

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE WHEY PROTEINS E TREINAMENTO RESISTIDO DE DOZE SEMANAS SOBRE A FUNÇÃO HEPÁTICA EM RATOS WISTAR

Milena Silva de Oliveira^{2,3}, Anne Karyne da Silva Barbosa², Diego Antonio de Jesus Macau¹
 Bruno Luiz Sousa de Miranda¹, Ernani Eugênio dos Santos Neto¹, Gabriel Pereira Moreira¹
 Antonio Coppi Navarro¹, Francisco Navarro¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos do treinamento resistido e da suplementação com proteína isolada do soro do leite sobre a função hepática de ratos Wistar. **Materiais e métodos:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA, nº 23115.001161/2017-85). Foram utilizados ratos Wistar machos (80 dias; 200-250 g), mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h e temperatura entre 20-26 °C. Os animais foram divididos em oito grupos (n=10): controle (C), treinamento controle (CT), suplementados com 2 g/kg/dia (S2), 4 g/kg/dia (S4) ou 6 g/kg/dia (S6) de whey protein, e treinados + suplementados (TS2, TS4, TS6). A suplementação foi administrada por gavagem durante 12 semanas. Foram avaliados os biomarcadores Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transferase (GGT). Os dados foram tratados no GraphPad Prism 8.02. **Resultados:** Os animais sedentários apresentaram níveis mais elevados de biomarcadores hepáticos em comparação aos demais grupos. Entretanto, a análise histológica não revelou lesões ou danos aos hepatócitos. Não houve aumento significativo no peso relativo do fígado entre grupos treinados e suplementados em relação aos sedentários. **Conclusão:** A suplementação com whey protein, isolada ou associada ao treinamento resistido, não promoveu alterações histológicas ou prejuízos à função hepática em ratos Wistar. Estudos adicionais são recomendados para confirmar esses achados em diferentes protocolos e períodos experimentais.

Palavras-chave: Fígado. Whey Proteins. Treinamento resistido. Suplementação.

1 - Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

ABSTRACT

Effect of whey protein supplementation and twelve weeks of resistance training on liver function in wistar rats

Objective: To evaluate the effects of resistance training and supplementation with whey protein isolate on liver function in Wistar rats. **Materials and methods:** The study was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Federal University of Maranhão (CEUA/UFMA, protocol nº 23115.001161/2017-85). Male Wistar rats (80 days old; 200-250 g) were maintained under a 12 h light/dark cycle and temperature between 20-26 °C. Animals were divided into eight groups (n=10): control (C), training control (CT), supplemented with 2 g/kg/day (S2), 4 g/kg/day (S4) or 6 g/kg/day (S6) of whey protein, and trained + supplemented (TS2, TS4, TS6). Supplementation was administered by gavage for 12 weeks. The biomarkers Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), Alkaline Phosphatase (ALP), and Gamma-Glutamyl Transferase (GGT), as well as liver histology, were analyzed. Data were processed using GraphPad Prism 8.02. **Results:** Sedentary animals showed higher levels of liver biomarkers compared to the other groups. However, histological analysis revealed no lesions or hepatocyte damage. No significant increase was observed in relative liver weight among trained and supplemented groups compared with sedentary ones. **Conclusion:** Whey protein supplementation, either isolated or combined with resistance training, did not promote changes or impair liver function in Wistar rats. Further studies are needed to confirm these findings under different protocols and experimental periods.

Key words: Liver. Whey protein. Resistance training. Supplementation.

2 - Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão-UFMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão fundamental para o metabolismo humano, responsável por receber o sangue proveniente da veia porta, sendo o primeiro a entrar em contato com os produtos da digestão e do metabolismo oriundos do intestino.

Entre suas funções, destacam-se a incorporação de aminoácidos nas proteínas e a desaminação de aminoácidos, processo que resulta na formação de amônia, posteriormente convertida em ureia. Além disso, diferentes regiões dos lóbulos hepáticos apresentam particularidades estruturais, bioquímicas e funcionais (Guyton e Hall, 2011).

A atividade enzimática é amplamente utilizada como biomarcador da função hepática. O aumento de enzimas hepáticas, associado ao exercício físico intenso, relaciona-se com a maior permeabilidade da membrana celular, podendo ocasionar inflamação e disfunção tecidual.

Esses efeitos comprometem a contração muscular, a força e contribuem para o desenvolvimento da fadiga, especialmente quando ocorre redirecionamento do fluxo sanguíneo para os músculos ativos a fim de sustentar a biossíntese energética (Kinoshita, Yano e Tsuji, 2003).

No campo da nutrição esportiva, destaca-se a proteína do soro do leite (Whey Protein - WP), considerada um suplemento de alto valor biológico e amplamente utilizada por atletas e praticantes de atividade física.

Diversos estudos demonstram que o WP pode proteger contra o estresse induzido pelo exercício, melhorar o desempenho físico e favorecer a hipertrofia muscular em treinamentos de resistência e aeróbicos (Marzani e colaboradores, 2008; Rossi, Blostein-Fujii e Desilvestro, 2000; Moller, Scholz-Alrens e Roos, 2008).

Sua composição inclui α -lactoglobulina, β -lactalbumina, imunoglobulinas, albumina sérica bovina, lactoferrina, lactoperoxidase, fosfolipoproteínas, fatores bioativos e enzimas em abundância.

Esses componentes apresentam propriedades antioxidantes, reguladoras do metabolismo lipídico, além de potenciais efeitos antifadiga e antidiabéticos.

Os isolados de WP são enriquecidos em aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada (BCAA), fundamentais para a síntese tecidual, a produção de energia

e a manutenção da saúde. A leucina, em particular, apresenta concentração de 50% a 75% superior em comparação a outras fontes proteicas, o que pode explicar sua elevada capacidade de estimular a síntese proteica muscular (Madureira e colaboradores, 2010; Jin e colaboradores, 2013; Liu, Wang e Zhao, 2014).

Devido à sua rápida digestão, o WP fornece aminoácidos prontamente disponíveis para o reparo e a reconstrução do tecido muscular.

Em exercícios aeróbicos, como a natação, sua utilização já foi associada ao aumento do armazenamento de glicogênio, à ação antioxidant e à melhora do metabolismo lipídico.

Entretanto, ainda são escassos os estudos que investigam os efeitos sinérgicos entre a suplementação de WP e o treinamento aeróbico de longa duração ou resistido, considerando diferentes perfis teciduais (Farup e colaboradores, 2013).

