

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA ISOLADA OU
ASSOCIADA À MALTODEXTRINA E/OU AMINOÁCIDOS DE CADEIA
RAMIFICADA SOBRE DESEMPENHO AERÓBIO E ANAERÓBIO E
BIOMARCADORES DE ESTRESSE FISIOLÓGICO**

JÚLIA COSTA GUIMARÃES NETA

MACEIÓ, 2018

JÚLIA COSTA GUIMARÃES NETA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA ISOLADA OU ASSOCIADA À MALTODEXTRINA E/OU AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA SOBRE DESEMPENHO AERÓBIO E ANAERÓBIO E BIOMARCADORES DE ESTRESSE FISIOLÓGICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: **Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo**

Faculdade de Nutrição

Universidade Federal de Alagoas

Co-orientador: **Dra. Karen Steponavicius Cruz Borbely**

Faculdade de Nutrição

Universidade Federal de Alagoas

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, pela vida, pelo amor e por terem sido meu contínuo apoio, ensinando que “conhecimento é a única coisa que ninguém tira de você” e, principalmente, a construção dos meus valores e princípios. Em especial, dedico à minha avó Maristela (*In Memoriam*) que foi minha luz, força e maior incentivadora para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Stela e Aldo, pelo amor incondicional, por todo suporte e torcida ao longo desses anos. Aos meus irmãos, Aldo e Victor, e primas-irmãs, Priscilla e Raísa pelo apoio, compreensão e vibrarem junto comigo a cada vitória conquistada e por se fazerem presentes nos dias difíceis.

Ao meu namorado, Cláudio, pela paciência, compreensão, palavras de conforto e incentivo. Obrigada por acreditar tanto em mim. Obrigada por todo suporte durante esse período.

Aos meus amigos queridos por serem sempre presentes, em especial, aos meus eternos da rua, por proporcionarem muito mais que momentos leves: incentivando, cobrando, torcendo e abraçando minhas dores e alegrias ao longo desses anos.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Ciências Aplicadas ao Esporte (CPCAE), não apenas pelo auxílio técnico, mas pela troca de experiências, conselhos e pela harmonia e união da nossa convivência. Em especial, obrigada ao Alex, meu super parceiro de coletas que tanto se virou em mil para se fazer presente, Reidson pelas palavras do coração, torcida verdadeira e seu inesgotável conhecimento, e ao meu amigo Higor, por me acalmar, aconselhar, orientar e mandar tantas palavras de incentivo (e puxões de orelha).

Ao professor Gustavo, pela orientação, confiança, dedicação e paciência. Sou muito grata pelo amadurecimento científico/teórico ao longo desses dois anos, mas também agradeço por ensinar o lado humano e ético da pesquisa, se tornando um verdadeiro exemplo para mim.

Aos professores, Emiliano e Alexandre, e colegas do Laboratório de Biologia Celular (LBC) por terem me recebido de braços abertos num mundo tão desconhecido por mim. Em especial a minha co-orientadora, Karen, pela paciência e entrega à esse projeto e Eloiza pela preocupação e ajuda nas análises dos dados.

Ao professor Cláudio e Pedro do Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte (LAF AE) pela oportunidade de conhecer o laboratório e aprender as técnicas de análise de alguns dados coletados.

À Amanda, funcionária do PPGNUT, por ter me ajudado em todo processo burocrático, facilitando e organizando minha vida. Obrigada também à Tia Rose da

limpeza por ter me ajudado com tanto carinho com a organização e limpeza do biotério durante a coleta.

Ao apoio financeiro da Capes e CNPq (442552/2014-9).

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

G963e Guimaraes, Júlia Costa.

Efeitos da suplementação de fosfatidilserina isolada ou associada à malto-dextrina e/ou aminoácidos de cadeia ramificada sobre desempenho aeróbio e anaeróbio e biomarcadores de estresse fisiológico / Júlia Costa Guimaraes Neta. – 2019.

46 f. : il.

Orientador: Gustavo Gomes de Araujo.

Coorientadora: Karen Steponavicius Cruz Borbely.

Dissertação (mestrado em Nutrição) Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 32-37.

Anexos: f. 38-46.

1. Nutrição. 2. Fosfolipídios. 3. Exercício físico. 4. Hormônio. 5. Músculos – Danos. I. Título.

CDU: 612.393:796



MACEIÓ, 2018
MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1150



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA ISOLADA OU
ASSOCIADA À MALTODEXTRINA E/OU AMINOÁCIDOS DE CADEIA
RAMIFICADA SOBRE DESEMPENHO AERÓBIO E ANAERÓBIO E
BIOMARCADORES DE ESTRESSE FISIOLÓGICO

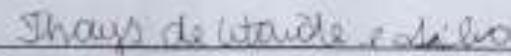
por

JÚLIA COSTA GUIMARÃES NETA

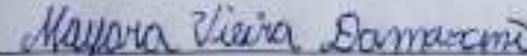
A Banca Examinadora, reunida aos 28 dias do mês de março do ano de 2018,
considera o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**.



Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)



Prof. Dr. Thays de Ataíde e Silva
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)



Prof. Dr. Mayara Vieira Damasceno
Departamento de Educação Física
Centro de Estudos Superiores de Maceió (CESMAC)
(Examinador)

RESUMO

O objetivo do estudo foi obter maior conhecimento sobre os efeitos da suplementação de fosfatidilserina (FS) no exercício físico. Para isso, foram realizados dois trabalhos: o primeiro foi um levantamento bibliográfico acerca da FS e seu impacto no desempenho físico. Os achados da suplementação de FS pode possuir propriedades ergogênicas interessantes para atletas especialmente para corrida, ciclismo e exercício intermitente, porém estudos mais específicos precisam objetivar o mecanismo de ação responsável por essa ação ergogênica. O segundo trabalho investigou o efeito da suplementação de FS isolada ou associada à maltodextrina (CHO) e/ou aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) sobre o desempenho anaeróbio e aeróbio e biomarcadores de estresse fisiológico em ratos *Wistar*. Os ratos foram separados em quatro grupos de acordo com o suplemento administrado: FS, FS+BCAA, FS+BCAA+CHO, e placebo (PLA). Todos os grupos realizaram um protocolo de exercício que consistiu na alternância de sessões de natação com intensidade alta (HIIT) e intensidade moderada (MIT). ANOVA two-way foi utilizada para identificar as diferenças entre no desempenho aeróbio e anaeróbio. Para comparar valores bioquímicos, glicogênio muscular e hepático, volume e carga de treinamento foi utilizado o ANOVA one-way seguido do *post hoc* de Tukey. Não houve diferença no desempenho anaeróbio ($p=0,76$) e capacidade aeróbia ($p=0,172$) entre os grupos no momento após o período experimental, porém o volume total de treinamento, na primeira e segunda semana, e carga total de treinamento, na primeira semana, foram menores no grupo PLA comparado com grupos suplementados ($p<0,05$). A concentração de CK foi maior no grupo FS comparado ao grupo FS+BCAA ($p=0,04$) e FS+BCAA+CHO ($p=0,01$). No fígado, a concentração de glicogênio foi menor na condição FS+BCAA em comparação ao grupo FS ($p=0,008$) e FS +BCAA +CHO ($p=0,02$). O grupo FS +BCAA+CHO apresentou uma concentração de glicogênio no sóleo 180% maior comparada ao grupo PLA ($p=0,03$) e 170% maior comparada ao grupo FS ($p=0,03$). A razão testosterona/corticosterona foi maior no grupo FS+BCAA comparado com os demais grupos ($p<0,05$). Nenhuma alteração significativa foi observada na testosterona, corticosterona e atividade da enzima CAT.

PALAVRAS-CHAVE: Fosfolipídios, Resposta hormonal, Exercício Físico, Dano muscular.

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain more knowledge about the effects of phosphatidylserine (PS) in physical exercise. For this, two works were carried out, the first one was a bibliographical survey about PS and its impact on physical performance. The findings demonstrated a potential ergogenic effect for athletes of running, cycling and intermittent exercise, however some studies relate PS supplementation in anaerobic exercise. More specific studies on the mechanism of action responsible for this ergogenic action are needed for a better understanding of the physiological role of PS. The second one investigated the effect of PS supplementation isolated or associated with maltodextrin and/or branched chain amino acids on anaerobic and aerobic performance, hormonal and metabolic responses in Wistar rats. The participants were separated in four groups according to the administered supplement: PS, PS + BCAA, PS + BCAA + CHO and placebo (PLA). All groups performed an exercise protocol that consisted of alternating high intensity (HIIT) and moderate intensity (MIT) swimming sessions. Two-way ANOVA was used to identify as a differential between groups over time without aerobic and anaerobic performance. To compare concentration values of CK, muscle and hepatic glycogen, testosterone, corticosterone, catalase (CAT), volume and training load, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc was used. There was no difference in anaerobic performance ($p=0,76$) and aerobic capacity ($p=0,172$) between groups after experimental tests. However, total training volume, in the first and second week, and total training load, in first week, was lower in PLA group compared to others supplemented ($p<0,05$). The CK concentration was higher in the PS group compared to the PS + BCAA group ($p=0,04$) and PS + BCAA + CHO ($p=0,01$). In the liver, glycogen concentration was lower in the PS + BCAA compared to the PS group ($p=0,008$) and PS + BCAA + CHO ($p=0,02$). PS + BCAA + CHO presented a 180% greater glycogen concentration in the soleus compared to PLA ($p=0,03$) and 170% greater compared to PS ($p=0,03$). Testosterone/corticosterone ratio was higher in PS + BCAA group compared to others groups ($p<0,05$). No significant changes were observed in the concentration of lactate, testosterone, corticosterone and CAT enzyme activity.

KEYWORDS: Phospholipid, Hormone, Physical Exercise, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

1º artigo: artigo de revisão

Figura 1 Vias de síntese de fosfatidilserina..... 14

2º artigo: artigo de resultados

Figura 1 Esquema geral da dinâmica de treinamento e coleta de dados para os grupos.....41

Figura 2 Exemplo da determinação de lactato mínimo pelo protocolo adaptado para ratos com ajuste polinomial de segunda ordem. 42

Figura 3 Comparação do desempenho anaeróbio 47

Figura 4 Capacidade aeróbia. 47

Figura 5 Volume (min) e Carga (UA) de treinamento durante o período experimental.
..... 48

Figura 6 Concentração de CK (U/L) 49

Figura 7 Análises bioquímicas de testosterona(ng/mL), corticosterona(ng/mL), razão T/C e atividade enzimática da catalase (nmol/min/mL).. 50

Figura 8 Percentual da concentração de glicogênio no sóleo e fígado 51

LISTA DE TABELAS

2º artigo: artigo de resultados

Tabela 1 Cronograma semanal das sessões de treino, teste de lactato mínimo e eutanásia dos animais.....	413
Tabela 2 Análise de lactato sanguíneo pré treinamento e após 4 semanas de treinamento.	478

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

AF – Ácidos fosfatídicos

AFV - Atividade física voluntária

BCAA – Aminoácido de cadeia ramificada

CAT – Catalase

CHO – Carboidrato

CK – Creatina quinase

DHA - Ácido docosa-hexaenóico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FC – Fosfatidilcolina

FE – Fosfatidiletanolamina

FS – Fosfatidilserina

FS-CB - Fosfatidilserina do cérebro bovino

FS-S – Fosfatidilserina da soja

FSSI - Fosfatidilserina sintetase I

FSSII - Fosfatidilserina sintetase II

GH – Hormônio do crescimento

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HIIT – Treino intervalado de alta intensidade

HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal

IL-6 – Interleucinas

LM – Lactato mínimo

MIT – Treino de moderada intensidade

mTor - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NO₂ - Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio

PLA – Placebo

RAZÃO T/C – Razão testosterona/corticosterona

RE – Retículo Endoplasmático

TE – Tempo até exaustão

TNF α - Fator de necrose tumoral

VO_{2max} – Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
2. COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	8
2.1. 1º Artigo: REVISÃO DA LITERATURA	9
GUIMARÃES, J.C; ARAÚJO, G.G. Efeitos da suplementação da fosfatidilserina em exercícios aeróbios e anaeróbios: uma revisão narrativa	9
2.2. 2º Artigo:ARTIGO DE RESULTADO	35
GUIMARÃES, JC; ARAÚJO, GG. Efeitos da suplementação de fosfatidilserina isolada ou associada à maltodextrina e/ou aminoácidos de cadeia ramificada sobre desempenho aeróbio e anaeróbio e biomarcadores de estresse fisiológico em ratos.	33
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
4. REFERÊNCIAS.....	66
5. ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO GERAL

É bem documentado que nutrientes encontrados em fontes alimentares têm importantes funções no corpo humano. Muitos desses nutrientes, como vitaminas e minerais, são essenciais para sobrevivência. Outros não são considerados essenciais, no entanto, a suplementação demonstrou ser benéfica. Um desses nutrientes é a fosfatidilserina (FS), fosfolipídios que contém ácido fosfórico na sua composição e são essenciais para estrutura das membranas celulares. Em humanos, a FS é localizada na camada interna da membrana celular e, além da função estrutural, possui papel importante na excitabilidade e comunicação celular incluindo regulação de receptores, enzimas, canais iônicos e sinalização molecular (JÄGER et al., 2007).

Foi demonstrado que o uso da FS (600mg) apresenta um efeito supressor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e Cortisol e aumenta a razão testosterona/cortisol (razão T/C) (STARKS et al. 2008). A suplementação de FS com dose elevada (600mg/dia) durante um curto prazo (10 dias) atenuou a resposta do cortisol após exercício moderado através do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (STARKS et al., 2008) e baixa dose (200 mg/dia) à longo prazo (6 semanas) de FS e carboidrato resultou em redução do estresse e melhorou o desempenho no golfe (JÄGER et al., 2007). Por outro lado, Kingsley et al. (2006a) reportaram que a suplementação prévia, mas única com FS (750 mg antes do esforço intermitente até a exaustão) não foi efetiva em atenuar as respostas do cortisol, dor percebida, dano muscular e respostas antioxidantes, mas o grupo suplementado diminuiu o tempo de corrida até a exaustão. Contudo, o uso crônico pode ser mais efetivo em atenuar o estresse fisiológico e deterioração da membrana provocada pelo esforço físico em comparação a suplementação aguda.

Embora os estudos tenham apontado que a suplementação de FS seja eficiente para melhorar o desempenho aeróbio (STARKS et al., 2008), ainda não está claro quais são os efeitos dessa substância sobre o desempenho anaeróbio. Fahey e Pearl (1998) investigaram o efeito da suplementação com FS sobre os níveis de cortisol, testosterona, ACTH, creatina quinase (CK), sensação de dores musculares e sensação de bem-estar em atletas que realizavam treinamento resistido. Esses autores demonstraram que a suplementação foi eficiente para diminuir a sensação de

dor e aumentar a sensação de bem-estar, porém, os níveis hormonais e de CK não foram significativamente diferentes em relação ao placebo (PLA).

Estratégias nutricionais têm sido associadas ao treinamento de alta intensidade para potencializar a síntese proteica (RASMUSSEN et al. 2000; TIPTON et al. 2001). A ingestão de suplementos a base de maltodextrina e aminoácidos após o exercício é uma estratégia comumente empregada para conter o efeito catabólico celular provocado pelo esforço, bem como aumentar o influxo de macronutrientes devido ao aumento da secreção de insulina (Rasmussen et al. 2000). Apesar de Jager et al. (2007) indicarem que a FS pode aumentar a taxa de glicose transportada para as células musculares e melhorar a síntese de glicogênio após exercício extenuante, ainda não se conhece os efeitos desse fosfolípido associada à suplementação de carboidrato e/ou aminoácidos em exercício anaeróbio.

