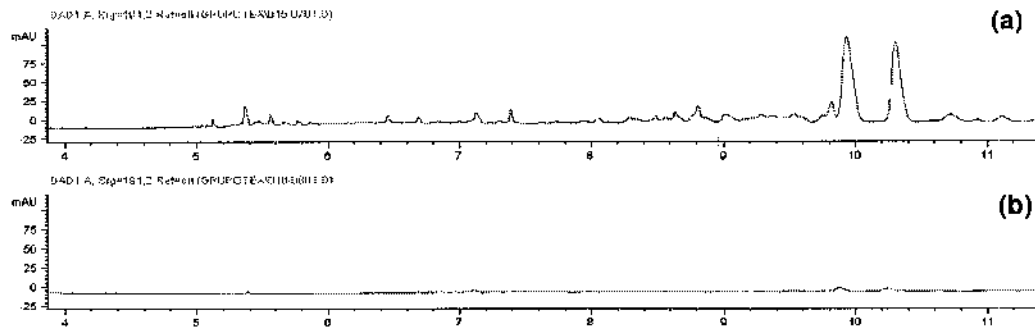


Figura 3.7 Perfil eletroforético do grupo HTX (estômagos de animais treinados-exaustos que tinham consumido dieta com hidrolisado e receberam infusão do hidrolisado). Eixo x é o tempo em minutos e y, mili-unidades de absorbância, sendo (a) conteúdo interno; (b) perfusado externo

Comparando o perfil eletroforético do conteúdo interno do estômago de cada um dos grupos (Figuras 3.4-a, 3.5-a, 3.6-a e 3.7-a) com o branco, que foi obtido utilizando apenas água destilada em lugar da suspensão protéica, observam-se alguns picos que podem corresponder a peptídeos oriundos do próprio estômago. Com relação ao fluido externo (Figura 3.8-b), no branco houve a incidência, próxima dos 9 minutos, de uma dupla de picos que não foi possível visualizar nas outras amostras.

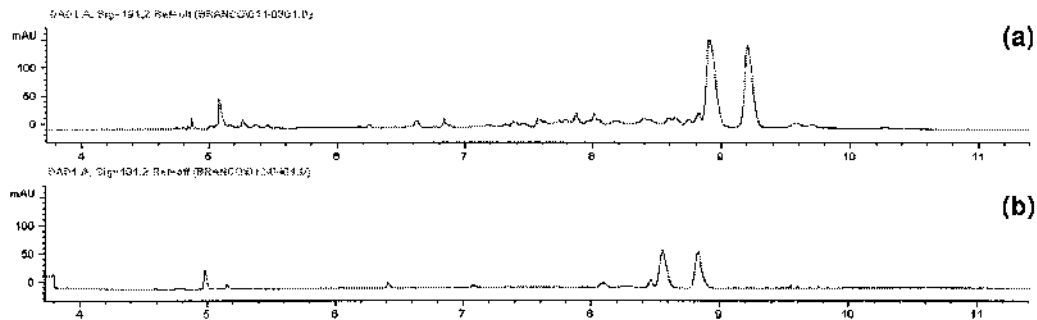


Figura 3.8 Perfil eletroforético dos fluidos obtidos, após água destilada ter sido infundida no estômago (branco), sendo **(a)** conteúdo interno; **(b)** fluido externo. (O eixo do tempo x é em minutos e a altura dos picos y, em mili-unidades de absorvância).

Foram apresentados somente os resultados dos eletroferogramas dos grupos TX e SX, pois os outros grupos não apresentaram picos passíveis de serem comparados.

- *Resultados cromatográficos*

Na determinação de aminoácidos por cromatografia líquida obtiveram-se os perfis de aminoácidos totais e livres do material infundido; isto é, perfis das proteínas incompletamente digeridas e perfis das mesmas, porém, totalmente hidrolisadas. Com esses dados foi possível distinguir entre o que era peptídeo e o que era aminoácido livre no material infundido e perfusado. O valor de aminoácidos livres foi subtraído do aminoácido total e feita a correção dos valores pela diluição das amostras (4x) e, em seguida, descontado o valor do branco de cada um, já que esse representa um aminoácido proveniente do animal.