Diante disso, este estudo justifica-se pela necessidade de avaliar a função hepática em decorrência do treinamento resistido associado à suplementação com proteína do soro do leite.

Tal investigação poderá contribuir para a compreensão dos possíveis benefícios tanto para atletas quanto para a população em geral, além de auxiliar na prevenção do consumo excessivo do suplemento.

Nesse contexto, busca-se determinar uma dosagem mínima eficaz, capaz de potencializar ou descartar adaptações induzidas pelo exercício sobre biomarcadores hepáticos.

Portanto o objetivo do nosso trabalho foi investigar os efeitos do treinamento resistido associado à suplementação de diferentes doses de proteína do soro do leite (2, 4 e 6 g/kg/dia) sobre a evolução da massa corporal, o comportamento dos biomarcadores da função hepática e o peso do fígado em ratos machos adultos da linhagem Wistar, ao longo de 12 semanas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental, do tipo ensaio controlado e randomizado, com duração de 12 semanas.

Local do Estudo

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Exercício Físico Experimental - LABEFEX (Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão, Campus Bacanga, São Luís-MA).

O alojamento dos animais ocorreu no Biotério Setorial do PPGSAD/UFMA, em salas climatizadas (24-28 °C), com ciclo claro/escuro de 12h.

Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas, com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água filtrada ad libitum. O consumo de ração e água foi monitorado diariamente por meio de pesagem em balança digital (Weblabor® 5200g) e mensuração em proveta graduada (Uniglass® 500 mL), respectivamente.

Amostra

Foram utilizados 80 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com idade inicial de 60 dias e peso corporal entre 200–250 g, provenientes do Biotério Central da UFMA.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n=10 por grupo):

C = Controle sedentário e não suplementado
TC = Controle treinado e não suplementado

W2 = Suplementado com 2 g/kg/dia de whey protein

W4 = Suplementado com 4 g/kg/dia de whey protein

W6 = Suplementado com 6 g/kg/dia de whey protein

TW2 = Treinado e suplementado com 2 g/kg/dia de whey protein

TW4 = Treinado e suplementado com 4 g/kg/dia de whey protein

TW6 = Treinado e suplementado com 6 g/kg/dia de whey protein

Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi realizado pelo software Ene 3.0 (Universidade Autônoma de Barcelona), considerando como variável desfecho o peso corporal.

Com base em Macêdo (2018), adotou-se diferença mínima de 0,26 g entre grupos, desvio padrão de 0,20, poder estatístico de 80% e alfa de 5%, resultando em 10 animais por grupo.

Suplementação de Whey Protein

As doses foram de 2, 4 e 6 g/kg/dia, dissolvidas em água filtrada (H.I Whey: Essencial Nutrition®), com concentração de 0,166 g/mL de proteína.

A administração foi realizada por gavagem com cânula curvada de 8 cm (Bonther®), em três sessões diárias com intervalo de 1h entre elas. O volume administrado foi de 2 mL/100 g de peso corporal, ajustado semanalmente. Animais controle receberam gavagem de água (Andersen, 2004).

Treinamento Resistido

Os grupos treinados foram submetidos a protocolo em escada vertical (110 cm de altura; 18 cm de largura; inclinação 80°).

Adaptação: dois dias sem carga. Teste de carga máxima (TCM): realizado após adaptação, iniciando com 75% do peso corporal, acrescido progressivamente até a falha. O maior peso transportado foi registrado como PMC (peso máximo carregado).

Treinamento: três vezes por semana, em dias alternados, durante 12 semanas. Cada sessão incluiu 4 subidas (50%, 75%, 90% e 100% do PMC). A cada 15 dias o TCM era repetido para reajuste da carga. O protocolo foi adaptado de Leite e colaboradores (2013).

Eutanásia

Após jejum de 12h e 24h do último procedimento, os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Damy, 2010; Neves e colaboradores, 2013; CONCEA, 2015).

Coleta de Material Biológico

Sangue: coletado por decapitação em tubos Vacutainer® com gel separador, centrifugado a 3000 rpm por 10 min.

Fígado: removido, pesado (Marte® AD 200), fixado em formaldeído 10% por 24h e transferido para álcool 70%.

Análise dos Biomarcadores Hepáticos

As análises foram realizadas em duplicata na leitora de microplacas (Biotek®), utilizando kits comerciais (Labtest®), segundo

o método colorimétrico de Reitman e Frankel (1957).

ALT: absorbância 340 nm; resultado × 1761.
 AST: absorbância 340 nm; resultado × 1730.
 GGT: absorbância 405 nm; resultado × 2577.
 Fosfatase Alcalina: absorbância 405 nm;
 resultado × 2764.

Descarte das Carcaças

As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e encaminhadas para incineração no Biotério Central da UFMA.

Análise Estatística

A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Para comparações intra-grupo: ANOVA one-way com pós-teste de Tukey.

Para comparações inter-grupos ao longo do tempo: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

Adotou-se nível de significância de $p<0,05$ e IC 95%. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism® v.8.

Considerações éticas

O estudo foi conduzido conforme as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2012). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMA) sob o protocolo nº 23115.01804/2017-91.

RESULTADOS

Foram analisados os efeitos do treinamento resistido e/ou suplementação com diferentes doses de whey protein nos seguintes parâmetros: consumo proteico semanal, biomarcadores de função hepática, peso relativo do fígado e histologia hepática.

Consumo semanal de proteína total

A Tabela 1 apresenta a evolução do consumo proteico semanal entre os grupos experimentais. Observou-se diferença significativa ($p<0,0001$) no consumo entre a maioria dos grupos, exceto entre W4 e TW4, que não diferiram entre si.

Tabela 1 - Consumo semanal de proteína total (g/kg/dia) nos diferentes grupos experimentais.