No entanto, ainda não estão claros quais são os efeitos da suplementação de FS associada ao treinamento de alta intensidade e suplementação de carboidrato e/ou aminoácidos no processo de síntese e recuperação muscular bem como no desempenho físico. Sendo assim, o presente trabalho foi dividido em dois tópicos, um artigo de revisão narrativa sobre os efeitos da suplementação de FS em exercícios aeróbios e anaeróbios. E outro artigo original com o objetivo de investigar os efeitos da suplementação crônica de fosfatidilserina isolada ou associada com maltodextrina e/ou aminoácidos no desempenho anaeróbio e aeróbio, nas respostas hormonais e metabólicas em ratos Wistar.

2. COLETÂNEA DE ARTIGOS

2.1. 1º Artigo: REVISÃO DA LITERATURA

GUIMARÃES, J.C; ARAÚJO, G.G. Efeitos da suplementação da fosfatidilserina em exercícios aeróbios e anaeróbios: uma revisão narrativa

Revista Pretendida: Revista de Nutrição

RESUMO

A fosfatidilserina (FS) é um fosfolípido que contém ácido fosfórico na sua composição e são essenciais para estrutura das membranas celulares. A FS é localizada na camada interna da membrana celular e, além da função estrutural, possui papel importante na excitabilidade e comunicação celular. O presente estudo teve como finalidade realizar um levantamento dos estudos sobre efeitos da suplementação de fosfatidilserina no exercício físico. Para isso, foi realizada uma busca nas bases de dados pubmed. Nessa revisão, foram examinadas evidências em modelos de experimentos em animais, humanos e cultura celular para elucidar os mecanismos da suplementação de FS que possivelmente atuam na melhora do desempenho para os exercícios anaeróbios e aeróbios. Os dados atuais sugerem que a FS pode alterar a função neuroendócrina em exercícios aeróbios executados por homens destreinados ou exercícios resistidos praticados por homens fisicamente ativos. A FS parece suprimir a liberação de hormônios catabólicos como cortisol durante atividade física, atenuando a resposta do estresse induzido pelo exercício. Em exercícios resistidos, ciclismo e corrida, A FS parece também diminuir a sensação de dor, melhorar bem-estar, diminuir danos musculares e acelerar a recuperação muscular. Os achados da suplementação de FS pode possuir propriedades ergogênicas interessantes para atletas especialmente para exercícios intermitentes e de alta intensidade, porém estudos mais específicos precisam objetivar o mecanismo de ação responsável por essa ação ergogênicas.

PALAVRAS-CHAVE: Fosfolípido, Desempenho, Cortisol, Dano muscular.

ABSTRACT

Phosphatidylserine (PS) is a phospholipid which contains phosphoric acid in its composition and is essential for the structure of cell membranes. PS is located in the inner layer of the cell membrane and, besides structural function, plays an important role in cellular excitability and communication. The present study aimed to carry out a survey of studies on the effects of PS supplementation on physical exercise. For this, a search was performed on the pubmed databases. In this review, evidence was examined in animal, human and cell culture experiment models to elucidate the mechanisms of PS supplementation that possibly act to improve performance for anaerobic and aerobic exercise. Current data suggest that PS can alter neuroendocrine function in aerobic exercises performed by untrained men or resistance exercises practiced by physically active men. PS seems to suppress the release of catabolic hormones like cortisol during physical activity, attenuating the stress response induced by exercise. In resisted exercises, cycling and running, PS also seems to decrease the sensation of pain, improve well-being, decrease muscle damage and accelerate muscle recovery.

The findings of PS supplementation may have interesting ergogenic properties for athletes especially for intermittent and high intensity exercises, but more specific studies need to objectify the mechanism of action responsible for this ergogenic action.

KEYWORDS: Phospholipid, Performance, Cortisol, Muscle damage.

INTRODUÇÃO

A Fosfatidilserina (FS) é um fosfolípido composto de dois ácidos graxos e um grupo polar, composto de um fosfato e uma molécula de serina, que são conectados a uma molécula de glicerol. A FS está localizada principalmente na camada interna das membranas celulares e compreende de 10-20% do total de fosfolípidos presentes na bicamada da membrana celular (FREYSZ et al., 1982).

Historicamente, a suplementação da FS foi derivada do cérebro bovino, porém devido à preocupação com a segurança na saúde, adotou-se a suplementação derivada da soja (JORISSEN et al., 2002). Já é documentado que a FS é componente de todas as membranas celulares eucarióticas (VANCE et al., 2005) e além da função estrutural, possui papel importante na excitabilidade e comunicação celular (KINGSLEY, 2006b). Vários estudos sugerem que dosagem entre 200-800mg de FS por dia pode resultar na melhora do humor, função cognitiva, desempenho esportivo, resposta endócrina ao estresse induzido pelo exercício e diminuição da dor após exercício (JÄGER et al., 2007; KINGSLEY et al., 2006b). Com essas descobertas, a suplementação de FS vem sendo estudada para avaliar a função cerebral, mostrando melhorar uma variedade de funções cognitivas que incluem memória e resposta de reação em idosos (AMADUCCI, 1998)

A quantidade de pesquisa que foi realizada na bioquímica acerca de FS é um testemunho da matriz de funções desempenhadas por este grupo de fosfolípidos. A administração de FS parece melhorar o humor, função cognitiva, desempenho esportivo, resposta endócrina ao estresse induzido pelo exercício e diminuição da dor após exercício (JÄGER et al., 2007; KINGSLEY et al., 2006c).

No âmbito do exercício, Kingsley et al., (2006a) foram os primeiros a identificar propriedade ergogênica da FS, os autores avaliaram homens fisicamente ativos suplementados com 750mg/dia de FS ou PLA durante 10 dias em um protocolo de exercício intermitente. O principal resultado desse estudo foi que a suplementação de FS aumentou o TE em $29 \pm 8\%$ comparado com o placebo (PLA). A suplementação de FS demonstrou acelerar a recuperação após o treinamento, prevenir a dor muscular, melhorar o bem-estar e possivelmente possuir propriedades ergogênicas em atletas de ciclismo, treinamento resistido e corrida de *endurance* (JAGER et al., 2007).

Embora alguns estudos tenham apontado que a suplementação com FS seja eficiente para melhorar o desempenho aeróbio (STARKS et al., 2008; KINGSLEY, 2006a), ainda não está claro quais são os efeitos dessa substância sobre o desempenho anaeróbio. Fahey e Pearl (1998) investigaram o efeito da suplementação com FS sobre os níveis de cortisol, testosterona, CK, sensação de dores musculares e sensação de bem-estar em atletas que realizavam treinamento resistido. Esses autores demonstraram que a suplementação foi eficiente para diminuir a sensação de dor e aumentar a sensação de bem-estar, porém, os níveis hormonais e CK não foram significativamente diferentes em relação ao PLA.

Sendo assim, o objetivo da presente revisão foi fazer um levantamento bibliográfico sobre a função e estrutura da FS endógena e debater sobre os efeitos da suplementação desse fosfolípido no desempenho físico.

BIOSSÍNTESE E ESTRUTURA

Os fosfolípidos são derivados do glicerol, um álcool com três átomos de carbono, ou da esfingosina, um álcool mais complexo. Os fosfolípidos derivados do glicerol são denominados de fosfoglicerídeos que consistem de um esqueleto de glicerol, duas cadeias de ácidos graxos e um álcool fosforilado (VANCE et al., 2005). Nos fosfoglicerídeos, um dos grupos hidroxílicos primários do glicerol é esterificado com ácido fosfórico; os outros grupos hidroxílicos são esterificados com ácidos graxos. O composto fundamental da série é, portanto, o éster fosfórico do glicerol (BEVERS et al., 2016). Esse composto tem um átomo de carbono assimétrico e pode ser designado tanto como D-glicerol-1-fosfato ou como L-glicerol3-fosfato. A FS é um fosfoglicerídeo composto de dois ácidos graxos e um grupo polar ligados a uma molécula de glicerol. Esse grupo polar é composto de um grupo fosfato, que se liga à molécula de glicerol, e uma molécula de serina ligada ao fosfato através do grupamento hidroxila de seu grupo (HÜBSCHER, 1962; VANCE et al., 2005).

No final dos anos 50, Hübscher et al. (1959) descobriram, em preparações mitocondriais e microsomas de fígado de rato, que L-serina é incorporada em FS através de reações induzidas por energia estimuladas por cálcio (HÜBSCHER & DILS, 1959; HÜBSCHER, 1962). Em mamíferos, a síntese de FS ocorre em reações de troca a partir de fosfolípidos pré-existentes, onde o grupo polar destes fosfolípidos é substituído. No retículo endoplasmático (RE), a FS pode ser sintetizada a partir de

fosfatidilcolina (FC) e serina gerando FS e colina, catalisada pela fosfatidilserina sintetase I (FSSI) ou a partir de fosfatidiletanolamina (FE) e serina, gerando FS e etanolamina, reação catalisada pela fosfatidilserina sintetase I (FSSII) (KUGE et al., 1997) , como apresentado na figura 1.

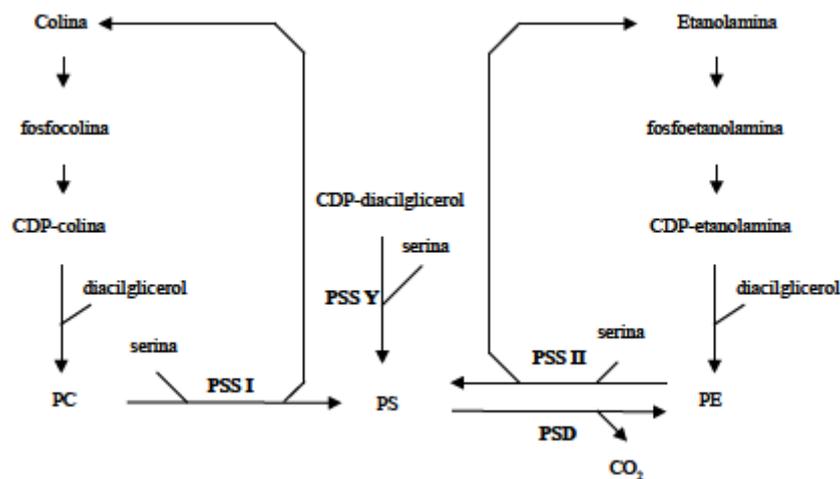


Figura 1. Vias de síntese de fosfatidilserina (PS); PE fosfatidiletanolamina; PC fosfatidilcolina; PSS I fosfatidilserina sintetase I; PSS II fosfatidilserina sintetase II; PSS Y: CDP-diacylglycerol; L-serina O-fosfatidiltransferase. *Fonte:* SANTOS, M.G, 2008.

A FS recentemente sintetizada é transportada do RE para o folheto externo da camada interna da membrana plasmática, onde as barreiras termodinâmicas minimizam sua saída para a camada externa (VAN MEER et al., 2008). Todas as células saudáveis exibem essa estrutura da membrana que é rica em FS na camada interna e pobre na externa (VOELKER et al., 1986; VAN MEER et al., 2008), essa assimetria transmembrana é fundamental para a sobrevivência da célula e a translocação ativa de FS para camada externa sinaliza o início do envolvimento fagocítico de células apoptóticas (SHIRATSUCHI et al., 1997; KAY et al., 2013)

A FS compreende de 10-20% do total de fosfolípidos presentes na bicamada da membrana celular (FREYSZ et al., 1982). Em humanos, a maior quantidade de FS está localizada no cérebro, estima-se que a concentração seja de aproximadamente 60g onde 30g é encontrada no cérebro e os outros 30g nos outros tecidos, como pulmão, testículos, rins, fígado, músculo esquelético, coração e plasma sanguíneo. (JAGER et al., 2007).

FS E A MEMBRANA PLASMÁTICA

O principal aspecto da FS que está subjacente às suas funções fisiológicas conhecidas não é a sua criação ou destruição, mas a sua localização: a exposição da FS na superfície das células de mamífero é fisiologicamente significativa porque normalmente está completamente ausente no espaço extracelular (BEVERS & WILLIAMSON, 2016). Existem duas atividades enzimáticas básicas que regulam a distribuição de FS entre os dois folhetos. Uma é responsável pela remoção de FS do folheto externo por transporte ativo dependente de ATP; as proteínas relevantes são membros da subfamília do tipo IV das ATPases do tipo P (FREYSZ et al, 1982). A vigilância constante do folheto externo por tais enzimas estabelece uma distribuição normal da membrana plasmática na qual praticamente todas as FS (e a maioria dos FE) estão no folheto interno. A segunda atividade enzimática que regula a distribuição de PS entre folhetos catalisa a troca rápida e não específica de fosfolípidos entre os dois lados da bicamada. (ALBERIO et al., 2000). Esta atividade, denominada scramblase, é essencial para processos fisiológicos porque a troca de fosfolípidos entre os dois folhetos de uma camada é lenta (BEVERS et al., 2016). Dado os diferentes tipos de respostas fisiológicas que são desencadeadas pela exposição à FS, pode-se esperar que exista uma ampla variedade semelhante nos mecanismos que operam nessas diferentes vias.

Além da função estrutural, a FS governa a passagem de fluidos pela membrana e, portanto, está envolvida na função regulatória das atividades das células biológicas. A FS exibe ação direta e indireta com proteínas integradas e associadas à membrana, ela modula a atividade enzimática, de receptores, canais iônicos e sinalização molecular (KINGSLEY, 2006c; JAGER et al., 2007). Essas proteínas possuem segmentos transmembranosos em contato direto com os lipídios circundantes das bicamadas. Assim, os lipídios da membrana atuam como um solvente para as porções hidrofóbicas dessas proteínas, tal como a água atua como um solvente para seus domínios hidrofílicos. No entanto, as interações com proteínas e solventes são muito mais diversas nos lipídios do que na água (HANAHAN et al., 1984).

SUPLEMENTAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

A FS é qualificada como não-essencial, pois as células animais não são capazes de sintetizar FS a partir de fosfatidilcolina catalisada pela enzima fosfatidilserina sintase (VOELKER et al.,1986). Por isso, precisam ser obtidas na alimentação como peixes, carne bovina, principalmente em vísceras (fígado, rins). Estudos estabeleceram que a FS exógena é efetivamente internalizada e incorporada nas células dos mamíferos (VOELKER et al.,1986), altamente biodisponível e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (ROSADINI et al., 1987).

A suplementação da FS depende da entrada da FS exógena no organismo para atingir a membrana interna e exercer as diversas funções bioquímicas das FS endógenas. A FS exógena é incorporada na membrana celular e transportada da camada externa para interna por uma amino-fosfolipídio translocase ATP-dependente específica para FS chamada flippase (SCHENKEL et al., 2014; VANCE et al., 2013). Tradicionalmente, a suplementação de FS era derivada do cérebro bovino (FS-CB), porém devido ao alto potencial de transferir doenças infecciosas, essa fonte é considerada imprópria e recentemente, a FS derivada da soja (FS-S) tornou-se uma alternativa segura (JORISSEN et al., 2002). As FS-S são ricas em ácido linoleico e palmítico enquanto que os ácidos oléicos e esteárico são abundantes em FS-CB. Mesmo assim, Blokland et al. (1999) reportaram comportamentos e respostas farmacológicas similares entre eles. Bruni et al. (1992) investigaram a administração oral de FS usando uma infusão duodenal com FS radioativas marcadas e observaram que, durante 5h, a FS foi hidrolisada e convertida em outros fosfolipídios (principalmente em FE e FC) e uma pequena quantidade de FS alcançou o sistema circulatório. Com isso, pode-se notar que tanto a suplementação oral ou injetada de FS são efetivas para o aumento da FS extracelular e pode levar a pequenos aumentos na FS dentro da membrana plasmática de tecidos.

