



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



**EFEITO DO CONSUMO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE NO SISTEMA
DE DEFESA HSP 70 E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS**

CAROLINA SOARES DE MOURA
Nutricionista

JAIME AMAYA-FARFAN
Orientador

Campinas - SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA SOARES DE MOURA

**EFEITO DO CONSUMO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE NO SISTEMA
DE DEFESA HSP 70 E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS**

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

Prof. Dr. JAIME AMAYA-FARFAN

Orientador

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Carolina Soares de Moura, aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pelo Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M865e Moura, Carolina Soares de
Efeitos do consumo das proteínas do soro do leite no sistema de defesa HSP70 e parâmetros bioquímicos em ratos / Carolina Soares de Moura. -- Campinas, SP: [s.n], 2012.

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

1. Proteínas do soro do leite 2. Stress. 3. Proteínas de choque térmico HSP70. 4. Glutamina. 5. Aminoácidos de cadeia ramificada I. Amaya-Farfan, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of whey protein in the system defense HSP70 and biochemical parameters in rats

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Heat shock protein

Stress

HSP70

Glutamine

Branched-chain amino acids

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

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Jaime Amaya-Farfan [Orientador]

Mario Maróstica Junior

Luciano Bruno de Carvalho Silva

Data da defesa: 23/02/2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfan (Orientador)

Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva

Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore

Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene

“Existe um povo que a bandeira empresta para
cobrir tanta infâmia e covardia!... E deixa-a
transformar-se nessa festa ...”

(O Navio Negreiro, Castro Alves)

Dedico esse trabalho a minha mãe e avó

Lucia e Madalena

Pelo amor, dedicação, força e empenho a tudo que diz respeito a mim;

Ao meu marido Felipe pela paciência, dedicação e compreensão, pois sabe que
tenho paixão pelo que faço.

Meu profundo e sincero agradecimento.

AGRADECIMENTOS

A minha família pela dedicação e incentivo nos momentos difíceis;

Ao Professor Jaime que a mim dedicou seu tempo, ajuda, conhecimento, confiança e amizade, o qual tenho muita consideração e admiração por tudo que representa;

Aos meus professores da graduação, iniciação científica e pós graduação, que representam muito do que me tornei, e que foram essenciais no meu desenvolvimento como pessoa e pesquisadora;

Aos amigos do laboratório de Fontes Protéicas em especial ao Pablo, Priscila e Susana pelo apoio, conselhos e incentivo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida;

A Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro;

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira auxiliaram nessa intensa trajetória, para que esse trabalho se tornasse realidade;

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1.INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Proteína do soro do leite	6
2.2 Aminoácidos de cadeia ramificada	12
2.3 Glutamina	16
2.4 Glutamina sintetase	18
2.5 Glutamina e exercício	21
2.6 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	24
2.7 Proteínas do estresse (<i>heat shock proteins</i>)	27
2.8 Proteínas do estresse e exercício	34
2.9 Proteínas do estresse e glutamina	41
2.10 Via de biossíntese da hexosamina	45
2.11 Proteínas do estresse e câncer	47

2.12 Parâmetros bioquímicos	50
2.12.1 Glicemia	50
2.12.2 Glicogênio muscular	51
2.12.3 Glicogênio cardíaco	52
2.12.4 Ácido úrico	52
2.12.5 Creatina quinase e Lactato desidrogenase	55
2.12.6 Proteínas totais e Albumina	55
2.12.7 Creatinina	56
2.12.8 Enzimas aspartato e alanina aminotransferase	57
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
4. ARTIGO	76
5. CONCLUSÃO GERAL	111
6. ANEXO	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN93-G	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALT	Enzima alanina aminotransferase
AST	Enzima aspartato aminotransferase
AT	Aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BCAAs	Abreviatura inglesa para aminoácidos de cadeia ramificada
BH	Via de biossíntese da Hexosamina
CAS	Caseína
CK	Creatina quinase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GFAT	L-glutamina-D-frutose-6-fosfato aminotransferase
GS	Glutamina sintetase
HSBP1	<i>Heat shock factor binding protein 1</i>
HSC	Isoforma cognata
HSE	<i>Heat shock element</i> , fator elementar no processo de transcrição

HSF	<i>Heat shock factors</i> , fatores de transcrição
HSP	<i>Heat shock protein</i> , proteína do estresse
HSPs	<i>Heat shock proteins</i> , proteínas do estresse
HSP70	Proteína do estresse com peso molecular de 70 kDa
LDH	Enzima lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
OGT	O-GlcNAc transferase
PSL	Proteínas do soro do leite
PSLC	Proteína do soro do leite concentrada
PSLH	Proteína do soro do leite hidrolisada
Sp1	Fator de transcrição
TG	Triacilglicerol
17-AAG	<i>17-allylamino-demethoxy geldanamycin</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de glutamina por meio dos BCAAs

Figura 2. Estresse oxidativo

Figura 3. Modelo de regulação do fator de transcrição

Figura 4. Ativação do HSF e início da síntese de HSP

Figura 5. Via de Biossíntese da Hexosamina

RESUMO

Introdução: As *heat shock proteins* (HSPs), ou proteínas do estresse, correspondem a um importante sistema de defesa celular que é capaz de proteger e reparar danos causados ao organismo, conferindo à célula maior tolerância e resistência contra situações de alteração na homeostase, sendo também consideradas como um sistema antioxidante complementar. A glutamina é conhecida pelo seu potencial em promover o aumento na HSP70 contra diversas situações agressoras. As proteínas do soro do leite (PSL) contêm concentrações elevadas de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), sendo estes substratos para a síntese de glutamina, por meio da enzima glutamina sintetase. **Objetivo:** o objetivo deste trabalho foi observar a influência do consumo das proteínas do soro do leite (PSL), na forma concentrada (PSLC) e hidrolisada (PSLH), na concentração da HSP70 em ratos exercitados em esteira rolante. **Metodologia:** foram utilizados 48 ratos Wistar machos (290g ± 8g) divididos primeiramente pelo regime de atividade física em sedentários (S) e exercitados (E), e cada um desses, subdividido em outros três grupos, segundo a dieta. As dietas foram baseadas na AIN93-G, com substituição da fonte protéica da seguinte forma: PSLC, PSLH e caseína (CAS), como controle. O período em dieta experimental foi de 3 semanas, e os animais exercitados foram submetidos a 5 sessões de exercício a 22m/min durante 30 minutos como fonte de estresse térmico, na última semana de vida. **Resultados:** os resultados revelaram que o consumo da PSLH no grupo exercitado promoveu o aumento da HSP70 em pulmão, e nos músculos sóleo e gastrocnêmio. O consumo da PSLH aumentou os níveis de glutamato,

isoleucina e leucina livres no plasma dos animais sedentários. Quando exercitado, o grupo PLSH teve redução no glutamato, leucina e valina (substratos envolvidos na síntese de glutamina) plasmáticos e aumento da enzima glutamina sintetase (GS) no sôleo, sugerindo o provável uso desses aminoácidos para proporcionar o aumento na HSP70. Em adição à elevação da GS, houve também aumento concomitante da concentração de corticosterona no grupo PSLH exercitado, sugerindo a influência do hormônio na enzima. Em relação ao possível dano oxidativo, avaliado pela geração de proteínas carboniladas, os grupos que consumiram PSLC e PSLH reduziram seus valores no plasma e, somente a PSLH, no gastrocnêmio. Houve preservação das proteínas totais e albumina nos grupos PSLC, PSLH exercitados. O ácido úrico aumentou no grupo PSLH exercitado, enquanto que a creatinina aumentou na PSLC, independente do exercício. A glicose foi reduzida nos animais sedentários que consumiram PSLH, porém as variações dos parâmetros sempre permaneceram dentro da normalidade. Nenhum efeito adverso ao consumo das diferentes fontes protéicas foi observado no rim ou no fígado, oriundo da mensuração das enzimas AST, ALT e o metabólito ureia respectivamente. **Conclusão:** os resultados indicam que o consumo da PSLH pode potencializar a resposta da HSP70, sugerindo aumento na proteção endógena e antioxidante, e que a PSLH possa ser mais estresse-responsiva em ratos submetidos ao exercício.

Palavras-chave: proteínas do soro do leite, HSP, proteínas do estresse, glutamina, BCAAs, glutamina sintetase, estresse.

ABSTRACT

Introduction: The heat shock proteins (HSPs), or stress proteins, correspond to an important cell defense system, whose function is to protect and repair injuries caused to the body, conferring the cell greater tolerance and resistance against altered homeostasis states, and for this reason they have been considered as a complementary antioxidant system. Glutamine in turn has been found to promote the increase of HSPs associated to various situations of stress. The milk whey proteins contain elevated concentrations of branched-chain amino acids (BCAAs), which can participate in the synthesis of glutamine via glutamine synthetase.

Objective: the objective of this work was to assess the influence of the intake of the whey proteins either in the form of a concentrate (WPC) or a hydrolyzate (WPH) in enhancing the concentration of HSP70 in rats exercised in the treadmill.

Methods: Forty-eight male Wistar rats (290 ± 8 g) were divided, first, into two categories according to the level of physical activity: sedentary (S) and exercised (E), and each one subdivided into three groups according to the source of protein in the diet. The diets were based on the standard AIN93-G, formulated containing either WPC, WPH or casein (CAS), as the sole source of protein. The animals consumed the experimental diets for three weeks and those belonging to the exercised group were submitted to training 5 sessions on the last week of life.

Results: the results showed that consumption of the WPH promoted the increase of HSP70 in lung, soleus and gastrocnemius in the exercised animals. Increases in plasma free glutamate, isoleucine and leucine of the sedentary rats were also observed. When exercised, the WPH group exhibited a reduction in the plasma

levels of glutamate, leucine and valine (all involved in the synthesis of glutamine), plus an increase in the enzyme glutamine synthetase (GS) in the soleus muscle, thus suggesting a probable utilization of these amino acids, as a substrate, in the increase of HSP70. Considering that there was also an elevation of the corticosterone levels in the exercised cohorts that consumed the WPH, the concomitant increase of GS, suggested that the hormone exerted an influence on the enzyme. With regard to a possible oxidative damage, as assessed by the presence of carbonyl proteins, the group that consumed both of the whey proteins (WPC, WPH) exhibited lower plasma levels, but only the WPH reduced the levels in the gastrocnemius. Both total plasma proteins and albumin were preserved in the exercised animals. Uric acid was found to increase in the WPH exercised group, while creatinine increased in the WPC group, regardless of the exercise. Plasma glucose levels were also lowered in the sedentary animals that consumed the WPH diet, but at no time, did the increased or decreased levels of these parameters extrapolate normality. Additionally, from the AST, ALT and urea data, no adverse effects on either liver or kidney could be detected with the intake of the different protein sources. **Conclusion:** from these results, it can be concluded that consumption of the WPH, in contrast to WPC or CAS, can enhance the HSP70 response suggesting a magnified endogenous and antioxidant protection, and that the hydrolyzed whey protein can be more stress-responsive.

Keywords: whey protein, HSP, heat shock protein, glutamine, BCAAs, glutamine synthetase, stress.

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A alimentação saudável, aliada ao fornecimento de substâncias bioativas capazes de melhorar a qualidade e expectativa de vida das pessoas, ganha nos dias atuais atenção especial por oferecerem a possibilidade de combater, atenuar ou prevenir processos patológicos. Em conjunto à inclusão de uma maior quantidade de compostos bioativos na dieta, se incentiva também a prática de exercício físico.

Em contrapartida, sabe-se que o exercício pode promover alterações na homeostase, incluindo a elevação da temperatura corporal, além do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são popularmente conhecidas como radicais livres, que podem desenvolver um quadro de estresse oxidativo. Desse modo, o exercício pode ser considerado uma maneira prática de estudar as respostas do organismo frente a eventos e agentes agressores (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; CASTRO, 2003; FIAMONCINI, 2002).

O corpo humano possui ferramentas contra situações de alteração na homeostase, a fim de mantê-la e diminuir os danos que possam ser originados dessa alteração.

As *heat shock proteins* (HSPs), ou proteínas do estresse, representam um importante mecanismo de defesa celular que promove a sobrevivência e tolerância das células frente a situações de alteração na homeostase, seja oriunda do aumento de temperatura corporal, estresse oxidativo, exposição a metais pesados, hipóxia, privação de glicose, transplantes entre outros tipos de injúria (JANG et al., 2008; BELTER; CAREY; JUNIOR, 2004). Ainda, as HSPs são

também consideradas um sistema antioxidante complementar, auxiliando na defesa do organismo contra as EROs (ANTUNES NETO; SILVA; MACEDO, 2008; ZOPPI, 2004; SMOLKA et al., 2000).

A glutamina parece ser capaz de oferecer proteção celular contra diversas formas de estresse, possivelmente associada com a capacidade que este aminoácido apresenta em induzir o aumento das HSPs. O aumento na síntese das HSPs poderia proporcionar um maior e melhor efeito protetor contra situações adversas ao organismo, sendo uma importante ferramenta de defesa celular (PASQUALE, 2008).

A glutamina é um aminoácido presente em abundância no plasma, sendo importante para o bom funcionamento do organismo. Embora seja abundante, situações de estresse podem provocar uma depleção acentuada dos níveis desse aminoácido (JONNALAGADDA, 2007). Por isso, durante situações de injúria, a demanda endógena de glutamina pode exceder o seu suprimento, contribuindo na redução da taxa de sobrevivência celular, podendo causar efeitos deletérios ao organismo, por vezes irreversíveis (PASQUALE, 2008; OEHLER & ROTH, 2004).

As proteínas do soro do leite (PSL) representam aproximadamente 20% das proteínas presentes no leite bovino, sendo reconhecidas pelo seu alto valor nutritivo, digestibilidade, efeito estimulante sobre o sistema imune, e modulação do sistema antioxidante enzimático (PACHECO, 2005; SGARBIERI, 2004). Essas proteínas são ricas em aminoácidos como a glutamina e principalmente em aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs). Os BCAAs são importantes precursores/substratos (fonte de nitrogênio) da síntese endógena de glutamina por

meio da enzima glutamina sintetase (JONNALAGADDA, 2007; WAGENMAKERS, 2004).

Apesar da importância que a enzima glutamina sintetase possa representar no metabolismo durante situações adversas ao organismo, existem poucos estudos que tratem da influência do estresse, bem como da oferta de dietas especiais nesse parâmetro.

Nós hipotetizamos que as PSL poderiam por meio de seu perfil aminoacídico rico em BCAAs, favorecer a concentração de glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase, e assim induzir o aumento na HSP70 em diversos tecidos.

O esperado potencial das proteínas do soro do leite por meio de sua composição aminoacídica em induzir o aumento das HSPs, podendo prevenir danos celulares irreversíveis que possam ser ocasionados pelo estresse oriundo do exercício, ressalta a importância científica de se desenvolver mais estudos nesta área. Além disso, até o momento não está disponível na literatura pesquisas que tratem do efeito de proteínas alimentares, como as do soro do leite, nas HSPs, bem como sua influência na enzima glutamina sintetase, sendo portanto um estudo inovador que justifica a execução da proposta.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteína do soro do leite

O soro de leite corresponde a fase líquida remanescente da coagulação enzimática ou ácida da caseína, processo que ocorre durante a fabricação do queijo (CAVALHEIRO, 2007), o qual representa aproximadamente 20% do leite bovino (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010).

Os componentes do soro do leite incluem principalmente as proteínas β -lactoglobulina, α -lactalbumina, glicomacropéptido, albumina de soro bovino, lactoferrina, imunoglobulinas, além da lactose e minerais solúveis remanescentes (MARSHALL, 2004).

A proteína do soro do leite é comercialmente caracterizada nas formas: concentrada, isolada e hidrolisada. A PSL na forma concentrada contém aproximadamente 80% de proteína, enquanto a PSL isolada apresenta valor $\geq 90\%$ de proteína. A forma hidrolisada possui por volta de 80% de proteína e pode produzir pequenos peptídeos durante o seu processamento. Apesar das variações entre as proteínas, as mesmas não parecem afetar significativamente a taxa de esvaziamento gástrico ou absorção de aminoácidos. A PSL é considerada uma fonte proteica de rápida ação e absorção, defende-se que a sua hidrólise não aumentaria a taxa de esvaziamento gástrico, ou aceleraria o aumento na concentração de aminoácidos no sangue (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010).

As proteínas do soro do leite conhecidas popularmente como “*Whey*” do nome em inglês *Whey protein*, são facilmente digeríveis e rapidamente absorvidas, propriedades muito conveniente às situações de injúria, em que a situação possui caráter emergencial. Possui alto valor nutritivo e qualidade

protéica, além disso o seu consumo leva ao rápido aumento de aminoácidos no plasma facilitando a síntese e manutenção protéica (TANG et al., 2009; SGARBIERI, 2004; HA; ZEMEL, 2003; BOIRIE et al., 1997).

O aparecimento da PSL no mercado popular se deu primariamente por meio do apelo aos praticantes de atividade física nas academias, pelo qual ficou conhecida a propriedade de favorecer o anabolismo muscular. A ingestão da PSL se mostrou mais eficaz no aumento da massa magra em conjunto com exercício do que o consumo de soluções baseadas em carboidratos, proteína da soja ou placebo (bebida sem valor energético). O efeito da PSL no aumento da síntese proteica muscular está atribuída ao vasto conteúdo de BCAAs, com relevância à leucina (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010).

O consumo da PSL hidrolisada estimulou a síntese protéica em músculo esquelético, superando a caseína (proteína padrão ouro), em repouso e após exercício de resistência (TANG et al., 2009). Apresentam também potencial antioxidante, pois podem aumentar os níveis de glutathione intracelular. Essa atribuição pode ser decorrente da alta concentração de aminoácidos sulfurados e precursores da glutathione (MICKE; BEEH; BUHL, 2002).

Ainda, pode ser capaz de reduzir o perfil lipídico presente na composição corporal de ratos submetidos ao treinamento, demonstrando o seu efeito conjunto com a prática de exercícios (COSTA, 2010). Em indivíduos com diagnóstico de sobrepeso e obesidade, a suplementação com PSL durante 12 semanas não resultou em nenhuma mudança na composição corporal desses indivíduos (PAL; ELLIS; DHALIWAL, 2010).

A atual e crescente epidemia mundial de obesidade com previsão de aumento no número de indivíduos afetados, faz com que pesquisadores procurem fontes de preferência alimentares para tentar atenuar ou evitar os riscos de doenças relacionadas a obesidade. A PSL mostrou redução importante na gordura corporal além de preservar a massa magra de indivíduos obesos (FRESTEDT et al., 2008).

O consumo de PSL foi capaz de reduzir e modular a toxicidade induzida em fígados de ratos e conseqüentemente diminuir os danos causados, bem como restaurou a capacidade antioxidante do grupo afetado (GAD et al., 2011). Promoveu também melhor e mais rápida cicatrização, bem como a redução nas cicatrizes de pele e útero. Essa habilidade parece estar atribuída as grandes quantidade de glutamato, o qual pode ser convertido em glutamina no corpo, podendo contribuir para promoção na cicatrização. A glutamina pode ser utilizada como combustível para a divisão celular como fibroblastos e células epiteliais (WANG et al., 2010).

A PSL mostrou novamente efeito hepatoprotetor, particularmente em relação a caseína, em ratos com doença hepática induzida. A inibição na produção de citocinas pela lactoferrina presente na PSL foi primeiramente sugerido como um dos fatores envolvidos na proteção hepática. Entretanto, o conteúdo de lactoferrina é inferior a 0.01%, por isso, desacreditou-se do efeito único da lactoferrina. Ainda permanece desconhecido o mecanismo pelo qual a PSL inibe o dano hepático (KUME; OKAZAKI; SASAKI, 2006).

A resistência a insulina nos primeiros dias após processo cirúrgico é um fenômeno conhecido e transitório. O consumo de uma solução de carboidrato

adicionado de proteína do soro do leite no período pré operatório em indivíduos eutróficos, reduziu a resistência insulínica, bem como atenuou a resposta inflamatória (PERRONE et al., 2011).

A força mecânica exercida pelo músculo esquelético durante o exercício principalmente intenso, pode induzir dano muscular, o qual é seguido pela resposta inflamatória, desenvolvimento da dor, e redução da capacidade de geração de força. O uso da proteína do soro do leite hidrolisada resultou na maior e rápida capacidade de recuperação de geração de força muscular (BUCKLEY et al., 2010).

A PSL mostrou efeito similar ao da glutamina na melhora e recuperação da permeabilidade e morfologia intestinal em pacientes com doença de Crohn. Especulou-se que a PSL é uma boa fonte para todos os aminoácidos, e que pode apresentar melhor eficiência na absorção, comparado com soluções contendo somente aminoácidos livres (BENJAMIN et al., 2011). Além disso, a ingestão da PSL mostrou resultados mais significativos do que o consumo de uma solução contendo os seus aminoácidos livres constituintes (KATSANOS et al., 2008). Ainda, o consumo da PSL intacta ou de seu hidrolisado pode prover resultado superior na hipertrofia muscular do que o uso de leucina livre ingerida após o exercício (HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010).

Em estudo realizado por Pennings e colaboradores (2011) se investigou a cinética de absorção e síntese muscular, depois da ingestão de PSL, caseína e caseína hidrolisada em indivíduos saudáveis. Os resultados no plasma mostram que o consumo da PSL eleva mais rapidamente e em maior concentração os aminoácidos indispensáveis comparado a caseína intacta ou até mesmo

hidrolisada. A velocidade na síntese muscular foi também superior para os indivíduos que consumiram PSL a decréscimo da caseína intacta ou hidrolisada. Enquanto que nenhuma diferença foi observada entre as caseínas, sugerindo que a hidrólise da caseína não influenciou esse parâmetro. Sugere-se que a ingestão de PSL resulta em melhor retenção proteica pós-prandial quando comprado à caseína em diferentes formas (intacta e hidrolisada), além da rápida e elevada concentração de aminoácidos.