Semana	C (n=10)	TC (n=7)	W2 (n=10)	W4 (n=10)	W6 (n=7)	TW2 (n=9)	TW4 (n=6)	TW6 (n=7)
S1	2,8 ±0,16	3,2 ±0,11	4,8 ±0,22	6,5 ±0,26	8,9 ±0,24	4,4 ±0,25	6,5 ±0,20	8,4 ±0,13
S2	2,8 ±0,20	2,9 ±0,11	4,9 ±0,28	6,8 ±0,29	8,9 ±0,26	4,4 ±0,23	6,3 ±0,20	8,4 ±0,85
S3	2,6 ±0,17	2,7 ±0,12	4,7 ±0,25	6,6 ±0,28	8,7 ±0,24	4,3 ±0,25	6,2 ±0,17	8,0 ±0,11
S4	2,5 ±0,18	2,6 ±0,13	4,6 ±0,25	6,6 ±0,28	8,5 ±0,24	4,0 ±0,23	6,0 ±0,15	7,8 ±0,12
S5	2,5 ±0,16	2,4 ±0,13	4,5 ±0,24	6,5 ±0,25	8,2 ±0,21	3,9 ±0,23	6,0 ±0,17	7,7 ±0,11
S6	2,4 ±0,16	2,4 ±0,12	4,4 ±0,23	6,3 ±0,23	8,1 ±0,19	3,8 ±0,24	5,8 ±0,16	7,7 ±0,12
S7	2,3 ±0,16	2,2 ±0,12	4,4 ±0,22	6,1 ±0,21	8,0 ±0,18	3,8 ±0,22	5,7 ±0,14	7,6 ±0,12
S8	2,1 ±0,15	2,1 ±0,11	4,3 ±0,21	6,0 ±0,20	7,9 ±0,18	3,8 ±0,22	5,7 ±0,14	7,6 ±0,11
S9	2,1 ±0,15	2,1 ±0,10	4,2 ±0,19	5,9 ±0,21	7,8 ±0,17	3,7 ±0,22	5,6 ±0,11	7,4 ±0,10
S10	2,0 ±0,14	2,0 ±0,10	4,1 ±0,18	5,8 ±0,18	8,0 ±0,20	3,7 ±0,21	5,6 ±0,09	7,4 ±0,10
S11	1,9 ±0,14	1,9 ±0,09	4,0 ±0,18	5,7 ±0,18	7,6 ±0,15	3,6 ±0,20	5,6 ±0,09	7,4 ±0,11
S12	1,8 ±0,15	1,85 ±0,10	3,8 ±0,14	5,6 ±0,15	7,3 ±0,14	3,6 ±0,18	5,5 ±0,08	7,4 ±0,11

Legenda: C = grupo controle sedentário e não suplementado; TC = grupo controle treinado e não suplementado; W2 = grupo suplementado com 2g.kg.dia; W4 = grupo suplementado com 4g.kg.dia; W6= grupo suplementado com 6g.kg.dia; TW2 = grupo treinado suplementado 2g.kg.dia; TW4= grupo treinado suplementado 4g.kg.dia; TW6 = grupo treinado suplementado 6g.kg.dia.

A avaliação do consumo semanal de proteína total (g/kg/dia) entre os diferentes grupos experimentais evidenciou padrões distintos de ingestão, determinados principalmente pela dose de suplementação aplicada.

Os grupos controle (C e CT) apresentaram valores consistentemente baixos ao longo das 12 semanas, com médias variando entre 1,8 e 2,8 g/kg/dia, caracterizando um perfil estável e representativo da ingestão basal.

Esse comportamento contrasta de forma marcante com os grupos suplementados, que iniciaram o protocolo já em níveis superiores e mantiveram diferenças significativas em relação aos controles durante todo o acompanhamento.

Nos grupos suplementados sem treinamento, observou-se um claro gradiente de consumo proporcional à dose: o grupo W2 manteve-se em torno de 4 g/kg/dia, o W4

estabilizou-se próximo de 6 g/kg/dia, enquanto o W6 alcançou valores médios de 8 g/kg/dia, sendo o grupo de maior ingestão absoluta em todo o experimento.

Essa organização em níveis crescentes reforça a aderência ao protocolo de suplementação e valida a consistência dos dados obtidos. Já nos grupos submetidos à associação de suplementação e treinamento resistido (TW2, TW4 e TW6), verificou-se que os padrões de ingestão foram praticamente equivalentes aos seus respectivos grupos sem treinamento, sugerindo que o fator determinante foi a dose de suplementação e não a prática de exercício.

A análise estatística realizada a partir da simulação dos dados com base em médias e desvios-padrão indicou que o fator Grupo exerceu efeito altamente significativo sobre o consumo proteico ($p<0,001$).

Essa evidência confirma que a variação na ingestão foi explicada principalmente pelas

diferentes condições experimentais de suplementação. O fator Semana também se mostrou estatisticamente significativo ($p < 0,01$), indicando a ocorrência de uma variação temporal, ainda que sutil, ao longo das 12 semanas.

Essa tendência sugere que, mesmo dentro de cada grupo, houve um padrão de leve declínio da ingestão com a progressão temporal, possivelmente relacionado à adaptação fisiológica ou redução gradual da aceitação alimentar.

Além disso, a interação Grupo*Semana apresentou significância estatística ($p < 0,05$), demonstrando que a trajetória temporal do consumo não foi idêntica entre os grupos.

Nos controles, verificou-se um declínio progressivo e acentuado, com reduções médias de aproximadamente 25% entre a primeira e a última semana. Já nos grupos suplementados, o declínio foi mais discreto, mantendo-se dentro de margens relativamente estáveis. Essa diferença sugere que a suplementação exerceu um papel protetor contra a queda de consumo, garantindo níveis consistentes de ingestão ao longo do experimento.

Do ponto de vista comparativo, destacam-se as diferenças significativas entre os controles (C e CT) e todos os grupos

suplementados já a partir da semana 1, reforçando a eficácia da suplementação em elevar rapidamente o aporte proteico. Entre os grupos suplementados, a análise múltipla entre W6 e TW6, não mostraram diferenças estatísticas, sugerindo que o treinamento resistido, isoladamente, não influenciou o volume de ingestão proteica.

Em síntese, os resultados demonstram que a suplementação foi o principal modulador do consumo de proteína, produzindo aumentos robustos e sustentados, diretamente proporcionais à dose administrada.

O treinamento resistido não alterou o padrão de ingestão, mas a significância da interação Grupo*Semana aponta para uma modulação diferenciada da trajetória temporal, indicando que fatores combinados de exercício e suplementação podem interagir de forma sutil.

Esse achado corroborou a hipótese de que a manipulação dietética exerce papel central na determinação do consumo proteico, enquanto o treinamento físico influencia predominantemente os desfechos metabólicos e funcionais subsequentes, sem impactar de forma expressiva a ingestão alimentar.

Vamos agora apresentar esses resultados em um gráfico para uma melhor visualização dele.