Com relação a quantidade de FS que deve ser administrada via oral, Jorissen et al. (2002) estudaram o tratamento com suplementação oral de 300 ou 600mg/dia de FS-S em pacientes idosos durante 12 semanas em um ensaio clínico randomizado. Os autores analisaram possíveis alterações hematológicas, bioquímicas, na pressão arterial, frequência cardíaca e efeitos colaterais e concluíram que, nessas condições, a FS é um suplemento alimentar seguro. Pepeu et al. (1996), em uma revisão, não encontraram relatos de efeitos colaterais em mais de cem pacientes tratados com FS. A farmacocinética da FS exógena em humanos não está muito bem elucidada e é

preciso mais informações com relação ao *turnover* na membrana celular e tempo de *washout* da FS exógena, porém apesar da ausência de relatórios na literatura científica publicada de reações adversas em relação à suplementação oral com FS, a segurança da suplementação dietética com FS foi demonstrada em muitos ensaios clínicos em humanos (ROSADINI et al., 1987; TAYLOR, 2003; MONTELEONE, 1990) e foi documentada em detalhes por vários pesquisadores (VAKHAPOVA et al., 2011; CENACCHI et al., 1993; ALLEGRO et al., 1987) e estabeleceu-se que, para humanos, a tolerância bioquímica de FS é de 300mg/dia durante 30 dias (CENACCHI; BAGGIO; PALIN, 1987). A FDA também aprovou a segurança de suplementos dietéticos diários com até 300 mg de FS (TAYLOR, 2003).

FUNÇÃO DA FOSFATIDILSERINA

A fosfatidilserina exógena afeta o número e a afinidade dos locais receptores de membrana (STOCKERT et al., 1989) e influencia os mecanismos de transdução da membrana celular, e a ativação específica da proteína quinase.

Alterações Celulares

A FS é o fosfolípido mais efetivo na ativação de diferentes isoformas de proteína quinase C (KAIBUCHI; TAKAY; NISHIZUKA, 1981) que realizam funções importantes em diversas vias de transdução de sinal. Foi observado que há interação entre FS e a proteína quinase Raf-1, promovendo uma cascata de reações que acredita-se ser crucial para desenvolvimento celular pela translocação de proteína na membrana plasmática (NAGAI et al., 1999). O aumento da FS nas células neuronais de ratos demonstrou uma redução da translocação da Raf-1, reduzindo a apoptose induzida por privação de soro (KIM et al., 2000). Esses dados sugerem que o aumento da concentração de FS na membrana das células neuronais pode proporcionar efeito protetor contra a morte celular. (KINGSLEY, 2006a).

Estudos *in vitro* vem demonstrando a relação entre a concentração de FS na ativação da bomba de sódio-potássio nos rins de coelhos (SPECHT; ROBISON, 1973). Também existe relatos da exigência de FS para recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático pela Ca^{2+} ATPase (SEPULVEDA; MATA, 2004). De forma

prática, a liberação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático é primordial para acontecer a contração muscular, sendo assim é plausível pensar na suplementação de FS durante o exercício para manter o balanço iônico por período mais longo e melhorar as atividades enzimáticas, retardando a fadiga muscular. Sabe-se que fadiga depende de muitos mecanismos a nível central e periférico, porém falha na contração muscular é um dos mecanismos responsáveis pela fadiga periférica.

Estresse Oxidativo

Na mitocôndria, o processo de utilização do oxigênio (O₂) ocorre na sua membrana interna, através da cadeia de transporte de elétrons, formada por quatro complexos protéicos que transferem os elétrons para o O₂ molecular, formando água e gerando um gradiente de prótons através da membrana, o qual, através de sua força motriz, aciona a ATP sintetase, proteína transmembrana responsável pela biossíntese de adenosina trifosfato (WESTERMANN, 2012). Dessa forma, quase todo o O₂ que é captado pelo organismo é utilizado pela mitocôndria, atingindo o montante de até 95%, através da fosforilação oxidativa, que conserva energia a partir da quebra de substratos moleculares de carbono ingeridos na alimentação (BABCOCK, 1999). Mesmo diante da importância vital do O₂ para obtenção de energia utilizável pela célula, endogenamente, espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas a partir de mecanismos que ocorrem ininterruptamente através da CTE. A exemplo do O₂·-, formado a partir da redução incompleta do O₂, que resulta de um vazamento de elétrons através da transferência sequencial dos mesmos na cadeia (BRAND, 2010).

Diante desse cenário, as EROs vêm recebendo atenção cada vez mais frequente em virtude dos possíveis mecanismos celulares em que estão envolvidas. Estes mecanismos podem ser danosos, promovendo peroxidação lipídica, que pode ser definida como o ataque de espécies radicalares a lipídeos, principalmente insaturados, nas membranas biológicas, podendo em grau elevado, levar a destruição da mesma e conseqüente morte da célula (BENZIE, 1996). Neste contexto, existe uma importância fisiológica na produção de um nível fisiológico de ERO para processos celulares vitais. Para controlar essa síntese, outra enzima atua sobre esse sistema oxidativo, a catalase (CAT). Sendo uma das primeiras proteínas a ser cristalizada (Sumner; Dounce, 1937), a CAT tem como principal função decompor o H₂O₂ em

H₂O e O₂, controlando a concentração de H₂O₂. A mesma contribui para a regulação de mecanismos fundamentais como a cascata de sinalização de morte celular, a qual o H₂O₂ está envolvido (SANCHO et al, 2003). Em mamíferos, a CAT tem maior atividade nos eritrócitos, sendo capaz de remover mais da metade de todo H₂O₂ formado em células eritrocitárias normais (GAETANI *et al*, 1989) bem como no tecido hepático, encontrando-se, predominantemente, nos peroxissomos, organelas fundamentais no metabolismo redox, como também dos aminoácidos e lipídeos (PURDUE & LAZAROW, 1996). Os eritrócitos humanos são continuamente submetidos a uma quantidade elevada de oxigênio e, devido o seu metabolismo ter na sua base uma ampla variedade de enzimas oxidases, principalmente na produção de energia para a célula a partir da oxidação de ácidos graxos, esta célula é exposta a uma quantidade significativa de H₂O₂. Assim, através desse quadro metabólico celular, a CAT tem sido alvo de estudos para indicar sua evidente importância na remoção do H₂O₂ em virtude do seu potencial deletério (GAETANI *et al*, 1996).

É sabido que FS-livre (não incorporadas as membranas celulares) podem ter efeitos antioxidantes e contribuir para defesa contra o estresse oxidativo (PEPEU et al., 1996). Kingsley et al. (2005) investigaram o efeito da suplementação oral de 750mg/dia de FS durante 10 dias no estresse oxidativo em um protocolo de corrida intermitente até a exaustão com homens jovens fisicamente ativos. Embora nenhum efeito na peroxidação lipídica (concentração sérica de hidroperóxido) ou na resistência à oxidação tenha sido encontrados, foi reportado uma tendência que sugeriu que a suplementação de FS melhorou o desempenho. Permanece incerto se a suplementação de FS é efetiva na melhora de defesa contra estresse oxidativo induzido pelo exercício ou se o aumento do desempenho, produzindo mais trabalho, levou à maior produção de EROs. Portanto, atualmente nenhuma evidência está disponível para confirmar os efeitos antioxidantes *in vivo* desse fosfolipídio.

Regulação Endócrina

Foi mostrado em voluntários masculinos saudáveis que uma única injeção de FS-CB, contrariou a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) causada pelo exercício físico (MONTELEONE et al. 1990). Isso sugeriu que a FS poderia ter

um efeito agudo na liberação induzida pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e pelo cortisol.

Cortisol e testosterona vem sendo utilizados como marcadores de recuperação e adaptação ao estresse do exercício (FAHEY; PEARL, 1998). Testosterona possui propriedades anabólicas como o estímulo de síntese proteica no músculo e outros tecidos importantes para o desempenho no exercício. Cortisol, por outro lado, possui propriedades catabólicas tal como a degradação de proteínas utilizadas no processo de gliconeogênese e remodelação muscular (VIRU et al., 1996). Esses hormônios desempenham importante função na resposta adaptativa ao exercício e na capacidade de recuperação em exercícios intensos. O cortisol tem recebido atenção entre os pesquisadores, pois tem papel importante no metabolismo do carboidrato, gordura e proteína e do seu papel na recuperação do exercício (FAHEY, 1997; VIRU et al., 1996), o que ajuda a suprimir o processo inflamatório e a fornecer aminoácidos para a remodelação de proteína pós exercício. Contudo, é um hormônio imunossupressor e pode interferir na hipertrofia muscular devido as suas propriedades catabólicas (KUIPERS; KEIZER, 1988).

A FS vem sendo estudada e parece atenuar a resposta do cortisol ao exercício em homens não treinados no protocolo de 18 min de ciclismo próximo a intensidade máxima (MONTELEONE et al., 1990), essa redução do cortisol talvez ajude na adaptação ao exercício com peso e previna ou atenua o *overtraining*. O cortisol influencia a síntese proteica durante a recuperação de exercício resistido (VIRU et al., 1996). A FS talvez influencie a testosterona que também é um hormônio importante na resposta adaptativa desse tipo de exercício.

Monteleone et al., 1992 analisaram os efeitos de 10 dias de administração oral de 800mg/dia de FS-CB na resposta neuroendócrina e relataram que a suplementação foi capaz de contornar a resposta aguda do cortisol no exercício físico, contrariando a ativação do eixo hipotalâmico induzindo pelo estresse do exercício em homens não treinados. Um pouco mais recente, a fim de responder questões sobre o potencial efeito da FS de atenuar o nível de cortisol induzido pelo estresse do exercício, Starks et al. (2008) avaliaram os efeitos de 600mg/dia de FS durante 10 dias na resposta hormonal de cortisol, hormônio do crescimento (GH) e testosterona antes, durante e após exercício de moderada intensidade (65-85% do $VO_{2máx}$) em homens saudáveis. Em um modelo duplo-cego, controle e *crossover*, foi visto que a

suplementação de FS não mostrou nenhum efeito nos níveis de GH, mas o pico de cortisol foi menor no grupo suplementado e a razão T/C foi maior quando comparados com o PLA. Esses dados sugerem que a suplementação de FS é efetiva para combater o estresse induzido pelo exercício e prevenir danos fisiológicos pelo excesso de exercício.

Por outro lado, Kingsley et al. (2006a) investigaram o efeito da administração oral de 750mg/dia de FS e o efeito na capacidade de exercício, cinética do consumo de oxigênio, função neuroendócrina e percepção de esforço em um protocolo de corrida intermitente. Os autores, apesar de encontrarem melhora no TE, não encontraram diferença nos níveis de cortisol sérico, quando compararam os grupos suplementados com FS e PLA. Talvez o nível de treinamento dos participantes possa ter refletido nesses achados, visto que sujeitos treinados atenuam as alterações do eixo hipotalâmico. Parker et al., 2015 foram os primeiros pesquisadores a relatar que a suplementação de FS aumentou o desempenho mental em adultos jovens previamente ao exercício contribuindo para confirmar evidências que sugerem que FS aumenta função cognitiva, porém não foi observada alteração nos níveis de cortisol, testosterona total ou humor dos participantes. Os autores sugerem futuros estudos para determinação da dosagem ótima de FS que favoreça a resposta endócrina em atletas.

Função Imunológica

A inflamação aguda é uma resposta do organismo para indicar danos nos tecidos, esse processo leva a mobilização da defesa e acarreta na remoção e reparo do tecido danificado. Após a sinalização de dano tecidual, mediadores inflamatórios derivados dos mastócitos e basófilos são ativados para aumentar a permeabilidade de sangue. Além disso, há o aumento de resposta inflamatória e das citocinas pro-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), e interleucinas (IL-6) (KINGLSEY, 2006). O poder de regular o processo inflamatório da FS vem sendo reconhecido desde a década de 70 quando Mongar et. (1972), utilizando métodos *in vitro*, demonstraram que baixa concentração de FS foi capaz de aumentar a liberação de histamina por meio de antígenos de tecidos de ratos.

A FS é localizada na membrana interna da membrana celular, porém quando a célula é danificada, a FS começa a ser externalizada para a camada externa da membrana. Acredita-se que esse processo é uma sinalização para apoptose celular. Rapidamente, os fagócitos identificam e removem as células apoptóticas e impedem a liberação de conteúdos intracelulares que podem ser tóxicos para células danificadas (ARAMAKI et al., 1997). Além disso, estudos *in vitro*, mostram que a exposição de FS inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias e induz a resposta anti-inflamatória (HUYNH;FADOK;HENSON, 2002). Os autores demonstraram que a FS não afeta a ação dos macrófagos sugerindo uma ação direta da FS com os linfócitos.

Apesar de alguns estudos sugerirem a ação da FS em células no local da inflamação, o mecanismo pelo qual essa inibição acontece ainda não está claro e por isso, a eficácia da FS como agente anti-inflamatório parece ainda não ser segura.

FOSFATIDILSERINA E EXERCÍCIOS AERÓBIOS

Já é documentado que em músculos saudáveis e descansados a CK se encontra dentro da membrana plasmática muscular, porém durante exercícios intensos, onde ocorre dano muscular, há um aumento da CK na circulação sanguínea. Fernholz et al. (2000) recrutaram doze corredores treinados para suplementar com 300 ou 600mg/dia de FS-S ou PLA durante 2 semanas, o protocolo de treinamento consistiu em 90 minutos de corrida num modelo duplo-cego e *crossover*. Os autores relataram que a suplementação de FS-S foi capaz de reduzir os danos musculares, através da diminuição significativa de CK, em corredores treinados em comparação com o PLA, mas não houve diferença entre a dose de 300 e 600mg/dia.

Por outro lado, Kingsley et al., (2005) investigaram os efeitos da suplementação de 750mg/dia durante 10 dias de FS no estresse oxidativo causado pelo exercício de corrida intermitente até a exaustão. Os autores não encontraram diferença entre a concentração de cortisol, danos musculares, percepção de dor ou no TE em jogadores de futebol que receberam FS ou PLA, mas relataram existir uma tendência ao aumento do TE em atletas suplementados com FS. Mais tarde, os mesmos autores investigaram a administração de 750mg/dia de FS-S durante 7 dias antes de um

exercício excêntrico e 2 dias após o exercício e relataram que esse protocolo de exercício aumentou a concentração de IL-6, de mioglobina, de CK, e elevou a percepção de dor, porém a suplementação de FS-S não foi capaz de atenuar essas respostas, sugerindo que a administração de 750mg/dia de FS-S não promove proteção adicional contra o início da dor muscular, dano muscular, inflamação e estresse oxidativo após uma corrida prolongada (Kingsley et al., 2006a).