Evidências demonstram que a PSL apresenta potencial na redução do risco de doenças cardiovasculares, inclusive em grupos populacionais de risco. Por meio de dose oral única, reduziu os níveis pós prandiais de triacilglicerol (TG) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), em mulheres no estágio de pós-menopausa com sobrepeso ou obesas, que ingerem dietas ricas em lípides (PAL; ELLIS; HO, 2010). O consumo de PSL durante 12 semanas também reduziu os perfis lipídicos de indivíduos obesos, comparado a caseína (PAL; ELLIS; DHALIWAL, 2010). Auxilia também na redução da hipertensão (FLUEGEL et al., 2010) sendo uma proteína interessante e importante por suas propriedades e atributos.

O consumo em alta concentração (45%) da PSL hidrolisada como única fonte proteica da dieta provocou efeitos deletérios ao rim, oriundo da mensuração dos marcadores: uréia e peso do rim (APARICIO et al., 2011). Entretanto, o estudo não comparou a PSL com outras fontes proteicas, como a caseína (padrão), por exemplo. Ainda, os marcadores utilizados são frágeis para se concluir uma lesão, geralmente utiliza-se a taxa de filtração glomerular, que melhor indica a funcionalidade do rim. Por outro lado, a ingestão de qualquer fonte proteica nesse

percentual muito provavelmente ocasionaria o mesmo efeito, portanto o mesmo não deveria ser atribuído exclusivamente a um efeito da PSL.

A ingestão da PSL se mostrou útil na terapia de indivíduos com esclerose lateral amiotrófica, que consiste em uma doença neurodegenerativa progressiva, melhorando o estado nutricional desses pacientes (SILVA et al., 2010).

A composição média dos aminoácidos indispensáveis presentes na proteína do soro do leite, caseína, leite humano, além da recomendação de consumo está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição média dos aminoácidos nas diferentes fontes proteicas

Aminoácidos	PSL ¹	PSLH ¹	Caseína ¹	PSL ²	Leite humano ³	FAO/WHO (1985) ³	FAO/WHO (2007) ³
Isoleucina	6.1	5.5	4.7	4.7	5.5	1.5	3
Leucina	12.2	14.2	8.9	11.8	9.6	2.1	5.9
Lisina	10.2	10.2	7.6	9.5	6.9	1.8	4.5
Metionina	3.3	2.4	3.0	3.1	1.6	-	1.6
Fenilalanina	3	3.8	5.1	3	4.2	2.1	3.8
Treonina	6.8	5.5	4.4	4.6	4.4	1.1	2.3
Triptofano	1.8	2.3	1.2	1.3	1.7	0.5	0.6
Valina	5.9	5.9	5.9	4.7	5.5	1.5	3.9

Concentração média dos aminoácidos indispensáveis (g/100g). PSL: proteína do soro do leite. PSLH proteína do soro do leite hidrolisada. (-) Em 1985 a recomendação para metionina era junto com a cisteína, não tendo valor exclusivo de metionina. ¹ Fonte: HULMI; LOCKWOOD; STOUT, 2010. ² Fonte: ETZEL, 2004. ³ FAO/WHO 2007.

Ao comparar com outra caracterização aminoacídica realizada por Ramos (2001), observa-se pequena alteração na concentração dos aminoácidos e fica evidente a superioridade, principalmente para alguns aminoácidos, incluindo os BCAAs, em relação à caseína, considerada como proteína padrão e de alto valor biológico.

Os aminoácidos indispensáveis presentes no soro do leite, tanto do isolado como do hidrolisado protéico, supera as recomendações da FAO (*Food and Agriculture Organization*), podendo estas proteínas ser consideradas como de alto valor nutritivo.

Apesar do atual avanço no número de pesquisas envolvendo o consumo das proteínas do soro do leite em diversas áreas e afins, até o momento não foi encontrado nenhum estudo que trate da influência do consumo das PSL nas proteínas do estresse (HSPs).

2.2 Aminoácidos de cadeia ramificada

As proteínas do soro do leite são ricas em aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), sendo eles a leucina, valina e isoleucina (HA; ZEMEL, 2003). São encontrados como porção protéica, correspondendo aproximadamente 99% na composição corporal e apenas 1% na forma livre do *pool* de aminoácidos (WILDMAN, 2004). A presença de BCAA no músculo varia de acordo com a predominância no tipo de fibra muscular, nas quais, se apresenta em maior concentração (20-30%) quando são fibras de contração lenta (tipo I), em contraste com as fibras de contração rápida (tipo II) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008).

O músculo esquelético é o local onde esses aminoácidos são metabolizados de maneira mais eficiente do que no fígado, pois, as aminotransferases específicas para os BCAAs possuem baixa atividade no fígado (WILDMAN, 2004).

A seu consumo está associado com a síntese protéica, inibição de processos de imunossupressão, redução da fadiga periférica e central, associada ao exercício físico e com o fornecimento de nitrogênio para a síntese de glutamina. Além disso, acredita-se que esses aminoácidos contribuam para o metabolismo como fonte de energia e de substratos para a síntese de intermediários do ciclo do ácido cítrico (SHIMOMURA et al., 2006; WILDMAN, 2004).

O consumo de BCAA atribuído a inibição da imunossupressão parece estar associada com a capacidade que esses aminoácidos possuem em promover a síntese de glutamina, por meio da via glutamina sintetase no músculo (JONNALAGADDA, 2007; WAGENMAKERS, 2004).

Os BCAAs são fonte de nitrogênio para a síntese de glutamina, sendo o grupo amino transaminado com o α -cetogluturato, por aminotransferases, para a formação de glutamato, a partir do qual ocorre a síntese de glutamina de acordo com a necessidade, por meio da enzima glutamina sintetase, conforme ilustrado na Figura 1 (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008).

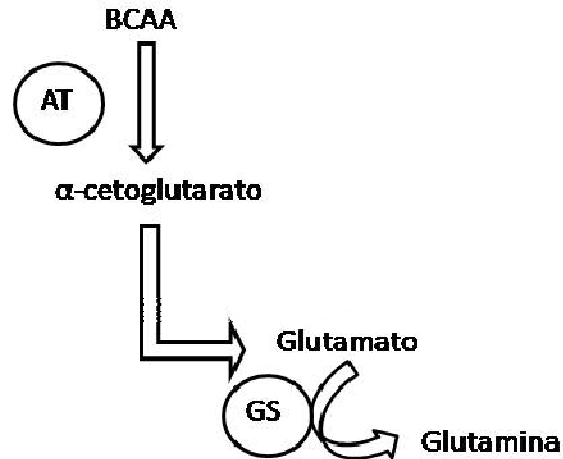


Figura 1. Síntese de glutamina utilizando os BCAAs por meio da glutamina sintetase. (AT aminotransferase; GS glutamina sintetase) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008).

Durante a prática de exercício físico, ocorre um aumento na taxa de oxidação dos BCAAs no músculo e sua decorrente liberação na corrente sanguínea. Enquanto as concentrações plasmáticas permanecem quase inalteradas, a concentração muscular apresenta reduções acentuadas desses aminoácidos (BLOMSTRAND et al., 1996).

Embora os BCAAs constituam uma grande porção da proteína muscular (aproximadamente 19%), a sua liberação na corrente sanguínea proveniente do músculo durante períodos de estresse é feita em pequenas doses. Quando se compara essa situação com a glutamina, a liberação desta na corrente sanguínea é feita em uma proporção superior em relação a sua presença e constituição no músculo, que é inferior à dos BCAAs. Isso sugere que a hidrólise muscular dos aminoácidos de cadeia ramificada pode estar associada com a produção de glutamina, por meio da transferência do grupo amino para o glutamato no

músculo. Essa hipótese justificaria a façanha do músculo em conseguir liberar maiores quantidades de glutamina na circulação, em relação a sua presença no músculo (WILDMAN, 2004).

Dietas isentas de glutamina e enriquecidas com 2% de BCAA mostraram aumento na permeabilidade intestinal e redução em sua atrofia durante a administração de nutrição parenteral. Acredita-se que os BCAAs (precursores) promovam o efluxo de glutamina oriundo do músculo, por meio da glutamina sintetase, oferecendo o principal combustível para os enterócitos, mesmo em sua ausência na dieta (MCCAULEY; HEEL; HALL, 1997).

Estudo realizado por Blomstrand e colaboradores (1996) investigou o efeito dos BCAAs nas concentrações plasmáticas e teciduais de aminoácidos, sendo os mais relevantes a glutamina, glutamato e a alanina durante o exercício de ciclismo. Em relação às concentrações plasmáticas de glutamina, estas se mantiveram quase que constantes no grupo suplementado com BCAAs antes e após a injúria, enquanto que o grupo placebo demonstrou queda logo após 5 minutos de exercício. O glutamato em ambos os grupos apresentou aumento em seus níveis. A alanina mostrou elevação dos seus níveis plasmáticos no grupo suplementado, enquanto o grupo placebo manteve-se praticamente constante. Em relação às concentrações musculares, o grupo suplementado apresentou aumento nos níveis de alanina após o exercício. No grupo placebo, os níveis teciduais de glutamina diminuíram. Os valores de glutamato diminuíram para ambos os tratamentos, porém, a redução foi maior no grupo placebo. Especulou-se, a possível dependência e interferência do glicogênio na liberação de glutamina,

pois, as mensurações foram realizadas com níveis reduzidos de glicogênio muscular.

2.3 Glutamina

Em um organismo saudável a glutamina é o aminoácido mais abundante compreendendo aproximadamente 50% do *pool* de aminoácidos livres no plasma. Entretanto, após situações de injúria como sepse, cirurgia, queimadura, processo inflamatório, estresse oxidativo e exercício físico, ocorre a depleção acentuada de sua concentração, devido ao aumento na utilização desse aminoácido pelas células (PASQUALE, 2008; JONNALAGADDA, 2007; SANTOS, et al., 2007; CASTELL, 2003; WISCHMEYER et al., 2001). Essa redução pode estar relacionada com o aumento de processos infecciosos, atrofia intestinal, diminuição da capacidade do sistema imune e outros processos patológicos, demonstrando a importância incontestável desse aminoácido para o organismo (SANTOS; CAPERUTO; ROSA, 2007).

A glutamina é classificada como condicionalmente indispensável (IOM, 2006) por ser considerado como indispensável em situações de injúria. Também é precursor obrigatório na síntese de proteínas, ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas. Auxilia na manutenção do balanço ácido-base, fornece esqueleto carbônico para a gliconeogênese, participa no transporte de nitrogênio e é constituinte do tripeptídeo glutathione, parte do sistema antioxidante enzimático (JONNALAGADDA, 2007; OEHLER & ROTH, 2004).

O aminoácido glutamina, além de ser fonte de energia para diversos tecidos, principalmente intestino e sistema imune, também parece ser capaz de oferecer proteção celular contra diversas formas de estresse, associada com a possível capacidade de indução e ativação das HSPs, sendo uma importante ferramenta de defesa celular, favorecendo a homeostase (PASQUALE, 2008).

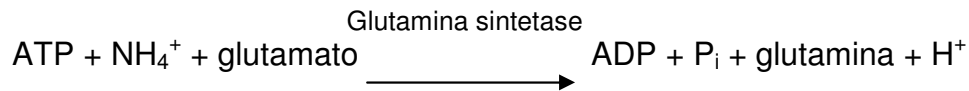
As principais enzimas responsáveis pelo seu metabolismo são: a glutaminase, que catalisa a hidrólise de glutamina para glutamato e amônia, e a glutamina sintetase, que catalisa a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia (PASQUALE, 2008).

A atividade dessas enzimas pode variar de acordo com o estado fisiológico do organismo, bem como a sua localização. Em células de rápida replicação como enterócitos, linfócitos e células endoteliais, ocorre um ávido consumo de glutamina. Esses locais possuem maior atividade de glutaminase do que glutamina sintetase, ao passo que no músculo esquelético ocorre maior atividade de glutamina sintetase (PASQUALE, 2008).

Em resposta a situações de injúria associada a elevação da utilização de glutamina, registra-se aumento concomitante de sua síntese no músculo esquelético pela via glutamina sintetase (OEHLER & ROTH, 2004). Aproximadamente 90% da glutamina corporal é oriunda da síntese endógena, 70% ocorre no músculo esquelético, sendo indispensável para atender as exigências diárias desse aminoácido (HE et al., 2010).

2.4 Glutamina sintetase

A glutamina sintetase (GS) é a única enzima capaz de catalisar a síntese de glutamina a partir dos precursores glutamato e amônia, sendo uma enzima chave na manutenção da homeostase desse aminoácido, regulando a sua concentração plasmática e muscular (HE et al., 2010; PINEL et al., 2006). Para a formação da glutamina, o glutamato é enzimaticamente combinado com o íon amônio pela ação da glutamina sintetase, na seguinte reação:



A GS é essencial para a síntese endógena de glutamina (MORROW & STAHL, 2002), podendo ser encontrada em músculo esquelético, fígado, pulmão e tecido adiposo, reconhecido como os principais locais de produção de glutamina (HUANG; WANG; WATFORD, 2007).

Entretanto o músculo esquelético é o principal tecido ativo para a síntese de glutamina, por meio da enzima glutamina sintetase, que responde aproximadamente por 70% da produção total de glutamina, sendo essa via indispensável para a sua necessidade diária (HE et al., 2010).

Sabe-se que durante situações de estresse oxidativo ocorre paralelamente a queda na concentração de glutamina, e o aumento da necessidade. Dessa maneira, o alto nível de atividade da enzima no músculo torna-se primordial e é preservado inclusive durante o avanço da idade, na tentativa de manter uma concentração adequada e garantir o fornecimento suficiente desse aminoácido

(PINEL et al., 2006; VERDIER et al., 2002). Também em processos catabólicos, a produção de glutamina pode ficar comprometida ou não atingir a demanda necessária. Nessa situação, o organismo pode utilizar alternativas, principalmente por meio da utilização dos BCAAs, sendo estes precursores de glutamina, contribuindo assim para a regulação da concentração plasmática do aminoácido (PASQUALE, 2008).

Os substratos (o glutamato e o íon amônio) agem como agentes alostéricos positivos, enquanto que a presença de glutamina inibe a enzima (OEHLER & ROTH, 2004). A GS parece ser bem responsiva a presença de injúria, e alguns hormônios que também são liberados durante condições de estresse, como os glicocorticóides, em ratos a corticosterona, parecem influenciar a expressão da enzima glutamina sintetase (WANG & WATFORD, 2007; SANTOS, 2004; MEZZAROBBA et al., 2003). O hormônio corticosterona foi capaz de influenciar a atividade da glutamina sintetase de maneira diretamente proporcional, sendo que a redução nos níveis desse hormônio provocou a inibição da atividade da glutamina sintetase em ratos treinados (SANTOS, 2004). De fato, fatores indicam que o hormônio corticosterona parece modular a expressão da enzima, pois quando ratos foram submetidos a adrenalectomia, que consiste na retirada das glândulas supra renais e conseqüentemente a ausência de liberação da corticosterona, mesmo frente a injúria (jejum), não houve o aumento que seria esperado na expressão da enzima glutamina sintetase, a qual permaneceu equivalente ao grupo não injuriado (MEZZAROBBA et al., 2003).

Em estudo realizado por Wang & Watford (2007) se investigou a influência *in vitro* da insulina, glicocorticóide sintético e uma combinação destes, em relação

à presença e ausência de glutamina, na expressão e na concentração da enzima glutamina sintetase. Foram examinados os efeitos em células de músculo esquelético, tecido adiposo e células do fígado. Demonstrou-se que, em células do músculo esquelético, o glicocorticóide foi capaz de aumentar a expressão e a concentração de glutamina sintetase, principalmente na ausência de glutamina. Inclusive o grupo controle, isento da adição hormonal, ocorreu aumento na concentração da enzima, mas não na expressão durante a ausência de glutamina, sugerindo que as células do músculo esquelético sejam as melhores para se observar possíveis alterações em relação à dieta, bem como que o aumento na expressão não obrigatoriamente leva a uma maior concentração do parâmetro estudado.

Nas células do fígado o glicocorticóide foi o hormônio que mais influenciou o aumento da expressão da enzima, tanto na presença, quanto na ausência de glutamina. Já em relação à concentração da enzima, não houve diferença entre os tipos de tratamentos hormonais, mas ocorreu maior concentração da enzima no grupo com ausência de glutamina (WANG & WATFORD 2007).

Em células do tecido adiposo a expressão e a concentração da glutamina sintetase foi maior com o tratamento de glicocorticóide, mas não mostrou diferença entre a situação de presença ou ausência de glutamina. O fator nutricional não exerceu influência sobre a enzima nesse tecido (WANG & WATFORD 2007).

O tecido muscular e o fígado mostraram-se mais sensíveis em relação à presença ou ausência de glutamina, quando comparado ao tecido adiposo (WANG & WATFORD 2007).

Logo, a presença de alguns hormônios e os níveis de glutamina, em situações de catabolismo, podem resultar em mudanças na glutamina sintetase.

A atividade da glutamina sintetase em músculo sóleo manteve-se constante com o avanço da idade em ratos, embora a idade tenha sido uma maneira de indução natural ao catabolismo. Sugeriu-se que o músculo sóleo não seja ideal para a mensuração dessa enzima, sendo indicado segundo o autor um músculo com fibras mistas, como por exemplo o gastrocnêmio (PINEL et al., 2006). No músculo tibial a expressão da glutamina sintetase também permaneceu constante com o avanço de idade dos animais, entretanto ao contrário do autor anterior, concluiu-se que a idade não influenciou a enzima, e não que a escolha do músculo poderia estar equivocada (MEZZAROBBA et al., 2003), pois a GS parecer ser preservada no músculo independente da idade do animal, portanto o envelhecimento pode não ser um fator de influência na enzima (VERDIER et al., 2002).

2.5 Glutamina e exercício

O exercício físico é uma maneira natural de induzir o sistema biológico a responder ao estresse. Diversos fatores associados ao exercício, seja durante ou após sua prática, podem contribuir para tal resposta, incluindo o aumento de temperatura, o acúmulo de ácido láctico, lesão da fibra muscular, estresse oxidativo, alterações na homeostase do cálcio, depleção de glicose e glicogênio (BELTER; CAREY; JUNIOR, 2004).

O exercício moderado ou intenso promove uma diminuição na concentração plasmática de glutamina, que posteriormente pode afetar os níveis teciduais desse aminoácido. Além disso, pode influenciar a capacidade de síntese desse aminoácido por meio de alterações hormonais decorrentes do treinamento, como a elevação dos níveis de glicocorticóides (SANTOS; CAPERUTO; ROSA, 2007).

A literatura relata que o exercício poderia induzir uma imunossupressão e conseqüentemente aumentaria a incidência de infecções oportunistas. As hipóteses e possibilidades são diversas, variando desde carga de treinamento, período de descanso para a recuperação, liberação de hormônios e o papel da glutamina durante situações de estresse (SANTOS, 2004).

O exercício de maratona promoveu diminuição na concentração plasmática de glutamina e de BCAAs imediatamente e após 1 hora da realização do exercício. As concentrações retornaram aos níveis basais, somente após 16 horas da última sessão (CASTELL et al., 1997). A queda nos níveis de BCAAs também pode interferir sobre os níveis de glutamina, uma vez que estes aminoácidos são fonte de nitrogênio que podem ser utilizados em sua síntese (SANTOS, 2004).

O músculo esquelético é o maior produtor de glutamina durante estados de homeostasia e catabólicos. Além disso, é um tecido capaz de armazenar a glutamina, sugerindo a importância desse aminoácido durante a prática de exercício (OEHLER & ROTH, 2004).

Santos (2004) investigou o efeito do exercício de natação na concentração plasmática e muscular (sóleo) de glutamina, glutamato e a atividade da glutamina sintetase em ratos. O estudo mostrou que o exercício promoveu uma ligeira queda na concentração plasmática de glutamina, enquanto que, na muscular, houve

diminuição acentuada. Em relação ao glutamato, os resultados mostram que ocorreu aumento da concentração plasmática no grupo treinado, enquanto que a muscular não mostrou nenhuma alteração. Já em relação à atividade da glutamina sintetase, esta foi expressivamente inferior no grupo treinado, em comparação com o sedentário. O autor defende que mesmo uma ligeira queda na concentração plasmática de glutamina possa comprometer parcialmente diversas funções do aminoácido no organismo, e que essa diminuição pode ser a explicação para a imunossupressão diagnosticada durante treinamentos. Frente a esses resultados, o autor sugere que o protocolo de treinamento utilizado resulte na diminuição da síntese de glutamina, guardando relação com a diminuição nos valores encontrados de corticosterona no grupo treinado. O curioso é que os níveis de corticosterona relatados nessa pesquisa foram reduzidos, situação contrária à geralmente descrita na literatura, onde o treinamento elevaria tal hormônio. O autor especula que o protocolo de treinamento utilizado promoveu um pequeno nível de estresse e que por isso apresentou queda do hormônio, ou que o tempo de coleta de dados (24 horas) foi o suficiente para o hormônio retornar aos seus níveis basais. Outra explicação para o ocorrido é a possível situação de estresse crônico provocado pelo *overtraining*.

2.6 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, deixando as moléculas instáveis e com alta reatividade (DEATON & MARLIN, 2003). Para que haja estabilidade, deve acontecer uma doação ou recebimento de elétrons mediante interação com outras moléculas, que têm como característica um tempo de meia-vida muito curto (ETZEL, 2004).

O peróxido de hidrogênio apresenta como característica singular, a permeabilidade entre as membranas celulares podendo sair e reagir com metais de transição (ferro e cobre) com facilidade, provocando nessa reação (Reação de Fenton) a produção do radical hidroxila, o mais potente e instável das EROs.

O radical hidroxila é a espécie mais reativa e não existe nenhuma enzima que possa catalisar a sua remoção, por isso o organismo tenta a todo custo evitar a sua formação.

As EROs são produzidas normalmente pelo organismo dentro de uma faixa de normalidade endógena, pois elas possuem funções vitais no organismo, como a participação em conjunto com o sistema imunológico na destruição de bactérias agressoras pelos macrófagos. Estas células utilizam, por exemplo, o peróxido de hidrogênio para provocar lesões na membrana do antígeno presente no organismo, e assim inativa-lo (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

No momento em que ocorre o desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e o antioxidante, com prevalência do primeiro, caracteriza-se um estado de estresse oxidativo, conforme exemplificado na Figura 2 (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).