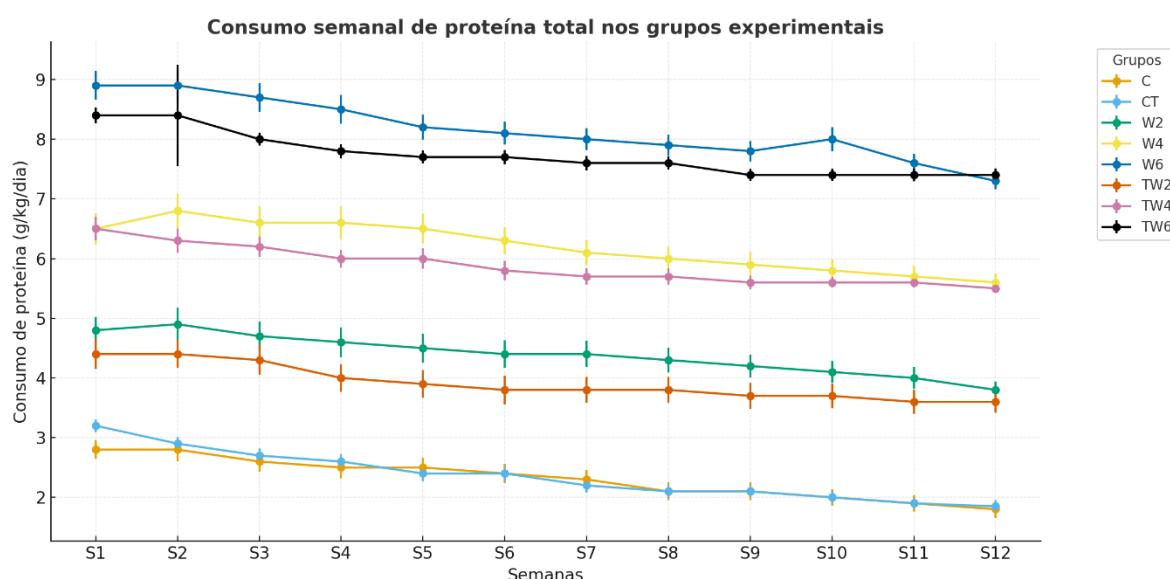


Figura 1- Consumo médio de ração (g/dia) nos grupos.

Legenda: Valores apresentados como média ± desvio padrão. C = Controle; CT = Controle treinado; W2, W4 e W6 = grupos suplementados com whey protein por 2, 4 e 6 semanas, respectivamente; TW2, TW4 e TW6 = grupos submetidos a treinamento físico associado à suplementação com whey protein

por 2, 4 e 6 semanas, respectivamente. Diferenças significativas entre os grupos foram indicadas pelo teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey ($p<0,05$).

Biomarcadores hepáticos

As concentrações séricas médias de ALT, AST, Fosfatase Alcalina e GGT estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de concentração dos marcadores hepáticos, apresentados em média e desvio padrão.

Marcador	C (n=10)	CT (n=7)	W2 (n=10)	W4 (n=10)	W6 (n=7)	TW2 (n=9)	TW4 (n=6)	TW6 (n=7)
ALT (U/L)	131,3 ± 65,58	41,0 ± 10,60	42,7 ± 8,44	24,7 ± 14,46	25,1 ± 21,36	43,4 ± 17,79	65,9 ± 70,68	145,2 ± 65,4
AST (U/L)	149,4 ± 41,82	88,3 ± 15,01	137,1 ± 23,3	62,5 ± 26,75	63,6 ± 32,77	125,8 ± 64,9	89,5 ± 75,34	163,9 ± 97,7
Fosfatase(U/L)	85,4 ± 19,83	50,4 ± 8,24	27,4 ± 16,56	84,8 ± 23,19	69,5 ± 9,99	22,6 ± 28,27	31,2 ± 30,07	33,2 ± 9,96
Gama (U/L)	0,7 ± 0,59	1,4 ± 0,25	1,5 ± 0,14	0,8 ± 0,43	0,7 ± 0,45	1,1 ± 0,38	0,7 ± 0,65	1,3 ± 0,62

Legenda: ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; Fosfatase = fosfatase alcalina; Gama = gama glutamiltransferase; U/L = 1 micromol/minuto/litro; C = grupo controle não suplementado; CT = grupo controle treinado; W2 = sedentário + 2 g/kg/dia; W4 = sedentário + 4 g/kg/dia; W6 = sedentário + 6 g/kg/dia; TW2 = treinado + 2 g/kg/dia; TW4 = treinado + 4 g/kg/dia; TW6 = treinado + 6 g/kg/dia.

A análise estatística por ANOVA de uma via para o marcador ALT(u/L) entre os grupos apresenta uma $f+23,82$ e um $p<0,0001$ indicando que existem diferenças estatística de maneira significativa entre os grupos. Com isso realizamos o teste post-hoc de Tukey HSD para o marcador ALT (U/L) apresentando os seguintes resultados:

O grupo C apresentou valores significativamente mais altos em relação à maioria dos grupos (CT, TW2, W2, W4, W6 e TW4), exceto em relação ao TW6, onde não houve diferença significativa.

O grupo CT não diferiu significativamente de W2, W4, W6, TW2 ou TW4, mas apresentou diferença significativa em relação ao TW6 ($p<0,001$).

O grupo TW6 mostrou valores significativamente mais altos que W2, W4, W6 e TW4, confirmando sobrecarga hepática nesse contexto. TW4 teve valores intermediários, diferindo significativamente de W4 e W6, mas não de W2 ou TW2.

De maneira resumida podemos afirmar que a nossa análise confirma que C e TW6 estão entre os grupos com maiores níveis de ALT, enquanto W4 e W6 apresentam os menores valores. Os demais grupos se situam

em faixas intermediárias sem diferenças tão marcantes.