Monteleone et al. (1990) avaliaram a administração intravenosa de 50 ou 75mg de FS-CB 10 minutos antes de um protocolo de exercício que consistiu em duas sessões compostas por três estágios distintos de ciclismo em 8 homens destreinados. Os autores encontraram que a FS-CB foi capaz de suprimir significativamente a liberação de ACTH e cortisol que estão aumentados durante o estresse induzido pelo exercício físico. Corroborando com esses achados, um estudo duplo-cego, randomizado e *crossover* mostrou que a suplementação com FS-S (800mg/dia durante 10 dias) suprimiu os níveis de cortisol e ACTH em exercício de ciclismo. Em comparação com o grupo PLA, os níveis de cortisol diminuíram em 30%, mostrando que a suplementação crônica com FS-S pode atenuar o estresse que o exercício promove (MONTELEONE et al., 1992)

Kingsley et al., (2006b), em um modelo de ensaio clínico duplo-cego, randomizado e *crossover*, avaliaram 14 homens fisicamente ativos em um exercício intermitente que consistiu em três estágios distintos: 10 minutos de ciclismo a 45, 55 e 65% do $VO_{2máx}$ seguido de uma sessão de 85% $VO_{2máx}$ até a exaustão. Os participantes foram suplementados com 750mg/dia de FS-S ou PLA durante 10 dias. O principal resultado desse estudo foi que a suplementação de FS-S influenciou na capacidade de exercício em 85% do $VO_{2máx}$, o grupo suplementado com FS-S aumentou o TE em $29 \pm 8\%$ comparado com o PLA. No entanto, a suplementação não influenciou significativamente na resposta cinética do oxigênio, nível do cortisol e não mudou a sensação durante o teste.

Starks et al. (2008) avaliaram os efeitos de 600mg/dia de FS durante 10 dias na resposta hormonal de cortisol, hormônio do crescimento (GH) e testosterona antes, durante e após exercício de moderada intensidade (65-85% do $VO_{2máx}$) em homens saudáveis. Em um modelo duplo-cego, controle e *crossover*, foi visto que a suplementação de FS não mostrou nenhum efeito nos níveis de GH, mas o pico de cortisol foi menor no grupo suplementado e a razão testosterona/cortisol foi maior

quando comparados com o PLA. Esses dados sugerem que a suplementação de FS é efetiva para combater o estresse induzido pelo exercício e prevenir danos fisiológicos pelo excesso de exercício.

FOSFATIDILSERINA E EXERCÍCIOS ANAERÓBIOS

Embora os estudos tenham apontado que a suplementação com FS seja eficiente para melhorar o desempenho aeróbio (STARKS et al., 2008; KINGSLEY, 2006), a literatura sobre o desempenho anaeróbio é limitada e ainda não está claro quais são os efeitos dessa substância nesse tipo de exercício. Fahey e Pearl (1998) utilizando um modelo contrabalanceado, crossover e controle, foram os únicos com modelo experimental em exercício de alta intensidade. Os autores investigaram o efeito da suplementação de 800mg/dia de FS durante duas semanas sobre os níveis de cortisol, testosterona, ACTH, CK, sensação de dores musculares e sensação de bem-estar em atletas que realizavam treinamento resistido, demonstrando que a suplementação foi eficiente para diminuir a sensação de dor e aumentar a sensação de bem-estar, porém, os níveis hormonais e de CK não foram significativamente diferentes em relação ao PLA. Embora, pela limitação de estudos relacionados a suplementação de FS e exercício resistido, não exista consenso no protocolo de suplementação deste fosfolípido (dosagem, duração da suplementação e tempo de suplementação), a administração oral de 800mg/dia durante 2 semanas demonstrou modificações fisiológicas e melhora na função cerebral sem relatos de efeitos colaterais.

É bem reconhecido que os sinais mecânicos desempenham um papel crítico na regulação da massa muscular esquelética e um mecanismo que vem sendo amplamente implicado na regulação da síntese protéica envolve a sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTor) e é acreditado que atue como potencializador do efeito anabólico promovido pelo treinamento resistido, e os ácidos fosfatídicos (AF) estão envolvidos na regulação dessa via (XIAOCHUN; JIANG, 2009).

Hoffman et al., 2012 demonstraram que a administração oral de 750mg/dia de AF durante 8 semanas (4 vezes na semana) de um protocolo de treinamento resistido (1RM) em homens treinados melhorou a força muscular e aumentou em 2,5% a massa

muscular quando comparado com o grupo PLA. Apesar desse estudo mostrar benefício do uso de AF em exercícios resistidos, ele não discute sobre mecanismos de ação para tal benefício. Com isso, Joy et al, 2014 compararam o efeito de alguns precursores de AF e AF sobre a capacidade de estimular a sinalização da mTor e aumentar as mudanças induzida pelo treinamento na composição corporal e desempenho. Na primeira fase do estudo os autores demonstraram pela técnica de cultura celular que a FS-S tem uma maior atuação como agonista na sinalização da via da mTor do que os AF derivados do ovo, mas sugerem que a reações dos AF após absorção depende de muitos fatores como estado nutricional do indivíduo, não podendo ser pontuado qual a melhor fonte de administração oral. Na segunda fase do estudo 28 homens consumiram 750mg/dia de AF e realizaram exercícios resistidos durante 8 semanas e foi demonstrado um aumento da área de secção transversa e o aumento na força no exercício de *leg press* comparado com o PLA sugerindo que AF é capaz de aumentar a sinalização da via da mTor e significativo aumento da resposta hipertrófica no músculo esquelético e força.

CONCLUSÃO

A suplementação com FS vem demonstrando influencia em várias funções celulares. Muitas dessas funções têm o potencial para trazer benefícios ao organismo humano durante o exercício físico ou no período de recuperação após o exercício. Os dados atuais sugerem que a FS pode alterar a função neuroendócrina em exercícios aeróbios executados por homens destreinados ou exercícios resistidos praticados por homens fisicamente ativos. A FS parece suprimir a liberação de hormônios catabólicos como cortisol durante atividade física, atenuando a resposta do estresse induzido pelo exercício. Em exercícios resistidos, ciclismo e corrida, A FS parece também diminuir a sensação de dor, melhorar bem-estar, diminuir danos musculares e acelerar a recuperação muscular. Contudo, o efeito ergogênico da FS requer mais estudos que descrevam os mecanismos de ação responsáveis para tais benefícios.

REFERÊNCIAS

ALBERIO L. et al. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. **Blood**, v.95, n.5, p. 1694–1702, 2000.

ALLEGRO L, FAVARETTO V, ZILIOGTO G. Oral phosphatidylserine in elderly patients with cognitive deterioration. An open study. **Clin Trials J**, v.24, p.104–108, 1987.

AMADUCCI, L. Phosphatidylserine in the treatment of alzheimer's disease: results of a multicenter study. **Psychopharmacol. Bull**, v.24, n.1, p.130–134, 1998.

ARAMAKI, Y. et al. Negatively charged liposomes inhibit tyrosine phosphorylation of 41-kDa protein in murine macrophages stimulated with LPS. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 231: p. 827-830, 1997.

BABCOCK, G.T. How oxygen is activated and reduced in respiration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.23, p.12971-12973, 1999.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr**, v.47, n.3, p.233-61, 1996.

BEVERS E.M., WILLIAMSON P.L. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. **Physiol Rev**, v. 96, p. 605-645, 2016.

BLOKLAND, A. et al. Cognition-enhancing properties of subchronic phosphatidylserine (PS) treatment middle-aged rats: comparison of bovine cortex PS and soybean PS. **Nutrition**, v.15, p. 778-783, 1999.

BRUNI, A. et al. Phospholipid metabolism in rat intestinal mucosa after oral administration of lysophospholipids. **Adv Exp Med Bio**, v. 318, p. 243-249, 1992.

CENACCHI, T. et al. Cognitive decline in the elderly: a double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration. **Aging**, v.5, p.23-33, 1993.

CENACCHI, T., BAGGIO, C, PALIN, E. Human tolerability of oral phosphatidylserine assessed through laboratory examinations. **Clin Trials J** v. 21, p.125-130, 1987.

FAHEY, T.D. Biological markers of overtraining. **Biol Sport**, v.14, p. 1-19, 1997.

FAHEY, T.D., PEARL, M.S. The hormonal and perceptive effects of phosphatidylserine administration during two weeks of resistive exercise-induced overtraining. **Biol Sport**, v. 15, n.3, p. 135-144, 1998.

FERNHOLZ, K.M., et al. The Effects of Phosphatidyl Serine on Markers of Muscular Stress in Endurance Runners [abstract]. **Med Sci Sports Exerc** ,v. 32, n.5, 2000.

FREYSZ, L. DREYFUS, C. VINCENDON, C. Asymmetry of brain microsomal membranes. In: Horrocks L, ed. **Phospholipids in the nervous system**. New York: Raven Press, v. 1, p. 37–47, 1982.

GAETANI, G.F., et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood Journal**, v.73, n.1, p.334–339, 1989.

HU"BSCHER, R.R., et al. Studies on the biosynthesis of phosphatidylserine, **Biochim Biophys. Acta**, v. 36, p. 518–528,1959.

HANAHAN, D.J., NELSON, D.R. Phospholipids as dynamic participants in biological processes. **J Lipid Res**, v. 25, p. 1528-1535, 1984.

HOFFMAN J., et al. Efficacy of phosphatidic acid ingestion on lean body mass, muscle thickness and strength gains in resistance-trained men. **J Int Soc Sports Nutr.**, v.6, n.47, 2012.

HUYNH, M.L, FADOK, V.A, HENSON, P.M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 and the resolution of inflammation. **J Clin Invest**, v. 109, p. 41-50, 2002.

JÄGER, R., PURPURA, M., KINGSLEY, M. Phospholipids and sports performance. **J Int Soc Sports Nutr** ,v.4, n.5, 2007.

JORISSEN, B.L, et al. Safety of soy derived phosphatidylserine in elderly people. **Nutr Neurosci**, v. 5, p. 337-343, 2002.

JOY, J., et al. Phosphatidic acid enhances mTOR signaling and resistance exercise induced hypertrophy. **Nutr Metab.** v,11. n, 29, 2014.

KAIBUCHI, K., TAKAY, Y., NISHIZUKA, Y. Cooperative roles of various membrane phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. **J Biol Chem** v. 256, p. 7146–7149, 1981.

KAY J.G, GRINSTEIN S. Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. **Adv Exp Med Biol** ,v. 991, p. 177–193, 2013.

KIM, H.Y., et al. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3): role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. **J Biol Chem**, v.275, p. 35215-3523, 2000.

KINGSLEY, M. Effects of phosphatidylserine supplementation on exercising humans. **Sports Med.** v.36, n.8, p. 657-669, 2006c.

KINGSLEY, M. et al. Effects of phosphatidylserine on exercise capacity during cycling in active males. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, p. 64-71, 2006a.

KINGSLEY, M. et al. Phosphatidylserine Supplementation and Recovery following Downhill Running. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 38, n. 9, p. 1617–1625, 2006b.

KINGSLEY, M. et al. Effects of Phosphatidylserine on Oxidative Stress following Intermittent Running. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.37, n. 8, p. 1300–1306, 2005.

KUIPERS H., KEIZER HA, Overtraining and elite athletes: Review and directions for the future. **Sports Med**, v.6, n.2,p. 79-92, 1988.

KUGE, O., NISHIJIMA M. Phosphatidylserine synthase I and II of mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1348, n.1, p. 151-156, 1997.

MONGAR, J.L, SVEC, P. The effect of phospholipids on histamine release. **Br J Pharmacol**,v.46, n.4, p. 741-752, 1972.

MONTELEONE P. et al. Blunting by chronic phosphatidylserine administration of the stress-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in healthy men. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 42, n.4, p. 385-388, 1992.

MONTELEONE, P, et al. Effects of Phosphatidylserine on the Neuroendocrine Response to Physical Stress in Humans. **Neuroendocrinology**, v. 52, n.3, p. 243-248, 1990.

NAGAI, Y. et al. An alternative splicing form phosphatidylserine-specific phospholipase A1 that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. **J Biol Chem.**, v.274, n.16, p.11053-11059, 1999.

PEPEU, G. et al. A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects: is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? **Pharmacol Res.**, v.33, n.2, p. 73-80, 1996.

PURDUE, P.E.; LAZAROW, P.B. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. **J Cell Biol**, v.134, n.4, p.849-862, 1996.

ROSADINI G, et al. Phosphatidylserine: quantitative EEG effects in healthy volunteers. **Neuropsychobiology**, v.24, n.1, p.42-48, 1987.

SANCHO, P. et al. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. **Mol Pharmacol**, v.63, n.3, p. 581-589, 2003.

SCHENKEL L.C., BAKOVIC M. Formation and regulation of mitochondrial membranes. **Int J Cell Biol**, 2014.

SEPULVEDA, M.R. MATA, A.M. The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1665, n.1, p. 75-80, 2004.

SHIRATSUCHI A, UMEDA M, OHBA Y, NAKANISHI Y. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. **J Biol Chem**, v.272, n.4, p. 2354-2358, 1997.

SPECHT, S.C, ROBINSON, J.D. Stimulation of the (Na⁺⁺K⁺)- dependent adenosine triphosphatase by amino acids and phosphatidylserine:chelation of trace metal inhibitors. **Arch Biochem Biophys.**, v. 154, n. 314–23, 1973.

STARKS, et al. The effects of phosphatidylserine on endocrine response to moderate intensity exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v.5, n.11, 2008.

STOCKERT M, BUSCAGLIA V, DE ROBERTIS E. In vivo action of phosphatidylserine, amitriptyline and stress on the binding of [3H]imipramine to membranes of the rat cerebral cortex. **Eur J Pharmacol**, v.160, n.1, p. 11-16, 1989.

SUMNER, J.B.; DOUNCE, A.L. Crystalline Catalase. **Science**, v.85, n. 2206, p.366-7, 1937.

TAYLOR, C.L. Letter regarding phosphatidylserine and cognitive dysfunction and dementia. Bethesda, MD: US **Food and Drug Administration**; 2003.

VAKHAPOVA V, et al. Safety of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids in non-demented elderly: a double-blind placebo-controlled trial followed by an open-label extension. **BMC Neurol**, v.11, n.79, 2011.

VANCE J.E, STEENBERGEN R. Metabolism and functions phosphatidylserine. **Prog Lipid Res**, v. 44, p. 207-234, 2005.

VANCE J.E, TASSEVA G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, p. 543–554, 2013.

VAN MEER, G. et al. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.2 p.112–124, 2008.

VIRU, A.T. et al. Determinants and modulators of hormonal responses to exercise. **Biol sport.**, v.13, p. 169-187, 1996.

VOELKER, D.R.; FRAZIER, J.L. Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary cell line requiring ethanolamine or phosphatidylserine for growth and exhibiting defective phosphatidylserine synthase activity. **J Biol Chem.**, v. 261, p.1002-1008, 1986.

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.10, n. 1016, p. 1-6, 2012.

XIAOCHUN, B.; JIANG, Y. Key factors in mTOR regulation. **Cell Mol Life Sci.**, v. 67, p. 239–253, 2009.

2.2. 2º Artigo: ARTIGO DE RESULTADOS

GUIMARÃES, JC; ARAÚJO, GG. Efeitos da suplementação de fosfatidilserina isolada ou associada à maltodextrina e/ou aminoácidos de cadeia ramificada sobre desempenho aeróbio e anaeróbio e biomarcadores de estresse fisiológico em ratos.