O conteúdo de aminoácidos livres dos quatro grupos experimentais que foram alimentados com e cujos estômagos receberam infusão do hidrolisado, estão na Figura 3.9, onde se pode notar que o grupo sedentário apresentou valores mais elevados em todos os aminoácidos livres, seguidos daqueles treinados e submetidos à exaustão, mostrando ainda que o nível de atividade física em pouco interfere nesse aspecto fisiológico do estômago.

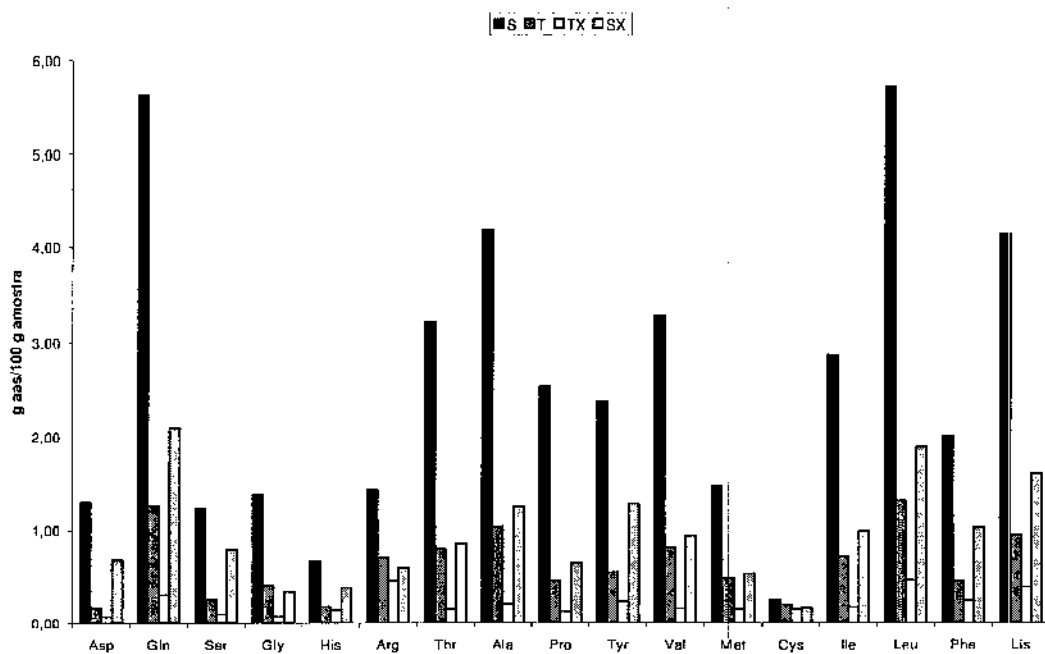


Figura 3.9 – Perfil de aminoácidos livres do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam a dieta com e a injeção do hidrolisado do soro de leite, segundo a sua distribuição por grupos de atividade física.

Os valores de aminoácidos totais e livres do conteúdo interno do estômago dos animais que receberam a infusão de hidrolisado do soro de leite, estão na Figura 3.10. É possível notar que todos os valores dos aminoácidos totais estão

mais elevados por causa da liberação de aminoácidos, ocorrida durante a hidrólise ácida de proteínas e peptídeos que estavam presentes, junto com alguns aminoácidos livres.

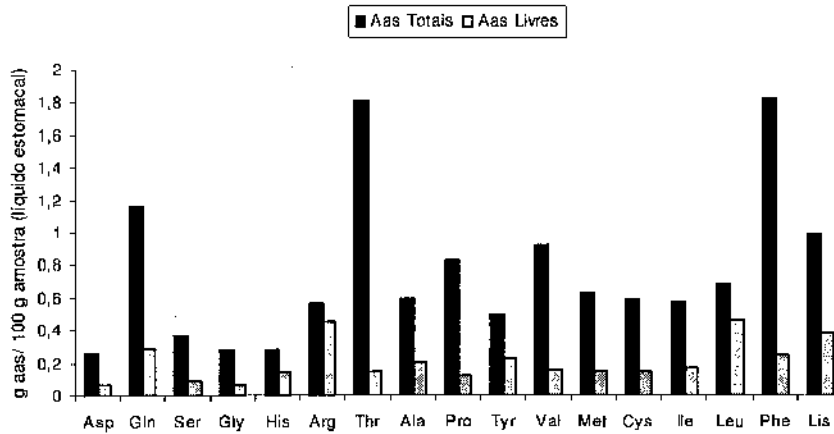


Figura 3.10 – Perfil de aminoácidos totais e livres do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam dieta com e injeção do hidrolisado do soro de leite, pertencentes ao grupo TX.

