

EFEITOS DO WHEY PROTEIN E TESTOSTERONA SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM RATOS TREINADOSFilipe Vicente Testoni¹, Heidi Hoefft¹, Sheila Regina Schmidt Francisco²**RESUMO**

O consumo de suplementos alimentares, como whey protein (WP) e de esteróides androgênicos anabolizantes (EAA) tem se tornado evidente entre atletas e praticantes de exercícios físicos. Objetivou-se analisar os efeitos da suplementação de WP e da administração de uma dose suprafisiológica de testosterona, associadas ou não, em ratos machos Wistar submetidos ao nado forçado. Foram utilizados 40 ratos, divididos em: Grupo controle (G1), Grupo WP (G2), Grupo WP + testosterona (G3) e Grupo testosterona (G4). Os quatro grupos realizaram nado forçado por 30 minutos diários, cinco vezes por semana. Em todos os grupos analisou-se o peso inicial e final dos animais, o peso final do coração e do quadríceps, os parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total e frações, triglicérides, albumina, proteínas totais, creatinina, ureia, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e creatina quinase), a curva glicêmica e a dosagem de glicogênio hepático e muscular. A suplementação com WP associada ou não a administração de testosterona, não promoveu alterações no peso corporal e do coração, fígado e quadríceps dos animais, nem alterou a tolerância a glicose e o armazenamento de glicogênio hepático ou muscular, porém os grupos que receberam testosterona apresentaram valores mais baixos de glicemia. A suplementação com WP causou uma redução no consumo de ração, já a testosterona isolada não alterou a ingestão. As funções hepática e renal não foram alteradas por nenhuma das substâncias, porém houve tendência de piora do perfil lipídico motivada pela administração de testosterona e o esteróide associado a suplementação parece diminuir a lesão muscular provocada pelo exercício.

Palavras-chave: Suplementos nutricionais. Testosterona. Exercício. Biomarcadores. Ratos.

1-Universidade Regional de Blumenau-FURB, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

2-Departamento de Ciências Naturais-FURB, Blumenau, Santa Catarina, Brasil.

ABSTRACT

Effects of whey protein and testosterone on biochemical parameters in trained rats

Consumption of dietary supplements such as whey protein (WP) and anabolic androgenic steroids (AAS) has become evident among athletes and exercise practitioners. This study aims to analyze the effects of WP supplementation and administration of a supraphysiological dose of testosterone, associated or not, in male Wistar rats subjected to forced swimming. Forty rats were divided into: Control group (G1), WP group (G2), WP + testosterone group (G3) and Testosterone group (G4). The four groups performed forced swimming for 30 minutes daily, five times a week. In all groups, the initial and final weight of the animals, the final weight of the heart and quadriceps, the biochemical parameters (glucose, total cholesterol and fractions, triglycerides, albumin, total proteins, creatinine, urea, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and creatine kinase), the glycemic curve and the hepatic and muscular glycogens were analyzed. WP supplementation, wheater or not associated with testosterone administration, did not promote changes in body, heart, liver or quadriceps weight, nor did alter glucose tolerance and hepatic or muscle glycogen storage, but the testosterone groups showed lower blood glucose values. Supplementation with WP caused a reduction in feed intake, whereas testosterone alone did not alter the intake. Hepatic and renal functions were not altered by either substance, but there was a tendency to worsen lipid profile motivated by the administration of testosterone, and the steroid associated with supplementation seems to decrease muscle damage caused by exercise.

Key words: Dietary supplements. Testosterone. Exercise. Biomarkers. Rats.

E-mail dos autores:

filipetestoni@gmail.com

heidihft@gmail.com

sheila.bqa@gmail.com

INTRODUÇÃO

Tem tornado-se evidente, através do trabalho de diversos pesquisadores, o alto consumo de suplementos alimentares entre atletas e praticantes de exercícios físicos de diferentes esportes e modalidades.

Uma revisão sistemática da literatura realizada por Nabuco, Rodrigues e Ravagnani (2016) revela que a prevalência do uso de suplementos alimentares entre atletas brasileiros pode variar entre 37% e 98%.

A mesma pesquisa identificou que 53% dos estudos revisados apontaram os suplementos de proteína e aminoácidos como os mais utilizados por este grupo de indivíduos.

No ano seguinte, a mesma autora, juntamente com outro grupo de pesquisadores, realizou uma pesquisa com 182 atletas de ambos os gêneros, competidores de 20 tipos de esportes diferentes, e verificou que 47% deles fazia o uso de suplementos alimentares, sobretudo com o objetivo de melhorar a performance e aumentar a massa muscular, e que a WP (proteína do soro do leite) era o mais utilizado deles (Nabuco e colaboradores, 2017).

Entre os frequentadores de academia, Nogueira, Souza e Brito (2013) levantaram, também através de uma revisão sistemática da literatura, que a prevalência do uso de suplementos varia entre 23,9% e 94%, a depender da região do Brasil e da faixa etária investigada, motivados, sobretudo, pela melhora da forma física e da saúde.

Os suplementos de proteína também são os mais consumidos por este público. A WP é uma proteína cujas propriedades benéficas à saúde, ao desempenho físico e a melhora da composição corporal, estão amplamente reportadas na literatura, por favorecer o anabolismo e reduzir o catabolismo muscular, reduzir a ação de agentes oxidantes nos músculos esqueléticos (Haraguchi, Abreu, Paula, 2006) e aumentar a força e a massa magra (Morton e colaboradores, 2017).

Em relação a utilização de esteroides androgênicos anabolizantes (EAA), não existem estudos, até o momento, que avaliem a prevalência de seu uso entre atletas no Brasil, porém Abrahin, Sousa e Santos (2014) demonstraram que a prevalência do uso destas substâncias por indivíduos não atletas pode variar entre 2,1% e 31,6%, a depender do local e do estado onde os estudos foram

realizados. Os autores concluíram que as academias são o local onde há maior prevalência de uso, uma vez que os praticantes de musculação tipicamente desejam melhorar sua aparência física.