Revista pretendida: British Journal of Nutrition

RESUMO

O Objetivo do estudo foi investigar o efeito da suplementação de fosfatidilserina (FS) isolada ou associada à maltodextrina (CHO) e/ou aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) sobre o desempenho anaeróbio e aeróbio, respostas hormonais e metabólicas em ratos Wistar. Os ratos foram separados em quatro grupos de acordo com o suplemento administrado: fosfatidilserina isolada (FS), fosfatidilserina e aminoácido de cadeia ramificada (FS+BCAA), fosfatidilserina com BCAA e maltodextrina (FS+BCAA+CHO) e placebo (PLA). Todos os grupos realizaram um protocolo de exercício que consistiu na alternância de sessões de natação com intensidade alta (HIIT) e intensidade moderada (MIT). ANOVA two-way foi utilizada para identificar as diferenças entre no desempenho aeróbio e anaeróbio. Para comparar valores bioquímicos, glicogênio muscular e hepático, volume e carga de treinamento foi utilizado o ANOVA one-way seguido do *post hoc* de Tukey. Não houve diferença no desempenho anaeróbio ($p=0,76$) e capacidade aeróbia ($p=0,172$) entre os grupos no momento após o período experimental, porém o volume total de treinamento, na primeira e segunda semana, e carga total de treinamento, na primeira semana, foram menores no grupo PLA comparado com grupos suplementados ($p<0,05$). A concentração de CK foi maior no grupo FS comparado ao grupo FS+BCAA ($p=0,04$) e FS+BCAA+CHO ($p=0,01$). No fígado, a concentração de glicogênio foi menor na condição FS+BCAA em comparação ao grupo FS ($p=0,008$) e FS +BCAA +CHO ($p=0,02$). O grupo FS +BCAA+CHO apresentou uma concentração de glicogênio no sôleo 180% maior comparada ao grupo PLA ($p=0,03$) e 170% maior comparada ao grupo FS ($p=0,03$). A razão testosterona/corticosterona foi maior no grupo FS+BCAA comparado com os demais grupos ($p<0,05$). Em conclusão, a FS isolada ou combinada com BCAA e CHO não foi capaz de melhorar a capacidade aeróbia e TE em um protocolo de HIIT, porém no grupo suplementado foi observada uma maior carga e volume total de treinamento nas primeiras semanas, sugerindo maior tolerância dos grupos FS isolado e combinado às sessões de treinamento comparado com PLA.

PALAVRAS-CHAVE: Fosfolipídios, treinamento intervalado de alta intensidade, capacidade aeróbia, capacidade anaeróbia, corticosterona, estresse.

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effect of phosphatidylserine (PS) supplementation isolated or associated with maltodextrin (CHO) and/or branched chain amino acids (BCAA) on anaerobic and aerobic performance, hormonal and metabolic responses in Wistar rats. Rats were separated into four groups according to the supplement administered: PS, PS + BCAA, PS + BCAA + CHO and placebo (PLA). All groups performed an exercise protocol that consisted of alternating high intensity (HIIT) and moderate intensity (MIT) swimming sessions. Two-way ANOVA was used to identify as a differential between groups over time without aerobic and anaerobic performance. To compare concentration values of CK, muscle and hepatic glycogen, testosterone, corticosterone, catalase (CAT), volume and training load, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc was used. There was no difference in anaerobic performance ($p=0,76$) and aerobic capacity ($p=0,172$) between groups after experimental tests. However, total training volume, in the first and second week, and total training load, in first week, was lower in PLA group compared to others supplemented ($p<0,05$). The CK concentration was higher in the PS group compared to the PS + BCAA group ($p=0,04$) and PS + BCAA + CHO ($p=0,01$). In the liver, glycogen concentration was lower in the PS + BCAA compared to the PS group ($p=0,008$) and PS + BCAA + CHO ($p=0,02$). PS + BCAA + CHO presented a 180% greater glycogen concentration in the soleus compared to PLA ($p=0,03$) and 170% greater compared to PS ($p=0,03$). Testosterone/corticosterone ratio was higher in PS + BCAA group compared to others groups ($p<0,05$). In conclusion, PS alone or combined with BCAA and CHO was not able to improve aerobic capacity and TE in a HIIT protocol, but in the supplemented group a higher load and volume total training was observed in the first weeks, suggesting a higher tolerance of PS groups isolated and combined to training sessions compared to PLA.

KEYWORDS: Phospholipids, High intensity interval training, Corticosterone, Oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A fosfatidilserina (FS) é o principal fosfolipídio presente na membrana celular e constitui 2 a 20% do total de fosfolipídios no plasma humano e membranas intracelulares (VAN MEER et al., 2008). São compostos essenciais para a constituição da membrana celular e apresentam interações diretas e indiretas com as proteínas integrais que modulam a atividade dos receptores, enzimas, canais de íons e moléculas de sinalização (KINGSLEY, 2006c; JAGER et al., 2007). Além da função estrutural e funcional na membrana celular, a FS vem sendo associada com melhora na recuperação de exercícios, na função imune, aumento da função cerebral, função antioxidante (JÄGER et al., 2007; FAHEY & PEARL et al., 1998; KINGSLEY, 2006b; TYURINA et al., 2000) bem como melhora na capacidade de prolongar o TE em exercícios físicos (KINGSLEY et al., 2005; KINGSLEY et al., 2006a)

As pesquisas mostram que a FS possui propriedades únicas como reduzir os níveis de cortisol após o exercício (HELLHAMMER et al., 2004; MONTELEONE et al., 1990; MONTELEONE et al., 1992), o que levaria a um aumento da razão testosterona/cortisol (razão T/C) (STARKS et al., 2008), melhora do humor, desempenho, recuperação, imunidade, tomada de decisão, precisão e cognição (PARKER et al., 2011; HELLHAMMER et al., 2004; FAHEY & PEARL et al., 1998; KINGSLEY et al., 2005; KINGSLEY et al., 2006a). Além disso, a FS tem sido relatada para melhorar as medidas subjetivas do *overtraining*, como a dor muscular e bem-estar (FAHEY & PEARL, 1998), esses achados sugerem que a FS, parcialmente, contraria a ativação induzida pelo estresse do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (MONTELEONE et al., 1992). Kingsley et al., (2006a) foram os primeiros a identificar propriedade ergogênica da FS, os autores avaliaram homens fisicamente ativos suplementados com 750mg/dia de FS ou PLA durante 10 dias em um protocolo de exercício intermitente. O principal resultado desse estudo foi que a suplementação de FS aumentou o tempo até exaustão (TE) em $29 \pm 8\%$ comparado com o placebo (PLA).

A FS foi estabelecida como um suplemento oral seguro (JORISSEN et al., 2002) capaz de atenuar as respostas séricas de cortisol (MONTELEONE et al., 1990; MONTELEONE et al., 1992) e as respostas agudas de creatina quinase (CK) ao exercício (FERNHOZ et al., 2000). Foi demonstrado que o uso da FS (600mg)

apresenta um efeito supressor do Cortisol e aumenta a razão T/C (STARKS et al. 2008). Por outro lado, Kingsley et al. (2006b) reportaram que a suplementação prévia, mas única com FS (750 mg antes do esforço intermitente até a exaustão) não foi efetiva em atenuar as respostas do cortisol, dor, dano muscular e respostas antioxidantes não enzimáticas, mas o grupo suplementado diminuiu o tempo de corrida até a exaustão. Contudo, o uso crônico pode ser mais efetivo em atenuar o estresse fisiológico e deterioração da membrana provocada pelo esforço físico em comparação a suplementação aguda. Nesse sentido, os níveis de lesão no músculo esquelético mensurados pela atividade plasmática de CK em corredores de fundo foi acentuadamente reduzido com suplementação crônica (15 dias – 300 mg) de FS em relação ao grupo PLA (FERNHOLZ et al. 2000; JAGER et al. 2007).

Embora alguns estudos tenham apontado que a suplementação com FS seja eficiente para melhorar o desempenho aeróbio (STARKS et al., 2008; KINGSLEY, 2006), ainda não está claro quais são os efeitos dessa substância sobre o desempenho anaeróbio. Fahey e Pearl (1998) investigaram o efeito da suplementação com FS sobre os níveis de cortisol, testosterona, CK, sensação de dores musculares e sensação de bem-estar em atletas que realizavam treinamento resistido. Esses autores demonstraram que a suplementação foi eficiente para diminuir a sensação de dor e aumentar a sensação de bem-estar, porém, os níveis hormonais e CK não foram significativamente diferentes em relação ao PLA.

Estudos relataram que o exercício de alta intensidade (HIIT) é capaz de melhorar o desempenho aeróbio em período de tempo mais curto comparado com exercício com maior volume e menor intensidade (LAURSEN, 2010; DE ARAUJO et al., 2015). Em modelo animal, de Araujo et al. (2016) observou, em doze semanas de um protocolo de HIIT, melhora de 27% na capacidade aeróbia, mas não na capacidade anaeróbia; aumento de 182% nos estoques de glicogênio muscular e diminuição da concentração de corticosterona em comparação ao grupo controle, indicando uma adaptação crônica positiva. A participação na atividade física muitas vezes desafia uma variedade de sistemas fisiológicos; conseqüentemente, a capacidade de manter a função celular normal durante a atividade pode determinar o desempenho esportivo.

Estratégias nutricionais têm sido associadas ao treinamento de alta intensidade para potencializar a síntese proteica (RASMUSSEN et al. 2000; TIPTON et al. 2001). A ingestão dietética de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) após o exercício

reduz a perda de aminoácidos dos músculos e, portanto, poupa a degradação da proteína muscular (BLOMSTRAND; SALTIN, 2011). A ingestão de proteína imediatamente após o exercício também mostrou, consistentemente, o aumento da síntese proteica, enquanto, simultaneamente, a degradação de proteína é diminuída (HOWARTH et al., 2009). Quando a ingestão de proteína é combinada com carboidrato (CHO) após o exercício, a sinalização molecular de hipertrofia no músculo esquelético é ativada (FERGUSON-STEGALL et al., 2011). Além disso, estudos mostram que a ingestão de proteína é necessária para uma melhor recuperação muscular após exercícios exaustivos requerendo tanto a síntese proteica quanto a síntese de glicogênio (MOORE et al., 2003) e que a combinação de BCAA com CHO aumenta a taxa de síntese de glicogênio (MORIFUJI et al., 2010; WILLIAMS et al., 2003). Apesar de Jager et al. (2007) indicarem que a FS pode aumentar a taxa de glicose transportada para as células musculares e melhorar a síntese de glicogênio após exercício extenuante, ainda não se conhece os efeitos da FS associada à suplementação de CHO e BCAA em exercício anaeróbio.

Considerando as respostas fisiológicas em relação à suplementação com FS e a redução de secreção de hormônios catabólicos, redução dos danos musculares, aumento da recuperação muscular em exercícios de *endurance*, parece coerente investigar os efeitos desse suplemento no treinamento de alta intensidade. Sendo assim, o presente estudo objetivou investigar os efeitos da suplementação crônica com FS isolada ou associada com maltodextrina (CHO) e/ou aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) no desempenho anaeróbio e aeróbio, nas respostas hormonais e metabólicas em ratos Wistar.

MÉTODO

Animais

Todos os experimentos seguiram as resoluções brasileiras específicas de bioética de pesquisa com animais: lei n. 6,638, de 8 de março de 1979 e decreto n. 645, de 10 de julho de 1945. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética no uso dos animais da UFAL com o número de protocolo 10/2016.

Foram utilizados 64 ratos machos *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) com aproximadamente 80 dias de idade, saudáveis, com pelagem em boas condições e massa corporal de 251 ± 28.5 g provenientes do Biotério Central da UFAL, que foram mantidos no Biotério da Faculdade de Nutrição da UFAL (FANUT).

Os ratos foram distribuídos randomicamente em gaiolas coletivas (com quatro ratos por gaiola). As gaiolas foram higienizadas três vezes por semanas durante todo o experimento. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab®) balanceada e água “*ad libitum*” e mantidos em sala com ciclo claro-escuro invertido de 12:12h (luzes acesas das 19-7h) com temperatura ambiente controlada em $22 \pm 3^\circ\text{C}$.

Adaptação ao meio líquido

O objetivo da adaptação ao meio líquido foi de reduzir o estresse sem promover adaptações fisiológicas pelo treinamento físico (MANCHADO et al. 2006). A adaptação ao meio líquido consistiu de 5min de natação, cinco vezes por semana, durante um período de duas semanas. Todos os procedimentos foram realizados em tanques cilíndricos com dimensões de 80cm de diâmetro e 100cm de profundidade, para natação individual (MANCHADO et al. 2006), com temperatura da água mantida a $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Houve necessidade de um tanque profundo com bordas lisas para evitar saltos recorrentes à superfície, forçando-os a nadar de forma contínua (DE ARAUJO et al., 2007). O protocolo de adaptação foi realizado no mesmo período do dia com intuito de preparar os animais para a rotina do período experimental.

Desenho experimental

Após o período de duas semanas de adaptação, o protocolo experimental foi realizado no período de 4 semanas. Os 64 ratos foram separados em 4 grupos experimentais: (1) suplementados com FS (FS; n=16), suplementados com FS e BCAA (FS + BCAA ; n=16), suplementados com FS, BCAA E CHO (FS+ BCAA+ CHO; n=16) e grupo PLA (n=16). Os animais foram pesados semanalmente para adequar a suplementação e intensidade de exercício. O protocolo experimental consistiu na alternância de exercícios de alta intensidade com 13% da massa corporal

(HIIT) e exercícios de forma contínua e moderada intensidade com 5% da massa corporal (MIT). Após o período de adaptação e ao final das quatro semanas de treinamento, todos os ratos foram avaliados pelo teste de lactato mínimo (LM) para posterior análise sanguínea (Figura 1).



Figura 1. Esquema geral da dinâmica de treinamento e coleta de dados para os grupos.

Protocolo de suplementação

Todos os suplementos foram administrados com solução contendo água destilada, com volume máximo de 1mL e aplicados por gavagem oral. (1) O grupo FS recebeu 300 mg de FS 20 min antes das sessões de treinamento e 1 mL de água destilada imediatamente após o treinamento. (2) O grupo FS+BCAA recebeu 300 mg de FS 20 min antes das sessões de treinamento e uma dose fixa de 0,5mL imediatamente após a sessão de treinamento. (3) O grupo FS+BCAA+CHO recebeu 300 mg de FS 20 min antes das sessões de treinamento e 0,5mL de BCAA com CHO imediatamente após o treinamento. Essa mistura foi dividida em duas doses de 0,9mL separadas por um tempo de 30 min. (4) O grupo PLA recebeu 1 mL de água destilada 20 min antes do treinamento e 1 mL de água destilada imediatamente após o treinamento.

As dosagens de CHO seguiram as especificações do estudo de RUFFO (2004): a maltodextrina (5g) foi dissolvida em 50 mL de água destilada, formando uma solução com concentração de 10% (m/V). A quantidade de CHO para cada animal manteve uma padronização nas quantidades ingeridas e foi calculada pela seguinte fórmula:

a= média de peso corporal (g) x 0,70 (g/Kg) de carboidrato/ 1000; Valor de a x 100 (mL)/ g de carboidrato= volume (mL). A solução carboidratada foi administrada juntamente com BCAA imediatamente após as sessões de exercício.