Figura 2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo prevalente provoca danos severos em diversas estruturas celulares como, membranas plasmáticas, DNA, proteínas, lipídeos, e organização celular entre outros, além de contribuir para a fadiga muscular. Quando essas estruturas celulares sofrem a ação das EROs, tornam-se incompatíveis com as suas funções orgânicas, ocasionando a morte celular (BACURAU & ROSA, 2004).

A contínua produção dessas espécies reativas pelo organismo é uma das explicações mais aceitas para a teoria do envelhecimento, caracterizado pelo acúmulo de lesões em diversos compartimentos celulares ao longo da vida, que contribuiria para a redução da funcionalidade celular e para aumento no aparecimento de patologias, conduzindo finalmente a morte. Além disso, o dano oxidativo provocado pelas EROs tem sido fortemente relacionado com a aceleração no processo de envelhecimento, e com o surgimento de diversas doenças (MOTA; FIGUEIREDO; DUARTE, 2004).

Os estímulos que podem exacerbar a atividade e produção de EROs são diversos, incluindo, o tabagismo, álcool, processos oncológicos e o exercício físico.

As espécies reativas de oxigênio são uma forma de injúria importante que é capaz de induzir a síntese das proteínas do estresse (HSPs). Além de promover uma alteração na homeostase, e favorecer o aparecimento de doenças (MORIMOTO, 1998).

O exercício em diversas modalidades, intensidade e duração é uma forma de indução ao aumento nos níveis de produção dessas espécies, podendo promover o estresse oxidativo. Diversos autores confirmam essa hipótese, pela qual demonstram aumento na oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, que são resultado da ação das EROs. A elevação nos níveis das HSPs como forma de proteção celular frente a períodos de estresse oxidativo provocados por uma variedade de protocolos de treinamento, trata-se de um sistema antioxidante complementar importante para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular (ANTUNES NETO; SILVA; MACEDO, 2008; OLIVEIRA JUNIOR, 2005; ZOPPI, 2004; SMOLKA et al., 2000).

2.7 Proteínas do estresse (*heat shock proteins*)

As *heat shock proteins* (HSPs), proteínas sintetizadas pelo organismo primeiramente em situação de choque térmico, hoje conhecidas como simplesmente proteínas do estresse, foram inicialmente descobertas por Feruccio Ritossa (1962), quando da observação de cromossomos de *Drosophila melanogaster* que foram submetidas ao tratamento de choque térmico, por meio da elevação quase que letal da temperatura, pela qual se codificou e expressou essa classe de proteínas (RITOSSA, 1962).

Essas proteínas (HSPs) pertencem a uma família altamente conservada e presente em todas as células do organismo. Trata-se de um sistema natural de defesa endógena que é capaz de proteger e reparar danos causados. As condições de estresse podem exacerbar problemas na conformação de proteínas, perdendo a sua estrutura original e conseqüentemente sua função. As HSPs conseguem realizar o correto enovelamento e renovelamento de muitas proteínas que por algum motivo não foi realizada de maneira eficiente e correta, ou que perderam a sua estrutura. Mantêm os polipeptídeos em conformação adequada para sua translocação através das membranas nas organelas, modula interações proteína-proteína além de prevenir a agregação oriunda de interações intra e intermoleculares, ações essas conhecidas como "*molecular chaperones*". São capazes de reparar proteínas danificadas, ou auxiliar em sua degradação caso o dano causado seja irreversível. Confere à célula uma maior tolerância e resistência contra uma variedade de agentes agressores, mantendo a integridade e estrutura celular, capaz de promover a sobrevivência das células durante

períodos de estresse (KAMPINGA & CRAIG, 2010; DILLER, 2006; WISCHMEYER, 2002; SANTORO 2000; BENJAMIN & McMILLAN, 1998; KIANG; TSOKOS, 1998).

As proteínas do estresse surgem no momento em que ocorre uma alteração na homeostasia orgânica, incluindo o aumento de temperatura, estresse oxidativo, isquemia, estresse osmótico, exposição a metais pesados, hipóxia, privação de glicose, processos oncológicos, febre, processo inflamatório, infecções viral ou bacteriana, transplantes, entre outros (ÅKERFELT; MORIMOTO; SISTONEN, 2010; JANG, 2008; BELTER; CAREY; JUNIOR, 2004; MORIMOTO, 1998).

Em organismos eucariontes, a expressão das proteínas de estresse é mediada por fatores de transcrição, denominados *heat shock factors* (HSF), em tradução literal, fatores de choque térmico, que requerem ativação prévia e translocação para o núcleo. Existem basicamente 4 variações de HSF (HSF1, HSF2, HSF3) que tem sido isolado de células de humanos e ratos, e um fator adicional o HSF4, descrito preferencialmente em células humanas (SANTORO, 2000).

Em células de mamíferos, diferentes HSFs são ativados em situações e eventos fisiológicos específicos. O HSF1 e HSF3, por exemplo, são altamente responsivos ao estresse e rapidamente ativados para oferecer proteção celular. Já o HSF2 é ativado durante desenvolvimento e diferenciação embrionária (SANTORO, 2000). O fator HSF4, diferente dos outros, não requer ativação transcricional, pois este se liga diretamente ao DNA. Tem sido sugerido que o HSF4 esteja envolvido na regulação negativa para a expressão das HSPs. É

preferencialmente expresso em coração, cérebro, músculo esquelético e pâncreas (NAKAI et al., 1997).

O HSF1 é o principal regulador na transcrição das HSPs, pois é rapidamente ativado e está presente na maioria dos eucariotos e em diversos tecidos e tipos de estresse, sendo considerado o fator estresse-responsivo mais eficaz. Na ausência de estresse celular o monômero HSF1 é inibido através de sua associação com as HSPs, formando um complexo inativo, conforme demonstrado na Figura 3. Na presença de estresse celular ocorre a dissociação ocasionando a liberação do monômero inerte HSF1 que assume um estado trimérico ativo que permite que este alcance o núcleo celular, onde será fosforilado em determinados resíduos de serina para que reconheça e se ligue ao promotor do gene HSP, denominado de *heat shock element* (HSE), iniciando assim o processo de transcrição dos genes que expressam essa classe de proteínas. A síntese das HSPs, induzida por diversos tipos de estresse está esquematizada na Figura 4 (CSERMELY & YAHARA, 2002; SHI; MOSSER; MORIMOTO,1998; PETERANDERL & NELSON, 1992).

Quando findar a injúria, os HSFs até o momento ativados, ou seja, em estado trimérico, precisam ser convertidos ao estado monomérico, no qual é inativo. Para que esse processo ocorra é necessário uma proteína adicional denominada *heat shock factor binding protein 1* (HSBP1), pois essa interage com o estado trimérico do HSF1 facilitando a sua conversão à forma monomérica. Assim, o monômero HSF1 se complexa novamente com as HSPs, cessando o processo de transcrição (MORIMOTO, 1998).

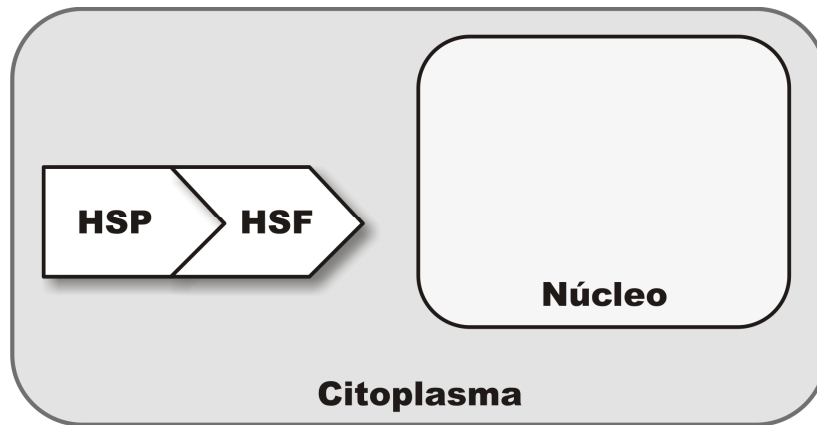


Figura 3. Modelo de regulação do fator de transcrição

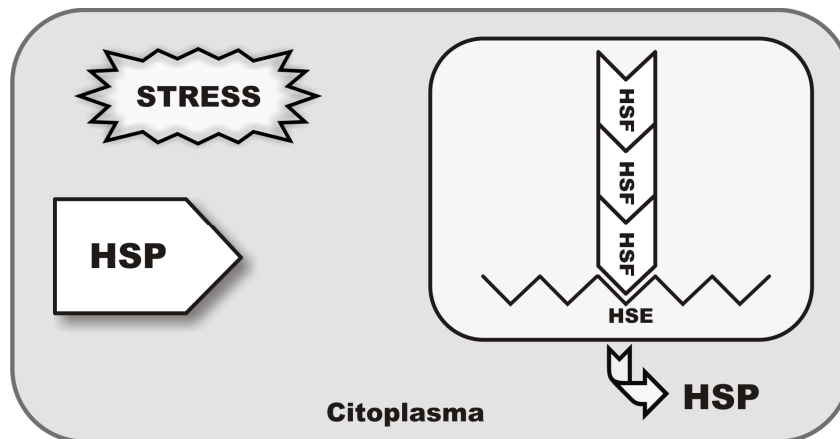


Figura 4. Ativação do HSF e início da síntese de HSP.

A ativação das HSPs provê as células um mecanismo capaz de restabelecer a homeostase protéica, ou seja, o balanço entre a síntese e degradação protéica durante situações de alteração na homeostase (SHI; MOSSER; MORIMOTO,1998).

Alguns fatores podem promover diferenças na taxa de expressão das HSPs, como por exemplo, uma possível adaptação genética a temperatura do *habitat* ao longo da evolução. Organismos que vivem no deserto que possui como

característica ambiental temperaturas elevadas, apresentam capacidade superior na síntese de HSP, mesmo quando submetidos a temperaturas inferiores ao padrão habitual. Outro fator que pode influenciar a síntese dessas proteínas está na eficiência da regulação transcricional que compreende a força de ligação das associações HSF-HSP, HSF-HSE, e fosforilação do trímero HSF (LYASHKO et al., 1994; ULMASOV et al., 1992). O grau de indução das HSPs pode também depender do nível e duração da exposição ao estresse. Os níveis de HSP após situação de estresse pode permanecer elevado, em relação ao basal, por dias ou semanas, dependendo do tipo de célula (KIANG; TSOKOS, 1998).

A variação na síntese basal das HSPs pode também estar relacionada com a origem e/ou naturalidade do indivíduo, sendo um fator adicional na variação da capacidade de indução das mesmas. Ao analisar a taxa de síntese basal de HSP70 de diferentes grupos populacionais, um de origem europeia e outra não europeia (abrangia africanos e asiáticos), observou-se que o grupo europeu apresentou maior taxa de síntese basal, porém menor capacidade de indução em situações de injúria. O grupo não europeu apresentou menor taxa de síntese basal e maior capacidade de indução quando injuriados. Especula-se que exista um mecanismo de compensação, uma vez que o indivíduo apresente maior síntese basal, este necessite de uma menor taxa de indução durante situações de injúria. Essas variações na expressão e indução de HSP podem contribuir para diferenças na tolerância a injúrias, suscetibilidade a doenças e taxa de sobrevivência em diferentes populações (BOSHOFF et al., 2000).

As proteínas do estresse podem ser agrupadas em famílias que são compostas por uma série de isoformas que diferem em relação ao seu peso

molecular, que pode variar entre 10 e 105 kDa, e que podem ainda ser constitutivas e induzíveis (HO & WESTWOOD, 2002; SANTORO, 2000). As HSPs podem agir de maneira completamente independente, bem como cooperativamente, com a finalidade de fornecer uma resposta a determinada injúria de maneira eficaz (NOBLE, 2002).

As famílias que possuem isoforma constitutiva ou cognata (HSC) estão presentes durante condições orgânicas normais, não apresentam variação em sua atividade, durante situações de estresse. Já as famílias que possuem uma isoforma induzível (HSP) estão geralmente presentes em situações em que o organismo encontra-se em desequilíbrio, sendo as principais famílias a HSP90 e HSP70, podendo variar a sua atividade de acordo com a intensidade de indução e gravidade do estresse (HO & WESTWOOD, 2002).

As HSPs constituem aproximadamente de 1-2% das proteínas de células não estressadas e de 4-6% de proteínas em células sob de situação de estresse. As de alto peso molecular (famílias HSP100, 90, 70 e 60) são ATP-dependentes, enquanto que as de baixo peso molecular (15-30 kDa) agem independentemente de ATP (KIM & KIM, 2011).

A HSP70, também referida como HSP72, representa umas das famílias mais importantes e estudadas, pois se faz rapidamente presente e em alta atividade no aparecimento de agentes agressores que promovam uma situação de estresse (GABAI & SHERMAN, 2002; SANTORO, 2000). Trata-se de uma das famílias mais conservadas ao longo da evolução, pois se faz presente desde a mais primitiva bactéria até o mais sofisticado organismo, sendo a primeira a ser induzida em condições de estresse (GUPTA et al., 2010; ROHDE et al., 2005).

A HSP70 é fortemente induzida por diferentes tipos de estresse, enquanto sua expressão é muito baixa, e/ou indetectável em condições fisiológicas de homeostase. É encontrada no compartimento intracelular, membrana plasmática e no espaço extracelular (KHALIL et al., 2011; ROHDE et al., 2005).

O processo de envelhecimento parece ser um fator importante no declínio da capacidade de indução da HSP70 e conseqüentemente redução na termotolerância e aumento na mortalidade frente a insulto térmico. Apenas 60% de ratos em idade avançada sobreviveram ao estresse térmico, enquanto todos os ratos jovens sobreviveram a mesma injúria, provavelmente pela redução de HSP70 verificada nos idosos (HALL, et al. 2000).

O aumento na expressão da HSP70 está associado com a proteção e diminuição de danos teciduais, melhor recuperação, promoção da longevidade, redução da mortalidade, confere à célula maior tolerância e resistência quando submetidas a diferentes injúrias (SALWAY et al., 2011; ZIEGLER et al., 2005; WISCHMEYER et al., 2001; KIANG; TSOKOS, 1998). Protege as células contra o ataque oxidativo das EROs, sugerindo capacidade antioxidante da HSP70 (ATALAY et al., 2004; ZOPPI, 2004; CSERMELY & YAHARA, 2002; GABAI & SHERMAN, 2002; SMOLKA et al., 2000). Já mostrou ter forte correlação com a rápida recuperação do músculo estriado após o exercício (SILVER & NOBLE, 2011), e atenua dano celular causado pela isquemia (JANG et al., 2008).

A presença de HSP70 no cérebro já foi relatada (CAMPISI et al., 2003), e recentes evidências indicam que as HSPs possuem propriedades neuroprotetoras durante injúria cerebral. A indução de HSP em cérebro já foi associado com a

resistência e sobrevivência seguido de isquemia. Entretanto os estudos que tratam do mecanismo ainda são limitados (STETLER et al., 2010).

Há uma grande discrepância em relação ao pico de elevação das HSPs, versus o tempo de sacrifício após a última injúria. Uma grande maioria defende sem muitos argumentos que o seu pico esteja entre 6 a 12 horas após a última injúria. Outros no entanto, demonstram picos com 24 até 36 horas depois. É muito difícil obter um parecer, pois as injúrias, as HSPs e os locais de mensuração são distintos, apesar da técnica ser quase sempre a mesma – western blott.

Ao analisar a HSP70 o seu maior pico foi 12 horas após a injúria, entretanto ao analisar as HSP 27 o pico foi 24 horas após, diante da mesma injúria. Isso remete a idéia de individualidade e características singulares que essas proteínas apresentam (QIAN et al., 1998).

2.8 Proteínas do estresse e exercício

O músculo estriado esquelético é um dos componentes mais dinâmicos do organismo. Além de fazer parte da estrutura corpórea, este tecido é responsável por inúmeras funções, coerentemente estando repleto de HSPs (NOBLE, 2002).

O mecanismo pelo qual a prática habitual de atividade física promove resistência celular prevenindo muitos efeitos danosos oriundos da exposição aos seus agentes agressores, ainda não está esclarecido. Acredita-se que o exercício facilite uma melhor e mais rápida indução da HSP70 contribuindo para uma estratégia de sucesso usada para a aumentar a resistência e sobrevivência celular (CAMPISI et al., 2003).

As principais HSP encontradas no músculo esquelético são: a ubiquitina, família de pequenas HSPs, HSP 47, família HSP70 e HSP90. A família HSP70 representa a maioria da classe, é uma das mais investigadas e está altamente presente em situações de injúria. Não por essa razão, as outras proteínas perdem a sua importância (NOBLE, 2002).

A família de pequenas HSPs são representadas pela faixa de peso entre 17 a 27 kDa, que possuem função na manutenção muscular, mas também possuem potencial de proteção muscular durante períodos de estresse (NOBLE, 2002). A ubiquitina é a menor das proteínas de estresse, pois apresenta baixo peso molecular (8,5 kDa), sendo responsável pela degradação proteica programada (NOBLE, 2002).

A HSP 47 é uma glicoproteína localizada no retículo endoplasmático envolvida no processamento de colágeno. E especula-se o seu envolvimento na manutenção da integridade da membrana celular (NOBLE, 2002).

Os membros da família HSP90 de maneira geral previnem a agregação proteica e auxiliam em sua síntese e degradação, possuem também interação com o fator de transcrição HSF1, sendo influenciados por agentes agressores (NOBLE, 2002).

No mínimo, 10 membros da família HSP70 já foram identificados em mamíferos. Apresenta duas isoformas, as constitutivas (HSC70) e as induzíveis (HSP72), ambas protegem a célula durante condições de estresse, com maior potencial para a HSP72, além de contribuir para a manutenção na síntese proteica (NOBLE, 2002).

Crescentes evidências sugerem a relação entre espécies reativas de oxigênio e HSP, tendo em vista que o estresse oxidativo parece ser capaz de ativar o HSF e dessa maneira induzir a síntese de HSP (HAMILTON & POWERS, 2002).

O aumento na expressão da HSP72 em músculo esquelético de humanos saudáveis é inversamente correlacionado com a porcentagem de gordura corporal e positiva relação com a sensibilidade à insulina. Logo, o aumento na expressão da HSP72 está associado com a redução da adiposidade. Sugere-se que o aumento da HSP72 pode promover a oxidação de ácidos graxos aumentando os níveis das enzimas citrato synthase e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase, além de favorecer o gasto energético (HENSTRIDGE et al., 2010).

É bem aceito que a atividade física crônica pode promover a redução no risco de doenças cardiovasculares, embora os mecanismos ainda não estejam bem elucidados, uma das hipóteses, seria o aumento das proteínas do estresse (HSPs) apresentadas pelo miocárdio, o que induziria tal proteção (LUNZ & NATALI, 2005; STARNES, 2002). As proteínas membro da família HSP70 são as mais correlacionadas com tal proteção (STARNES, 2002).

O mecanismo pelo qual a proteína de estresse provê a proteção cardíaca ainda não está esclarecido, mas especula-se que seja por meio da capacidade que as HSPs possuem em restaurar enzimas e proteínas-chave desnaturadas durante o período de estresse (STARNES, 2002).

Sugere-se que a indução das HSPs em especial a HSP72, seja um mecanismo importante de proteção ao miocárdio contra processos de injúria, como por exemplo, isquemia e reperfusão. Foi proposto que esse aumento na

síntese das HSPs promova a proteção de diferentes estruturas protéicas em diversos compartimentos celulares, por meio do potencial que estas manifestam em restaurar a maquinária do processo de tradução para a capacidade normal durante momentos de estresse, no qual a síntese protéica está inibida (QIAN et al., 1998). A proteção do miocárdio induzida pelo exercício executado, inclusive por poucos dias, pode estar associado com o aumento da HSP72 neste tecido (DEMIREL et al., 2001).

Estudos demonstram que ratos que apresentam expressão superior de HSP possuem rápida recuperação e redução da taxa de infarto proporcionando uma resistência cardíaca. Mas, que a elevação dos níveis de HSP não seja o único fator determinante para a obtenção desse resultado. Outros fatores e componentes que ainda não estão esclarecidos provavelmente também norteiam tal processo (QIAN et al., 1998).

O gênero (masculino ou feminino) parece influenciar a HSP70 pós exercício em músculo esquelético. Os ratos machos apresentam maior concentração de HSP70 comparado as fêmeas. Quando ovariectomizadas demonstraram melhor resposta da HSP70 frente ao exercício, em relação a ratas tratadas com estrogênio. Especulou-se que a HSP70 responda de forma gênero-específica, e que o estrogênio atenua a expressão da HSP70 em músculo esquelético após o exercício (PAROO; DIPCHAND; NOBLE, 2002).

A elevação da temperatura corporal induzida pelo exercício, parece ser um fator essencial na indução da síntese de HSP72. Os animais que foram submetidos ao treinamento em esteira rolante em ambiente com temperatura de

25 °C, apresentam maior concentração de HSP do que aqueles exercitados a 4 °C (OGURA et al., 2008).

A influência do exercício em induzir o aumento nas concentrações de HSP pode apresentar alterações de acordo com o tipo de fibra muscular prevalente no músculo (SAMELMAN, 1999). Os músculos que possuem predominância de fibras oxidativas geralmente exibem altos níveis basais de HSP, e conseqüentemente a magnitude da resposta ao estresse pode ficar reduzida. Especula-se que essa variação na síntese basal em alguns tecidos contribui para alterações na capacidade de indução a síntese de HSP mediante estresse (NOBLE, 2002).

Diante do descrito, seria plausível imaginar o exercício como fonte de alteração na homeostase, representaria pouco efeito na indução das HSPs em músculos com predominância de fibras do tipo I (fibras oxidativas), tendo como exemplo clássico o sóleo. Entretanto, alguns estudos demonstram uma situação contrária, na qual conseguem obter indução das HSP por meio do estresse provocado pelo exercício em músculo sóleo.