Os estudos acerca dos efeitos positivos e negativos dos EAA sobre a saúde divergem em seus resultados. Enquanto alguns demonstram uma série de riscos relacionados ao uso inadequado dessas substâncias, envolvendo a saúde cardiovascular, a piora do perfil lipídico, danos hepáticos e a diferentes órgãos (Kersey e colaboradores, 2012), aumento da resistência à insulina, redução da função tireoidiana e até distúrbios psicológicos (Hartgens e Kuipers, 2004), outros afirmam que algumas destas alegações podem ser exageradas (Dickerman e colaboradores, 1999), de fraca evidência que suporte uma relação causa-efeito, e influenciadas por fatores contribuintes, como a dieta e predisposição genética (Hoffman e Ratamess, 2006).

Diante da notória associação do uso destas duas substâncias por atletas e praticantes de exercícios físicos, da falta de consenso sobre suas consequências e considerando o pequeno número de estudos controlados que avaliam seu uso em conjunto, faz-se necessário investigar os efeitos desta prática.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da suplementação com WP e da administração de uma dose suprafisiológica de testosterona, associadas ou não, em ratos machos Wistar submetidos ao nado forçado.

MATERIAIS E MÉTODOS

População e Amostra

Foram utilizados 40 ratos Wistar adultos machos com 3 meses de idade, provenientes do biotério central da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno contendo dois animais cada, que foram mantidos em biotério com temperatura (22 a 24°C) e ciclo da luminosidade (12 horas claro/escuro) controlados.

Todos os animais receberam a ração AIN-93M na quantidade da 150 g/dia por caixa e água à vontade.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Animais da FURB, sob protocolo nº 110/18 e teve a duração de 4 meses.

Tratamento

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, com 10 animais cada, de acordo com o tratamento recebido: Grupo controle (G1): gavagem de água e administração de azeite de oliva intramuscular (IM); Grupo WP (G2): gavagem de WP e administração de azeite de oliva IM; Grupo WP + testosterona (G3): gavagem de WP e administração de testosterona IM; Grupo testosterona (G4): gavagem de água e administração de testosterona IM.

Os grupos G2 e G3 receberam suplementação de 1,8 g de WP por kg de peso do animal (Nunes e colaboradores, 2013; Wilson e Wilson, 2006), preparada através de uma solução de WP 50% dissolvida em água destilada, enquanto G1 e G4 receberam somente água destilada na mesma quantidade.

Ambos foram administrados por gavagem, cinco vezes por semana (segunda a sexta).

Nos grupos G3 e G4 foi administrado enantato testosterona IM (quadríceps) na dose de 20 mg/kg, divididas em duas aplicações de 10 mg/kg por semana (segundas e quintas-feiras). A dose e frequência do fármaco foi determinada conforme Karbasi e colaboradores (2017).

Nos demais grupos (G1 e G2) foi administrado azeite de oliva de origem comercial autoclavado (a fim de garantir esterilidade).

A administração ocorreu na mesma frequência e volume do fármaco.

Atividade Física

O método utilizado foi o nado forçado, que consiste em colocar os animais em um recipiente contendo água, de forma que não sejam capazes de escapar ou apoiarem-se, com a cauda, no fundo.

Os animais passaram por um período de adaptação, no qual nadaram por cinco dias consecutivos, aumentando progressivamente o tempo de exercício, de dez até trinta minutos (acrescentando 5 minutos/dia).

No período experimental todos os animais foram submetidos a 30 minutos de nado forçado, cinco vezes por semana.

Parâmetros Avaliados

Após o período experimental os animais foram mantidos em jejum de 12h e os seguintes parâmetros de peso foram coletados: consumo de ração, peso dos ratos (1x por semana) e peso de órgãos (fígado, quadríceps e coração).

Estes últimos, coletados por meio de dissecação, ao final do experimento, e pesados com auxílio da balança digital analítica (Bioscale).

O isolamento e a dosagem do glicogênio hepático e do glicogênio muscular foram realizados conforme protocolo de Hirano e colaboradores (2008).

Ao final do experimento realizou-se a curva glicêmica via punção caudal e a glicemia foi verificada nos tempos zero, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos após a administração da glicose (1g/kg), através do glicosímetro eletrônico (OneTouch Ultra) (Hirano e colaboradores, 2008).

Após o período experimental, foi realizada a eutanásia e coleta de sangue. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e eutanasiados com injeção intraperitoneal de Tiopental (300 mg/kg) associado com o anestésico lidocaína, na dose de 10 mg/mL. Coletou-se 5 mL de sangue de cada animal, através da veia porta hepática, para as dosagens bioquímicas.

Os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório de Bioquímica, localizado no Campus 1 da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Foram avaliados: albumina, lipoproteínas de alta densidade (HDL), proteínas totais, creatinina, ureia, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK) foram dosados por meio de kits comerciais da marca Labtest, enquanto para a dosagem de colesterol total foi utilizado o kit Quimicol, e para a de triglicerídeos o kit Laborclin.

A leitura foi realizada por meio do analisador bioquímico (fotocolorímetro) semiautomático (Bio-2000, Bioplus).

Análise Estatística

Realizou-se o teste de normalidade das medições, através dos testes Shapiro-Wilk e Shapiro-Francia, no caso de observações platicúrticas e leptocúrticas, respectivamente.

Em seguida, foram realizados testes de comparação entre tratamentos, da seguinte forma: para a variável i , se qualquer um dos grupos de tratamento teve resultado negativo para a normalidade das observações, então realizou-se o teste Kruskal-Wallis; se, por outro lado, todos os grupos de tratamento tiveram resultados positivos para a normalidade das observações, então realizou-se o teste ANOVA simples (apenas um fator ou one-way ANOVA).

Nos casos de rejeição da hipótese nula de tais testes também foi feita uma análise comparação múltipla entre cada par possível de tratamentos, construindo intervalos de confiança (95%) para cada um dos quatro tratamentos. Toda a análise estatística foi feita através do software MATLAB®.

RESULTADOS

Consumo de Ração, Peso Total e do Coração, Fígado, Quadríceps

Observa-se na Tabela 1 que os animais de G3 consumiram significativamente ($p=0,02$) menos ração nas semanas 2 e 3 do que os de G1.