Protocolo de treinamento

O período experimental durou quatro semanas, com frequência de treinamento de 3-5 dias por semana. Assim como o período de adaptação, as sessões de treino foram realizadas em tanque cilíndrico com dimensões de 80cm de diâmetro e 100cm de profundidade para natação individual com temperatura da água mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$. As sessões de treino foram baseadas na intensidade do teste de LM determinada individualmente por ratos (DE ARAUJO et al. 2007). A organização de treinamento foi dividida a fim de desenvolver tanto a aptidão anaeróbia quanto aeróbias, assim foram subdivididos em duas intensidades: alta intensidade (HIIT), e exercícios contínuos de moderada intensidade (MIT) (tabela 1);

HIIT – Treino que consistiu em 5 séries de 1 minuto ou até a exaustão com 1 minuto de pausa entre as séries com intensidade equivalente a 13% do peso corporal.

MIT – Série única de 30 minutos ou até a exaustão com intensidade equivalente a 5% do peso corporal.

Foi adotado como critério de exaustão quando o rato permanecia submerso por até 10 segundos. Para determinação da intensidade individual dos exercícios os ratos eram pesados semanalmente.

Tabela 1 Cronograma semanal das sessões de treino, teste de lactato mínimo e eutanásia dos animais

SEMANA	SEG	TER	QUA	QUI	SEX	SÁB	DOM
1	Teste LM	MIT	HIIT	MIT	HIIT	DESCANSO	DESCANSO
2	HIIT	MIT	HIIT	MIT	HIIT	DESCANSO	DESCANSO
3	DESCANSO	MIT	HIIT	MIT	HIIT	DESCANSO	DESCANSO
4	HIIT	MIT	HIIT	teste LM	teste LM	DESCANSO	DESCANSO
5	Eutanásia	Eutanásia					

Avaliação da performance aeróbia e anaeróbia

Para determinar o desempenho aeróbio e anaeróbio, foi utilizado o protocolo de LM adaptado para ratos por de Araujo et al. (2007). Este teste consiste em uma fase de indução da hiperlactatemia seguida de incrementos de intensidade. A fase de hiperlactatemia consistiu em duas sessões de natação a 13% da massa corporal: (1) 30s de esforço; (2) 1min de repouso passivo; (3) exercício até exaustão para avaliar o desempenho anaeróbio. Foi adotado como critério de exaustão, a incapacidade do animal permanecer na superfície da água por aproximadamente 10s. No 7 e 9 min após indução da hiperlactatemia, foram coletadas amostras de sangue (25 µl) para determinação da concentração máxima de lactato. Após 9 minutos de intervalo passivo, a fase incremental consistiu em natação com pesos amarrados (mochilas) equivalentes a 3,5%; 4,0%; 4,5%; 5,0%; 5,5% e 6,5% da massa corporal. Cada esforço teve duração de 5 min com intervalo de 30s para coleta de sangue e determinação da lactatemia. A intensidade do LM foi obtida a partir do ponto zero derivado do ajuste polinomial de segunda ordem para o menor valor de lactato da curva em forma de “U” obtida entre a concentração sanguínea de lactato (mM) e a carga da fase incremental do teste. Os critérios para esse teste foram a presença do ajuste em forma de “U” e o coeficiente de determinação (R^2) do ajuste polinomial superior a 0,75. O teste de LM foi aplicado em todos os grupos após a adaptação ao meio líquido e no último dia do período experimental (Figura 2).

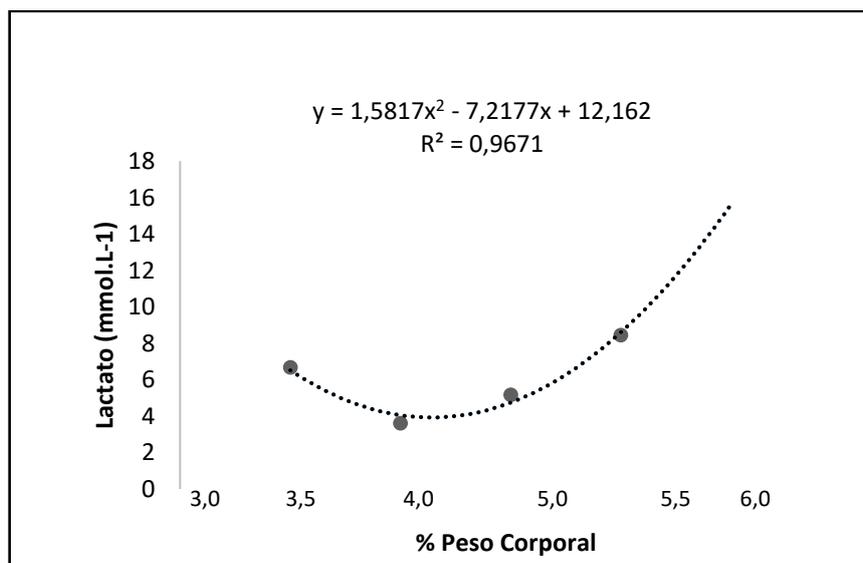


Figura 2. Exemplo da determinação de lactato mínimo pelo protocolo adaptado para ratos com ajuste polinomial de segunda ordem.

Sacrifício dos animais

Após o período de treinamento, todos os animais foram eutanasiados (48h após o teste de LM). Os animais foram previamente pesados para determinação da dose do anestésico, foi utilizado uma solução com tiopental (100mg/kg i.p), em seguida foram coletados sangue e excisão tecidual (fígado e músculo sóleo).

Análise de sangue e tecidos

Amostras de sangue e tecidos foram coletadas após 48h do LM. CK, hormônios, nível de enzima antioxidante, níveis de metabólitos e concentração de glicogênio serão descritas abaixo.

O sangue foi coletado por punção cardíaca, depois colocado em tubos com EDTA (plasma) e tubos secos (soro) de acordo com as análises e separados em alíquotas para posterior análise utilizando kits comerciais. Depois da coleta sanguínea, o fígado e o sóleo foram cuidadosamente dissecados e colocados em papel filme para remover os excessos de gordura e tecidos conectivos. As amostras de tecidos para análise de concentração de glicogênio foram colocadas em eppendorfs no freezer -80°C e transportadas no nitrogênio líquido para posterior análise. Foram retirados 200-250mg de tecido muscular e 500g de tecido hepático.

Análises bioquímicas

Lactato

As concentrações plasmáticas de lactato foram determinadas depois de coletadas amostras sanguíneas proveniente da extremidade da cauda do animal, com auxílio de tubo capilar heparinizado e calibrado a 25 µl, diluído em 50 µl de fluoreto de sódio a 1%, contido em tubos plásticos, tipo Eppendorf. As amostras foram centrifugadas por 10 min e 100 µL de plasma foi colocado em tubos contendo 500 µL de EDTA. As amostras homogeneizadas foram realizadas seguindo especificações do fabricante LABTEST® e absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 340nm.

Creatina Quinase (CK)

A determinação da CK indica o nível de dano muscular esquelético (TOTSUKA et al., 2002). Para mensuração da atividade plasmática da Creatina Quinase (CK), foram feitas análises utilizando o kit BioTécnica® CKNAC. Misturou-se a solução tampão (frasco de 2,5 mL) com reagente específico, deixando-os em banho-maria a 37°C durante 3 minutos.. Em seguida, adicionou-se à solução reativa, 40 µL de plasma (estocado à 2-8 °C durante 10 semanas), deixando novamente a mistura em banho-maria a 37°C por 1 minuto. De forma imediata, realizou-se quatro leituras das absorbâncias de uma mesma amostra a 340 nm, com um minuto de intervalo entre uma leitura e outra, para que fosse obtido um valor Δ . O cálculo da atividade de CK (U/L) na amostra foi feito pela equação $CK (U/L) = 4127 \times \Delta \text{absorbância}/\text{minuto}$.

Glicogênio muscular e hepático

Frações pesando entre 200-250mg do músculo sóleo e 500g do tecido hepático foram retiradas imediatamente após o sacrifício dos animais e colocados no freezer - 80°C, depois de estocados por 1 semana, foram colocadas em banho maria a 100/c em 0,5 mL de KOH 1N durante 20 minutos para determinação do glicogênio muscular. Foram adicionadas 20 µL de solução saturada de Na₂SO₄ e o glicogênio foi precipitado através de duas passagens de 2,5mL de etanol, seguida de centrifugação em 4mL de água e da determinação colorimétrica realizada em 1mM de extrato. 20 µL de fenol a 80% e 2mL de ácido sulfúrico concentrado, após fervura de 15 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro 490nm. Soluções conhecidas de glicose foram utilizadas para curva de calibração.

Testosterona e Corticosterona

Para determinação dos níveis de testosterona e corticosterona (ng/mL), amostras de sangue foram centrifugadas a 3000g/10min, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até sua análise. Testosterona e corticosterona foram mensuradas por kit elisa a 450nm (Abcam ab108666) e 540nm (Abcam ab108821), respectivamente de acordo com as instruções do fabricante.

.

Catalase

As alíquotas de soro para análise da CAT foram armazenadas à -20°C até análise. A atividade da CAT foi mensurada por kit de catalase (Abcam ab83464) de acordo com as instruções do fabricante. Para iniciar a reação, foi adicionado 12 µL de H₂O₂ 1 mM e incubado durante 30 min a 25°C. O H₂O₂ não convertido foi medido calorimetricamente a 450 nm usando leitor de microplacas. A atividade de CAT foi calculada como a quantidade de H₂O₂ decomposta por minuto a pH de 4,5 e 25°C.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste de Shapiro-wilk para verificar normalidade do resíduo dos dados. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o Software SPSS (versão 17.0, Chicago IL.,USA) e os dados estão apresentados em média ± erro padrão (EP). A análise de variância (ANOVA two-way) foi utilizada para identificar as diferenças entre os grupos ao longo do tempo no desempenho aeróbio e anaeróbio. Para comparar valores da concentração de CK, glicogênio muscular e hepático, testosterona, corticosterona, catalase, volume e carga de treinamento foi utilizado o ANOVA one-way seguido do *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

O desempenho anaeróbio mensurado pelo TE não foi diferente entre os grupos ($p=0,82$), apesar de observado aumento do TE após as quatro semanas de

treinamento quando comparado com o momento pré treinamento ($p=0,0001$). (Gráfico 1)

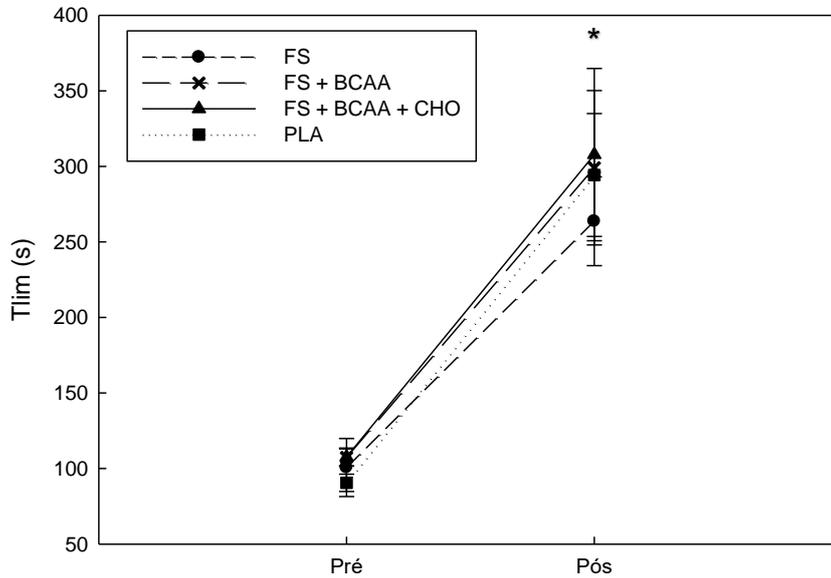


Figura 3. Comparação do desempenho anaeróbio mensurada pelo tempo até exaustão entre as condições FS, FS + BCAA, FS + BCC + CHO e PLA no momento pré e pós treinamento (4 semanas). *Denota diferença significativa em relação ao momento pré treinamento

Não foi observada diferença na capacidade aeróbia mensurada pelo teste de LM após 4 semanas de treinamento ($p=0,90$), também não foi observada diferença entre os grupos no mesmo momento ($p=0,172$) (Gráfico 2).

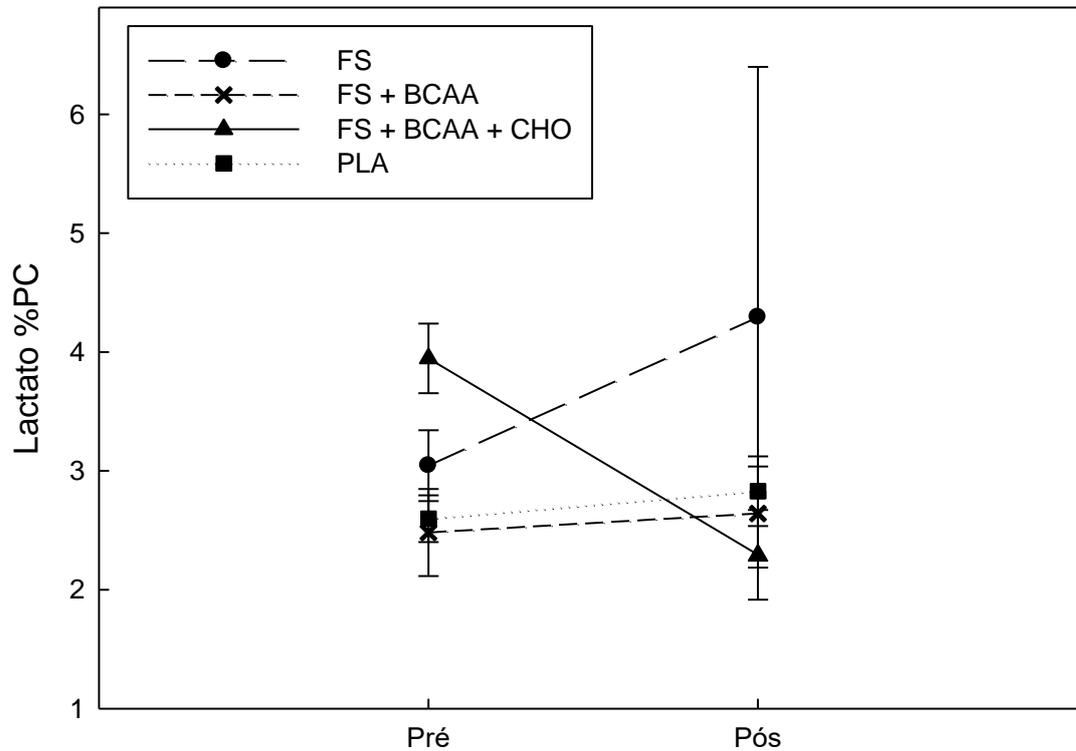


Figura 4.. Capacidade aeróbia mensurada pelo teste de lactato mínimo nos momentos pré e pós treinamento (4 semanas).

A tabela 2 mostra que não foi observada diferença entre as concentrações e pico de lactato entre os grupos em nenhum dos momentos estudados ($p=0,56$; $p=0,15$), porém a concentração e pico de lactato aumentaram no período pós treinamento ($p=0,016$; $p= 0,001$).

Tabela 2. Análise de lactato sanguíneo pré treinamento e após 4 semanas de treinamento.