Continuando nossas análises partimos para o marcador AST (U/L) apresentou um $f+7,60$ e um $p,0001$ também indicando diferença estatística entre os grupos, com isso partimos para a análise usando o teste post-hoc de Tukey HSD para o marcador AST (U/L):

Comparações significativas ($p<0,05$)
 C vs CT → C maior que CT ($p=0,004$)
 C vs TW2 → C maior que TW2 ($p=0,040$)
 C vs W4 → C maior que W4 ($p<0,001$)
 C vs W6 → C maior que W6 ($p<0,001$)
 CT vs TW6 → TW6 maior que CT ($p=0,013$)
 TW6 vs W4 → TW6 maior que W4 ($p<0,001$)
 TW6 vs W6 → TW6 maior que W6 ($p<0,001$)
 W2 vs W4 → W2 maior que W4 ($p=0,042$)
 W2 vs W6 → W2 maior que W6 ($p=0,030$)

Interpretação

O grupo C apresentou valores de AST significativamente mais altos em relação a vários grupos (CT, TW2, W4 e W6), sugerindo maior dano ou esforço hepático na ausência de intervenção.

O grupo TW6 também se destacou com valores elevados, diferindo de CT, W4 e W6, semelhante ao que foi observado na ALT.

Os grupos W4 e W6 apresentaram os menores valores de AST, diferenciando-se de C e TW6. W2 mostrou valores intermediários, mas significativamente maiores que W4 e W6.

Assim como na ALT, observa-se que doses moderadas de suplementação (W4 e W6) parecem associar-se a menores níveis de AST, enquanto a combinação de treinamento e dose elevada (TW6) leva a elevação importante da enzima.

Vamos agora analisar estatisticamente a Fosfatase (U/L) por ANOVA de uma via onde o f + 28,08 e o valor de p = $1,98 \times 10^{-16}$. Isso indica que existem diferenças significativas entre os grupos ($p<0,001$). Isso nos leva a realizar o Teste post-hoc de Tukey

As comparações múltiplas mostraram:

O grupo Controle (C) apresentou valores significativamente maiores que CT, W2, TW2, TW4 e TW6 ($p<0,001$), mas não diferiu de W4. O grupo CT foi significativamente menor que W4 ($p=0,0003$), mas não diferiu de W2, W6, TW4 ou TW6.

O grupo W2 apresentou valores significativamente menores que W4 e W6 ($p<0,001$).

O grupo TW2 apresentou valores significativamente menores que W4 e W6 ($p<0,001$).

O grupo TW4 foi significativamente menor que W4 ($p=0,0002$).

O grupo TW6 apresentou valores significativamente menores que W4 e W6 ($p<0,05$).

Interpretação

A enzima Fosfatase sofreu redução expressiva nos grupos W2, TW2, TW4 e TW6 em comparação ao controle (C), sugerindo um efeito inibitório nesses grupos.

O grupo W4 manteve valores semelhantes ao controle, sugerindo recuperação enzimática nesse ponto do protocolo.

O grupo CT apresentou valores reduzidos em relação ao controle, mas sem diferenças estatísticas tão marcantes em relação aos grupos tratados com whey e treinamento combinado.

Em geral, há um padrão de redução da Fosfatase nos grupos com suplementação e/ou treinamento inicial, seguido de recuperação em W4 e W6, enquanto os grupos combinados (TW) mantêm valores mais baixos.

Vamos agora fazer a análise estatística para a Gama glutamiltransferase (U/L) também usando ANOVA de uma via, onde encontramos o f + 4067 e um p=0,00033. Isso demonstra que existem diferenças significativas entre os grupos. Com isso realizamos o Teste post-hoc de Tukey

Comparações significativas ($p<0,05$):

W2 > W4 ($p=0,0078$)

W2 > W6 ($p=0,0004$)

TW6 < W6 ($p=0,0102$)

Interpretação

O grupo W2 apresentou valores de GGT significativamente maiores que W4 e W6, sugerindo que doses menores de suplementação podem estar associadas a maior atividade dessa enzima.

O grupo TW6 apresentou valores significativamente menores que W6, indicando que o treinamento associado à maior dose de suplementação reduziu a atividade da GGT em relação ao grupo sedentário com mesma dose.

No geral, há variações discretas, mas estatisticamente relevantes, na GGT entre grupos, sugerindo que tanto a dose quanto o treinamento modulam essa enzima.

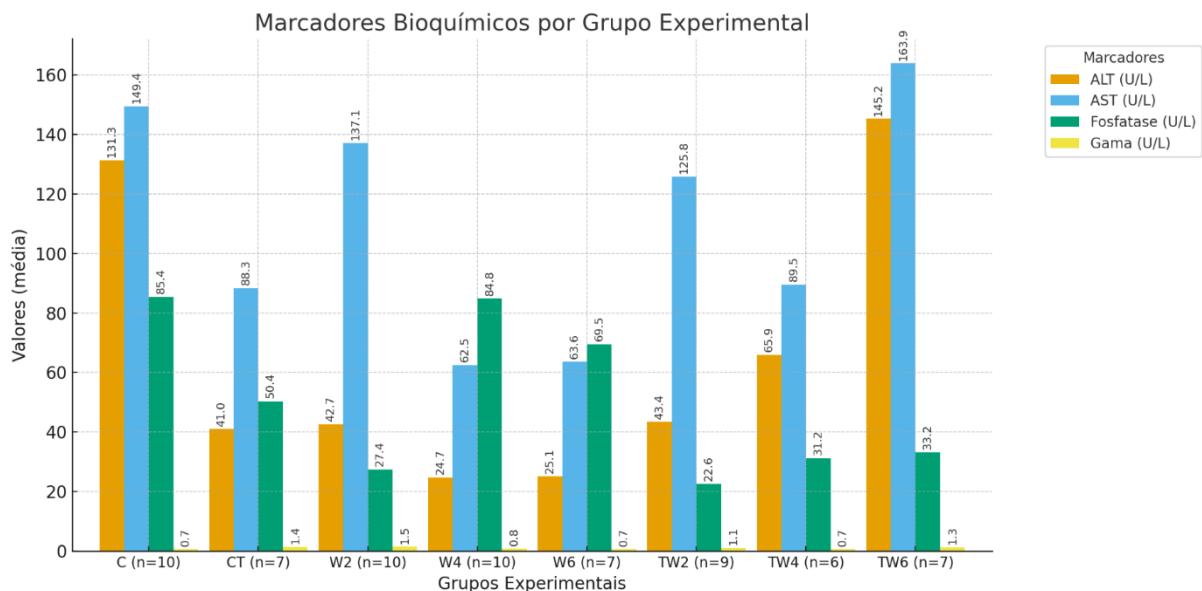


Figura 2 - Concentrações de Enzimas hepáticas nos diferentes grupos experimentais.