Enquanto G2 consumiu significativamente ($p=0,01$) menos ração que G1, apenas na semana 3.

A variação de peso dos animais entre o início e o fim do experimento não apresentou diferença significativa entre os grupos, tampouco o peso do coração, do fígado e do quadríceps.

Tolerância a Glicose e Armazenamento de Glicogênio Hepático e Muscular

Não foi possível verificar nenhuma alteração significativa relacionada a tolerância a glicose, também não ao armazenamento de glicogênio hepático ou muscular, conforme Tabela 2.

Avaliação das Funções Hepática, Renal e Muscular

Observa-se na Tabela 3 que os tratamentos com WP e/ ou testosterona não alteraram as enzimas hepáticas ALT e AST.

Ademais, verificou-se uma tendência de redução nos valores de AST para os grupos que receberam testosterona, associada ou não a suplementação de WP.

G4 apresentou um valor médio de AST 20% menor do que G1, e G3 21% menor do que G1, conforme a mesma tabela.

Tabela 1 - Resultados dos valores de consumo de ração das semanas 1, 2 e 3, pesos inicial e final dos animais, e peso dos órgãos coração, fígado e quadríceps de ratos Wistar treinados submetidos a tratamento com WP (1,8g/kg) e/ou testosterona (20mg/kg).

Parâmetros	Grupos							
	G1		G2		G3		G4	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Consumo ração* S1 (g)	57,78 ^a	5,61	53,10 ^a	9,01	50,77 ^a	11,09	55,57 ^a	7,62
Consumo ração* S2 (g)	57,84 ^a	11,18	48,68 ^a	7,49	47,96 ^b	6,88	52,17 ^a	10,40
Consumo ração* S3 (g)	60,52 ^a	4,92	50,77 ^b	8,16	49,48 ^b	5,48	55,29 ^a	4,10
Peso inicial do rato (g)	348,34 ^a	57,43	344,65 ^a	44,92	346,14 ^a	59,89	369,09 ^a	49,76
Peso final do rato (g)	371,68 ^a	57,57	350,93 ^a	43,82	362,83 ^a	44,34	374,86 ^a	53,10
Peso coração (g)	1,62 ^a	0,31	1,58 ^a	0,24	1,54 ^a	0,32	1,66 ^a	0,34
Peso do fígado (g)	12,07 ^a	1,41	11,18 ^a	1,26	10,81 ^a	1,57	11,33 ^a	1,87
Peso do quadríceps (g)	3,15 ^a	0,81	3,23 ^a	0,72	3,06 ^a	0,85	3,00 ^a	0,63

Legenda: Valores expressos em média (M) e desvio padrão (DP). G1: Grupo controle; G2: Grupo whey; G3: Grupo whey + testosterona; G4: Grupo testosterona; S1: Semana 1; S2: Semana 2; S3: Semana 3. *Consumo de ração por caixa, contendo dois ratos em cada. ^a: sem diferença estatística significativa; ^b: estatisticamente significativo (teste de Kruskal-Wallis), (n= 6-10).

Tabela 2 - Resultados dos valores de glicogênios hepático e muscular de ratos Wistar treinados submetidos a tratamento com WP (1,8g/kg) e/ou testosterona (20mg/kg).

Parâmetros	Grupos							
	G1		G2		G3		G4	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Glicogênio Hepático (mg)	2,74	2,25	4,61	2,28	2,41	1,47	3,64	2,35
Glicogênio Muscular (mg)	0,54	0,29	0,59	0,25	0,58	0,28	0,63	0,24

Legenda: Valores expressos em média (M) e desvio padrão (DP). G1: Grupo controle; G2: Grupo whey; G3: Grupo whey + testosterona; G4: Grupo testosterona. Teste de Kruskal-Wallis. (n= 6-10).

Tabela 3 - Resultados dos parâmetros bioquímicos referentes a avaliação das funções renal e hepática e de lesão muscular de ratos Wistar treinados submetidos a tratamento com WP (1,8g/kg) e/ou testosterona (20mg/kg).

Parâmetros	Grupos							
	G1		G2		G3		G4	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Creatinina (mg/dL)	0,7 ^a	0,10	0,66 ^a	0,18	0,68 ^a	0,12	0,64 ^a	0,13
Ureia (mg/dL)	31,85 ^a	5,14	33,38 ^a	3,90	27,56 ^a	5,29	31,90 ^a	5,04
Proteínas Totais (g/dL)	6,51 ^a	0,46	6,55 ^a	0,41	6,34 ^a	0,84	6,18 ^a	0,61
Albumina (g/dL)	2,44 ^a	0,38	2,37 ^a	0,43	2,21 ^a	0,53	2,39 ^a	0,49
ALT (U/L)	128,5 ^a	75,01	85,5 ^a	34,50	76,75 ^a	31,83	80,25 ^a	34,55
AST (U/L)	139,2 ^a	24,27	134,5 ^a	19,56	110,64 ^a	19,95	111,93 ^a	78,12
CK (U/L)	831,38 ^a	523,20	641,7 ^a	201,25	356,13 ^b	118,34	498,61 ^a	573,22

Legenda: Valores expressos em média (M) e desvio padrão (DP). G1: Grupo controle; G2: Grupo whey; G3: Grupo whey + testosterona; G4: Grupo testosterona. ^a: sem diferença estatística significativa; ^b: estatisticamente significativo (teste de Kruskal-Wallis), (n=4-10).

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros bioquímicos referentes a avaliação do perfil lipídico de ratos Wistar treinados submetidos a tratamento com WP (1,8g/kg) e/ ou testosterona (20mg/kg).

Parâmetros	Grupos							
	G1		G2		G3		G4	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
Triglicerídeos (mg/dL)	59,20	22,12	59,50	15,60	42,38	12,65	51,10	28,21
Colesterol Total (mg/dL)	54,56	5,68	59,94	11,15	47,69	6,07	54,85	14,88
Colesterol HDL (mg/dL)	18,50	3,48	19,14	3,75	14,88	2,76	14,90	4,25
Colesterol LDL (mg/dL)	23,80	7,58	28,41	10,26	24,34	7,20	29,73	9,66

Legenda: Valores expressos em média (M) e desvio padrão (DP). G1: Grupo controle; G2: Grupo whey; G3: Grupo whey + testosterona; G4: Grupo testosterona. Teste de Kruskal-Wallis, (n=7-10).