	Pré treinamento				Pós treinamento			
	FS	FS +BCAA	FS+ BCAA + CHO	PLA	FS	FS + BCAA	FS + BCAA + CHO	PLA
Pico de Lactato (mmol/L)	4,95±1,66	5,58±1,33	6,41±0,75	5,60±0,75	7,89±0,43 ^a	8,79±0,47 ^a	8,39±2,22 ^a	7,35±0,31 ^a
Concentração de Lactato (nmol/L)	6,49±2,76	7,17±2,60	6,26±1,76	7,91±1,97	13,39±5,46 ^a	17,58±1,06 ^a	16±1,15 ^a	12,73±1,87 ^a

^a Diferença significativa em relação ao momento pré-treinamento.

O volume e carga de treinamento foram calculados semanalmente. Foi observado menor volume de HIIT no grupo PLA na segunda ($p=0,001$) terceira

($p=0,012$) e quarta ($p=0,002$) semana com relação ao grupo FS, FS+BCAA e FS+BCAA+CHO. Um menor volume de MIT no grupo PLA também foi observado na primeira ($p=0,001$) e última semana ($p=0,01$) em comparação com FS, FS+BCAA e FS+BCAA+CHO. Durante o período experimental, foi observado menor volume total de treinamento no grupo PLA na primeira ($p=0,001$) e segunda ($p=0,001$) semana, mas nenhuma diferença entre os grupos nas semanas seguintes (Gráfico 3A).

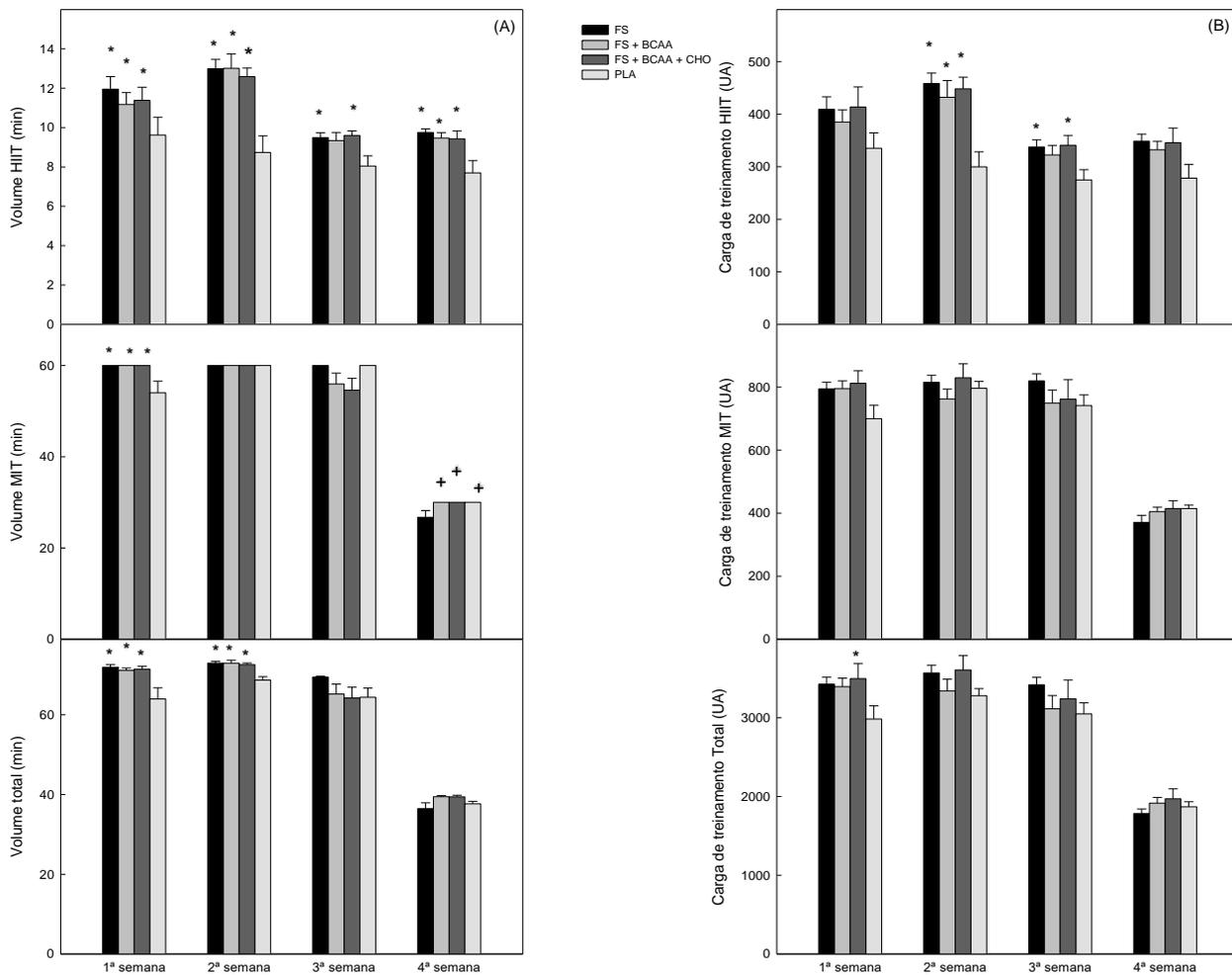


Figura 5. Volume (min) e Carga (UA) de treinamento durante o período experimental. *Denota diferença significativa em relação ao PLA. + Diferença em relação ao grupo FS

Foi verificada uma menor carga de treinamento de HIIT no grupo PLA na segunda ($p=0,001$) e terceira ($p=0,03$) semana em comparação com grupo FS, FS+BCAA e FS+BCAA+CHO. A carga total de treinamento no grupo PLA foi menor

na primeira semana ($p=0,04$) comparada com o grupo FS+BCAA+CHO, porém não foi observada alteração na carga de treinamento nas outras semanas. Não houve diferença de carga de treinamento de MIT em nenhuma das semanas entre os grupos estudados (figura 5B).

A concentração de CK foi comparada somente no momento após treinamento e foi observada maior concentração de CK no grupo FS comparada ao grupo FS+BCAA ($p=0,04$) e ao grupo FS +BCAA +CHO ($p=0,01$). Não foi encontrada diferença entre o grupo FS +BCAA +CHO e o PLA ($p=0,88$) e entre FS + BCAA e PLA ($p=0,99$), entre FS e PLA ($p=0,059$), nem entre os grupos experimentais FS + BCAA e FS+BCAA +CHO ($p=0,94$) (Figura 6)

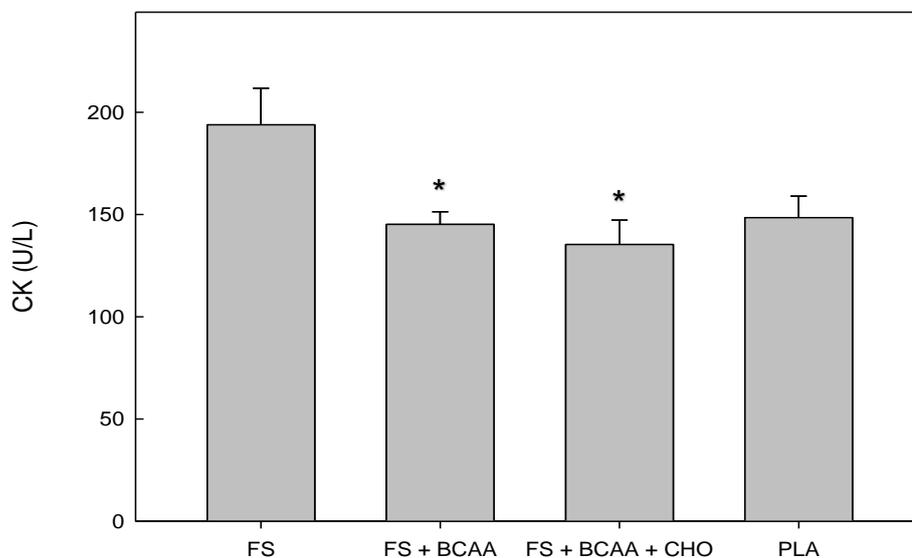


Figura 6. Concentração de CK (U/L) nas condições FS, FS +BCAA, FS +BCC +CHO e PLA no momento após o período de treinamento (4 semanas). Os dados são apresentados em \pm EP. *Diferença significativa em relação ao grupo FS ($p<0,05$)

A figura 7 mostra que não foi observada diferença na concentração da corticosterona ($p=0,44$) e testosterona ($p=0,056$), porém a razão T/C foi maior no grupo FS+BCAA em comparação com FS ($p=0,02$), FS+BCAA+CHO ($p=0,02$) e PLA ($p=0,001$). Não houve diferença na atividade da enzima catalase em nenhum dos grupos estudados ($p=0,23$).

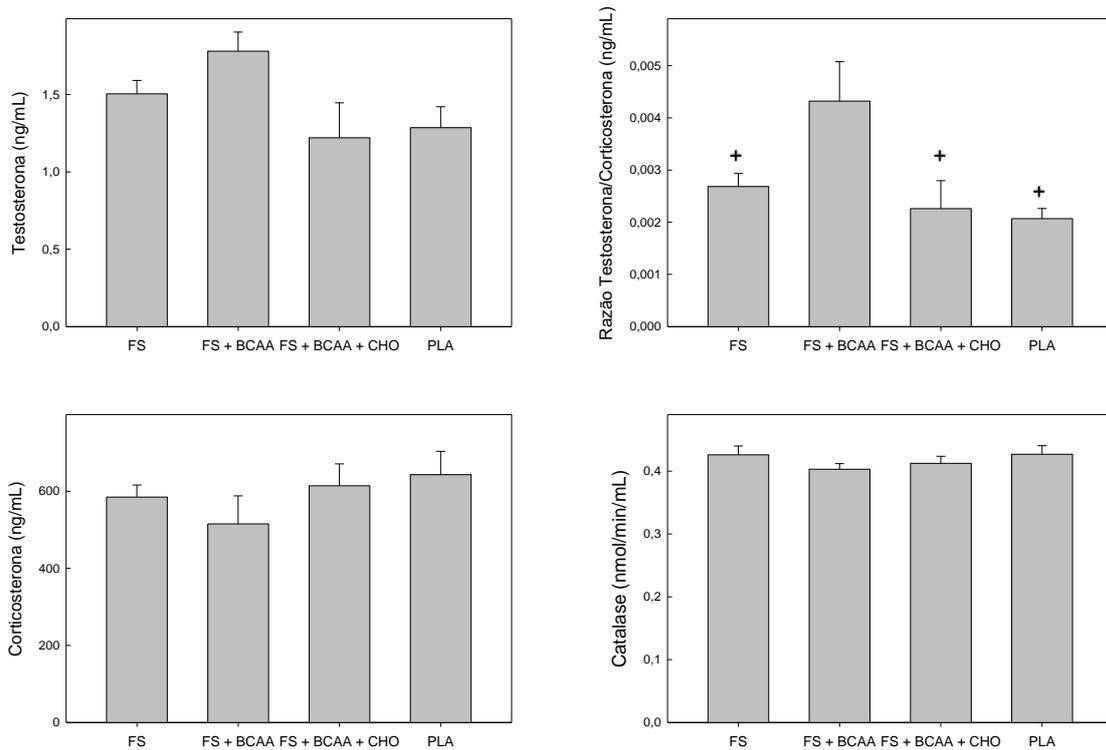


Figura 7. Análises bioquímicas de testosterona (ng/mL), corticosterona (ng/mL), razão T/C e atividade enzimática da catalase (nmol/min/mL). + Diferença significativa em comparação com o grupo FS + BCAA.

A concentração de glicogênio no músculo sóleo foi analisada no momento pós treinamento. O grupo FS + BCAA + CHO apresentou uma concentração de glicogênio muscular (sóleo) 180% maior comparada ao grupo PLA ($p=0,03$) e 170% maior em comparação ao grupo FS ($p=0,03$). Não houve diferença entre as outras condições analisadas ($p < 0,05$). A concentração de glicogênio hepático foi menor na condição FS + BCAA em comparação ao grupo FS ($p=0,008$) e também em comparação com o grupo FS + BCAA + CHO ($p=0,02$). Não houve diferença entre o PLA e nenhuma das condições estudadas (Figura 8).

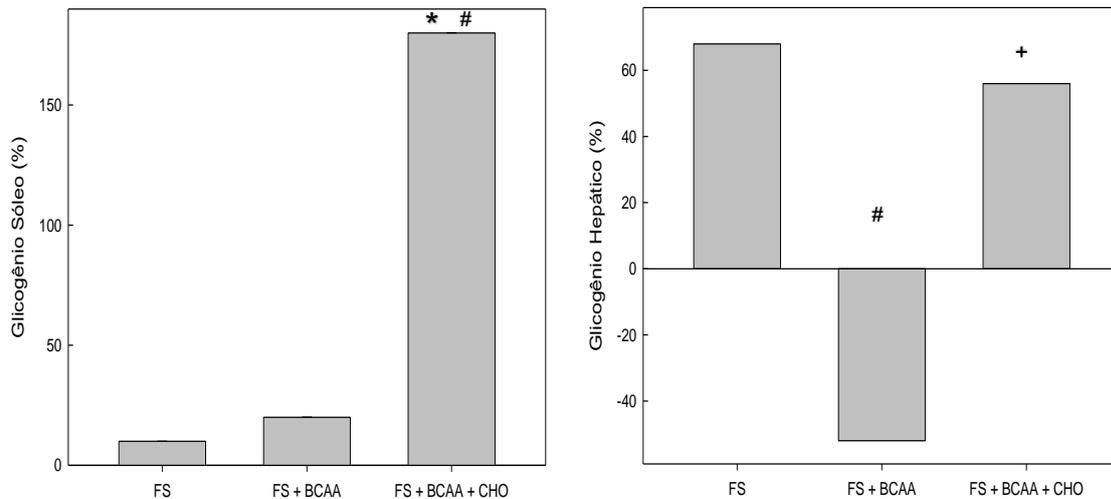


Figura 8. Percentual da concentração de glicogênio no sóleo e fígado nas condições FS, FS +BCAA e FS +BCC +CHO em comparação com o grupo PLA no momento após o período de treinamento (4 semanas). Os dados são apresentados em \pm EP. *Diferença significativa em comparação com o PLA. #Diferença significativa em relação ao grupo FS. + Diferença significativa em comparação com o grupo FS +BCAA.

DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo a investigar o efeito isolado e combinado de FS, CHO e BCAA no desempenho após um protocolo de HIIT. Nossos resultados contradizem em parte a hipótese inicial e mostram que apesar de uma maior carga total de treinamento na primeira semana, a FS isolada ou combinada com BCAA e CHO não teve efeito na capacidade aeróbia e TE em ratos.

Estudos *in vitro* demonstram que uma pequena concentração de FS é efetiva para ativar Na⁺/K⁺ ATPase-dependente em preparações de cérebro e rim de mamífero (TSAKIRIS; DELICONSTANTINOS, 1984; SPECHT & ROBINSON, 1973), além disso foi descoberto que Ca²⁺-ATPase, uma enzima responsável pela reabsorção de cálcio do citosol do músculo para o retículo sarcoplasmático, requer FS (MORROT et al., 1990). A FS exógena mantém a homeostase iônica, sendo plausível supor que a suplementação melhore o mecanismo de contração e conseqüentemente o desempenho durante o exercício. Sendo assim, Kingsley et al. (2006a) foram os primeiros a encontrar efeito ergogênico da FS em homens fisicamente ativos, mostrando que 750mg foi capaz de melhorar a capacidade de exercício em um protocolo de ciclismo intermitente (45, 55 e 65% VO_{2MÁX}) seguido de uma série final até a exaustão (85% VO_{2MÁX}). Os autores observaram que, apesar de nenhuma

alteração na concentração de cortisol, substrato de oxidação e percepção de esforço no grupo suplementado, observou-se aumento do TE após 10 dias de suplementação comparado com o PLA.