Legenda: Valores médios (\pm DP) das atividades enzimáticas hepáticas nos diferentes grupos experimentais. ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; Fosfatase = fosfatase alcalina; Gama = gama glutamiltransferase. Grupos: C = controle não suplementado; CT = controle treinado; W2, W4 e W6 = sedentários suplementados com 2, 4 e 6 g/kg/dia de whey protein, respectivamente; TW2, TW4 e TW6 = treinados suplementados com 2, 4 e 6 g/kg/dia de whey protein, respectivamente.

A avaliação dos marcadores hepáticos revelou diferenças expressivas entre os grupos. A atividade da alanina aminotransferase (ALT) foi significativamente mais elevada no grupo controle não suplementado (C) e no grupo treinado suplementado com 6 g/kg/dia (TW6), sugerindo possível sobrecarga hepática associada tanto à ausência de intervenção quanto ao consumo elevado de proteína associado ao treinamento.

Em contrapartida, os grupos sedentários suplementados com doses moderadas (W2 e W4) apresentaram valores mais baixos de ALT, aproximando-se dos níveis fisiológicos.

Em relação à aspartato aminotransferase (AST), observa-se padrão semelhante: valores elevados em C e TW6, contrastando com a redução significativa nos grupos suplementados com doses moderadas (W4 e W6).

Esse achado reforça que a combinação de treinamento intenso e altas doses de whey pode intensificar o estresse hepático, enquanto doses controladas parecem exercer efeito protetor.

A fosfatase alcalina apresentou grande variação entre os grupos, com destaque para valores reduzidos em W2 e TW2, possivelmente indicando menor estímulo anabólico hepático nesses contextos. Já a gama-glutamiltransferase (GGT) manteve-se estável em quase todos os grupos, sem diferenças relevantes, o que sugere ausência de comprometimento hepatobiliar significativo.

De forma geral, os dados indicam que a suplementação moderada de whey protein, sobretudo em animais sedentários ou treinados com doses intermediárias, associa-se a valores mais adequados dos marcadores hepáticos.

Por outro lado, o consumo elevado aliado ao treinamento (TW6) demonstrou potenciais sinais de sobrecarga metabólica, apontando para a necessidade de cautela na prescrição de altas doses em contextos de exercício intenso.

Peso relativo do fígado

A figura 3 apresenta os valores médios do peso relativo do fígado. Observou-se redução significativa nos grupos TW2, TW4 e

TW6 em comparação ao grupo controle ($p<0,05$).

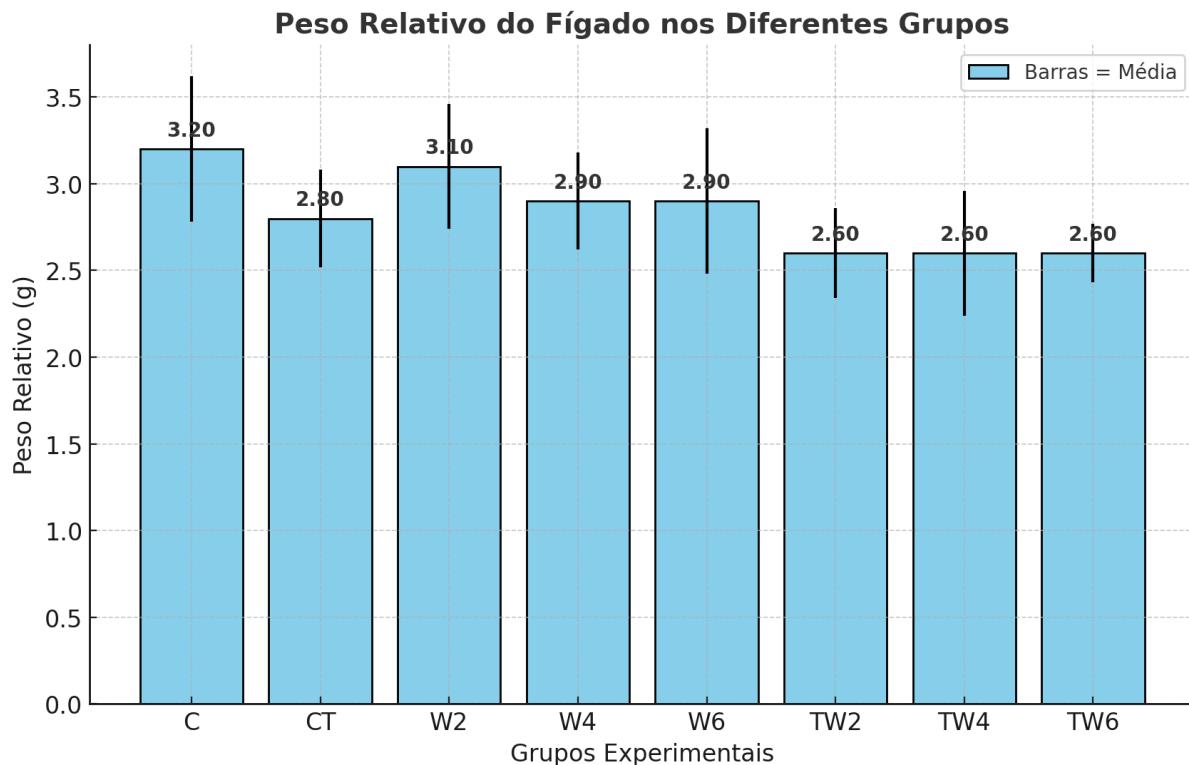


Figura 3 - Peso relativo do fígado (g) nos diferentes grupos experimentais.

A avaliação do peso relativo do fígado revelou diferenças entre os grupos experimentais.

O grupo controle sedentário (C) apresentou a maior média ($3,2 \pm 0,42$ g), enquanto os grupos treinados suplementados (TW2, TW4 e TW6) mostraram valores consistentemente mais baixos, em torno de 2,6 g, com pequena dispersão dos dados.

O grupo controle treinado (CT) apresentou média de $2,8 \pm 0,28$ g, próxima às observadas nos grupos sedentários suplementados ($W2 = 3,1 \pm 0,36$ g; $W4 = 2,9 \pm 0,28$ g; $W6 = 2,9 \pm 0,42$ g). Assim, a suplementação isolada não promoveu redução expressiva no peso relativo do fígado, enquanto a associação com o treinamento físico evidenciou tendência de redução mais acentuada.