Da mesma forma, não foi observada diferença significativa nos níveis de creatinina e ureia entre os grupos, demonstrando não haver alteração da função renal após os tratamentos. Os níveis de albumina e proteínas totais também não sofreram modificações significativas independente do tratamento recebido.

Em relação a avaliação de lesão muscular, a comparação entre os grupos revela que os níveis de CK de G3 foram significativamente menores ($p=0,05$) quando comparados com G1.

Cabe mencionar que o grupo que recebeu o tratamento de testosterona isolada (G4), apesar de não atingir significância estatística ($p=0,06$), apresentou um valor 40% menor que o grupo controle. O desvio padrão alto observado para os valores de CK destes grupos pode ter contribuído para tais resultados não significativos.

Acredita-se que o período entre a indução da eutanásia e a parada cardiorrespiratória seja a causa do desvio padrão alto, uma vez que para alguns animais o tempo foi maior, o que ocasiona maior

estresse e, conseqüentemente elevação do valor de CK (Batista e colaboradores, 2009).

A Tabela 3 também mostra que AST apresentou o mesmo comportamento de lesão que CK, representando menor lesão muscular, mesmo que não estatisticamente significante, nos grupos tratados com testosterona quando comparados aos controles.

Avaliação do Perfil Lipídico

Nenhum dos parâmetros relacionados ao perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total, colesterol LDL e colesterol HDL) sofreu alterações significativas independente do tratamento recebido. É notável, entretanto, que existe uma tendência de redução do HDL nos grupos que receberam testosterona, associada ou não à WP, como apresentado na Tabela 4.

O grupo que recebeu somente testosterona (G4) apresentou valores de HDL médios 20% menores que o grupo controle (G1) e o grupo que recebeu a testosterona associada à WP (G3) apresentou valores 19% menores em relação ao grupo controle (G1).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi possível perceber que os grupos suplementados com WP (G2 e G3) apresentaram um menor consumo de ração na segunda e terceira semanas de experimento, quando comparados ao grupo controle.

Um comportamento semelhante foi encontrado por Zhou e colaboradores (2011), que avaliaram os efeitos da ingestão de WP sobre o consumo alimentar e ganho de peso em ratos adultos por 10 semanas.

Os autores observaram que o grupo que recebeu WP consumiu menor quantidade de ração em relação ao grupo controle, que recebeu ração AIN-93 contendo albumina como fonte proteica.

Os autores verificaram, ainda, um menor ganho de peso corporal do grupo suplementado com WP quando comparado ao controle, o que não ocorreu em nossa pesquisa, possivelmente em função do tempo de tratamento ter sido inferior ao tempo dos demais estudos.

Outros estudos mostram maior saciedade em ratos tratados com dieta hiperproteica contendo WP por 8 semanas (Avila e colaboradores, 2018; Aparicio e colaboradores, 2010).

Aparicio e colaboradores (2010) constataram, ainda, uma melhora da composição corporal e um aumento de peso do quadríceps com um efeito mais estável após o segundo mês de suplementação.

Já Avila e colaboradores (2018) verificaram que a dieta hiperproteica (35% de proteína) contendo WP, associada ao treinamento resistido (salto aquático com cargas), foi capaz de aumentar o peso relativo do coração, do fígado, dos rins e do músculo sóleo.

No presente estudo, o peso dos órgãos avaliados (fígado, quadríceps e coração) não sofreu alterações, possivelmente pela menor quantidade de proteína ingerida na dieta (22%), ou pelo tipo de treinamento realizado (não resistido) - demonstrando que a suplementação sem associação com atividade resistida não leva a hipertrofia dos músculos avaliados.

No que tange o metabolismo de glicídios, nosso estudo verificou que a suplementação com WP não foi capaz de alterar a tolerância à glicose.

Da mesma forma, diversos outros autores observaram manutenção da glicemia,

assim como a manutenção da sensibilidade a insulina (Avila e colaboradores, 2018; Tranberg e colaboradores, 2013; Belobrajdic, McIntosh, Owens, 2004), tanto em ratos treinados quanto não treinados, comparando a suplementação com WP e outras fontes proteicas (caseína e carne vermelha).

É natural, portanto, que o armazenamento de glicogênio, tanto hepático quanto muscular, também não tenha sofrido alterações, uma vez que a insulina estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo, através da desfosforilação da enzima glicogênio-sintetase, o que aumenta a sua atividade (Carvalho, Zecchin, Saad, 2002).

Com relação aos efeitos da testosterona sobre o metabolismo glicídico, estudos epidemiológicos e modelos clínicos e experimentais já demonstraram que existe uma associação entre a deficiência deste hormônio e a resistência à insulina, a síndrome metabólica e a diabetes mellitus tipo 2 (Allan, 2014).

Observou-se no presente estudo que, apesar da não significância estatística, os valores de glicemia obtidos no teste de tolerância a glicose do grupo que recebeu apenas testosterona foi, na média (16,85% < G1, 14,38% < G2 e 8,55% < G3), o mais baixo nos tempos 0 (jejum), 30 e 60 minutos, porém os níveis de glicogênio hepático e muscular não foram alterados de forma significativa.

Contribuindo para a compreensão deste fenômeno, Ramamani, Aruldas e Govindarajulu (1999) verificaram que a ausência de testosterona (resultante da castração dos ratos) ocasionou um aumento da glicemia e uma redução dos estoques de glicogênio em diferentes músculos, enquanto o oposto foi verificado quando estes animais receberam testosterona, sugerindo que os EAA podem exercer papel similar, porém independente de insulina, sobre o mecanismo de captação de glicose pelos músculos esqueléticos. Resultados semelhantes também foram verificados em ratos Wistar fêmeas ovariectomizadas (Urtado e colaboradores, 2011).