Na Figura 3.11, o perfil aminoacídico encontrado no conteúdo externo do estômago, mostrou que, após duas horas de incubação, havia uma baixa quantidade de aminoácidos fora do órgão, sugerindo que não ocorreu passagem significativa de aminoácidos através da parede estomacal, o qual é consistente com a não-existência de um cotranportador neste órgão, conforme exposto anteriormente³. Porém, exceção deve ser feita para o aminoácido valina, que se apresentou em quantidade notavelmente elevada por ocasião da determinação de aminoácidos totais. Os aminoácidos livres são imperceptíveis na figura.

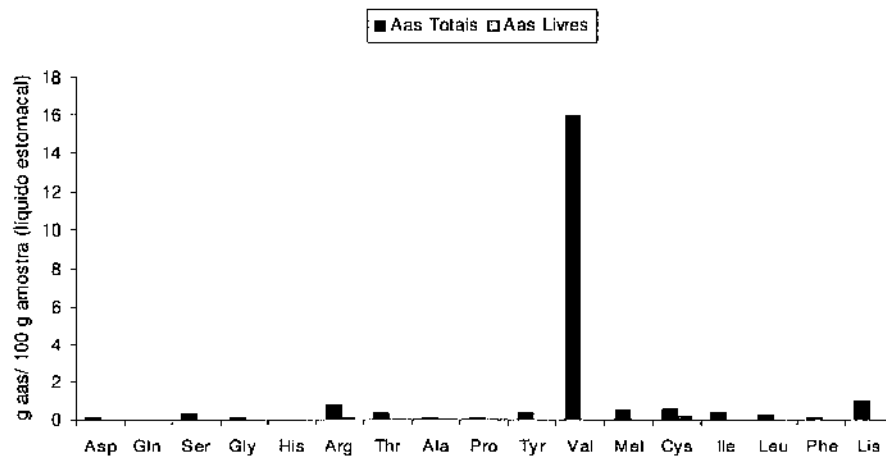


Figura 3.11 – Perfil de aminoácidos totais e livres do perfusado externo do estômago de ratos que receberam infusão de suspensão com hidrolisado do soro de leite do grupo TX.

Um aminograma semelhante à Figura 3.10 foi obtido com a infusão de isolado do soro de leite, Figura 3.12, onde observa-se que após hidrólise total todos os valores dos aminoácidos aumentaram.

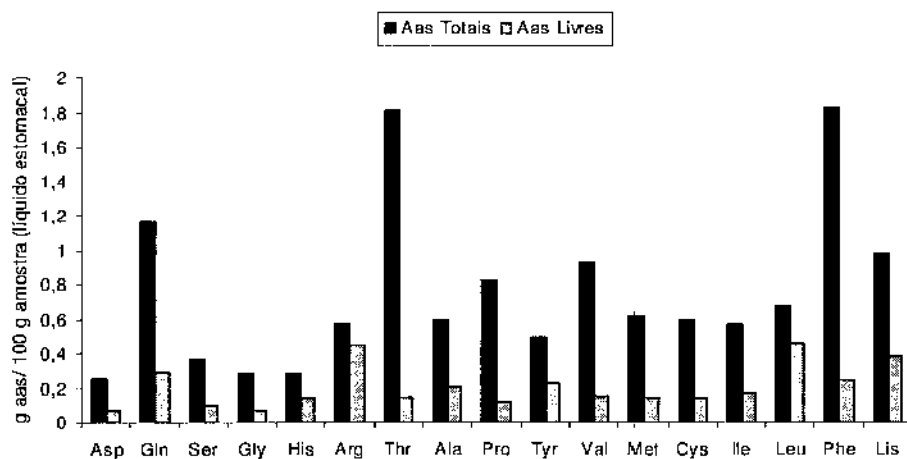


Figura 3.12 – Perfil de aminoácidos totais e livres do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam infusão de suspensão com isolado do soro de leite do grupo TX.