Conforme demonstrado por Smolka e colaboradores (2000), o exercício em esteira rolante promoveu aumento na concentração de HSP72 em músculo sóleo de ratos da linhagem Wistar em situação de estresse oxidativo, que foi entendido pelo autor que o aumento da HSP72 seja uma resposta protetora antioxidante com a finalidade de garantir a sobrevivência das células (SMOLKA et al., 2000).

O mesmo ocorre em estudo realizado por Zoppi (2004), apresentando aumento da concentração de HSP72 de ratos submetidos a treinamento em esteira. Este mensurou tais proteínas em diferentes músculos sendo o sóleo, músculo semitendinoso e o extensor digital longo, representando variação nos

tipos de fibras musculares. A maior indução e conseqüente elevação na concentração de HSP foram reveladas no músculo sóleo.

De acordo com Samelman (1999) que estudou a influência do exercício crônico e agudo (única sessão) em esteira rolante nos níveis de HSPs em músculos sóleo, gastrocnêmio e miocárdio de ratos. Observou que o grupo crônico foi o que apresentou os maiores níveis de HSP, sendo o músculo sóleo seguido do miocárdio foi os que obtiveram a maior elevação, já o gastrocnêmio não demonstrou diferença em nenhuma das variantes nem em relação ao tipo de exercício nem o músculo escolhido.

Belter e colaboradores (2003), analisaram a relação entre o exercício e a expressão da HSP72 em tríceps de camundongos, mostrando que o grupo treinado apresentava níveis mais elevados de HSP72 em relação aos sedentários.

A pesquisa realizada por Oliveira (2005) investigou a influência do exercício na expressão da HSP70 em músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos submetidos a uma única sessão de natação. Os resultados mostram que o exercício não foi capaz de aumentar a expressão da HSP70 em músculo sóleo. Entretanto, no músculo gastrocnêmio, o exercício aumentou, em relação ao grupo controle, a expressão da HSP70. O autor atribui essa diferença em relação as variações no recrutamento dos músculos referente a características das fibras para a realização do exercício. Assim, o modelo de exercício proposto pode ter influenciado o recrutamento preferencial pelo gastrocnêmio e que por fim estaria mais suscetível ao estresse, apresentando maior conteúdo de HSP.

A intensidade do exercício parece influenciar a expressão da HSP72, conforme demonstrado por Skidmore e colaboradores (1995), que submeteram

ratos ao exercício em esteira rolante, demonstrando que a expressão da HSP72 estava elevada nos músculos sóleo, gastrocnêmio e ventrículo esquerdo do coração, mas não influenciou no extensor longo dos dedos. Esses resultados sugerem que a intensidade específica do grupamento muscular exigido influi na expressão, e que por isso o extensor longo não apresentou alteração.

A mesma alteração é corroborada com estudo realizado por Milne & Noble (2002), que verificaram a influência da intensidade do exercício em esteira, aumentando o conteúdo de HSP70 no coração, em relação aos sedentários, a partir da velocidade de 24m/min, até o maior nível de HSP em 33m/min. Quando a mesma variação foi investigada em músculo sóleo, o aumento da concentração de HSP se registrou na velocidade de 15m/min, e se manteve quase constante até a velocidade de 27m/min. A partir da velocidade de 30 a 33m/min, houve nesse músculo uma ligeira queda na HSP, enquanto que, durante esse intervalo (30 - 33min) não houve diferença estatística em relação ao grupo sedentário.

O exercício de exaustão também inicia uma resposta ao estresse elevando progressivamente a concentração de HSP72 em músculo esquelético em humanos saudáveis (FEBBRAIO; KOUKOULAS, 2000).

Diante do descrito na literatura, observa-se uma discrepância de resultados em relação à indução das HSPs em diferentes grupamentos musculares, o que leva a crer que a influência não está apenas relacionada ao tipo de fibra muscular predominante, mas também aos diferentes protocolos de treinamento utilizados pelos autores (natação, esteira), duração e intensidade do exercício, bem como o tempo transcorrido desde última injúria, antes do sacrifício.

Apesar da tendência mostrada pelo organismo em promover a adaptação ao exercício, elevados níveis de HSP persistem mesmo com treinamentos repetitivos e protocolos longos (ANTUNES; SILVA; MACEDO, 2008; ZOPPI, 2004; SMOLKA et al., 2000).

2.9 Proteínas do estresse e glutamina

Estudos mostram que a glutamina, por si só, é capaz de induzir o rápido e significativo aumento na expressão da HSP72 em ratos, e assim proteger o organismo de uma forma mais eficaz contra possíveis danos celulares (WISCHMEYER et al., 2001; EHRENFRIED et al., 1995). Além disso, a utilização de glutamina, aliado ao aumento na expressão da HSP, é capaz de proporcionar o aumento no percentual de sobrevivência durante uma situação de estresse nos animais (SINGLETON & WISCHMEYER, 2007).

Wischmeyer (2001) suplementou a dieta oferecida a ratos com glutamina em diversas doses (enteral, entre 0,15 e 0,75g/kg) e mensurou a expressão da HSP72 em diversos tecidos como coração, pulmão, rim, cólon e íleo. Os resultados mostraram que quanto maior a dose de glutamina, maior a expressão da HSP72, mostrando ser dose-dependente. Em relação aos diversos tecidos, todos apresentaram aumento na expressão da HSP72, com exceção do íleo. O autor acredita que a glutamina foi o estopim para a indução à uma resposta ao estresse, por meio da regulação na expressão da HSP, e dessa maneira proteger o tecido afetado.

O efeito proporcionado pela glutamina parece ser dose-dependente, capaz de aumentar a concentração de HSP70 em pulmão e reduzir os danos teciduais induzidos por isquemia e reperfusão (GUIQI, 2011).

O estímulo para o aumento da HSP70 pode ser um importante mecanismo de citoproteção, inclusive nos rins. A administração de glutamina em processo pré-operatório renal, elevou a HSP70 e atenuou os danos causados pela cirurgia (FULLER et al., 2007).

A glutamina foi capaz de aumentar a expressão da HSP70 em intestinos de ratos, tendo o pico de concentração no tempo de 2 horas após a última injúria. O autor acredita que a capacidade protetora conferida pela glutamina, amplamente utilizada para proteção em particular da mucosa intestinal, esteja diretamente relacionada com a indução e conseqüente aumento da HSP70, pois dessa maneira, a glutamina não seria apenas um combustível dos enterócitos, mas também uma forma de indução na expressão das HSPs e que estas últimas promoveriam o efeito protetor às células intestinais (Ehrenfried et al., 1995). Mais uma vez o efeito protetor conferido pela glutamina foi fortemente associado com o aumento na HSP70 que esse aminoácido promove (ZHONG et al., 2011; WISCHMEYER et al., 2003).

A administração parenteral de glutamina possibilitou o aumento na expressão da HSP70 em ratos, que atenuou o dano celular causado pela isquemia durante processo de transplante, sendo a isquemia responsável por uma condição de estresse oxidativo as células (JANG et al., 2008).

Em estudo realizado por Ziegler e colaboradores (2005) suplementando glutamina por via parenteral durante 7 dias em pacientes adultos em situação

crítica, se demonstrou aumento da concentração sérica de HSP70, e dos níveis de glutamina plasmática nos pacientes. O autor sugere que a glutamina oferece um importante efeito de proteção celular mediado pelo aumento na concentração dessa classe de proteínas.

A glutamina se mostrou um componente essencial para o aumento na concentração de HSP em resposta ao estresse térmico. Foi realizado teste para verificar se outros aminoácidos como arginina, histidina, glutamato, prolina, alanina e glicina individualmente, suportariam o mesmo efeito da glutamina nas mesmas concentrações. Os dados revelaram que nenhum dos aminoácidos testados separadamente foi capaz de aumentar a HSP. Entretanto vale ressaltar que esse estudo foi realizado *in vitro*, e portanto a célula tinha apenas o aminoácido testado como única fonte de nutriente, não possuindo a dinâmica do corpo, uma vez que se sabe que o glutamato, por exemplo, pode ser utilizado para a síntese de glutamina. Mas devido a importância e envolvimento do glutamato no metabolismo da glutamina, houve uma segunda tentativa, o qual aumentaram a concentração (10mM) de incubação utilizada. Nessa concentração, o glutamato foi capaz de elevar a HSP, porém ainda inferior a glutamina (4mM) (PHANVIJHITSIRI et al., 2006).

O uso de uma única dose glutamina 30 minutos antes da indução de uma diarreia severa, foi capaz de aumentar a HSP 25, 70 e 90, no intestino e reduzir a incidência e severidade da diarreia. Já em tecidos com tumor a administração de glutamina não alterou os níveis das HSPs verificadas (XUE et al., 2008).

O efeito protetor conhecido da glutamina pode estar diretamente relacionado com a habilidade que este aminoácido mostrou em aumentar a

expressão do sistema de defesa das HSPs. E que são as HSPs as responsáveis pela proteção conferida. Essa hipótese é sustentada pois, quando o gene da HSP70 foi silenciado, mesmo com a suplementação de glutamina, não houve redução dos marcadores de lesão. Portanto, sugere-se que a expressão da HSP70 é requerida e necessária para os efeitos da glutamina em relação a atenuação da injúria (SINGLENTON et al., 2007).

O aumento na expressão da HSP70 em coração, pulmão e fígado após administração intravenosa de glutamina (pré-operatório), atenuou o processo inflamatório induzido pelo procedimento de Bypass (técnica utilizada no qual o aparelho faz a função do pulmão e coração durante cirurgias, sendo uma forma de circulação extra corporal) em ratos (HAYASHI et al., 2002).

Quando a glutamina é reduzida (0.5 mM para 0.125 mM) durante períodos de estresse, a expressão da HSP70 é prejudicada, podendo chegar a diminuir aproximadamente até 40% os níveis de HSP70 (OEHLER et al., 2002).

A glutamina mais uma vez aumentou a concentração de HSP70, agora em pulmão de ratos submetidos ao estresse da hiperóxia, e atenuou marcadores de lesão, bem como elevou o tempo de sobrevivência dos animais (PERNG et al., 2010).

Diante do descrito pode-se sugerir que a glutamina é um potente aminoácido, capaz de aumentar a concentração de HSPs em diversos tecidos, frente a uma variedade de situações estressoras. E que a elevação nas HSPs é um efeito promissor que favorece as propriedades de proteção, defesa e resistência da célula, pela qual são responsáveis.

2.10 Via de biossíntese da hexosamina

O mecanismo pelo qual a glutamina é capaz de aumentar a expressão das proteínas do estresse (HSPs) ainda não está bem esclarecido, mas especula-se que seja por meio da via de biossíntese da hexosamina. Essa via depende da glutamina, permitindo no final, a glicosilação (adição de grupos glicosídicos) de fatores de transcrição e proteínas nucleares (HAMIEL et al., 2009).

A via de biossíntese da hexosamina (BH) está fortemente relacionada com aspectos de sobrevivência celular, na qual envolve a utilização de unidades de glicose oriundas do metabolismo oxidativo. Estima-se que em condições normais a via BH consuma de 2% a 5% da glicose captada pelas células.

Uma das enzimas regulatórias chaves dessa via, é a enzima GFAT (L-glutamina-D-frutose 6-fosfato aminotransferase), que é dependente do aminoácido glutamina. Assim, a glutamina passa ser um substrato chave e um fator limitante nessa etapa, e é nesse momento que se faz a relação entre aporte de glutamina e aumento na síntese das HSPs (CHATHAM et al., 2008).

A via de biossíntese da hexosamina pode ser observada na Figura 5. As unidades de glicose são convertidas em glicose-6-fosfato, e esta é convertida em frutose-6-fosfato. A frutose-6-fosfato será convertida em glucosamina pela enzima GFAT, tendo o aminoácido glutamina como único doador do grupo amino para que ocorra tal conversão (CHATHAM et al., 2008).

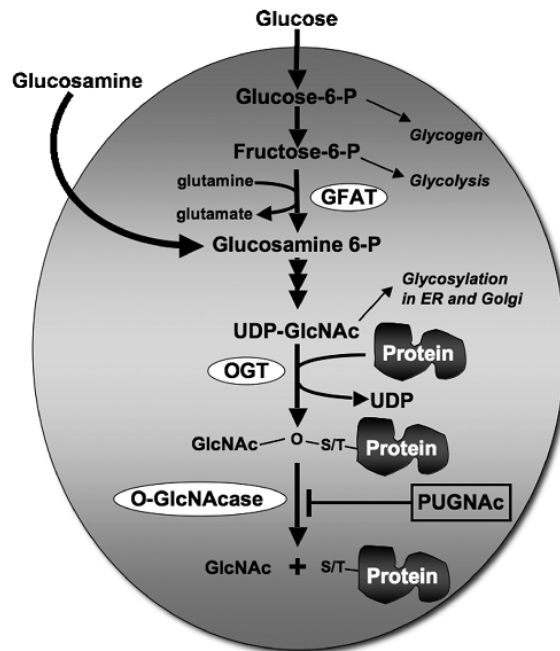


Figura 5. Via de Biossíntese da Hexosamina (CHATHAM et al., 2008).

A glucosamina será convertida em UDP-GlcNAc que é produto final primário, o qual é substrato para diversas reações de glicosilação catalisadas por várias transferases, incluindo particularmente a O-GlcNAc transferase (OGT). A enzima OGT é responsável pela catalização da modificação protéica, que envolve a glicosilação em resíduos específicos de serina e treonina em diversas proteínas. Embora essa enzima seja altamente conservada e importante para o organismo, ainda não está esclarecido o seu mecanismo de regulação. Acredita-se que a regulação esteja basicamente relacionada com a concentração do seu substrato o UDP-GlcNAc, pois é sensível a essas alterações (CHATHAM et al., 2008).

A concentração de proteínas glicosiladas é regulada pela enzima N-acetilglucosaminidase (O-GlcNAcase), localizada primordialmente no citoplasma,

no qual catalisa a remoção do grupo glicosídico das proteínas (CHATHAM et al., 2008).

O uso de alloxan, um inibidor da enzima OGT, inibiu a habilidade da glutamina em aumentar a HSP70 mesmo diante da injúria em células do miocárdio, sugerindo que a via BH possa estar envolvida no aumento das HSPs provocado pela administração de glutamina (GONG & JING, 2011).

Um dos fatores de transcrição que é modificado pela via HB que apresenta relação com a síntese das HSPs, inclui o Sp1 (HAMIEL et al., 2009).

O Sp1 é um fator de transcrição chave requerido para a expressão ótima das HSPs após situações de injúria. A glicosilação do Sp1 causa sua translocação para o núcleo, no qual torna-se ativo e dessa maneira induz a atividade do promotor do gene (HAMIEL et al., 2009).

Em tese, um maior aporte de glutamina favoreceria essa via aumentando a taxa de glicosilação das proteínas, ou seja, a força de ligação entre os fatores envolvidos na síntese das HSPs.

2.11 Proteínas do estresse e câncer

Até o momento, a literatura traz dados que quase sempre, ou sempre, atribui que o aumento nas HSPs seja benéfico, inclusive em diversos tecidos, processos cirúrgicos, além de algumas patologias. Entretanto quando tratamos de câncer os dados presentes na literatura modificam suas atribuições e considerações. Apesar de não ter relação com o objetivo geral desta dissertação,

acredita-se que seja de relevância para a revisão, pois trata-se de um campo novo que envolve as HSPs.

É importante para o leitor compreender que estabelecer uma faixa de concentração de HSP que possa ser considerada e utilizada como referência de normalidade é algo que até o momento não foi realizado. O que se sabe, é que quando falamos de HSP exclusivamente com relação ao câncer já diagnosticado, o significado é diferente, do que classicamente foi descrito desde sua descoberta na década de 60, com relação a outras patologias ou processos cirúrgicos.

Em anos recentes, alguns estudos têm mostrado a presença de diversas famílias de HSP em vários tipos de tumores, as quais podem ser usadas como biomarcadores clínicos ou alvo para a terapia do câncer (KHALIL et al., 2011).

Sabe-se que as HSPs promovem aumento na tolerância celular contra agentes agressores (insultos). As mesmas entretanto, não diferenciam as células saudáveis das malignas. Portanto, especula-se que o aumento na expressão de HSP seria pelo menos em parte, responsável pela tolerância e resistência de tumores contra muitos agentes anti-carcinogênicos e quimioterápicos (KHALIL et al., 2011; JEGO et al., 2010).

As HSPs podem ser alvo na terapia contra o câncer, pois do ponto de vista farmacológico, iniciou-se a administração de inibidores de HSP, na tentativa de diminuir a resistência dos tumores frente aos tratamentos quimioterápicos (KHALIL et al., 2011). A depleção ou inibição da HSP geralmente reduz o tamanho e mostrou até mesmo causar a não evolução do tumor (JEGO et al., 2010).

As HSPs podem ser consideradas como biomarcadores clínicos, pois a alta taxa de expressão de HSP tem sido relacionada com o nível e grau de

agressividade em diversos tipos de câncer (KHALIL et al., 2011), podem revelar o grau de severidade da condição da doença (YEH et al., 2010).

O aumento anormal na expressão das HSPs em diversos tumores está correlacionado com o aumento da proliferação celular, metástase e resultado terapêutico limitado. Portanto a inibição farmacológica das HSPs representa um desafio para a terapia do câncer. Essa inibição auxiliaria na redução da tolerância no tumor favorecendo o tratamento químico do câncer (KHALIL et al., 2011). O aumento anormal nos níveis de HSP27 foi observado em muitos tipos de câncer e está associado com a agressividade do tumor, resistência a quimioterapia e pobre prognóstico para os pacientes (KIM & KIM, 2011).

Ainda não está esclarecido como cada uma das diferentes famílias de HSPs se comporta, inclusive nos diferentes tipos de câncer. Mas as HSP70, HSP27 e HSP90 tem sido consideradas como principais alvos de inibição como nova estratégia na terapia do câncer, entretanto de maneira geral poucos inibidores estão disponíveis no mercado.

Particularmente em relação a HSP90 existem aproximadamente 14 drogas inibidoras conhecidos até o momento. O uso desses inibidores tem se mostrado ser mais efetivo quando utilizado em conjunto com a terapia anti-câncer tradicional, do que quando usados como terapia única (KHALIL et al., 2011).

Um conhecido e testado inibidor de HSP90 é o *17-allylamino-demethoxy geldanamycin* (17-AAG) sendo um inibidor promissor, que na maioria dos casos não foi tóxico, principalmente em leucemia (FLANDRIN et al., 2008).

Especula-se que embora os inibidores induzam o esgotamento da HSP90 em células tumorosas, os mesmos não apresentam efeito em tecidos normais. A

base molecular para a atividade seletiva dos inibidores de HSP90 parece ser a conformação do complexo HSP90. A HSP90 isolada de células de tumor tem uma afinidade de ligação para os inibidores entre 20 e 200 vezes maior do que a HSP90 isolado a partir de células normais (JEGO et al., 2010). Muitas indústrias farmacêuticas acreditam que inibidores de HSPs podem ser uma classe de drogas promissoras na terapia anti-câncer, entretanto o desenvolvimento de tais drogas pode levar anos, bem como o custo ser elevado (JEGO et al., 2010).

Por outro lado, pouco se sabe dos efeitos adversos para o paciente que faz uso de inibidores de HSPs, bem como por quanto tempo é favorável o seu uso (KHALIL et al., 2011).

2.12 Parâmetros bioquímicos

A seguir encontram-se alguns dos parâmetros bioquímicos que podem ser usados na compreensão dos efeitos do consumo das proteínas do soro do leite. Tais parâmetros foram tratados e discutidos resumidamente na elaboração do artigo, entretanto aqui segue de uma forma mais ampla e menos resumida.

2.12.1 Glicemia

A proteína do soro do leite foi capaz de reduzir a glicemia de maneira dose-dependente (PETERSEN et al., 2009), consistente com nossos resultados. Tais proteínas parecem ter efeitos insulíntrópicos, o qual favorece a redução da glicemia.

Alguns aminoácidos em particular, podem agir mais efetivamente nesse efeito como leucina, isoleucina, valina, lisina e treonina. Entretanto o estudo realizado por Katsanos e colaboradores (2008), mostrou que a PSL foi mais insulino-trópica ao comparar-se com um mix de seus aminoácidos constituintes na mesma proporção. O autor acredita que o efeito da PSL se faz através de mecanismos que estão além do que o atribuído ao seu teor de aminoácidos.

2.12.2 Glicogênio Muscular

O glicogênio é a forma em que o organismo armazena energia em diversos tecidos. O exercício promove a depleção de glicogênio, o qual pode favorecer a queda de rendimento, *performance* e aceleração da fadiga. A velocidade de restauração dos estoques de glicogênio seguido do exercício é um dos fatores mais importantes e determinantes no processo de recuperação. Tal restauração pode levar até 24 horas para ocorrer dependendo da dieta consumida, bem como da extensão da depleção de glicogênio (JENTJENS & JEUKREDUP, 2003).

De acordo com a dieta consumida após o exercício as concentrações de glicogênio muscular anteriormente depletadas devido ao exercício, podem aumentar a níveis superiores ao repouso (músculo não exercitado) por um processo conhecido como super compensação de glicogênio.

Ainda não se conhece o mecanismo pelo qual as proteínas do soro do leite estimulam o acúmulo de glicogênio. Entretanto sabe-se que a concentração de glicogênio é um regulador da atividade e expressão dos transportadores de glicose (GLUT). Talvez de alguma maneira as PSL sinalizem ou estimulem o

aumento na concentração, atividade do GLUT, ou ainda aumente a translocação desses transportadores para membrana, favorecendo a entrada da glicose na célula e conseqüente aumento na síntese de glicogênio.

2.12.3 Glicogênio cardíaco

O glicogênio cardíaco ocupa aproximadamente 2% do volume celular em músculo cardíaco em um adulto, e mais de 30% em fetos. A manutenção dos níveis de glicogênio no coração é importante pois trata-se de um combustível endógeno para manter os processos vitais de homeostase e sobrevivência, afinal é um órgão vital.

A concentração de glicogênio no coração parece estar relacionado com a maior tolerância e resistência a situações de hipóxia e anóxia, favorecendo a sobrevivência e homeostase do músculo cardíaco (TAEGTMEYER, 2004).