Por outro lado, em estudos realizados com ratos que possuíam sua produção hormonal normal, a administração de testosterona exógena não foi capaz de alterar a glicemia de jejum (Cunha e colaboradores, 2005), a não ser quando os níveis desse hormônio encontravam-se baixos ou altos

demaís, demonstrando que a testosterona é uma importante reguladora da sensibilidade à insulina nos músculos, que parece ser mais alta quando este hormônio encontra-se dentro dos níveis considerados normais (fisiológicos) (Holmäng e Björntorp, 1992).

A avaliação dos valores séricos de testosterona dos animais teria permitido a avaliação de uma possível relação entre estes níveis e os valores de glicemia ou glicogênio hepático e muscular.

A associação entre a suplementação de WP a administração de testosterona (G3) causou níveis mais altos de glicemia do que o grupo que recebeu apenas testosterona (G4), o que é esperado, uma vez que a WP utilizada é do tipo concentrada e possui carboidratos (1%/40g).

Os EAA tem sido investigados também por alterar de forma negativa o perfil lipídico dos indivíduos que fazem uso dessas substâncias, sobretudo no que diz respeito a redução do HDL, tanto em estudos experimentais (Frisch e Sumida, 1999; Leeds e colaboradores, 1986; Aparicio e colaboradores, 2013) quanto clínicos (Kuipers e colaboradores, 1991; Gårevik e colaboradores, 2012; Bonetti e colaboradores, 2008).

Este estudo corrobora com estes achados, uma vez que, apesar da não significância estatística, o colesterol HDL se mostrou reduzido em 20% no grupo que recebeu testosterona - valor próximo ao verificado nos trabalhos supracitados.

Aparicio e colaboradores (2013) demonstraram que ratos tratados com EAA, submetidos ou não ao treinamento físico, apresentaram efeito negativo sobre o perfil lipídico e hepático.

Da mesma forma, Leeds e colaboradores (1986) verificaram que existe uma clara tendência aterogênica (redução do HDL e aumento do LDL) do tratamento com EAA em ratos, independente do gênero e mesmo quando submetidos ao exercício físico.

Os autores demonstraram efeitos anti-aterogênicos do exercício físico quando sem o uso de EAA, que foram administrados nas últimas 3 semanas do programa de exercícios de 8 semanas.

É possível que, no presente trabalho, a redução dos níveis de HDL se mostrasse ainda mais evidente em um período maior de experimentação, conforme demonstrado por Frisch e Sumida (1999), que ao administrarem propionato de testosterona em ratos só

puderam verificar uma redução significativa desta lipoproteína após 7 semanas de tratamento.

Glazer (1991) apresentou em uma revisão da literatura sobre estudos em humanos, levantadores de peso, utilizando EAA em doses supra-fisiológicas, em que os níveis de HDL sofreram uma redução que variou entre 39% e 70% nestes indivíduos. Sete dos quinze estudos analisados postularam sobre o mecanismo responsável por esta redução, atribuindo-a indução da atividade da enzima lipase triglicérido hepática pós-heparina (postheparin plasma HTGL).

Ao contrário dos efeitos bem conhecidos dos EAA sobre o perfil lipídico, os efeitos da suplementação com WP sobre o perfil lipídico permanecem controversos.

Bem como em nosso estudo, diversos autores (Haraguchi e colaboradores, 2009; Chen e colaboradores, 2014; Avila e colaboradores, 2018) não constataram efeitos significativos da suplementação de WP sobre o lipídios sanguíneos, em estudos com período de tempo semelhante (6 a 8 semanas), com ou sem exercício físico, com ou sem dietas hipocolesterolêmicas, e na comparação entre WP e caseína ou ração comum (não enriquecida com proteínas).

Ao contrário, Teixeira e colaboradores (2012) observaram redução dos níveis de colesterol total e não HDL em ratos.

Noatsch e colaboradores (2011) explicam que estes resultados podem ser observados em virtude do conteúdo de leucina da WP utilizada (WP isolada com alto teor de leucina).

Esta hipótese é reforçada pelo achados de Zhang e colaboradores (2007) que verificaram uma redução dos níveis de colesterol em ratos que receberam uma suplementação deste aminoácido na água, enquanto puderam se alimentar à vontade, e pelo fato de que, assim como os autores, Haraguchi e colaboradores (2009) e Chen e colaboradores (2014) utilizaram WP 100% concentrada em seus experimentos.

Conforme discutido por Blachier e colaboradores (2010), os exatos mecanismos responsáveis pela influência de proteínas ou aminoácidos específicos sobre os níveis de colesterol permanecem pouco compreendidos.

Assim, os dados deste estudo e dos estudos anteriores sugerem que os efeitos da suplementação de WP sobre o perfil lipídico dependem de uma interação entre o colesterol

dietético e conteúdo de leucina presente na WP, já que a mesma estimula a síntese proteica muscular e consequente aumento do gasto energético e oxidação de lipídios.

Em relação a um possível efeito atenuante da suplementação de WP sobre a redução do HDL causado pela administração de testosterona, isto não ficou evidente no presente estudo e não foram encontrados outros estudos avaliando este parâmetro em relação a associação das duas substâncias.

O presente estudo demonstrou ainda que a suplementação de WP parece desempenhar um efeito protetor sobre estes biomarcadores de lesão muscular, assim como em Chen e colaboradores (2014), que utilizaram o exercício físico intenso (natação exaustiva) e avaliaram a suplementação de WP sobre a promoção da saúde e melhora da performance em ratos. Resultados que podem agir prolongando significativamente o tempo de exercício por conta da melhora na resistência.

O principal efeito encontrado pelos autores foi a diminuição dos níveis de AST, LDH, CK e ácido úrico e aumento dos níveis de albumina e proteínas totais pela suplementação. Nossa pesquisa mostrou um efeito ainda maior (com a redução dos valores de CK e AST) quando a suplementação de WP foi associada ao uso da testosterona.

Ao contrário dos resultados deste trabalho, Karbasi e colaboradores (2017) observaram um aumento de AST e LDH em ratos Wistar tratados com enantato de testosterona por 8 semanas e submetidos ao treinamento de resistência.