Na Figura 3.13 obtida com a infusão do isolado, também se registra a presença de quantidade elevada de valina, agora, com relação à proteína intacta. Este fato, não encontrado na literatura, pode ser um achado importante, pois mostra ser uma característica das proteínas dos soro e revela a passagem de peptídeos contendo elevados teores do aminoácido de cadeia ramificada, valina. A presença de peptídeos ricos em valina, e não valina na forma livre, no líquido externo (perfusado) ao estômago, tanto no caso do isolado, quanto do hidrolisado, causou intriga e é assunto que deverá ser objeto de pesquisa futura.

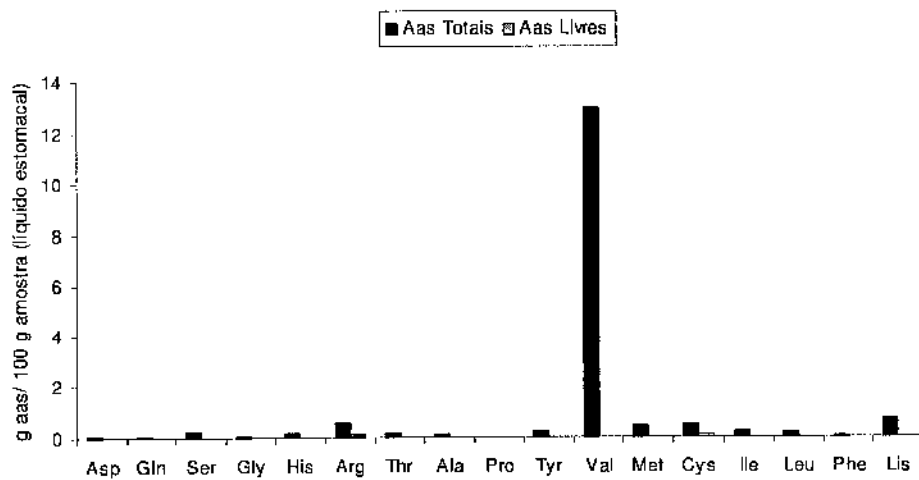


Figura 3.13 – Perfil de aminoácidos totais e livres do perfusado externo do estômago de ratos que receberam infusão com suspensão do isolado do soro de leite do grupo TX.

Em caráter exploratório, o resíduo do material infundido nos estômagos foi analisado com relação a seus aminoácidos. No caso do resíduo do isolado, não houve aminoácidos livres detectados. Já no caso do

hidrolisado enzimático, houve uma quantidade de aminoácidos livres e ainda muitos peptídeos. Após hidrólise ácida desse material retirado dos estômagos registraram-se um aumento no perfil de aminoácidos e, a diferença para mais, foi calculada e se encontra no gráfico da Figura 3.14. É pertinente mencionar aqui que o hidrolisado enzimático se apresenta como um material insolúvel em meio aquoso e a sua extração para análise é limitada.

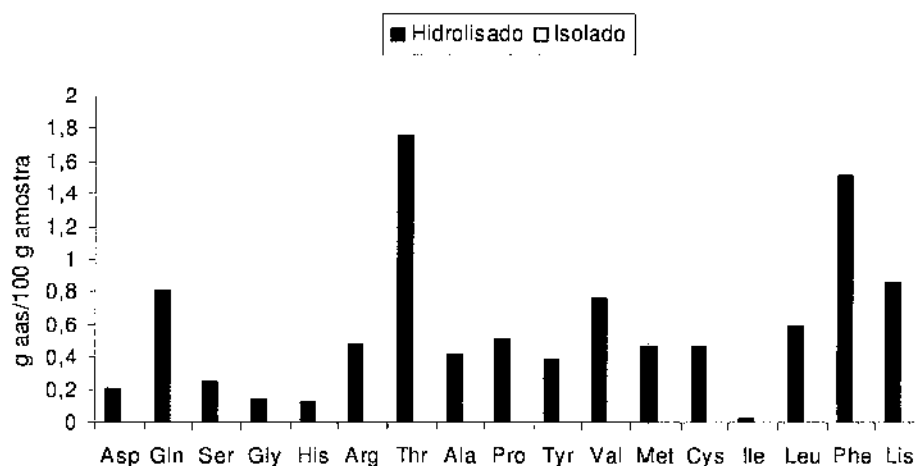


Figura 3.14 – Valores de aminoácidos do conteúdo interno do estômago de ratos que receberam injeção de solução com hidrolisado ou isolado do soro de leite do grupo TX.