2.12.4 Ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas, sendo oriundo da conversão da hipoxantina para xantina e de xantina para ácido úrico, ambas reações são catalizadas pela xantina oxidoreductase (ÁLVAREZ- LARIO & VICENTE-MACARRÓN, 2010).

O ácido úrico é um poderoso e importante antioxidante sérico sendo o mais abundante, representando aproximadamente 60% da capacidade de remoção sérica das EROs, evitando danos ao organismo (BAILLIE et al., 2007; WARING et

al., 2006; SQUADRITO et al., 2000; AMES et al., 1981). Está presente no sangue como urato, sua forma solúvel, sendo capaz de remover radicais peróxidos, radical hidroxila, além de quelar metais de transição (CHAMORRO et al., 2004).

Durante o processo de evolução a maioria dos mamíferos perderam a atividade da enzima uricase, que seria responsável por metabolizar o ácido úrico para alantóina. Essa mutação portanto, fez com que os níveis de ácido úrico aumentassem acentuadamente ao longo dos anos de evolução. Ames e colaboradores (1981) defende que essa mutação e conseqüente aumento dos níveis séricos de ácido úrico, foi determinante para proporcionar o prolongamento da expectativa de vida e que favoreceu e potencializou mecanismos protetores contra as EROs. Igualmente houve o desenvolvimento eficiente na reabsorção de ácido úrico pelos rins (quase 90% dele é reabsorvido) o que também poderia ter auxiliado no aumento do ácido úrico sérico ao longo da evolução.

O mesmo processo de evolução foi acompanhado pela perda da capacidade de síntese de ácido ascórbico - vitamina C em seres humanos, especula-se que o aumento do ácido úrico, pela perda da uricase, foi uma maneira compensatória para a perda de um antioxidante (vitamina C), pelo acúmulo do outro (ácido úrico) (SEVANIAN et al., 1991; AMES et al., 1981). Além disso, o ácido úrico também parece ser utilizado como um antioxidante para o próprio ácido ascórbico, sem o aparente consumo do ácido úrico em fluidos biológicos (SEVANIAN et al., 1991).

Waring e colaboradores (2003) suplementaram indivíduos saudáveis submetidos a exercício físico com ácido úrico e vitamina C, verificaram que houve

redução significativa nos marcadores de estresse oxidativo e aumento na capacidade antioxidante no grupo suplementando com ácido úrico.

Vale ressaltar que o ácido úrico apresentou capacidade antioxidante superior ao da vitamina C, sendo esta última amplamente descrita na literatura com atribuição de propriedade antioxidante, podendo ser considerada padrão ouro, o que demonstra o importante potencial antioxidante representado pelo ácido úrico (WARING et al., 2003; SPITSIN et al., 2002).

O exercício por si só eleva os níveis séricos de ácido úrico, como já demonstrado por Kaya e colaboradores (2006). Espera-se que o conteúdo de ácido úrico (como mecanismo antioxidante) aumente devido ao exercício uma vez que este provoca diversas alterações na homeostase inclusive aumento na produção de EROs.

A redução nas concentrações de ácido úrico foi relacionado com o aumento na taxa de progressão de doença (esclerose lateral amiotrófica) pois indivíduos doentes apresentaram níveis inferiores comparados com saudáveis (KEIZMAN et al., 2009). O mesmo ocorreu na doença de Parkinson, em que indivíduos doentes apresentaram baixos níveis de ácido úrico e houve forte correlação inversa entre ácido úrico com a duração e dosagem diária do medicamento específico para Parkinson (levodopa) (ANDREADOU et al., 2009).

A proteína do soro do leite possui atribuições antioxidantes principalmente relacionado ao sistema antioxidante enzimático, porém até o momento não foi encontrado nenhum estudo que verifique a influência das proteínas do soro do leite nos níveis de ácido úrico.

2.12.5 Creatina quinase e lactato desidrogenase

O exercício físico pode romper estruturalmente ou deixar enfraquecida a membrana plasmática, resultando na liberação de proteínas intracelulares na corrente sanguínea, entre elas está presente a creatina quinase. A creatina quinase, portanto, é um indicador de dano muscular proveniente dessa ruptura das membranas, provocadas pelo exercício (MAGAL et AL., 2010).

A quantificação de LDH também representa um biomarcador sanguíneo relacionado ao dano muscular (COOKE, et. al., 2010).

O exercício induz o aumento da concentração sérica de CK e LDH (COOKE, et. al., 2010)., entretanto o seu aumento pode levar de 24 até 72 horas para ocorrer.

2.12.6 Proteínas totais e albumina

As proteínas do soro do leite aparentemente preservaram os níveis de proteínas totais e albumina mesmo após o exercício. O aumento nas proteínas totais também foi verificado por Haraguchi (2010) em ratos que consumiram proteína do soro do leite em relação a caseína.

A albumina é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 65kDa e representa mais de 50% da concentração total de proteínas presente no soro. A albumina sérica possui propriedades de ligação e transporte de diversas substâncias endógenas e exógenas, além de contribuir para a manutenção da pressão osmótica, propriedade anti-inflamatórias, sendo estas propriedades

fisiológicas importantes para o bom funcionamento do organismo (ARQUES & AMBROSI, 2011; QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

A albumina também apresenta capacidade antioxidante, podendo prover apoio para a proteção celular contra o ataque das espécies reativas de oxigênio, por meio da habilidade de ligar e transportar substâncias com capacidade antioxidante conhecidas, como bilirrubina e óxido nítrico. Ainda, a albumina possui uma ligação relativamente fraca e não específica com o ferro, que pode também oferecer proteção antioxidante quando outras estratégias antioxidantes estão oprimidas como em condições de sobrecarga de ferro e/ou hemólise acentuada. Essa capacidade da albumina de ligação com o ferro, faz com que o ferro não fique livre para interagir com o peróxido de hidrogênio evitando a formação do radical hidroxila por meio da reação de Fenton (ARQUES & AMBROSI, 2011; ROCHE et al., 2008; QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

2.12.7 Creatinina

A creatinina é produzida no músculo esquelético sendo produto da reação da creatina. A quantidade de creatinina produzida pelo corpo pode variar primariamente de acordo com a massa muscular, seguida de idade, etnia, gênero e dieta. A creatinina foi comumente utilizada para indicar alteração na função renal, porém pode não ser um bom preditor na detecção de doença renal, principalmente quando analisado logo no início, para diagnóstico (BAXMANN et al., 2008).

Resultados indicam uma forte correlação entre os níveis séricos de creatinina com a quantidade de massa magra. Investigações sugerem que a creatinina poderia ser usada como parâmetro ou marcador indireto para estimar a massa muscular (SCHUTTE et al., 1981; BANSAL, et al., 2011). Assim, a creatinina sérica pode estar elevada em indivíduos com maior predominância de massa muscular independente da função renal, estando esta normal (WALTHER et al., 2011). Baixos níveis de creatinina, o qual estima-se menor massa muscular, parece estar relacionado com o aumento da mortalidade, independente da função renal e fatores de risco tradicionais em pacientes com doença coronariana (BANSAL et al., 2011).

2.12.8 Enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST / ALT)

As enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST/ALT respectivamente) por ora, podem ser consideradas importantes marcadores de lesão, principalmente hepática. O consumo das proteínas do soro do leite reduzem os níveis de ALT no soro de ratos com doença hepática, e que portanto, reduziria o dano hepático, bem como favoreceria a regeneração dos hepatócitos (ORYAN et al., 2011).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÅKERFELT, M.; MORIMOTO, R. I.; SISTONEN, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews - Molecular cell Biology**, v. 11, p. 545 – 555, 2010.

ÁLVAREZ-LARIO, B.; MACARRÓN-VICENTE, J. Uric acid and evolution. **Rheumatology**, v. 49, p. 2010 – 2015, 2010.

AMES, B. N. et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. **Proc. NatL. Acad. Sci.**, v. 78, n. 11, p. 6858 – 6862, 1981.

ANDREADOU, E.; NIKOLAOU, C.; GOURNARAS, F. et al. Serum uric acid levels in patients with Parkinson's disease: Their relationship to treatment and disease duration. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, p. 724 – 728, 2009.

ANTUNES NETO, J. M. F.; SILVA, L. P.; MACEDO, D. V. Proteínas de estresse HSP70 atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. **Brazilian Journal of Biomotricity**, v. 2, n. 3, p. 160 – 175, 2008.

APARICIO, V. A. et al. Effects of high-whey-protein intake and resistance training on renal, bone and metabolic parameters in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 836 – 845, 2011.

ARQUES, S.; AMBROSI, P. Human Serum Albumin in the Clinical Syndrome of Heart Failure. **Journal of Cardiac Failure**, v.17, n. 6, p. 451 – 458, 2011.

ATALAY, M. et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, p. 605 – 611, 2004.

BACURAU, R. F. P.; ROSA, L. F. B. P. C. Produção de espécies reativas de oxigênio durante a atividade motora e mecanismos de defesa. In: LANCHETA JUNIOR, A. H. L. **Nutrição e Metabolismo**: aplicados à atividade motora. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 131-150.

BAILLIE, J. K. et al. Endogenous Urate Production Augments Plasma Antioxidant Capacity in Healthy Lowland Subjects Exposed to High Altitude. **Chest**, v. 131, p. 1473 – 1478, 2007.

BANSAL, N. et al. Relation of Body Mass Index to Urinary Creatinine Excretion Rate in Patients With Coronary Heart Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 108, p. 179 – 184, 2011.

BAXMANN, A. C. et al. Influence of Muscle Mass and Physical Activity on Serum and Urinary Creatinine and Serum Cystatin C. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, p. 348 - 354, 2008.

BELTER, J. G.; CAREY, H. V.; JUNIOR, T. G. Effects of voluntary exercise and genetic selection for high activity levels on HSP72 expression in house mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 1270 – 1276, 2004.

BENJAMIN, J. et al. Glutamine and Whey Protein Improve Intestinal Permeability and Morphology in Patients with Crohn's Disease: A Randomized Controlled Trial. **Digestive Diseases and Sciences**, 2011.

BENJAMIN, I. J.; McMILLAN, D. R. Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. **American Heart Association**, v. 83, p.117-132, 1998.

BOIRIE, Y. et al. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Physiology**, v.94, p. 14930 – 14935, 1997.

BOSHOFF, T. et al. Differential basal synthesis of Hsp70:Hsc70 contributes to Interindividual variation in Hsp70: Hsc70 inducibility. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1317 – 1325, 2000.

BUCKLEY, J. D. et al. Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. **Journal of Science and Med. in Sport**, v. 13, p. 178 – 181, 2010.

BLOMSTRAND, E. et al. Influence of ingesting a solution of branched-chain amino acids on plasma and muscle concentrations of amino acids during prolonged submaximal exercise. **Nutrition**, v. 12, ns. 7/8, p. 485 – 490, 1996.

CAMPISI, J. et al. Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 284, p. 520 – 530, 2003.

CASTELL, L. M. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and in immunodepression. **Sports Med**, v. 33, n.5, p. 323 – 345, 2003.

CASTELL, L. M. et al. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v.75, p. 47 – 53, 1997.

CASTRO, M. A. C. **Estudo comparativo da produção de radicais livres e catalase nos exercícios de intensidade e duração moderadas.** Brasília, 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Universidade Católica de Brasília.

CAVALHEIRO, L. A. **O efeito da suplementação de soro de leite sobre os linfócitos de ratos wistar.** Campinas, 2007. 108p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

CHAMORRO, A.; PLANAS, A. M.; MUNER, D. S. et al. Uric acid administration for neuroprotection in patients with acute brain ischemia. **Medical Hypotheses**, v. 62, p. 173 – 176, 2004.

CHATHAM, J. C. et al. Hexosamine biosynthesis and protein o-glycosylation: the first line of defense against stress, ischemia, and trauma. **Shock**, v. 29, n. 4, p. 431 - 440, 2008.

CSERMELY, P.; YAHARA, I. Heat shock proteins. In: KERI, G.; TOTH, I. **Molecular Pathomechanisms and new trends in drug research**. 2002. p. 67 – 75.

COOKE, M. B.; RYBALKA, E.; STATHIS, C. G. et al. Whey protein isolate attenuates strength decline after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n. 30, p. 1 -9, 2010.

COSTA, G. E. A. **Comparação dos efeitos nutricionais, bioquímicos e fisiológicos decorrentes do consumo de proteínas do leite por ratos sedentários e treinados**. Campinas, 2010. 94p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

DEATON, C. M.; MARLIN, D. J. Exercise-Associated Oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n. 3, p. 278 – 291, 2003.

DEMIREL, H. A. et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. **Journal Appl. Physiol.**, v. 91, p. 2205 – 2212, 2001.

DILLER, K. R. Stress protein expression kinetics. **Annu. Rev. Biomed. Eng**, v. 8, p. 403 – 424, 2006.

EHRENFRIED, J. A. et al. Glutamine-mediated regulation of heat shock protein expression in intestinal cells. **Surgery**, v. 118, n. 2, p. 352 – 357, 1995.

ETZEL, M. R.; Manufacture and use of dairy protein fractions. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 996 – 1002, 2004.

FARFAN, J. A. et al. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a Joint WHO/FAO Consultation. Geneva: OMS – Nações Unidas, 2007, v.1, 276 p.

FEBBRAIO, M. A.; KOUKOULAS, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **Journal Appl. Physiol.**, v. 89, p.1055 – 1060, 2000.

FIAMONCINI, R. L. **Análise do estresse oxidativo em jogadores juniores de Futebol: comparação entre pré e pós-exercício aeróbio e Anaeróbio.** Florianópolis, 2002. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina.

FULLER, T. F. et al. Glutamine Donor Pretreatment in Rat Kidney Transplants with severe preservation reperfusion injury. **Journal of Surgical Research**, v. 140, p. 77 – 83, 2007.

FLANDRIN, P. et al. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 13, p. 357 – 364, 2008.

FLUEGEL, S. M. et al. Whey beverages decrease blood pressure in prehypertensive and hypertensive young men and women. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 753 – 760, 2010.

FRESTEDT, J. L. et al. A whey-protein supplement increases fat loss and spares lean muscle in obese subjects: a randomized human clinical study. **Nutrition & Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 1 – 7, 2008.

GABAI, V. L.; SHERMAN, M. Y. Interplay between molecular chaperones and signaling pathway sin survival of heat shock. **Journal Appl. Physiol**, v. 92, p. 1743 – 1748, 2002.

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

GUIQI, G. Pre-treatment with glutamine attenuates lung injury in rats subjected to intestinal ischaemia–reperfusion. njury, **Int. J. Care Injured**, v. 42, p. 72 – 77, 2011.

GONG, J.; JING, L. Glutamine induces heat shock protein 70 expression via O-GlcNAc modification and subsequent increased expression and transcriptional activity of heat shock factor-1. **Minerva Anestesiol**, v.77, p. 488 – 495, 2011.

GUPTA, S.C. et al. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far?. **Life Sciences**, v. 86, p. 377 – 384, 2010.

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

HALL, D. M. et al. Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. **Journal Appl. Physiol.**, v.89, p.749–759, 2000.

HAMIEL, C. R. et al. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 297, p. 1509 – 1519, 2009.

HAMILTON, K. L.; POWERS, S. K. Heat shock proteins and reactive oxygen species. In: NOBLE, E. G.; LOCKE, M. **Exercise and the stress response: the role of stress proteins**, 2002. p. 123 – 131.

HARAGUCHI, F. H.; PEDROSA, M. L.; PAULA, H. et al. Evaluation of Biological and Biochemical Quality of Whey Protein. **J. Med. Food.**, v. 13, n. 6, p. 1505 – 1509, 2010.

HAYASHI, Y. et al. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass–induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. **Circulation**, v. 106, p. 2601 – 2607, 2002.

HE, Y. et al. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 13, p. 9516 – 9524, 2010.

HENSTRIDGE, D. C. et al. The relationship between heat shock protein 72 expression in skeletal muscle and insulin sensitivity is dependent on adiposity. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 59, p. 1556 – 1561, 2010.

HO, J. S. L.; WESTWOOD, J. T. Transcriptional regulation of the mammalian heat shock genes. In: NOBLE, E. G.; LOCKE, M. **Exercise and the stress response: the role of stress proteins**, 2002. p. 13 – 41.

HUANG, YI-FANG; WANG, Y.; WATFORD, M. Glutamine directly downregulates glutamine synthetase protein levels in mouse C2C12 skeletal muscle myotubes. **J. Nutr.** v. 137, p. 1357 – 1362, 2007.

HULMI, J. J.; LOCKWOOD, C. M.; STOUT, J. R. Review Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, n.51, p. 1 – 11, 2010.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary DRI Reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. In: _____. Washington: Academies Press, 2006. p. 147.

JANG, H. J. et al. Glutamine induces heat-shock protein-70 and glutathione expression and attenuates ischemic damage in rat islets. **Transplantation Proceedings**, v. 40, p. 2581 – 2584, 2008.

JEGO, G. et al. Targeting heat shock proteins in cancer. **Cancer letters**, *In press*, 2010.

JENTJENS, R.; JEUKREDUP, A. Determinants of Post-Exercise Glycogen Synthesis During Short-Term Recovery. **Sport. Med.** V. 33, n.2, p. 117 -144, 2003.

JONNALAGADDA, S. S. Glutamine. In: DRISKELL, J. A. **Sports Nutrition: fats and proteins**, 2007. p. 261 – 275.

KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature**, v. 11, p. 579 – 592, 2010.

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

KATSANOS, C. S. et al. Whey protein ingestion in elderly results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. **Nutr. Res.**, v. 28, n. 10, p. 651–658, 2008.

KEIZMAN, D.; ISH-SHALOM, M.; BERLINER, S. et al. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: Further evidence for oxidative stress?. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 285, p. 95 – 99, 2009.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacol. Ther.**, v. 80, n. 2, p. 183 – 201, 1998.

KIM, L. S.; KIM, J. H. Heat Shock Protein as Molecular Targets for Breast Cancer Therapeutics. **Journal Breast Cancer**, v. 14, n. 3, p. 167-174, 2011.

KUME, H.; OKAZAKI, K.; SASAKI, H. Hepatoprotective effects os whey protein on D-Galactosamine-Induced hepatitis and liver fibrosis in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 70, n. 5, p. 1281-1285, 2006.

KHALIL, A. A. et al. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets?. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1816, p. 89 – 104, 2011.

LUNZ, W.; NATALI, A. J. Exercício e Proteínas de Estresse (Hsp 72) no Músculo Cardíaco. **R. bras. Ci. e Mov.**, v. 13, n. 3, p. 89 – 98, 2005.

LYASHKO, V.N. et al. Comparison of the heat shock response in ethnically and ecologically different human populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 12492 - 12495, 1994.

MAGAL, M.; DUMKE, C. L.; URBIZTONDO, Z. G. et al. Relationship between serum creatine kinase activity following exercise-induced muscle damage and muscle fibre composition. **Journal of Sports Sciences**, v. 28, n.3, p. 256 – 266, 2010.

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

MEZZAROBBA, V. et al. The role of adrenal hormones in the response of glutamine synthetase to fasting in adult and old rats. **Clinical Nutrition**, v. 22, n.6, p. 569 – 575, 2003.

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

MILNE, K. J.; NOBLE, E. G. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. **Journal Appl. Physiol**, v. 93, p. 561 – 568, 2002.

MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes & Development**, v.12, p. 3788 – 3796, 1998.

MORROW, S. A.; STAHL, J. Inhibition of Glutamine Synthetase in A549 Cells During Hyperoxia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v. 27, p. 99 – 106, 2002.

MOTA, M. P; FIGUEIREDO, P. A; DUARTE, J. A. Teorias Biológicas do Envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.

McCAULEY, R. D.; HEEL, K.; HALL, J. C. Enteral branched-chain amino acids increase the specific activity of jejunal glutaminase and reduce jejunal atrophy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 12, p. 429 – 433, 1997.

NAKAI, A. et al. HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. **Molecular and cellular Biology**, v. 17, n. 1, p. 469 – 481, 1997.

NOBLE, E. G. Heat shock proteins and their induction with exercise. In: NOBLE, E.G.; LOCKE, M. **Exercise and the stress response: the role of stress proteins**, 2002. p. 43 – 61.

OEHLER, R. et al. Glutamine depletion impairs cellular stress response in human leucocytes. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 17 – 21, 2002.

OEHLER, R.; ROTH, E. Glutamine metabolism. In: CYNOBER, L. A. **Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition**, 2004. p. 169 – 180.

OGURA, Y. et al. Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, p. 1600 – 1607, 2008.

OLIVEIRA JUNIOR, L. P. **Indução da síntese de proteínas de choque térmico (HSP) mediada pelo óxido nítrico em resposta ao exercício de resistência**. Porto Alegre, 2005. 108p. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

ORYAN, A. et al. Hepatoprotective effects of whey protein isolate against acute liver toxicity induced by dimethylnitrosamine in rat. **Comp Clin Pathol**, v. 20, p. 251 – 257, 2011.

PACHECO, M. T. B.; *et al.* Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 2, p. 333 – 338, 2005 .

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

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

PAROO, Z.; DIPCHAND, E.S.; NOBLE, E. G. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. 245 – 251, 2002.

PASQUALE, M. G. Conditionally Essential Amino Acids. In: _____. **The Anabolic Edge**, 2008. p. 253 – 295.

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

PERNG, Wann-Cherng. et al. Glutamine attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, p. 56 – 61, 2010.

PERRONE, F. et al. Effects of preoperative feeding with a whey protein plus carbohydrate drink on the acute phase response and insulin resistance. A randomized trial. **Nutrition Journal**, v.10, p. 1- 7, 2011.

PETERANDERL, R.; NELSON, H. C. M. Trimerization of the Heat Shock transcription factor by a triple-stranded α -helical coiled-coil. **Biochemistry**, v. 31, p. 12272 – 12276, 1992.

PETERSEN, B.L.; WARD, L. S.; BASTIAN, E. D. et al. whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. **Nutrition Journal**, v.8, n.47, p. 1 – 5, 2009.