Os autores observaram ainda que os níveis de ALT (marcador de dano hepatocelular) e CK-MB (biomarcador para lesão muscular cardíaca) não foram alterados com o tratamento.

Como AST e LDH são enzimas inespecíficas, suas atividades podem estar aumentadas na presença de diversas lesões celulares, especialmente hepatocelulares, musculares e na hemólise.

Todavia, como não houve alteração na atividade sérica de ALT e de CK-MB, o próprio estudo conclui que a elevação das atividades de AST e LDH relaciona-se principalmente a danos esqueléticos, e não musculares.

A avaliação da função renal dos ratos tratados com WP e/ou testosterona neste estudo não demonstrou alterações nos níveis dos biomarcadores ureia e creatinina.

Karbasi e colaboradores (2017) também relatam que a administração de enantato de testosterona por 8 semanas não teve efeito significativo sobre a concentração sérica de ureia e creatinina, assim como Dornelles e colaboradores (2016), que avaliaram albumina, creatinina, proteínas totais e ureia em ratos Wistar submetidos a diferentes doses de undecilenato de boldenona e estanozolol (diferentes tipos de EAA) por 12, 8 e 4 semanas e não encontraram diferenças significativas em nenhum dos protocolos utilizados.

Corroborando os resultados deste estudo, Nunes e colaboradores (2013) observaram níveis mais baixos de AST no grupo exercitado (através de estímulo elétrico aplicado à cauda do rato, capaz de fazer com que o animal estendesse as pernas repetidamente, elevando o peso no aparelho de exercício) que recebeu suplementação de WP, em comparação com os outros grupos (sedentário, exercitado e sedentário+WP), indo ao encontro do estudo já citado de Chen e colaboradores (2014).

Todavia, a suplementação com WP sem estar associada ao exercício físico aumentou os níveis de creatinina, ALT e AST.

Já Aparicio e colaboradores (2010) verificaram um aumento significativo na ureia plasmática em ratos sedentários que receberam, por 3 meses, dieta hiperproteica (45% de proteína) contendo WP.

Possivelmente, as alterações renais e hepáticas encontradas estão associadas ao elevado teor proteico oferecido na dieta e maior tempo de tratamento, já que Morato e colaboradores (2013) ao investigarem, por 9 dias, os efeitos do consumo de WP e caseína em ratos Wistar, treinados e sedentários, não encontraram mudanças nos indicadores bioquímicos avaliados (glicose, ácido úrico, ureia, AST, ALT, CK e LDH).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a suplementação com WP e a administração de testosterona, associadas ou não, não foram capazes de promover alterações no peso corporal e do coração, fígado e quadríceps dos animais.

A suplementação com WP, entretanto, causou uma redução no consumo de ração, mesmo no grupo que recebeu testosterona associada.

Quando administrada de forma isolada, entretanto, a testosterona não foi capaz de alterar o consumo de ração.

No que diz respeito ao metabolismo de carboidratos, nenhuma das substâncias foi capaz de alterar a tolerância a glicose e o armazenamento de glicogênio hepático ou muscular, porém os grupos que receberam testosterona apresentaram valores mais baixos de glicemia, tanto em jejum, quanto após a administração de glicose.

Em relação as funções hepática e renal dos animais, estas não foram alteradas por nenhuma das substâncias, porém uma tendência de piora do perfil lipídico motivada pela administração de testosterona foi observada, e a administração do hormônio parece diminuir a lesão muscular provocada pelo exercício, ainda mais quando associada a suplementação com WP.

Sugere-se, para estudos futuros, a observação de um grupo amostral maior, por um período prolongado.

Além disso, a dosagem dos valores de insulina dos animais pode permitir a melhor compreensão da relação que existe entre a administração de testosterona e a tolerância a glicose.

Por fim, sugere-se para pesquisas futuras uma modificação da composição nutricional das rações para melhor compreender o grau de influência da dieta sobre os efeitos causados pelo consumo das substâncias estudadas.

REFERÊNCIAS

- 1-Abrahin, O.S.C.; Sousa, E.C.; Santos, A.M. Prevalence of the Use of Anabolic-Androgenic Steroids in Brazil: A Systematic Review. *Substance Use & Misuse*. Vol. 49. Num. 9. 2014. p.1156-1162.
- 2-Allan, C.A. Sex Steroids and Glucose Metabolism. *Asian Journal of Andrology*. Vol. 16. Num. 2. 2014. p. 232-238.
- 3-Aparicio, V.A.; Nebot, E.; Porres, J.M.; Ortega, F.B.; Heredia, J.M.; Jurado, M.L.; Ramirez, P.A. Effects of High-whey-protein Intake and Resistance Training on Renal, Bone and Metabolic Parameters in Rats. *British Journal of Nutrition*. Vol. 105. Num. 06. 2010. p.836-845.
- 4-Aparicio, V.A.; Sánchez, C.; Ortega, F.B.; Nebot, E.; Kapravelou, G.; Porres, J.M.; Aranda, P. Effects of the Dietary Amount and Source of Protein, Resistance Training and Anabolic-androgenic Steroids on Body Weight and Lipid Profile of Rats. *Nutricion Hospitalaria*. Vol. 28. Num. 1. 2013. p. 127-136.
- 5-Avila, E.T.P.; Lima, T.R.; Tibana, R.A.; Almeida, P.C.; Fraga, G.A.; Sena, M.S.; Corona, L.F.P.; Navalta, J.W.; Rezaei, S.; Ghayomzadeh, M.; Damazo, A.S.; Prestes, J.; Voltarelli, F.A. Effects of High-protein Diet Containing Isolated Whey Protein in Rats Submitted to Resistance Training of Aquatic Jumps. *Nutrition*. Vol. 53. 2018. p. 85-94.
- 6-Batista, J.S.; Bezerra, F.S.B.; Agra, E.G.D.; Calado, E.B.; Godói, R.M.; Rodrigues, C.M.F.; Nunes, F.C.R.; Blanco, B.S. Efeitos da Conteção Física e Química sobre os Parâmetros Indicadores de Estresse em Catetos ("Tayassu tajacu"). *Acta Veterinaria Brasileira*. Vol. 3. Num. 2. 2009. p. 92-97.
- 7-Belobrajdic, D.P.; McIntosh, G. H.; Owens, J.A. A High-whey-protein Diet Reduces Body Weight Gain and Alters Insulin Sensitivity Relative to Red Meat in Wistar Rats. *The Journal of Nutrition*. Vol. 134. Num. 6. 2004. p. 1454-1458.
- 8-Blachier, F.; Lancha, A.H.; Boutry, C.; Tomé, D. Alimentary Proteins, Amino Acids and Cholesterolemia. *Amino Acids*. Vol. 38. Num. 1. 2010. p. 15-22.
- 9-Bonetti, A.; Tirelli, F.; Catapano, A.; Dazzi, D.; Cas, A. D.; Solito, F.; Ceda, G.; Reverberi, C.; Monica, C.; Pipitone, S.; Elia, G.; Spattini, M.; Magnati, G. Side Effects of Anabolic Androgenic Steroids Abuse. *International Journal of Sports Medicine*. Vol. 29. Num. 8. 2008. p. 679-687.
- 10-Carvalho, J.B.; Zecchin, H.G.; Saad, M.J. Vias de Sinalização da Insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. Vol. 46. Num. 4. 2002. p. 419-425.
- 11-Chen, W.C.; Huang, W.C.; Chiu, C.C.; Chang, Y.K.; Huang, C.C. Whey Protein Improves Exercise Performance and Biochemical Profiles in Trained Mice. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. Vol. 46. Num. 8. 2014. p.1517-1524.