Pela comparação visual da absorvabilidade do isolado, em relação ao hidrolisado, pode se afirmar que este último pode contribuir mais profusamente à translocação de peptídeos para o meio seroso que o isolado. A avaliação do efeito ou vantagem fisiológica de se ingerir a proteína previamente hidrolisada, porém, não foi completa devido à

impossibilidade de comparar o efeito do treinamento, separadamente do efeito da dieta neste processo da absorção estomacal de peptídeos.

3.4 Conclusão

Diante dos resultados apresentados é possível concluir que o consumo de hidrolisado do soro de leite apresenta uma resposta numericamente vantajosa para o animal treinado, no que diz respeito à chegada da exaustão, embora as médias estatísticas não tenham sido significativamente diferentes ($p=0,13$) entre a dieta preparada com o isolado (proteína intacta) e aquela com o hidrolisado. O grau de variação (CV = 11,5% para os treinados e 21,6% para os sedentários) entre as respostas, porém, continua sendo um fator que talvez pudesse ser minimizado trabalhando com animais selecionados especificamente para o exercício físico. Devido às adaptações fisiológicas próprias do exercício, os animais que foram submetidos a treinamento prévio, obtiveram desempenho expressivamente superior àqueles que permaneceram sedentários até o momento de serem submetidos à exaustão. A atividade enzimática da pepsina parece ter sido estimulada mediante uma combinação do consumo crônico do hidrolisado, mas desestimulada pela exaustão.

Após duas horas de perfusão *ex-vivo* dos estômagos para estudar o impacto do consumo da proteína pré-hidrolisada na capacidade digestiva, a análise de peptídeos por eletroforese capilar deixou clara a presença maior de fragmentos ou peptídeos no interior do estômago dos animais que tinham consumido o hidrolisado durante cinco semanas, em relação aos que consumiram a proteína intacta, significando a instalação de uma atividade digestiva atenuada no animal que se alimentou com proteólisado. As implicações, tanto negativas como positivas, dessa adaptação fisiológica não podem ser avaliadas neste

momento, mas elas não mostraram diferença no crescimento do animal e, ainda, poderiam ter aplicação no tratamento de anormalidades de hipersecreção de sucos gástricos.

Evidências foram apresentadas de que existe, ao menos, um peptídeo que se transfunde através da parede estomacal, com características de alto conteúdo do aminoácido de cadeia lateral ramificada, valina. O fato de não terem sido vistas grandes quantidades de picos nos perfusados externos, independente da dieta consumida ou da proteína infundida, poderia ser interpretado como indicação de uma baixa translocação de peptídeos.

Conclui-se que, apesar da presença de aminoácidos e peptídeos no conteúdo estomacal dos animais, não é possível afirmar se estes seriam adequadamente transportados e se haveria um bom aproveitamento pelo organismo. A influência da atividade física nesses parâmetros também não pode ser afirmada, necessitando assim de estudos futuros.

3.5 Referências

- 1) SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, dezembro 2004.
- 2) SCHMIDL, M.K., et al. Use of hidrolysate-based products in special medical diets. **Food Technology**, v.48, n.10, p.77-80, october 1994.
- 3) OGIHARA, H.; et al. Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.220, n.3, p.848-852, march 1996.
- 4) LANCHETA Jr., A.H. **Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
- 5) MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Fisiologia do Exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- 6) REEVES, P.G.; NIELSEN, F.R.; 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 -76 rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, november 1993.
- 7) PELLET, P.L.; YOUNG, V.R. **Nutritional Evaluation of Protein Foods**. Tokyo: The United Nations University; 1980.
- 8) AOAC. **Official Methods of Analysis**, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC; 1990.