PINEL, C. et al. Alterations in glutamine synthetase activity in rat skeletal muscle are associated with advanced age. **Nutrition**, v. 22, p. 778 – 785, 2006.

PHANVIJHITSIRI, K. et al. Heat induction of heat shock protein 25 requires cellular glutamine in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 291, p. 290 – 299, 2006.

QIAN, YONG-ZHEN. et al. Dissociation of Heat Shock Proteins expression with ischemic tolerance by whole body hyperthermia in rat heart. **Journal Mol. Cell. Cardiol.**, v. 30, p. 1163 – 1172, 1998.

QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S. EVANS, T. W. Albumin: Biochemical Properties and Therapeutic Potential. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1211 – 1219, 2005.

RAMOS, A. G. **Utilização das proteínas do soro lácteo pelo rato jovem.** Campinas, 2001. 95p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571 - 573, 1962.

ROCHE, M. et al. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, v. 582, p. 1783 – 1787, 2008.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 563 – 575, 2008.

ROHDE, M.; DAUGAARD, M.; JENSEN, M. H. et al. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes & Development*, v. 19, p. 570 – 582, 2005.

SALWAY, K. D.; GALLAGHER, E.J.; PAGE, M. M. et al. Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, p. 287 – 97, 2011.

SAMELMAN, T. R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. **Experimental Physiology**, v. 85, n. 1, p. 97 – 102, 1999.

SANTORO, M. G. Heat Shock Factors and the control of the stress response. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 55 – 63, 2000.

SANTOS, R. V. T. **Efeitos do treinamento extenuante sobre o metabolismo de glutamina e seu papel na interação entre o exercício físico, sistema imunológico e tecido muscular**. São Paulo, 2004. 159p. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; ROSA, L. F. B. P. C. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sciences**, v. 80, p. 573 – 578, 2007.

SEVANIAN, A.; DAVIES, K. J. A.; HOCHSTEIN, P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, n. 11, p. 29 – 34, 1991.

SILVA, L. B. C. et al. Effect of nutritional supplementation with milk whey proteins in amyotrophic lateral sclerosis patients. **Arq Neuropsiquiatr**, v.68, n.2, p.263 – 268, 2010.

SILVER, J. T.; NOBLE, E. G. Regulation of survival gene hsp70. **Cell Stress and Chaperones**, 2011.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **Am. Journal Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 292, p. 1839 – 1845, 2007.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira Medicina Esporte**, Niterói, v. 10, n. 4, p. 308 – 313, 2004.

SCHUTTE, J. E. et al. Total plasma creatinine: an accurate measure of total striated muscle mass. **J. Appl. Physiol.**, v. 51, n. 3, p. 762 – 766, 1981.

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

SPITSIN, S. V. et al. Comparison of uric acid and ascorbic acid in protection against EAE. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33, n. 10, p. 1363 – 1371, 2002.

STETLER, R. A. et al. Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, v. 92, p. 184 – 211, 2010.

SHI, Y.; MOSSER, D. D.; MORIMOTO, R. I. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. **Genes & Development**, v. 12, p. 654 – 666, 1998.

SHIMOMURA, Y. et al. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. **The Journal of Nutrition**, v.136, p. 529 – 532, 2006.

SKIDMORE, R. GUTIERREZ, J. A.; GUERRIRO, V.; KREGAL, K. C. HSP70, induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. **Am J Physiol**, v. 268, p. 92 – 97, 1995.

SMOLKA, M. B. et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. 1539 – 1545, 2000.

SQUADRITO, G. L. et al. Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the Mechanism of Neuroprotection by Uric Acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 376, n. 2, p. 333 – 337, 2000.

STAHL, J.; MORROW, S. A. M. Inhibition of glutamine synthetase in A549 cells during hyperoxia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v. 27, p. 99 – 106, 2002.

STARNES, J. W. Stress proteins and myocardial protection. In: NOBLE, E. G.; LOCKE, M. **Exercise and the stress response: the role of stress proteins**, 2002. p. 97 – 117.

TAEGTMEYER. Glycogen in the heart an expanded view. **Journal of Molecular and cellular cardiology**, v. 37, p. 7-10, 2004.

TANG, J. E. et al. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. **Journal Appl. Physiol.**, v. 107, p. 987 – 992, 2009.

ULMASOV, K. A. et al. Heat shock proteins and thermoresistance in lizards. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, p. 1666 – 1670, 1992.

VERDIER, L. et al. Do sex steroids regulate glutamine synthesis with age?. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 282, p. 215 – 221, 2002.

XUE, H. et al. Bolus oral glutamine protects rats against CPT-11-induced diarrhea and differentially activates cytoprotective mechanisms in host intestine but not tumor. **The journal of Nutrition**, v. 138, p. 740-746, 2008.

WAGENMAKERS, A. J. M. Metabolism of branched-chain amino acids in man. In: CYNOBER, L. A. **Metabolic & Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition**. 2^{ed.}, 2004. p. 123 – 133.

WALTHER, C. P. et al. Interdialytic creatinine change versus predialysis creatinine as indicators of nutritional status in maintenance hemodialysis. **Nephrol. Dial Transplant**, p. 1- 7, 2011.

WANG, J. et al. Whey peptides improve wound healing following caesarean section in rats. **British Journal of Nutrition**, v 104, p. 1621–1627, 2010.

WANG, Y.; WATFORD, M. Glutamine, insulin and glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in C2C12 myotubes, Hep G2 hepatomacells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 594 – 600, 2007.

WARING, W. S.; CONVERY, A.; MISHRA, V. et al. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. **Clinical Science**, v. 105, p. 425 – 430, 2003.

WARING, W. S. et al. Uric Acid Restores Endothelial Function in Patients With Type 1 Diabetes and Regular Smokers. **Diabetes**, v.55, p. 3127 – 3132, 2006.

WILDMAN, R. E. C. Branched-Chain Amino Acids. In: WOLINSKY, I.; DRISKELL, J. **Nutritional Ergogenic Aids**. 2004. p. 47 – 59.

WISCHMEYER, P. E. et al. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, p. 2403 – 2410, 2001.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine and Heat Shock Protein Expression. **Nutrition**, v. 18, p. 225 – 228, 2002.

WISCHMEYER, P. E. et al. Glutamine Attenuates Tumor Necrosis Factor-Release and Enhances Heat Shock Protein 72 in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Nutrition**, v. 19, p. 1- 6, 2003.

YEH, Chen-Hsiung. et al. Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. **Leukemia Research**, v. 34, p. 605 – 609, 2010.

ZIEGLER, T. R. et al. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. **Intensive Care Med**, v. 31, p. 1079 – 1086, 2005.

ZOPPI, C. C. **Efeitos do treinamento e do “overtraining” no metabolismo oxidativo, enzimas antioxidantes e HSP72 em diferentes fibras musculares.** Campinas, 2004. 96p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

ZHONG et al. Intestinal growth and morphology is associated with the increase in heat shock protein 70 expression in weaning piglets through supplementation with glutamine. **J. Anim. Sci.**, v. 89, p. 3634 – 3642, 2011.

ARTIGO

4. ARTIGO

Hydrolyzed whey protein enhances the heat shock protein (HSP70) in rats

Carolina Soares de Moura¹

Pablo Christiano Barboza. Lollo¹

Priscila Neder Morato¹

Everardo Carneiro²

Jaime Amaya-Farfan¹

1- Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil.

2- Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil.

Corresponding author:

Jaime Amaya-Farfan

E-mail jaf@fea.unicamp.br

Telephone +55 19 3521 4075 / **Fax** +55 19 3521 4060

Address: Laboratory of Nutrition and Metabolism / Department of Food and Nutrition, Faculty of Food Engineering, CP 6121, University of Campinas – UNICAMP.

Abstract

Whey protein is rich in BCAAs which is a source of nitrogen for the endogenous synthesis of glutamine by way of the enzyme glutamine synthetase. The main objective of the present study was to evaluate the effects of consuming whey proteins on the heat shock protein HSP70 and glutamine. Forty-eight male Wistar rats (300g) were first divided into a sedentary group and an exercised group, and each group further divided into 3 sub-groups according to the protein source: casein (CAS), whey protein (WP) and hydrolyzed whey protein (WPH). The results indicated that the consumption of WPH enhanced HSP70 in the lung and in the gastrocnemius and soleus muscles. The concentration of protein carbonyls decreased in the plasma for the groups that consumed WP and WPH, and in the gastrocnemius muscle only for the WPH group. In the sedentary group, WP and WPH increased the free glutamate, only WPH increased isoleucine and leucine levels in the plasma. In the exercised group, the WPH group reduced the concentrations of glutamate, leucine and glutamine and increased the concentration of glutamine synthetase in the soleus muscle, also increasing the corticosterone levels. These results suggest probable use of amino acids precursors of the glutamine synthesis that were reduced and glutamine itself could be used to enhance the HSP70 levels. The data indicated no liver or kidney damage as measured by the markers AST, ALT and urea. The results indicate that the intake of WPH can enhance HSP70 and that the enzyme glutamine synthetase could be involved in the mechanism of increasing the production of HSP70.

Key words: glutamine synthetase, HSP70, whey protein, BCAAs.

Introduction

Whey protein (WP) represents approximately 20% of the proteins present in bovine milk, and has been recognized for its high nutritive value, good digestibility, fast absorption and peak in plasma amino acids ⁽¹⁾. WP has been the object of many investigations due to a series of properties such as modulating the enzymatic antioxidant system⁽²⁾, maintenance of the muscle mass⁽³⁾, improving the nutritional status of patients with Amyotrophic lateral sclerosis – ALS⁽⁴⁾, antistress effect ⁽⁵⁾ among others.

The heat shock proteins (HSPs) were initially discovered by Feruccio Ritossa in 1962, when observing the chromosomes of *Drosophila melanogaster* submitted to heat shock treatment by increasing the temperature to near-lethal levels, by way of which this class of proteins was codified and expressed⁽⁶⁾.

This is a natural endogenous defense system capable of protecting against and repairing damage, which is activated the moment any alteration in organic homeostasis occurs, including increases in temperature, generation of reactive oxygen species (ROSs), ischemia, hypoxia and a privation of glucose, amongst other types of physiological stress, which can be associated with the practice of physical exercise ^(7,8). Thus exercise could be a practical way to induce and study organic alterations such as heat stress ⁽⁹⁾.

HSPs confer greater cell tolerance and resistance against a variety of aggressor agents in an attempt to maintain cell integrity, structure and function, promoting cell survival during periods of stress. In the presence of stressful

conditions, these proteins are responsible for repairing or correctly folding the damaged cellular proteins, or assisting in their elimination if they become irreversibly damaged ⁽¹⁰⁾.

The heat shock protein 70 family (HSP70 family or HSP72 family) is an easily inducible and also the most studied group, because it is readily expressed and highly active and has been considered as a complementary antioxidant system ^(7,11).

It is known that whey protein contains generous amounts of branched-chain amino acids (BCAAs), and these amino acids could participate in the endogenous synthesis of glutamine by way of the enzyme glutamine synthetase ^(1,3,12).

We hypothesize that hydrolyzed whey proteins could elicit the enhanced production of HSP70 when fed to rats submitted to exercise as a source of stress. It is also hypothesized that the enzyme glutamine synthetase is involved in the mechanism of enhancing of the HSP70.

Material and methods

Animals

Forty-eight male Wistar rats (21-day old, specific-pathogen free) reared in the Multidisciplinary Center for Biological Research, University of Campinas, SP, Brazil, were housed (~22 °C, 55% RH, inverted 12-hour light cycle) in individual growth cages, with free access to commercial feed (Labina, Purina, Brazil) and water *ad libitum*, until they reached 150g. The research was approved by the

Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Campinas (CEEA-UNICAMP, protocol 2297-1).

Diets

The diets were prepared based on the AIN93-G diet⁽¹³⁾, using either whey protein (WP), whey protein hydrolyzate (WPH) or casein (CAS) as the only protein source. Table 1 shows the nutrient composition of each diet, Table 2 shows the amino acid composition of the protein sources and Table 3 the molecular weight distribution and peptide profile of the WPH.

Table 1. Diets composition (g/kg of diet)

Ingredient	Diet with CAS (g)	Diet with WP (g)	Diet with WPH (g)
Corn Starch	437.926	427.31	425
Dextrinised starch	145.42	141.9	141.13
Sucrose	110.16	107.5	106.92
WPH	-----	-----	156.4189
WP	-----	152.77	-----
CAS	135.968	-----	-----
Vegetable oil	70	70	70
Fiber (cellulose)	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10
L-Cystine	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014

Table 2. Amino acid profile of the protein sources (g/100g)

Amino Acid	CAS	WP	WPH
Asparagine	5.96	11.52	11.16
Glutamate	19	18.82	17.99
Serine	4.68	5.31	5.04
Glycine	1.39	1.74	1.75
Histidine	2.12	1.31	1.27
Arginine	3.03	2.66	2.31
Threonine	3.56	7.64	7.4
Alanine	2.3	5.11	4.89
Proline	8.85	5.89	5.68
Tyrosine	4.57	2.88	2.78
Methionine	2.32	2.51	2.52
Cystine	0.16	1.48	1.6
Isoleucine	4.51	6.88	6.97
Leucine	7.62	10.14	10.15
Valine	5.36	5.68	5.81
Phenylalanine	3.89	2.86	2.78
Lysine	6.62	9.2	9.48
Total BCAA	17.49	22.7	22.93

Table 3. Molecular weight distribution and peptide profile of the WPH

Daltons	%
> 20.000	17
5.000 – 20.000	15.6
1.000 – 5.000	26.7
< 1.000	40.5

Experimental procedures

When the animals reached 150 g of body mass they were randomized and divided into six groups, corresponding to the three diets (CAS, WP and WPH) and two exercise regimes (S and E, for sedentary and exercised, respectively).

The experiment was conducted for 3 weeks of treatment with the experimental diets. The animals in the exercised group were submitted to five exercise sessions on a treadmill at 22 m·min⁻¹ for 30 minutes during the last week of treatment⁽¹⁴⁾. The animals were sacrificed, following a 6-hour recovery period after the last session of exercise^(15,16). Immediately after sacrifice, the gastrocnemius, soleus, spleen, lung, kidney and heart were collected and stored in liquid nitrogen until analyzed.

Protein extraction and immunoblotting – The protein content of the supernatants was determined by the Lowry method⁽¹⁷⁾. For immunoblotting, tissue homogenates were subjected to SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The blots were probed with the appropriate antibodies (Stressgen, Victoria, B.C., Canada Ref SPA810 diluted 1:2000) to assess the protein level of the HSP70, glutamine synthetase (GS) (Abcam, Cambridge, Ref. ab64613 diluted 1:1000) and tubulin (Abcam, Cambridge, Ref. ab44928 diluted 1:1000). The appropriate secondary mouse antibody conjugated to peroxidase and the BM chemiluminescence blotting system (Abcam) were used for detection. The bands were visualized using a GE, ImageQuant, model LAS 4000 instrument. Specific

protein bands present in the blots were quantified by the digital program ImageJ (v. 1.44 for Windows).

Amino acid composition of the protein sources and plasma free amino acids

The protein sources were hydrolyzed at 110°C in 6M HCl for 24 hours. The hydrolyzed samples were then diluted in deionized water, α -aminobutyric acid added as the internal standard (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO), and derivatized with phenylisothiocyanate. The PTH-derivatives were chromatographed using a Luna C-18, 100 Å; 5 μ , 250 x 4.6 mm (00G-4252-EQ) column, at 50 °C⁽¹⁸⁾. The plasma free amino acids were extracted with trichloroacetic acid, derivatized and chromatographed as described above.

Biochemical parameters – Blood samples were collected, kept at 4°C, and centrifuged at 3000xg (4°C, 15 min) to obtain the serum and plasma. The serum were assessed for uric acid, creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), total protein, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine and urea using spectrophotometric (Beckman-Coulter DU 640, USA) determinations employing Laborlab kits (São Paulo, Brazil). Glucose was determined in the blood using an Accu-Chek Active glucometer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Body temperature was taken both before and after the last exercise session with an infrared thermometer (Geratherm Medical Diagnostic Systems, Geschwenda, Germany). Corticosterone (CORT) was

determined using an ELISA enzyme immunoassay kit (Assay Designs – Stressgen, catalog.900-097)

Protein carbonyls

Samples of the gastrocnemius muscle (150 – 200mg) were mixed and homogenized in 3 mL of 50mM phosphate buffer, pH7.4, containing (0.1% digitonin, and a cocktail of antiproteases (40µg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 µg/mL leupeptin, 7 µg/mL, pepstatin, 5 µg/mL aprotonin and 1 mM EDTA). The plasma (100uL) was directly homogenized in 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). The carbonyl groups reacted with the DNPH, and after successive deproteinization and dissolution in guanidine hydrochloride procedures, were read in a spectrophotometer (EPOCH, Biotech micro plate reader) in the spectra from 355 to 390 nm, according to a previously described method ⁽¹⁹⁾. A standard curve was constructed by dissolving bovine serum albumin (BSA) in guanidine hydrochloride, and the results expressed in ng/mg of protein.

Determination of Glycogen

Glycogen was determined in the heart and in the gastrocnemius muscle (35 – 50 mg) according to a previously described method ⁽²⁰⁾. The absorbance was read in a spectrophotometer (Beckman Coulter DU 640, USA) at 490 nm and the results expressed as g/100g of tissue.

Statistical Analysis

The data were analyzed by ANOVA, followed by the Duncan post-hoc test, using the software SPSS, version 17.0. The criterion of significance of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results

Temperature

The body temperature was determined as a datum for the induction of heat stress from exercise. Figure 1 shows that regardless of the diet, the mean temperature for all the groups was considerably elevated as a result of the exercise.

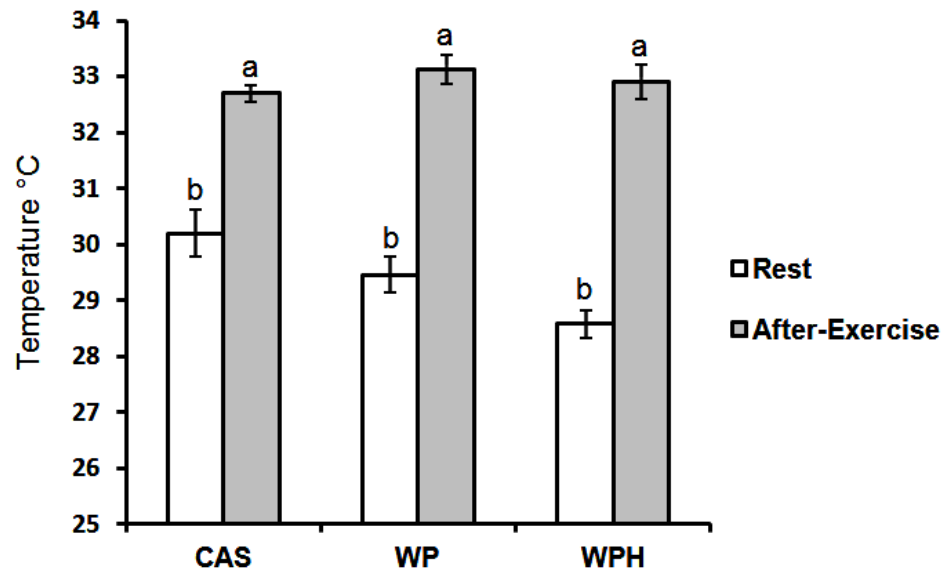


Figure 1. Mean and standard error for the body temperature of the exercised animals at rest and after exercise Diets: Casein (CAS), whey protein (WP), whey protein hydrolyzed (WPH). Different letters represent statistical differences between rest and exercise for each diet.

Carbonyl proteins

Circulating and tissue proteins tend to be chemically modified in the presence of reactive oxygen species (ROS) forming carbonyls proteins in the body. Dietary proteins showed to have influenced the extent of carbonylation. In Figure 2 A, one can see that the plasma of those animals consuming both the WP and WPH exhibited a decrease in the concentration of carbonyl proteins than casein, whereas only the WPH was able to sustain the lower levels in the gastrocnemius muscle (Figure 2 B).

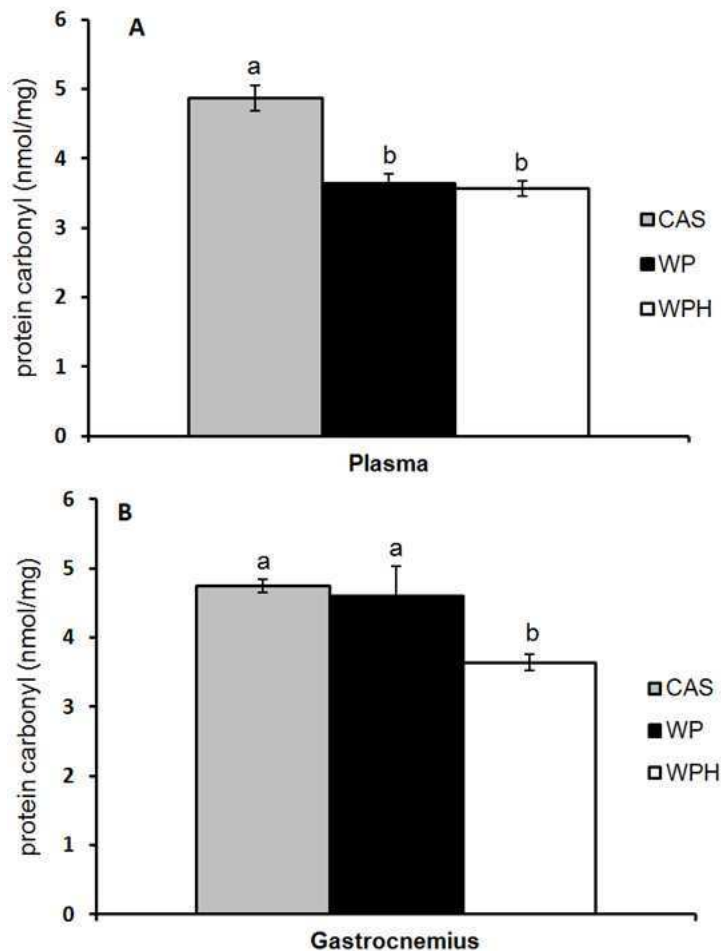


Figure 2. Concentration of protein carbonyls in the exercised group for the different protein sources. The values are expressed as the mean plus standard error. Different letters represent statistical differences. A) plasma protein carbonyl; B) gastrocnemius protein carbonyl.