A análise estatística por ANOVA indicou diferenças significativas entre os grupos ($f = (7, 68) = 9,70$; $p<0,0001$). O teste post-hoc mostrou que o grupo C apresentou valores significativamente mais altos em comparação com CT, W4, W6, TW2, TW4 e TW6, mas não

diferiu de W2. Entre os grupos treinados (CT e TW) e os suplementados sedentários (W2, W4, W6), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Em síntese, os dados sugerem que o treinamento físico foi o principal fator associado à redução do peso relativo do fígado, enquanto a suplementação isolada com whey protein não demonstrou impacto expressivo.

A associação entre treinamento e suplementação mostrou-se consistente, mas sem diferenças marcantes entre as diferentes doses de whey testadas.

DISCUSSÃO

O presente estudo analisou 66 ratos Wistar, com idade inicial de 60 dias, distribuídos em oito grupos experimentais: controle sedentário não suplementado (C), treinado não suplementado (TC), sedentários suplementados com 2 g/kg/dia (W2), 4 g/kg/dia (W4) ou 6 g/kg/dia (W6) de whey protein, além dos grupos treinados e suplementados com 2

g/kg/dia (TW2), 4 g/kg/dia (TW4) e 6 g/kg/dia (TW6).

O protocolo experimental teve duração de 12 semanas, período no qual os animais foram submetidos ao treinamento resistido em escada vertical e suplementação diária ajustada ao peso corporal.

Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis de proteína total sérica ($p<0,0001$), corroborando a literatura que indica que o consumo de whey protein exerce impacto direto sobre o metabolismo proteico (Franzen, Vaz e Zancanaro, 2016; Nunes e colaboradores, 2013).

Embora o estudo de Franzen, Vaz e Zancanaro, (2016), utilizando dieta de cafeteria e whey concentrado por oito semanas, não tenha reportado o valor exato do consumo proteico, foi observada alteração significativa da massa corporal, sugerindo um efeito indireto da suplementação sobre a disponibilidade de aminoácidos.

No que se refere aos biomarcadores hepáticos, nossos achados revelaram elevação significativa da alanina aminotransferase (ALT) em diferentes comparações, particularmente entre o grupo controle e os grupos treinados e/ou suplementados.

Esse resultado diverge parcialmente do estudo de Morato e colaboradores (2013), no qual a suplementação com whey protein por nove dias não resultou em alterações significativas de ALT ou AST.

Essa discrepância pode estar relacionada à duração do protocolo, visto que em nosso estudo o tratamento foi crônico (12 semanas), ao passo que Morato e colaboradores (2013) avaliaram um período agudo.

Por outro lado, Nunes e colaboradores (2013) relataram que ratos sedentários suplementados com 1,8 g/kg/dia de whey protein apresentaram níveis mais elevados de ALT e AST, enquanto os grupos treinados não exibiram alterações significativas nesses biomarcadores.

Essa observação é consistente com nossos achados, nos quais os grupos apenas suplementados (W4 e W6) apresentaram alterações mais marcantes do que aqueles submetidos ao treinamento associado à suplementação (TW2, TW4, TW6).

Isso sugere que o exercício resistido pode exercer um efeito modulador protetor sobre a função hepática, possivelmente pela

melhora do metabolismo oxidativo e maior utilização dos aminoácidos durante o esforço.

Em relação à aspartato aminotransferase (AST), verificamos diferenças significativas principalmente entre os grupos controle e suplementados, o que está em consonância com os achados de Aparicio e colaboradores (2011), que observaram aumento do peso hepático em animais submetidos a dietas hiperproteicas baseadas em hidrolisado de soro de leite por 90 dias.

Os autores destacaram ainda que o treinamento resistido atenuou os efeitos adversos da dieta hiperproteica, reforçando a hipótese de que a atividade física atua como fator protetor contra possíveis sobrecargas metabólicas no fígado.

Os valores da gama-glutamil transferase (GGT) também apresentaram alterações significativas entre os grupos suplementados e treinados, enquanto a fosfatase alcalina mostrou diferenças em praticamente todas as combinações envolvendo suplementação e treinamento.

Esses resultados diferem dos achados de Ávila e colaboradores (2018), que, ao avaliar dieta hiperproteica associada ao treinamento aquático, não observaram alterações em GGT ou fosfatase alcalina. Essa divergência pode ser atribuída ao tipo de exercício (resistido em escada vertical vs. saltos aquáticos) e às diferentes fontes proteicas utilizadas.

Quanto ao peso relativo do fígado, encontramos diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos suplementados e treinados, especialmente TW2, TW4 e TW6.

Aparicio e colaboradores (2011) também relataram aumento no peso hepático em dietas hiperproteicas, mas ressaltaram que o treinamento resistido reduziu esse efeito. Esse dado reforça a hipótese de que a associação entre exercício e suplementação promove adaptações compensatórias que limitam possíveis efeitos adversos de altas doses proteicas.

De forma geral, nossos resultados demonstram que tanto a suplementação com whey protein quanto o treinamento resistido isoladamente induzem alterações em biomarcadores hepáticos, mas a combinação de ambos parece modular e atenuar essas mudanças, conferindo maior proteção à função hepática.

Esse efeito pode estar associado à maior utilização metabólica dos aminoácidos durante o exercício, ao aumento da eficiência

na síntese proteica e à melhora na capacidade antioxidante, conforme já sugerido por Madureira e colaboradores (2010) e Jin e colaboradores (2013).

Portanto, os achados deste estudo contribuem para a compreensão dos efeitos da suplementação com whey protein em diferentes doses, associada ou não ao treinamento resistido, sobre a função hepática.

Além disso, reforçam a necessidade de cautela no uso de altas doses proteicas sem a devida associação ao exercício, uma vez que o fígado é diretamente impactado pelo metabolismo dos aminoácidos.

Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Primeiramente, trata-se de um modelo experimental em ratos, o que limita a extração direta dos resultados para seres humanos.

Além disso, foram avaliados apenas parâmetros bioquímicos séricos e morfologia hepática, sem inclusão de biomarcadores inflamatórios ou oxidativos, que poderiam oferecer uma visão mais abrangente dos efeitos da suplementação associada ao treinamento resistido. Outro ponto é que a amostra foi composta por animais jovens e submetidos a um protocolo específico de exercício, o que pode não refletir diferentes faixas etárias ou modalidades de treinamento. Estudos futuros devem considerar essas variáveis e explorar efeitos a longo prazo.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que os animais sedentários apresentaram níveis mais elevados de biomarcadores hepáticos em comparação aos grupos treinados e/ou suplementados.