- 9) ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.6, p.1256-1262, november 1979.
- 10) WHITE, J.A.; HART, R.J.; KRY, JC. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n.4, p.170-177, oct/dec 1986.
- 11) SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v.39, n.12, p.1412-1415, 1967.
- 12) SMOLKA, M.B., et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology; Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.279, p.R1539-1545, november 2000.
- 13) ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. **Journal of General Physiology**, v.22, p.79-89, june 1938.
- 14) BRENNAN, F.T., et al. Acid-secretory effects of pentagastrin, histamine, urecholine, DBcAMP, and cGMP in isolated stomachs of fed and fasted rats. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.149, p.725-730, 1975.
- 15) McLAUGHLIN, G.M., et al. Pharmaceutical drug separations by HPCE: Practical guidelines. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.15, n. 6-7, p.961-1021, 1992.

- 16) ZHU, M.; HANSEN, D.; BURD, S.; HVEBNER, V.; BALASUBRAMANIAN, P.; CHEN, A.J.C. Use of high performance eletrophoresis in monitoring peptide synthesis. **Bio-Rad Bulletin**, 1482, 1989.
- 17) HANGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatography of amino-acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, p.912-916, nov/dec 1989.
- 18) CHABANET, C.; YVON, M. Prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.599, n.1-2, p.211-225, may 1992.
- 19) PIMENTA, F.M.V., et al. Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.984-991, september 2006.
- 20) BEJMA, J.; RAMIRES, P.; JI, L.L. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: Differential effects in the myocardium and liver. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.169, n.4, p.343-351, august 2000.
- 21) COPPI, G.; BONARDI, G.; GAETANI, M. Experimental gastric ulcers and uropepsinogen excretion in rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.23, n.9, 722-723, september 1971.
- 22) DI PALMA, J.; et al. Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children, and adults. **Gastroenterology**, v.101, p.116-121, 1991.

23) FNB (Food and Nutrition Board), IOM (Institute of Medicine). **Dietary reference intake for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. Washington, DC: National Academies Press, 2002.

24) RODRIGUEZ, I.; LI, S. F. Y. Surface deactivation in protein and peptide analysis by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.383, n.1-2, p. 1-26, 1999.

Contudo, diante dos resultados encontrados no presente trabalho, pode-se concluir que, as diferenças observadas no metabolismo do glicogênio do miocárdio, na interação fonte protéica da dieta e exercício físico, não revelaram que o hidrolisado seja responsável por incrementar os estoques de glicogênio nem na atividade enzimática das duas principais enzimas que regulam os estoques desta reserva energética no miocárdio (glicogênio sintase e fosforilase), e nem na atividade da enzima creatina quinase no miocárdio.

Também se conclui que, no parâmetro exaustão, ocorre uma maior resistência à fadiga e desempenho superior no exercício, quando há treinamento prévio, e que a atividade enzimática da pepsina parece ter sido estimulada pela combinação do consumo crônico do hidrolisado, mas sem interferência da exaustão. Com relação aos peptídeos e aminoácidos livres, foi notada a influência da dieta, no qual é possível afirmar que eles estão presentes em maior quantidade no estômago quando ocorre o consumo de hidrolisado do soro de leite e também, evidências indicam que ocorre transfusão do aminoácido de cadeia ramificada valina através da parede estomacal. Porém, não se pode afirmar que esses peptídeos e aminoácidos encontrados no estômago seriam adequadamente transportados e se ocorreria um bom aproveitamento pelo organismo, necessitando assim de estudos futuros.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 841-1, sobre "EFEITOS DO CONSUMO DE PROTEOLISADO DO SORO DE LEITE NO ESTÔMAGO, CORAÇÃO, INTESTINO E PÂNCREAS DE RATOS JOVENS EXERCITADOS EM ESTEIRA" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán / Iara Ribeiro Carvalho / Ana Cláudia Coelho Nery está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 08 de junho de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 841-1, entitled "EFFECTS OF THE INTAKE OF MILK WHEY PROTEIN HYDROLYSATE IN THE STOMACH, HEART, INTESTINE AND PANCREAS OF YOUNG RATS EXERCISED IN THE TREADMILL", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 8, 2005.

Campinas, 08 de junho de 2005.

Prof. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Ajonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEPERINH VAZ
CEP - 13.061-970 - CAMPINAS - SP - 06.532

TELEFONE 55 19 3786-6309
FAX 55 19 37893124

UNICAMP - JEM-5FC01818E - 15-Jun-2005 13:49:02-486-1/1