HSP70

Figure 3 shows the blot concentrations and patterns of the HSP70 in the lung, soleus and gastrocnemius muscles, kidney, heart and spleen in the exercised group. The consumption of WPH elicited a greater HSP production response in lung, and in the soleus and gastrocnemius muscles, but not in the spleen, kidney and heart. Figure 4 shows the concentration of HSP70 found in the same tissues in the sedentary group.

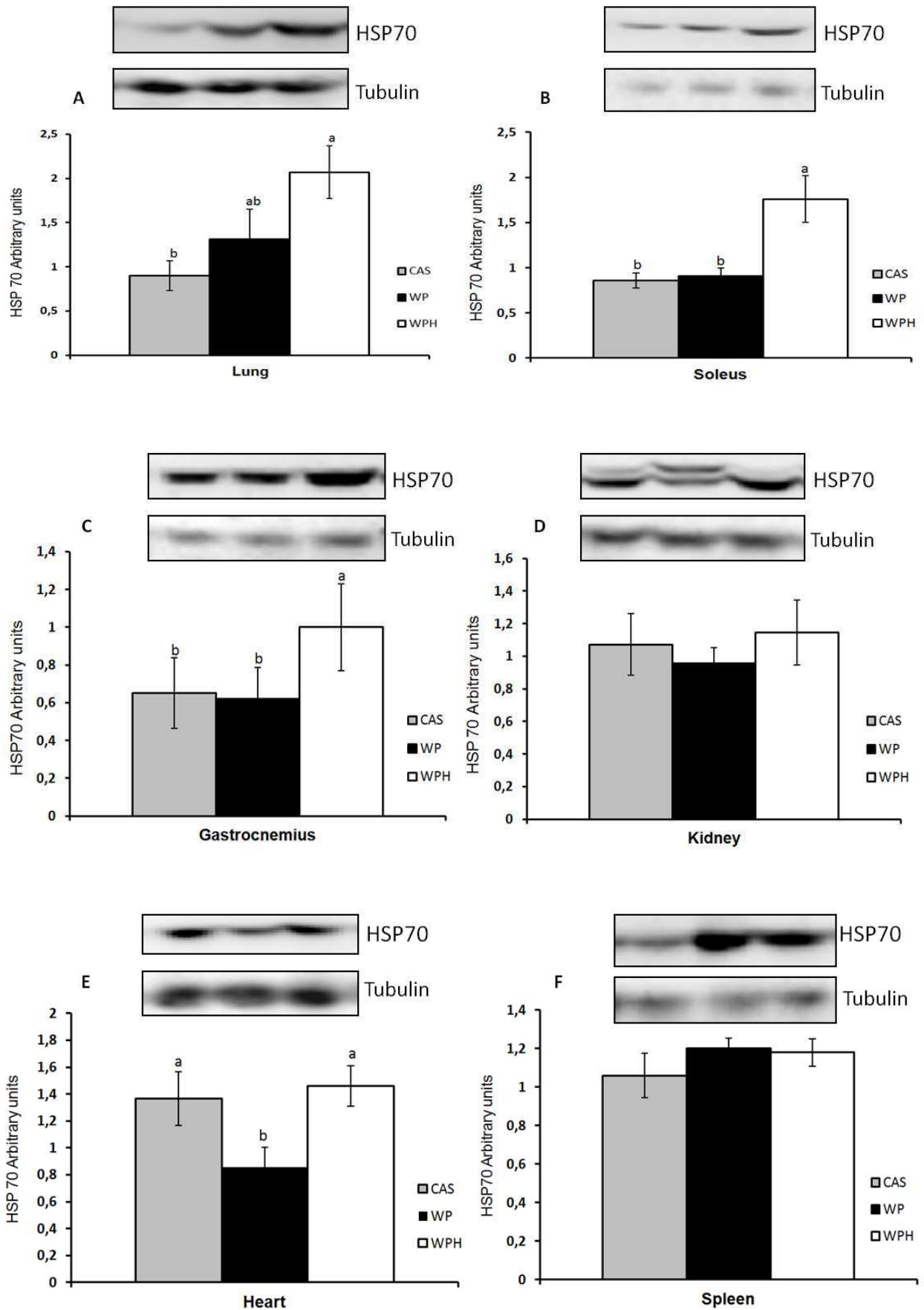


Figure 3. Western blot of HSP70 in the exercised group. Different letters represent statistical differences. A) lung; B) soleus; C) gastrocnemius; D) kidney E) heart; F) spleen.

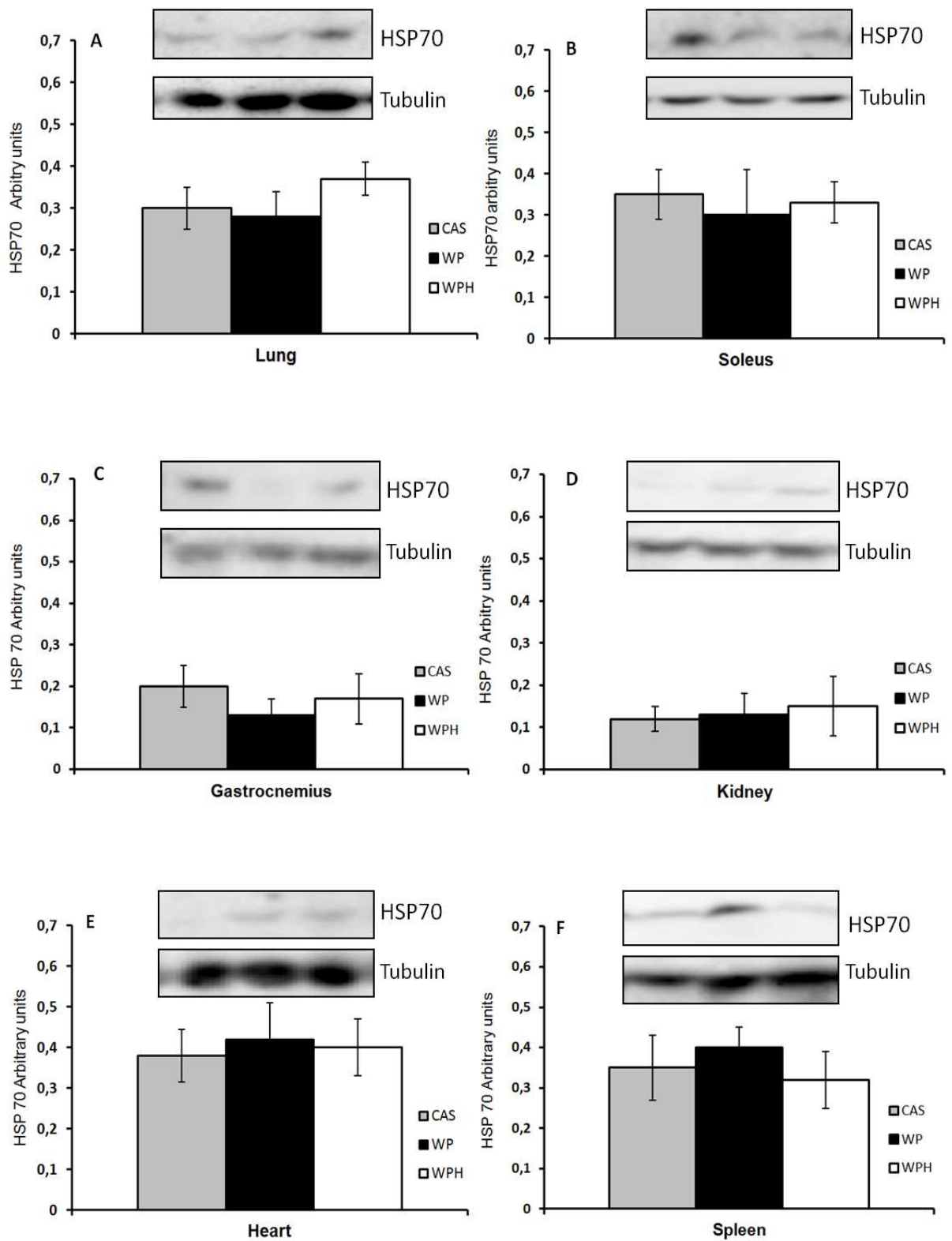


Figure 4. Western blot of HSP70 in the sedentary group. Different letters represent statistical differences. A) lung; B) soleus; C) gastrocnemius; D) kidney E) heart; F) spleen.

Glutamine synthetase

The blot concentration of glutamine synthetase is shown in Figure 5. These are among the tissues that have been reported to exhibit substantial levels of GS activity⁽²¹⁾ and the data revealed that only the WPH diet produced an elevation of the enzyme in the soleus, while no effect was observed in lung.

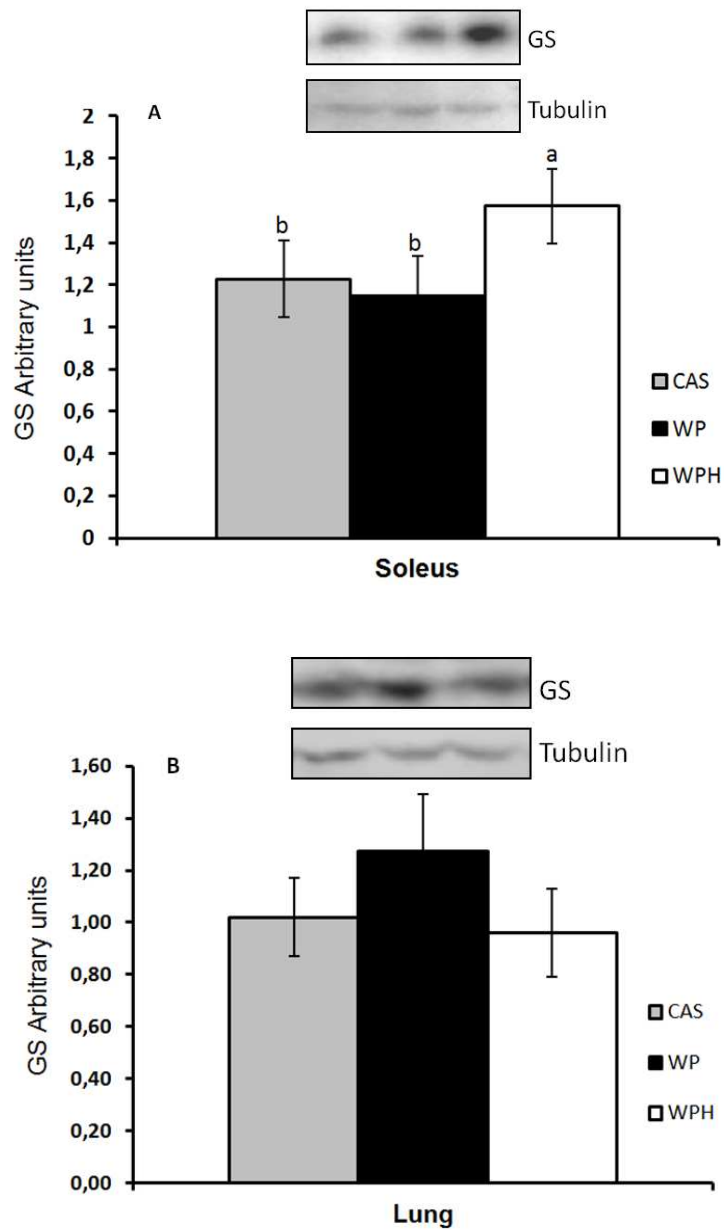


Figure 5. Western blot of Glutamine synthetase in exercised group. Different letters represent statistical differences. A) soleus; B) Lung.

Glycogen

The glycogen stores were determined in both the gastrocnemius and heart muscles (Figures 6 A and B). These data showed that the whey proteins promoted a greater store of glycogen in both muscles than casein. In the case of the gastrocnemius muscle (Figure 6 A), the WPH was the dietary protein that produced the greatest amount of glycogen in the sedentary group, while in the exercise group both WP and WPH diets caused a substantial increase. As for the heart muscle, both WP and WPH produced similar responses, surpassing casein in the sedentary animals. Exercise, however, removed the difference between diets (Figure 6 B).

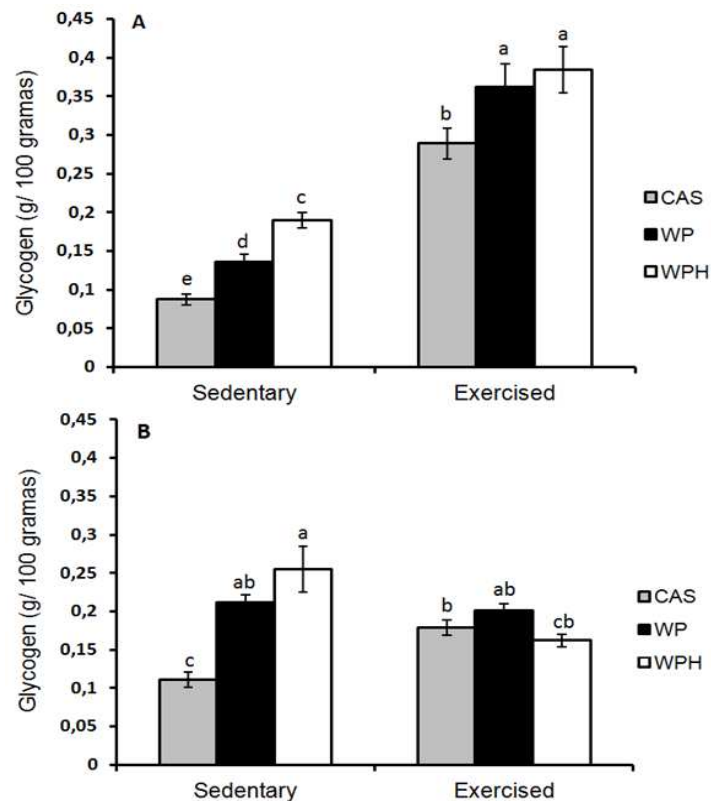


Figure 6. Glycogen concentration (g/100g tissue) in the different groups according to diet and exercise. The values are expressed as the mean plus standard error. Different letters represent statistical differences. A) gastrocnemius glycogen; B) heart glycogen.

Blood Parameters

The data in Table 4, show that consumption of the WPH decreased the blood glucose levels in the sedentary animals, yet remaining within normal values. However, when the animals were submitted to the exercise, the diet exerted no influence on the blood sugar levels. As far as the uric acid concentration was concerned, the diets containing hydrolyzed whey protein produced higher levels in the exercised groups than the casein, while in the sedentary groups the values showed no alteration. The exercise alone increased the uric acid levels for the WP and WPH diets, but not for the casein diet. The remaining parameters, CK, LDH and urea appeared to be unaltered in all groups. The use of WP in the diet increased the blood creatinine levels, independent of physical activity. There was a difference among the diets indicating that the whey protein, both non-hydrolyzed and hydrolyzed, promoted an elevation of the total blood proteins in both the sedentary and exercised groups. Serum albumin responded in a similar form, only in this case the exercise promoted an increase of its own. For the liver marker AST, the data revealed that while the diet had no effect, exercise alone was able to increase the values. The ALT parameter, however, showed a decrease in the sedentary group that consumed WPH, but showed no difference in the exercised groups. The corticosterone concentration was greater in the exercised than in the sedentary animals, independent of the diet consumed. However for the exercised groups, the WPH resulted the highest levels of this hormone.

Table 4. Blood Parameters

Parameter	Sedentary			Exercised		
	CAS	WP	WPH	CAS	WP	WPH
Glucose (mg·dL ⁻¹)	156 ^a ± 6.11	151 ^{ab} ± 3.23	135 ^b ± 5.82	141 ^{ab} ± 5.02	141 ^{ab} ± 5.37	136 ^b ± 3.14
Uric acid (mg·dL ⁻¹)	1.62 ^{bc} ± 0.14	1.27 ^c ± 0.16	1.62 ^{bc} ± 0.35	1.99 ^{bc} ± 0.35	2.32 ^{ab} ± 0.25	2.89 ^a ± 0.38
LDH (U·L)	726.41 ± 28.64	743.55 ± 17.2	730.67 ± 12.75	756.24 ± 35.13	796.07 ± 42.01	749.7 ± 44.83
CK (U·L)	1112.62 ± 91.31	1105.45 ± 47.09	1071.29 ± 51.9	1144.97 ± 90.15	1240 ± 49.97	1074 ± 93.73
AST (U·L)	112.98 ^{bc} ± 10.06	103.36 ^c ± 8.92	104.74 ^c ± 9.5	145.4 ^a ± 7.55	146.09 ^a ± 10.40	136.52 ^{ab} ± 9.89
ALT (U·L)	24.11 ^{ab} ± 2.38	19.13 ^{bc} ± 0.92	17.8 ^c ± 1.9	24.46 ^a ± 1.35	27.83 ^a ± 1.59	23.63 ^{ab} ± 1.35
Total protein (g·dL ⁻¹)	5.75 ^b ± 0.2	7.06 ^a ± 0.56	6.62 ^a ± 0.34	6.55 ^b ± 0.17	7.25 ^a ± 0.27	7.27 ^a ± 0.31
Albumin (g·dL ⁻¹)	3.98 ^c ± 0.08	4.71 ^b ± 0.1	4.43 ^b ± 0.08	4.51 ^b ± 0.07	5.1 ^a ± 0.25	5.12 ^a ± 0.18
Urea (mg·dL ⁻¹)	18.23 ± 1.69	17.52 ± 1.71	20.09 ± 1.94	19.14 ± 1.75	18.96 ± 1.79	18.86 ± 1.28
Creatinine (mg·dL ⁻¹)	0.50 ^c ± 0.04	0.60 ^{ab} ± 0.02	0.47 ^c ± 0.08	0.53 ^{bc} ± 0.03	0.63 ^a ± 0.03	0.53 ^{bc} ± 0.02
CORT (ng·mL ⁻¹)	99 ^c ± 17.35	87.44 ^c ± 8.79	86.59 ^c ± 9.65	162.75 ^b ± 18.32	161.10 ^b ± 15.05	206.91 ^a ± 22.02

The values are expressed as the mean and standard error. Different letters represent statistical differences. Diets: Casein (CAS), whey protein (WP), whey protein hydrolyzed (WPH).

Free amino acids in the plasma

Table 5 shows the plasma free amino acid profiles for the three diets both in the sedentary and exercised animals. With the exception of aspartic acid, significant differences were observed for all the amino acids as a result of either diet or exercise. The differences found for glutamate, glutamine and the branched-chain amino acids (BCAAs) are worthy of mention. In general, it can be seen that in the sedentary animals, the whey protein diets produced an increase in the levels of glutamate, but only WPH increased the levels of leucine and isoleucine in the sedentary animals, whereas exercise tended to promote a decrease in most of them. Glutamine showed to be decreased in the casein and mostly WPH exercised group, whereas the BCAAs valine decreased in all diets with exercise. Also, isoleucine was observed to increase with exercise for all three diets. Glutamate reduced for the WPH diet with the exercise.

Table 5. Free amino acids in the plasma (uMol/L)

Amino acid	Sedentary			Exercised		
	CAS	WP	WPH	CAS	WP	WPH
Aspartic acid	65.3 ± 2.3	68 ± 1.22	67 ± 1.87	70 ± 0.57	67 ± 2.9	68.33 ± 2.4
Glutamate	28.5 ^b ± 4.3	35 ^a ± 2.82	39.5 ^a ± 2.4	42.5 ^a ± 4.9	32 ^{ab} ± 3.7	29.5 ^b ± 4.6
Hydroxyproline	46.65 ^a ± 2.1	45.3 ^{ab} ± 1.24	47.33 ^a ± 2.3	44.33 ^{ab} ± 1.8	39.3 ^{bc} ± 0.23	37 ^c ± 1.7
Asparagine	83 ^{ab} ± 4.5	77 ^{bc} ± 4.94	90.66 ^a ± 1.4	77.33 ^{bc} ± 3.4	75 ^{bc} ± 2.6	66 ^c ± 1.7
Serine	182.5 ^a ± 2	104.5 ^c ± 3.17	118.33 ^{bc} ± 7.8	136.6 ^b ± 7.7	80.5 ^d ± 4.9	112.6 ^c ± 5.5
Glutamine	826.33 ^a ± 27.1	835.3 ^a ± 34.4	795 ^a ± 20	697.33 ^b ± 29.8	773.3 ^{ab} ± 14.2	651.3 ^c ± 10.6
Glycine	80.5 ^d ± 10.7	105 ^{bc} ± 6.7	90 ^{cd} ± 4.6	125.5 ^{ab} ± 9.5	52 ^e ± 8	136 ^a ± 0.5
Histidine	21 ^c ± 2.9	34.66 ^a ± 0.23	30 ^{ab} ± 0.5	23.5 ^c ± 0.8	30.66 ^a ± 4.3	24.5 ^{bc} ± 0.5
Arginine	36.5 ^{ab} ± 4.9	26 ^b ± 4	24.3 ^b ± 6.35	50.5 ^a ± 10.1	48.5 ^a ± 2	49 ^a ± 1
Taurine	87.5 ^c ± 2	123.5 ^b ± 3.1	183.5 ^a ± 0.28	75.5 ^c ± 1.4	119 ^b ± 13.2	130 ^b ± 10
Threonine	353.5 ^b ± 9.5	552 ^a ± 18.3	513 ^a ± 3.67	222 ^c ± 4.2	542 ^a ± 11	547.5 ^a ± 6.6
Alanine	551 ^c ± 25.4	607.5 ^{bc} ± 6.6	690 ^a ± 2.8	487.5 ^d ± 33.1	637 ^{ab} ± 2.8	555.5 ^c ± 24.5
Proline	430 ^a ± 29.9	186.5 ^{cd} ± 7.2	205.6 ^c ± 6.7	260.5 ^b ± 3.7	168.3 ^{cd} ± 3	138.5 ^d ± 5.4
Tyrosine	34.5 ^c ± 2	46.5 ^b ± 3.1	37 ^c ± 2.3	15.32 ^d ± 0.94	54 ^a ± 1.7	52.5 ^{ab} ± 2.5
Valine	135.5 ^a ± 8.4	79 ^b ± 1	90 ^b ± 0.57	80.5 ^b ± 7.7	56 ^c ± 5.7	50 ^c ± 1
Methionine	48 ^{ab} ± 1.2	54 ^a ± 2.8	52 ^a ± 1.63	40.5 ^b ± 7.2	52 ^a ± 2	53 ^a ± 2
Cystine	72 ^a ± 3.5	72 ^a ± 1.41	59.66 ^b ± 1.84	62 ^{ab} ± 1	68 ^{ab} ± 3.6	65.5 ^{ab} ± 4.3
Isoleucine	17.5 ^d ± 3.8	17.65 ^d ± 0.54	37 ^b ± 4.2	27 ^c ± 1.15	33.5 ^{bc} ± 1.4	49 ^a ± 4
Leucine	72.5 ^d ± 10.2	77.5 ^d ± 12.4	131 ^a ± 1	70.5 ^d ± 16.4	112.5 ^b ± 3.6	104.5 ^c ± 2
Phenylalanine	11 ^d ± 3	39.5 ^b ± 0.5	30 ^c ± 2.8	11 ^d ± 0.57	52 ^a ± 2.3	37 ^{bc} ± 4
Tryptophan	149.3 ^{bc} ± 7	172.5 ^{ab} ± 18.7	127.5 ^c ± 6	124 ^c ± 7.5	162.5 ^{ab} ± 6	189 ^a ± 5.7
Lysine	426 ^c ± 20.1	597 ^a ± 29.4	492 ^b ± 3.4	394 ^c ± 19.6	448 ^{bc} ± 12.7	485.5 ^b ± 11.2

Discussion

No reports were found in the literature relating the effect of whey protein on the production of HSP70. Independent of the type of diet, exercise induced an increase in body temperature, which seemed to have stimulated a concomitant rise in HSP70, consistent with a state of altered homeostasis ⁽²²⁾. The HSP70 is strongly induced by different types of stress while its expression is very low or undetectable in normal homeostasis ⁽²³⁾, consistent with our data for sedentary animals. It can also be seen that although the rise in temperature was essentially the same for all groups, the exercised animals that consumed the WPH showed the greatest enhancement in the levels of HSP70 for the gastrocnemius, soleus and lung. This finding suggests that the consumption of hydrolyzed whey protein can have the ability to magnify the defense capacity of the HSP70 system in the animal, when submitted to the heat shock from exercise.