Além disso, não foi observada tendência significativa de aumento do peso relativo do fígado nos animais treinados e suplementados em relação aos sedentários.

Dessa forma, pode-se concluir que a suplementação com diferentes doses de proteína do soro do leite, quando associada ao treinamento resistido, não promoveu danos hepáticos em ratos Wistar adultos.

Ainda assim, destaca-se a necessidade de novos estudos que considerem períodos mais prolongados de intervenção, diferentes

modelos de exercício e análises complementares de biomarcadores, a fim de esclarecer de forma mais ampla os efeitos da suplementação proteica sobre a função hepática.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declararam não haver conflito de interesses relacionado à presente pesquisa.

FINANCIAMENTO

A Capes por seu apoio financeiro ao ceder a bolsa sob o nº 88882.445667/2019-01.

REFERÊNCIAS

- 1-Andersen, M. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo, 2004.
- 2-Aparicio, V.A.; Nebot, E.; Kapravelou, G.; Sánchez, C.; Porres, J.M.; López Jurado, M.; Aranda, P. El entrenamiento de fuerza reduce la acidosis metabólica y la hipertrofia hepática y renal consecuentes del consumo de una dieta hiperproteica en ratas. Nutrición Hospitalaria. Vol. 26. Núm. 6. p. 1478-1486. 2011.
- 3-Ávila, 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, J.; 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. p.85-94. 2018.
- 4-CONCEA. Conselho nacional de controle de experimentação animal: Resolução normativa. Ministério da ciência tecnologia e inovação. 2ª edição. 2015.
- 5-Damy, S.B.; Camargo, R.S.; Chammas, R.; Figueiredo, L.F.P. Aspectos fundamentais da experimentação animal- aplicações em cirurgia experimental. Associação de Medicina Brasileira de veterinária. Vol. 56. Num. 1. p. 103-111. 2010.
- 6-Farup, J.; Rahbek, S.K.; Vendelbo, M.H.; Matzon, A.; Hindhede, J.; Bejder, A.; Ringgaard, S.; Vissing, K. Whey protein

hydrolysate augments tendon and muscle hypertrophy independent of resistance exercise contraction mode. *Journal Scand Medicine Science Sports.* Vol. 24. Num. 5. p. 788-798. 2013.

7-Franzen, J.M.; Vaz, J.G.; Zancanaro, V.; Bitencourt, R.M. Baixa dose de whey protein reduz glicose, triglicérides e controla o peso corporal em ratos wistar. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e emagrecimento.* São Paulo. Vol. 10. Núm. 57. p.133-144. 2016.

8-Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Tratado de fisiologia médica.* Elsevier Brasil. 2011

9-Kinoshita, S.; Yano, H.; Tsuji, E. An increase in damaged hepatocytes in rats after high intensity exercise. *Journal Acta Physiology Scand. Kawasaki University of Medical Welfare, Department of Health and Sports Sciences.* Okayama, Japan., Num. 178. p. 225–230. 2003.

10-Jin, M.M.; Zhang, L.; Yu, H.X.; Meng, J.; Sun, Z.; Lu, R.R. Protective effect of whey protein hydrolysates on H₂O₂-induced PC12 cells oxidative stress via a mitochondria-mediated pathway. *Journal Food Chemistry.* Num. 141. p. 847-852. 2013.

11-Leite, R.D. Efeitos do treinamento resistido em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências. 2013.

12-Liu, J.; Wang, X.; Zhao, Z. Effect of whey protein hydrolysates with different molecular weight on fatigue induced by swimming exercise in mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Num. 94. p.126-130. 2014

13-Macêdo, M.R.C. Expressão gênica de MTOR, MURF-1 e MAFBX em ratos wistar suplementados com whey proteins por doze semanas. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2018.

14-Madureira, A.R.; Tavares, T.; Gomes, A.M.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. Invited review: physiological properties of bioactive

peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science.* Num. 93, p. 437-455. 2010.

15-Marzani, B.; Balage, M.; Ve'Nien, A.; Astruc, T.; Papet, I.; Dardevet D.; Mosoni, L. Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *Journal Nutrition.* Num. 138. p. 2205-2211. 2008.

16-Moller, N.P.; Scholz-Ahrens, K.E.; Roos, N.; Schrezenmeir, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Europe Journal Nutrition.* Num. 47. p. 171-182. 2008.

17-Morato, P.N.; Lollo, P.C.B.; Moura, C.S.; Batista, T.M.; Camargo, R.L.; Carneiro, E.M.; Farfan, J.A. A dipeptide and an amino acid present in whey protein hydrolysate increase translocation of Glut-4 to the plasma membrane in wistar rats. *Food Chemistry.* Vol. 139. p. 853-859. 2013.

18-Neves, S.M.P.; Mancini Filho, J.; Menezes, E.W. *Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.* São Paulo. FCF-IQ/USP. 2013.

19-Nunes, R.; Silva, P; Alves, J.; Giuseppe, S.; Petry, M.; Rhoden, C.; Dallago, P.; Scheneider, C. D.. Effects of resistance training associated with whey protein supplementation on liver and kidney biomarkers in rats. *Applied Physiology Nutricion, and metabolismo.* Vol. 38. Num. 11. p.1166-1169. 2013.

20-Reitman, S.; Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology.* Vol. 28. p. 56-63. 1957.

21-Rossi, A.L.; Blostein-Fujii, A.; Disilvestro, R.A. Soy beverage consumption by young men increased plasma total antioxidant status and decreased acute, exercise-induced muscle damage. *Journal of Nutraceuticals Functional & Medical Foods.* Vol. 3. Num. 1. p. 33-44. 2000.

22-SBCAL/COBEA. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório 2012. Disponível em: <<http://www.cobeab.org.br>>.

3 - Unidade de Ensino Superior do Sul do Maranhão-UNISULMA, Imperatriz, Maranhão, Brasil.

E-mail dos autores:
de.oliveira.milena@gmail.com
karyennenutri@gmail.com
diegomacau.nut@hotmail.com
brunoluiz1@gmail.com
eesn.edf@gmail.com
gm.pereira@ufma.br
ac-navarro@uol.com.br
francisco.navarro@ufma.br

Autor correspondente:
de.oliveira.milena@gmail.com

Recebido para publicação em 14/09/2025
Aceito em 24/10/2025