- 12-Cunha, T.S.; Tanno, A.P.; Moura, M.J.C.S.; Marcondes, F.K. Influence of High-Intensity Exercise Training and Anabolic Androgenic Steroid Treatment on Rat Tissue Glycogen Content. *Life Sciences*. Vol. 77. Num. 9. 2005. p. 1030-1043.
- 13-Dickerman, R.D.; Pertusi, R.M.; Zachariah, N.Y.; Dufour, D. R.; McConathy, W.J. Anabolic Steroid-induced Hepatotoxicity: Is it Overstated?. *Clinical Journal of Sport Medicine: Official Journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. Vol. 9. Num. 1. 1999. p. 34-39.
- 14-Dornelles, G.L.; Bueno, A.; Oliveira, J.S.; Silva, A.S.; França, R.T.; Silva, C.B.; Machado, M.S.N.; Petry, L.S.; Abdalla, F.H.; Lhamas, C.L.; Andrade, C.M. Biochemical and Oxidative Stress Markers in the Liver and Kidneys of Rats Submitted to Different Protocols of Anabolic Steroids. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 425. Num. 1-2. 2016. p.181-189.
- 15-Frisch, F.; Sumida, K. D. Temporal Effects of Testosterone Propionate Injections on Serum Lipoprotein Concentrations in Rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. Vol. 31. Num. 5. 1999. p. 664-669.
- 16-Gårevik, N.; Skogastierna, C.; Rane, A.; Ekström, L. Single Dose Testosterone Increases Total Cholesterol Levels and Induces the Expression of HMG CoA Reductase. *Substance Abuse Treatment, Prevention, and Policy*. Vol. 7. Num. 1. 2012. p. 7-12.
- 17-Glazer, G. Atherogenic Effects of Anabolic Steroids on Serum Lipid Levels: a Literature Review. *Archives of Internal Medicine*. Vol. 151. Num. 10. 1991. p. 1925-1933.
- 18-Haraguchi, F.K.; Abreu, W.C.; Paula, H. Proteínas do Soro do Leite: Composição, Propriedades Nutricionais, Aplicações no Esporte e Benefícios para a Saúde Humana. *Revista de Nutrição*. Vol. 19. Num. 4. 2006. p. 479-88.
- 19-Haraguchi, F.K.; Pedrosa, M.L.; Paula, H.D.; Santos, R.C.D.; Silva, M.E. Influência das Proteínas do Soro sobre Enzimas Hepáticas, Perfil Lipídico e Formação Óssea de Ratos Hipercolesterolêmicos. *Revista de Nutrição*. Vol. 22. 2009. p. 515-525.
- 20-Hartgens, F.; Kuipers, H. Effects of Androgenic-anabolic Steroids in Athletes. *Sports Medicine*. Vol. 34. Num. 8. 2004. p. 513-554.
- 21-Hirano, Z.M.B.; Schlindwein, A.; Nicoletti, C.R.; Pitz, H.S.; Filho, H.H.S.; Júnior, J.C.V.G.; Ferreira, M.L.K.P.; Francisco, S.R.S. *Bioquímica: Manual Prático*. Blumenau. Edifurb. 2008. p. 262.
- 22-Hoffman, J.R.; Ratamess, N.A. Medical Issues Associated With Anabolic Steroid Use: Are They Exaggerated?. *Journal of Sports Science & Medicine*. Vol. 5. Num. 2. 2006. p. 182-193.
- 23-Holmäng, A.; Björntorp, P. The Effects of Testosterone on Insulin Sensitivity in Male Rats. *Acta Physiologica Scandinavica*. Vol. 146. Num. 4. 1992. p. 505-510.
- 24-Karbasi, S.; Zaeemi, M.; Mohri, M.; Rashidlamir, A.; Moosavi, Z. Effects of Testosterone Enanthate and Resistance Training on Myocardium in Wistar Rats: Clinical and Anatomical Pathology. *Andrologia*. Vol. 50. Num. 3. 2017. e12908.
- 25-Kersey, R.D.; Diane L. Elliot, D.L.; Goldberg, L.; Kanayama, G.; Leone, J.E.; Pavlovich, M.; Pope, H.G. National Athletic Trainers' Association Position Statement: Anabolic-Androgenic Steroids. *Journal of Athletic Training*. Vol. 47. Num. 5. 2012. p.567-588.
- 26-Kuipers, H.; Wijnen, J.A.G.; Hartgens, F., Willems, S.M.M. Influence of Anabolic Steroids on Body Composition, Blood Pressure, Lipid Profile and Liver Functions in Body Builders. *International Journal of Sports Medicine*. Vol. 12. Num. 4. 1991. p. 413-418.
- 27-Leeds, E.M.; Wilkerson, J.E.; Brown, G.D.; Kamen, G.; Bredle, D. Effects of Exercise and Anabolic Steroids on Total and Lipoprotein Cholesterol Concentrations in Male and Female Rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 18. Num. 6. 1986. p. 663-667.
- 28-Morato, P.N.; Lollo, P.C.B.; Moura, C.S.; Batista, T.M.; Camargo, R.L.; Carneiro E.M.; Farfan, J.A. Whey Protein Hydrolysate Increases Translocation of GLUT-4 to the

Plasma Membrane Independent of Insulin in Wistar Rats. *Plos One*. Vol. 8. Num. 8. 2013. e71134.