It has been well documented that the administration of glutamine can promote an increase in HSP70 as an agent protecting against various forms of injury, in a dose-dependent way ⁽²⁴⁾. Although it has not yet been proven, a mechanism has been proposed by which glutamine may be involved in a greater production of HSP70, via the enhancement of the hexosamine biosynthetic pathway ⁽²⁵⁾.

It has been suggested that the protective effects of glutamine may be related to the increase in the expression of heat shock proteins (HSPs) ^(26, 27, 28). When the HSP70 gene was silenced, the administration of glutamine did not

reduce the damage markers, the author suggested that HSP70 expression was required for glutamine effects on survival of injured tissue ⁽²⁹⁾.

Besides glutamine, the whey protein contains generous amounts of BCAAs, which can be substrates for the endogenous synthesis of glutamine exclusively by glutamine synthetase. Glutamine synthetase, is a key enzyme in the production and homeostasis of glutamine ⁽³⁰⁾.

The BCAAs from whey proteins are a source of nitrogen for the synthesis of glutamine, the amino group being transaminated with α -keto glutarate for the formation of glutamate. The glutamate then combines with the ammonium ion under the action of glutamine synthetase, finally forming glutamine ⁽¹²⁾.

The free amino acids isoleucine, leucine and glutamate in the plasma of sedentary animals that consumed the WPH diet, increased in comparison with those that consumed casein, showing that there were larger amounts of substrate in this group for the eventual biosynthesis of glutamine. However, with physical exertion, the levels of glutamine decreased for all groups, consistent with the knowledge that exercise alone can promote the lowering of plasma glutamine ⁽³¹⁾. It can be seen that the decrease in glutamine was greatest in the WPH group, which was exactly the one showing the highest increase in HSP70, thus suggesting that this amino acid can be used, at least in part, to promote the substantial production of HSP70.

In addition, there were reduction in the valine, leucine and glutamate (amino acids glutamine substrates) in the WPH exercised group. In association with the

above mentioned decreases in the plasma concentration of the glutamine substrates, Figure 4 shows an increase in the amount of glutamine synthetase enzyme in the soleus of the animals that consumed the WPH, suggesting the probable use of amino acids precursors. In the lung, no difference due to the diet was observed, and this may be consistent with the notion that skeletal muscle, and not lung, is the principal active tissue for the synthesis of glutamine by glutamine synthetase, being responsible for about 70% of the total production of this amino acid in the body ⁽³²⁾.

Stress states associated with increased endogenous glucocorticoid release (e.g., exercise) as part of the response to stress, have been shown to increase GS in the muscle ⁽³³⁾. Regarding the relevance of glucocorticoid hormones on the activation of GS, ⁽³⁴⁾ showed that rats unable to produce corticosterone were also unable to respond to stress via the increased production of GS. Thus it should be pointed out that, according to the present data, the WPH diet, besides promoting a considerable increase in GS, was also the one that produced the highest levels of corticosterone, consistent with the notion that corticosterone influences GS .

Considering that there was a reduction in the amount of carbonyls proteins in the gastrocnemius muscle and plasma of the animals that consumed the hydrolyzed whey protein, and that the production of HSP70 was also considerably greater in these animals, it can be suggested that the HSP70 may be responsible for protection against the modification of tissue proteins caused by ROS. Is has

already been suggested that the HSP70 could operate as an auxiliary antioxidant system ⁽¹¹⁾.

The increase in the expression of HSP70 has been related to protect intestinal epithelial cells, reduction tissue damage, faster recovery from traumas, promotion of longevity, mortality reduction and a greater tolerance and resistance to various kinds of cell injury ^(35, 36, 37, 26), since it has been shown to have a strong relationship with the recovery of striated muscle after physical exercise (33). One implication of the current data is that the greater increase in HSP70 could protect cells from stress-induced damage.

Observing the blood parameters, it can be seen there was a reduction in the glucose levels in the sedentary animals that consumed the WPH. Similar results have been reported in the literature ⁽³⁸⁾ suggesting that either whey protein, or some amino acids such as the BCAAs, lysine and threonine exert an insulinotropic effect, which is dose-dependent.

Uric acid is the most abundant and powerful serum antioxidant capable of removing peroxy and hydroxyl radicals, besides transition metals ⁽³⁹⁾. During the process of evolution the majority of mammals lost the enzyme that metabolizes uric acid to make allantoin. At the same time, a more efficient system to reabsorb uric acid by the kidney was developed, making it possible to concentrate greater and greater levels of uric acid in the blood, thus favoring the mechanisms for protecting the body against ROS and gaining a longer life expectancy ⁽⁴⁰⁾.

It has also been reported that the exercise alone can raise the levels of uric acid ⁽⁴¹⁾. In the present experiment, however, this assertion was not confirmed for the casein diet. Nevertheless, the data showed that the exercise did have the effect of increasing the levels of uric acid, provided either the WP or WPH diets were consumed too. Therefore it becomes apparent that the type of dietary protein may be decisive for obtaining a significant amount of uric acid antioxidant protection from exercise.

Physical exercise can structurally rupture or weaken the plasma membrane, leading to the liberation of intracellular proteins into the bloodstream. The quantification of CK and LDH is also a blood indicator related to muscle damage ^(42,43). The results for CK and LDH showed no significant alteration in relation to the diet or exercise. This was probably due to the times of the sample collections, since the rise in the levels of CK and LDH can take from 24 to 72 hours to occur ⁽⁴²⁾.

The consumption of whey proteins indicated there was a preservation effect on the levels of serum albumin and total proteins after exercise. Serum albumin represents nearly 50% of the serum proteins and has antioxidant capacity, additionally assisting with the transport of other antioxidant agents, such as bilirubin and nitric oxide. This molecule can still weakly bind iron so as to make it unavailable to react with hydrogen peroxide thus preventing the formation of hydroxyl radicals ⁽⁴⁴⁾. Similar results were found by other authors ^(45,46). The present results suggest that the consumption of concentrated and hydrolyzed whey

protein could support the properties of the albumin by increasing its concentration, its antioxidant capacity being worthy of mention.

The consumption of WP favored an increase in the levels of serum creatinine, which is produced in the skeletal muscle as a product of creatine. The amount of creatinine synthesized by the body can vary according to the muscle mass, followed by age, ethnic group, gender and diet ⁽⁴⁷⁾. Investigations have suggested that creatinine could be used as an indirect marker to estimate muscle mass, since there is a strong correlation between serum creatinine levels and the amount of lean mass ^(48,49).

The present results on AST, ALT enzymes and urea indicated that neither of the different protein sources used in the present study apparently cause any the liver or kidney damage.

Glycogen is one of the most important forms by which an organism stores energy in the different tissues. Exercise causes a depletion of the glycogen, which can favor a fall in yield and performance and an acceleration of fatigue. The speed of restoration of the glycogen reserves after exercise is one of the most important and determinant factors in the recovery process. This restoration is variable, and can take up to 24 hours, depending o the diet consumed and on the extent of depletion of the glycogen ⁽⁵⁰⁾.

Both hydrolyzed and unhydrolyzed whey proteins were better than casein for the exercised groups with regard to restoring the glycogen reserves in the gastrocnemius muscles, as seen after only 6 hours of recovery.

According to the diet consumed after exercise, the muscle glycogen concentrations, depleted due to the exercise, can increase to levels superior to those at rest (non-exercised muscle) by a process known as super compensation of glycogen ⁽⁵⁰⁾. This corroborates the present results, since all the exercised groups showed higher glycogen levels than the sedentary groups.

It has been suggested that the increase of HSP70 stimulates fat oxidation, elevating citrate synthase e β -hydroxyacyl-CoA deshydrogenase enzyme levels, favoring energy expenditure⁽⁵¹⁾. That could help in the preservation of glycogen as a source of energy, because the animal that expresses more HSP70 would oxidize more fat which would save more glycogen.

The present results are similar to those found by ⁽⁵²⁾, who also found higher glycogen concentrations in rats who consumed hydrolyzed whey proteins after exercise. The mechanism by which the whey proteins stimulate the accumulation of glycogen is still unknown. However a mechanism has been proposed to increase the muscle glycogen that involves an increase in the activity of glycogen synthase.

The glycogen concentration in the heart appears to be related to a greater tolerance and resistance to situations of hypoxia and anoxia, favoring survival and homeostasis of the heart muscle⁽⁵³⁾. The results found suggest that the consumption of WP and WPH was capable of favoring cardiac glycogen in the sedentary groups, whereas the diet did not influence this in the exercised groups.

In summary, the data obtained showed that the consumption of hydrolyzed whey protein resulted in an increase in the concentration of HSP70, which was higher than that produced by the whey protein without prior hydrolysis or by casein. This finding was observed in the gastrocnemius and soleus muscles, and lung tissue, but not in the spleen, kidney or heart. The data also suggested that the enzyme glutamine synthetase could be involved in the mechanism of increasing the production of HSP70 consistent with the hypothesis of the authors.

Further research is needed to better understand the relationship between WPH consumption and increased HSP70.

Acknowledgment

The authors are grateful to the Foundation for Research of the State of São Paulo, Brazil (FAPESP) for financial support, and to Hilmar Ingredients (North Lander, California, USA) for providing the whey protein and whey protein hydrolysate products.

REFERENCES

1. Pal S, Ellis V, Dhaliwal S. (2010) Effects of whey protein isolate on body composition, lipids, insulin and glucose in overweight and obese individuals. *Br J Nutr.* **104**, 716-723.
2. Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA *et al.* (2011) Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition.* **27**, 582-589.
3. Lollo PCB, Amaya-Farfan J, Carvalho-Silva LB (2011) Physiological and Physical Effects of Different Milk Protein Supplements in Elite Soccer Players. *Exercise Physiology & Sports Medicine.* **30**, 49-57.
4. Carvalho-Silva LB, Mourão LF, Silva AS *et al.*(2010) Effect of nutritional supplementation with milk whey proteins in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Arq Neuropsiquiatr.* **68**, 263-268.
5. Nery-Diez AC, Carvalho IR, Amaya-Farfan J *et al.* (2010) Prolonged Ingestion of Prehydrolyzed Whey Protein Induces Little or No Change in Digestive Enzymes, but Decreases Glutaminase Activity in Exercising Rats. *J Med Food*, **13**, 992–998.
6. Ritossa F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* **18**, 571-573.
7. Silver JT, Noble EG. (2011) Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones.*
8. Morimoto RI. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**, 3788-3796.

9. Staib JL, Tumer N, Powers SK. (2009) Increased temperature and protein oxidation lead to HSP72 mRNA and protein accumulation in the in vivo exercised rat heart. *Exp Physiol* **94**, 71–80.
10. Kampinga HH, Craig EA. (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.***11**, 579-592.
11. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA *et al.* (2000) HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **279**, 1539-1545.
12. Rogero MM, Tirapegui J. (2008) Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* **44**, 563-575.
13. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JR GC. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition.* **123**, 1939-1951.
14. Aoi W, Takanami Y, Kawai Y *et al.* (2011) Dietary whey hydrolysate with exercise alters the plasma protein profile: a comprehensive protein analysis. *Nutrition.* **27**, 687-692.
15. Jing L, Wu Q, Wang F. (2007) Glutamine induces heat-shock protein and protects against Escherichia coli lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in rats. *Crit Care.* **11**, R34.
16. Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R *et al.* (2001) Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol.* **90**, 2403-2410.

17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-275.
18. WHITE JA, HART RJ, FRY JC. (1986) An evaluation of the waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. *The journal of automatic chemistry* **8**, 170-177.
19. Reznick AZ, Packer L. (1994) Oxidative damage to proteins spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**, 357-363.
20. Lo S, Russell JC, Taylor AW. (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology* **28**, 234-236.
21. Huang YF, Wang Y, Watford M. (2007) Glutamine directly downregulates glutamine synthetase protein levels in mouse C2C12 skeletal muscle myotubes. *J Nutr.* **137**, 1357-1362.
22. Belter JG, Carey HV, Garland TJr. (2004) Effects of voluntary exercise and genetic selection for high activity levels on HSP72 expression in house mice. *J Appl Physiol.* **96**, 1270-1276.
23. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH *et al.* (2005) Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 570-582.
24. Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R *et al.* (2001) Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol.* **90**, 2403-2410.

25. Hamiel CR, Pinto S, Hau A *et al.* (2009) Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* **297**, 1509-1519.
26. Zhong X, Zhang XH, Li XM *et al.* (2011) Intestinal growth and morphology is associated with the increase in heat shock protein 70 expression in weaning piglets through supplementation with glutamine. *J Anim Sci.* **89**, 3634-3642.
27. Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD *et al.* (2003) Glutamine Attenuates Tumor Necrosis Factor Release and Enhances Heat Shock Protein 72 in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nutrition.* **19**, 1-6.
28. Scharte M, Baba HA, Van Aken H *et al.* (2001) Alanyl-glutamine dipeptide does not affect hemodynamics despite a greater increase in myocardial heat shock protein 72 immunoreactivity in endotoxemic sheep. *J Nutr.* **131**, 1433-1437.
29. Singleton KD, Wischmeyer PE. (2007) Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **292**, 1839-1845.
30. Verdier L, Boirie Y, Van Driessche S *et al.* (2002) Do sex steroids regulate glutamine synthesis with age?. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282**, 215-221.
31. Santos RVT, Caperuto EC, Rosa LFBPC. (2007) Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sciences.* **80**, 573-578.
32. He Y, Hakvoort TB, Köhler SE *et al.* (2010) Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification. *J Biol Chem.* **285**, 9516-9524.

33. Labow BI, Souba WW, Abcouwer SF. (1999) Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol.* **276**, 1136-1145.
34. Mezzarobba V, Torrent A, Leydier I *et al.* (2003) The role of adrenal hormones in the response of glutamine synthetase to fasting in adult and old rats. *Clin Nutr.***22**, 569-575.
35. Salway KD, Gallagher EJ, Page MM *et al.* (2011) Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds. *Mech Ageing Dev.* **132**, 287-297.
36. Wischmeyer PE. (2002) Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition.* **18**, 225-228.
37. Ziegler TR, Ogden LG, Singleton KD *et al.* (2005) Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med.* **31**, 1079-1086.
38. Petersen BL, Ward LS, Bastian ED *et al.* (2009) Whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. *Nutr J.***8**(47).
39. Waring WS, McKnight JA, Webb DJ *et al.* (2006) Uric Acid Restores Endothelial Function in Patients With Type 1 Diabetes and Regular Smokers. *Diabetes.* **55**, 3127-3132.
40. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E *et al.* (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci.* **78**, 6858-6862.

41. Kaya M, Moriwaki Y, Ka T *et al.*(2006) Plasma concentrations and urinary excretion of purine bases (uric acid, hypoxanthine, and xanthine) and oxypurinol after rigorous exercise. *Metabolism*. **55**, 103-107.
42. Cooke MB, Rybalka E, Stathis CG *et al.* (2010) Whey protein isolate attenuates strength decline after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals. *J Int Soc Sports Nutr*. **7**, 1-9.
43. Magal M, Dumke CL, Urbiztondo ZG *et al.* (2010) Relationship between serum creatine kinase activity following exercise-induced muscle damage and muscle fibre composition. *J Sports Sci*. **28**, 257-266.
44. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. (2005) Albumin: Biochemical Properties and Therapeutic Potential. *Hepatology*. **41**, 1211-1219.
45. Haraguchi FK, Pedrosa ML, Paula H *et al.* (2010) Evaluation of Biological and Biochemical Quality of Whey Protein. *J Med Food*. **13**, 1505-1509.
46. Pimenta FMV, Abecia-Soria MI, Auler F *et al.* (2006) Physical performance of exercising young rats fed hydrolysed whey protein at a sub-optimal level. *International Dairy Journal*.**16**, 984-991.
47. Baxmann AC, Ahmed MS, Marques NC *et al.* (2008) Influence of Muscle Mass and Physical Activity on Serum and Urinary Creatinine and Serum Cystatin C. *Clin J Am Soc Nephrol*. **3**, 348-354.
48. Bansal N, Hsu CY, Zhao S *et al.* (2011) Relation of body mass index to urinary creatinine excretion rate in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*. **108**,179-184.

49. Schutte JE, Longhurst JC, Gaffney FA *et al.* (1981) Total plasma creatinine: an accurate measure of total striated muscle mass. *J Appl Physiol.* **51**, 762-766.
50. Jentjens R, Jeukendrup A. (2003) Determinants of Post-Exercise Glycogen Synthesis During Short-Term Recovery. *Sports Med.* **33**, 117-144.
51. Henstridge DC, Forbes JM, Penfold SA, *et al.* (2010) The relationship between heat shock protein 72 expression in skeletal muscle and insulin sensitivity is dependent on adiposity. *Metabolism.* **59**,1556-1561.
52. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C *et al.* (2005). Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *Br J Nutr.* **93**, 439-445.
53. Taegtmeyer H. (2004) Glycogen in the heart an expanded view. *J Mol Cell Cardiol.* **37**, 7-10.

5. CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, o consumo da proteína do soro leite hidrolisada aumenta o sistema de defesa representado pela concentração de HSP70 em gastrocnêmio, sóleo e pulmão. Sugere-se que o mecanismo responsável pelo aumento na produção de HSP70, além do perfil aminoacídico das proteínas do soro, esteja relacionado com o fato da proteína estar hidrolisada e que, a enzima glutamina sintetase esteja também envolvida no processo que leva ao aumento da HSP70. Talvez o organismo que consuma a PSL hidrolisada, por meio de seu perfil aminoacídico rico em BCAAs, utilize esses substratos (precursores) para sintetizar glutamina, por meio da ação da glutamina sintetase no músculo esquelético, que por sua vez utiliza a glutamina oriunda dessa síntese para favorecer a indução da HSP70.

Ressalta-se que as PSL mostraram superioridade e vantagens ao seu consumo em diversos parâmetros estudados. A proteína do soro do leite demonstra diversos indícios de proteção celular, seja pelo aumento das proteínas do estresse (HSP70), como pelo aumento da albumina, proteínas totais e ácido úrico do soro sanguíneo do rato.

A proteína do soro do leite pode chegar, com os avanços científicos, a ser considerada um fonte protéica importante, não apenas para a boa nutrição do indivíduo, mas também por suas propriedades funcionais para a saúde, seja para praticantes de atividade física ou aqueles que apresentem alterações na homeostase.

Novas pesquisas devem ser realizadas com a finalidade de investigar se o consumo das proteínas do soro do leite influenciam outras HSPs, bem como em outras situações de alteração na homeostase que não seja oriunda do exercício. Ainda, estudar se o consumo das proteínas do soro do leite se comportaria da mesma maneira, aumentando as HSPs, em ratos ou indivíduos com câncer.

ANEXO. Aprovação da comissão de Ética



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

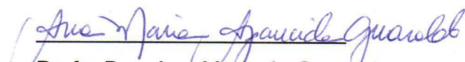
CERTIFICADO

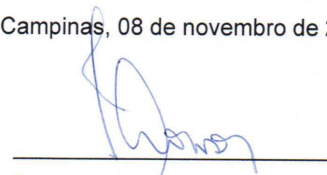
Certificamos que o Protocolo nº **2297-1**, sobre "**Efeito do consumo das proteínas do soro do leite nos biomarcadores do stress HSP 70 e no metabolismo da glutamina em ratos submetidos ao exercício de esteira**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan / Carolina Sares de Moura**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **08 de novembro de 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2297-1**, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 8, 2010**.

Campinas, 08 de novembro de 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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