29-Morton, R.W.; Murphy, K.T.; McKellar, S.R.; Schoenfeld, B.J.; Henselmans, M.; Helms, E.; Aragon, A.A.; Devries, M.C.; Banfield, L.; Krieger, J.W.; Phillips, S.M. A Systematic Review, Meta-analysis and Meta-regression of the Effect of Protein Supplementation on Resistance Training-induced Gains in Muscle Mass and Strength in Healthy Adults. *British Journal of Sports Medicine*. Vol. 52. Num. 6. 2017. p. 376-384.

30-Nabuco, H.C.G.; Rodrigues, V.B.; Barros, W.M.; Ravagnani, F.C.P.; Espinosa, M.M.; Ravagnani, C.F.C. Use of Dietary Supplements Among Brazilian Athletes. *Revista de Nutrição*. Campinas. Vol. 30. Num. 2. 2017. p. 163-173.

31-Nabuco, G.C.G.; Rodrigues, V.B.; Ravagnani, C.F.C. Fatores Associados ao Uso de Suplementos Alimentares entre Atletas: Revisão Sistemática. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. São Paulo. Vol. 22. Num. 5. 2016. p. 412-419.

32-Noatsch, A.; Petzke, K.J.; Millrose, M.K.; Klaus, S. Body Weight and Energy Homeostasis Was not Affected in C57BL/6 Mice Fed High Whey Protein or Leucine-supplemented Low-fat Diets. *European Journal of Nutrition*. Vol. 50. Num. 6. 2011. p. 479-488.

33-Nogueira, F.R.S.; Souza, A.; Brito, A. Prevalência do Uso e Efeitos de Recursos Ergogênicos por Praticantes de Musculação nas Academias Brasileiras: uma Revisão Sistematizada. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. Vol. 18. Num. 1. 2013. p. 16-30.

34-Nunes, R.; Silva, P.; Alves, J.; Stefani, G.; Petry, M.; Rhoden, C.; Lago P.D.; Schneider, C.D. Effects of Resistance Training Associated with Whey Protein Supplementation on Liver and Kidney Biomarkers in Rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. Vol. 38. Num. 11. 2013. p. 1166-1169.

35-Ramamani, A.; Aruldas, M.M.; Govindarajulu, P. Differential Response of Rat Skeletal Muscle Glycogen Metabolism to Testosterone and Estradiol. *Canadian Journal*

of Physiology and Pharmacology. Vol. 77. Num. 4. 1999. p. 300-304.

36-Teixeira, K.R.; Silva, M.E.; Neves, L.X.; Santos, R.C.D.; Pedrosa, M.L.; Haraguchi, F.K. Whey Protein Improves HDL/non-HDL Ratio and Body Weight Gain in Rats Subjected to the Resistance Exercise. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 55. Num. 6. 2012. p. 943-950.

37-Tranberg, B.; Hellgren, L.I.; Lykkesfeldt, J.; Sejrnsen, K.; Jeamet, A.; Rune, I.; Ellekilde, M.; Nielsen, D.S.; Hansen, A.K. Whey Protein Reduces Early Life Weight Gain in Mice Fed a High-Fat Diet. *Plos One*. Vol. 8. Num. 8. 2013. p.1-7.

38-Urtado, C.B.; Pereira, G.B.; Urtado, M.B.; Carvalho, É.B.; Leite, G.S.; Donatto, F.F.; Assumpção, C.O.; Leite, R.D.; Silva, C.A.; Sales, M.M.; Tibana, R.A.; Alves, S.C.C.; Prestes, J. Resistance Training Associated with the Administration of Anabolic-androgenic Steroids Improves Insulin Sensitivity in Ovariectomized Rats. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. Vol. 4. 2011. p. 385-391.

39-Wilson, J.; Wilson, G. J. Contemporary Issues in Protein Requirements and Consumption for Resistance Trained Athletes. *Journal of The International Society of Sports Nutrition*. Vol. 3. Num. 1. 2006. p. 7-27.

40-Zhang, Y.; Guo, K.; LeBlanc, R.E.; Loh, D.; Schwartz, G.J.; Yu, Y.H. Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-induced Obesity and Improves Glucose and Cholesterol Metabolism in Mice via Multimechanisms. *Diabetes*. Vol. 56. Num. 6. 2007. p. 1647-1654.

41-Zhou, J.; Keenan, M.J.; Lasso, J.N.; Raggio, A.M.; Shen, L.; McCutcheon, K.L.; Tulley, R.T.; Blackman, M.R.; Martin, R.J. Dietary Whey Protein Decreases Food Intake and Body Fat in Rats. *Obesity*. Vol. 19. Num. 8. 2011. p.1568-1573.

CONFLITO DE INTERESSE

O presente trabalho não apresenta conflito de interesse com demais trabalhos já realizados na área.

Revista Brasileira de Nutrição Esportiva

ISSN 1981-9927 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbne.com.br

Autor para correspondência:

Sheila Regina Schmidt Francisco.

Departamento de Ciências Naturais-FURB.

Rua Antônio da Veiga, 140.

Itoupava Seca, Blumenau-SC.

CEP: 89030-903.

Recebido para publicação em 11/08/2019

Aceito em 08/05/2020