Apesar do potencial da FS em contribuir para manutenção da homeostase iônica, os resultados do presente estudo mostram que não houve diferença na capacidade aeróbia e TE em ratos nas diferentes suplementações. No entanto, a carga total de treinamento, na primeira semana foi maior nos grupos suplementados em relação ao PLA e a carga no HIIT foi superior na segunda e terceira semana em relação ao PLA. O volume total de treinamento foi superior ao PLA nas duas primeiras semanas e o volume do HIIT foi superior em todas as 4 semanas de treinamento comparado com o PLA. Esses dados demonstram maior tolerância dos grupos FS isolado e combinado às sessões de treinamento.

O HIIT é um protocolo de treinamento efetivo para melhora do limiar anaeróbio, máxima captação de oxigênio, desempenho anaeróbio, fibras tipo I, atividade da citrato sintase e outras variáveis aeróbias em sedentários e atletas treinados (LAURSEN; JENKINS, 2002), porém existe uma linha tênue entre essas melhoras e sintomas de *overtraining*, estresse fisiológico e imunossupressão devido a intensidade inapropriada, o que pode ocasionar a diminuição do desempenho (HOHL et al., 2009). Nossos dados sugerem que a FS pode auxiliar no processo de adaptação no HIIT, e, talvez o grupo PLA demorou um tempo maior para sofrer as adaptações ao HIIT comparado com os grupos suplementados.

Scariot et al. (2016) analisaram o efeito de 12 semanas de treinamento aeróbio na atividade física voluntária (AFV) em ratos, utilizando o teste de LM para análise da capacidade aeróbia e desempenho anaeróbio, demonstraram que fazer exercício aeróbio diariamente pode ter efeito protetor no declínio da AFV, porém, não previne o declínio da capacidade aeróbia e desempenho anaeróbio. Os autores sugerem que ratos selvagens tem maiores oportunidades de explorarem o ambiente em comparação com ratos que vivem em gaiolas, levando-os ao sedentarismo e, portanto, têm adaptações fisiológicas diferentes (expressão de genes, remodelação de tecidos, etc), indicando maiores dificuldades em identificar melhora no desempenho comparados com ratos em seu habitat natural. Os autores aguçam reflexões sobre a forma de manutenção dos animais no laboratório.

A segunda hipótese do presente estudo foi que a combinação de FS com BCAA e com BCAA e CHO poderia ter um possível efeito potencializador também no estresse oxidativo, na redução dos danos musculares, redução dos níveis de cortisol, aumento da razão T/C e maior síntese de glicogênio muscular e hepático após exercício. Apesar dos efeitos comprovados da ingestão de proteína na taxa de síntese protéica (WILLIAMS et al., 2003; FERGUSON-STEGALL et al., 2011), a suplementação de proteínas combinada com carboidratos não está consistentemente associada ao melhor desempenho (MILLARD-STANFFORD et al., 2005). Nossos resultados mostraram que a combinação de FS com esses macronutrientes não melhoram capacidade aeróbia e o desempenho anaeróbio em ratos no protocolo de HIIT.

A concentração de CK desempenha papel importante no ajuste do metabolismo energético necessário para a atividade muscular e pode ser utilizada como indicador de dano celular (WILLIAMS et al., 2003). Em humanos, estudos com menos de 800 mg de suplementação de FS-S mostraram efeitos benéficos no desempenho e marcadores de danos musculares: 750 mg de FS-S resultaram em um aumento do TE durante protocolo intermitente de ciclismo (KINGSLEY et al., 2006a), e uma tendência de melhora do desempenho em exercícios intervalados durante protocolo de corrida até exaustão quando em comparado com o PLA (KINGSLEY et al., 2005). 600 mg e 300 mg de FS-S reduziram significativamente os níveis de CK 24 h após uma corrida de 90 min (FERNHOZ et al., 2000). Estudos anteriores encontraram menor valor de CK em ciclistas que utilizaram BCAA ,durante e após exercício de *endurance* com moderada intensidade, comparado com o grupo PLA (DONG-HEE et al., 2013). No presente estudo a concentração de CK foi atenuada no grupo FS +BCAA e FS+BCAA+CHO em comparação com grupo FS. Esses dados evidenciam que a associação da FS com macronutrientes melhora o processo de reparação tecidual. Talvez a dosagem isolada de 300mg não foi suficiente para o estresse crônico induzido pelo exercício durante o protocolo experimental nas quatro semanas.

Devido a maior captação de oxigênio durante o exercício, há o aumento do estímulo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tecidos e sangue (JI, 1993). Para controlar a produção de EROs, uma das enzimas que atua sobre esse sistema oxidativo, é a CAT. É sabido que FS-livre (não incorporadas as membranas celulares) podem ter efeitos antioxidantes e contribuir para defesa contra o

estresse oxidativo (PEPEU, et al. 1996). Liu et al. (2012) investigaram o efeito da suplementação de 300mg/kg de FS isolada ou combinada com ácido docosahexaenóico (DHA) no estresse oxidativo, comportamento e memória cognitiva em ratos, os resultados demonstraram uma maior atividade da CAT no grupo com suplementação combinada de FS e DHA, porém não houve diferença quando administrados de forma isolada. No âmbito do exercício, Kingsley et al. (2005) foram os primeiros a investigar o efeito crônico da suplementação de 750mg de FS no estresse oxidativo e lesão muscular no exercício intermitente, e demonstraram que a suplementação de FS não foi efetiva em atenuar o estresse oxidativo ao mensurar atividade do γ -tocoferol e antioxidantes não enzimáticos no exercício até exaustão, o que corrobora com os achados do presente estudo, onde protocolo de suplementação não foi capaz de atenuar o estresse oxidativo, demonstrado pela não alteração da atividade da enzima CAT. No estudo de Kingsley et al. (2005) também foi mensurada a concentração de hidroperóxidos antes e após a suplementação e identificaram níveis semelhantes na produção de radicais livres, que superou a defesa antioxidante, ocasionando a peroxidação lipídica. No presente estudo não foi mensurada a atividade da CAT antes do período experimental, mas talvez a FS tenha efeito protetor na redução do dano que foi mascarada pelo aumento do volume e carga de treinamento dos grupos suplementados.

O protocolo do presente estudo não permitiu estudar mecanismos pelo qual a FS afeta o desempenho, contudo, além da integridade da membrana plasmática e da diminuição do estresse oxidativo e lesão muscular, outro mecanismo de ação proposto na literatura é a ação antagonista a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) causada pelo exercício (MONTELEONE et al., 1990). Monteleone et al. (1992) utilizaram duas doses de FS-CB: 400 e 800mg/dia durante 10 dias e verificaram que a maior dose resultou na diminuição da concentração plasmática de cortisol em homens saudáveis sedentários, porém a dose de 400mg/dia não afetou a concentração do cortisol. Os autores sugeriram que talvez seja necessário um período maior que 10 dias com altas doses de FS para neutralizar o estresse induzido pela ativação HPA em homens saudáveis. Kingsley et al. (2006a) avaliaram a suplementação de 750mg/dia de FS-S durante 10 dias e não houve alteração nos níveis séricos de cortisol depois de um protocolo intermitente de ciclismo em homens jovens, fisicamente ativos. Provavelmente seja necessário um maior período de

suplementação de FS, visto que muitos estudos utilizaram a suplementação de FS durante longos períodos (>2 semanas), e reportam melhora na função cerebral mesmo administrando doses mais baixas (<500mg/dia) (CENACCHI et al., 1993). No presente estudo, apesar das quatro semanas de treinamento, não foi encontrado alteração na concentração de corticosterona e testosterona em nenhum dos grupos encontrados. Em ratos, de Araujo et al. (2016) investigaram os efeitos do HIIT a curto (6 semanas) e longo prazo (12 semanas), e demonstraram que os níveis de corticosterona nas 12 semanas foram menores que o grupo controle e maiores no HIIT a curto prazo comparado com o grupo controle, sugerindo que o curto prazo de HIIT pode ser considerado um período de estresse transitório e talvez, o curto período promova um estresse imediato e seja insuficiente para promover adaptações positivas.

Um resultado interessante do nosso estudo, foi o aumento significativo da razão T/C do grupo FS+BCAA comparado com os demais, Sharp e Pearson, (2010), investigaram o efeito da suplementação de curta duração (três semanas) e alta concentração de BCAA (1800mg de leucina, 750mg de isoleucina e 750g de valina), no perfil hormonal e lesão muscular em exercício de alta intensidade. Os autores encontraram maior nível de testosterona e menor concentração de CK e cortisol no grupo suplementado com BCAA comparado com o PLA, sugerindo que o BCAA pode favorecer para um perfil hormonal anabólico ao mesmo tempo que atenua os danos musculares induzidos pelo treinamento. Mei-Chich et al. (2011) investigaram o efeito de uma bebida contendo BCAA e CHO na resposta fisiológica e bioquímica durante a recuperação muscular após exercício até exaustão. Apesar da não diferença nos níveis de CK e lactato, a razão T/C 120min após a sessão de treino foi maior no grupo suplementado com a bebida combinada quando comparada com PLA, indicando a ocorrência de resposta anabólica durante o período de recuperação.

Jager et al. (2007), em uma revisão, sugeriram que a suplementação de FS poderia aumentar a taxa de glicose transportada para as células musculares e, conseqüentemente, aumentar a recuperação do glicogênio muscular em exercício intenso. Ainda seria esperado um efeito interativo entre os aminoácidos e CHO, dada a resposta resultante da insulina dos CHOs e da leucina dos BCAA's. 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 (BRADY et al., 1997). Nosso resultado demonstra um aumento no grupo FS+BCAA+CHO de 180% no estoque de glicogênio muscular (sóleo) comparado com PLA e 170% maior em comparação ao grupo FS. Previamente, pelo nosso conhecimento, nenhum outro estudo mensurou concentração muscular e hepática de glicogênio após suplementação crônica de FS. De Araujo et al. (2016) demonstraram que independente da duração do HIIT (6 ou 12 semanas), a síntese de glicogênio no músculo sóleo não excedeu 70% da supercompensação, sugerindo uma limitação de síntese de glicogênio devido as suas características oxidativas, rico em fibras do tipo I e baixo poder glicolítico, talvez, por isso, o treinamento intervalado pode não ter provocado adaptações significativas na repleção de glicogênio (FOURNIER et al., 2004)

Talvez o dado mais intrigante do nosso estudo foi a diminuição significativa do estoque de glicogênio hepático no grupo FS+BCAA em comparação ao grupo FS e FS+BCAA+CHO. Sabe-se que o glicogênio hepático é combustível importante para o metabolismo aeróbio e o desempenho anaeróbio, alguns estudos mostram que a suplementação de BCAA após o treino, tem efeito poupador do glicogênio hepático, aumentando seu estoque (DE ARAUJO et al., 2006; CAMPOS-FERRAZ et al., 2013). O aumento da sensibilidade à glicose é resultante de inúmeras alterações celulares, dentre as quais, aumento do número dos transportadores de glicose GLUT2 e da atividade e do conteúdo das glicocinases (WEINHAUS et al., 2007). Em particular, glicocinase no fígado é envolvida no metabolismo de regulação da glicose (HIGUCHI et al., 2011) e L-GK tem papel na regulação da síntese do glicogênio hepático (MATSCHINSKY, 2009). HIGUCHI et al. (2011) demonstraram uma redução da glicose6-fosfato no fígado com administração oral de BCAA em animais cirróticos, sugerindo que a suplementação pode ter papel importante na supressão da gliconeogênese, porém a expressão de glicogênio sintase não foi aumentada. A administração de BCAA aumentou a bioatividade do aparelho de detecção de glicose, provavelmente através da ativação de um mecanismo de transcrição, sugerindo que esses aminoácidos podem melhorar o metabolismo da glicose através da utilidade acelerada de glicose e glicose-6-fosfato no fígado. Portanto, a suplementação de BCAA a longo prazo pode aumentar a síntese hepática de glicogênio, porém, assim como no presente estudo, talvez o tempo não tenha sido suficiente para promover a adaptação ao exercício de HIIT.

Essas discrepâncias dos resultados encontrados podem resultar das diferenças na quantidade de FS fornecida, sua composição ou que os modelos de exercícios utilizados podem não ser adequados para detectar os efeitos no desempenho e recuperação muscular. Existem protocolos bastante diferentes em relação à intensidade e duração antes da intervenção da suplementação e para avaliar o desempenho após o período de intervenção. Um modelo experimental com intensidade de exercício similar antes e após a intervenção da dieta representaria uma abordagem mais apropriada para obter resultados mais coerentes.

CONCLUSÃO

A FS isolada ou combinada com BCAA e CHO não foi capaz de melhorar a capacidade aeróbia e TE em um protocolo de HIIT em ratos Wistar. Porém, no grupo suplementado foi observada uma maior carga e volume total de treinamento e maior carga no HIIT nas primeiras semanas de treinamento, e, ainda, o volume do HIIT foi superior em todas as 4 semanas de treinamento comparado com o PLA. Esses dados demonstram maior tolerância dos grupos FS isolado e combinado às sessões de treinamento. Além disso, maior razão T/C foi encontrada no grupo FS+BCAA comparado com os outros grupos. Não deve ser negligenciado que nosso estudo traz novos resultados sobre o impacto positivo da FS em exercício de alta intensidade.

REFERÊNCIAS

BLOMSTRAND, E, SALTIN, B. BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 281, p.365–374, 2011.

CAMPOS-FERRAZ, P.L., et al. Distinct effects of leucine or a mixture of the branched branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, and valine) supplementation on resistance to fatigue, and muscle and liver-glycogen degradation, in trained rats. **Nutrition**, v.29, n.11, p.1388-1294, 2013.

CENACCHI, T. et al. Cognitive decline in the elderly: a double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration. **Aging**, v.5, p.23-33, 1993.

DE ARAUJO J.A., et al. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. **Life Sci**, v.79, n.14, p. 1343–1348, 2006.

DE ARAUJO, G.G. et al. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 148, n.4, p. 888- 892, 2007.

DE ARAUJO, G.G. et al. Interval versus continuous training with identical workload: physiological and aerobic capacity adaptations. **Physiol.Res**, v.64, n.2, p. 209–219, 2015.

DE ARAUJO, GG, PAPOTI, M, DOS REIS, IG, DE MELLO, MAR, GOBATTO CA. Short and long term effects of high-intensity interval training on hormones, metabolites, antioxidant system, glycogen concentration and aerobic performance adaptation in rats. **Front Physiol**, v.7, n.505, 2016.

DONG-HEE, K. et al. Effect of BCAA intake during endurance exercises on fatigue substances, muscle damage substances, and energy metabolism substances. **J Exerc Nutr Biochem**, v.17, n.4. p. 169-180, 2013.

FAHEY, T.D., PEARL, M.S. The hormonal and perceptive effects of phosphatidylserine administration during two weeks of resistive exercise-induced overtraining. **Biol Sport**, v. 15, n.3, p. 135-144, 1998.

FERGUSON-STEGALL, L. et al. Postexercise carbohydrate-protein supplementation improves subsequent exercise performance and intracellular signaling for protein synthesis. **J Strength Cond Res**, v.25, p. 1210–1224, 2011.

FERNHOLZ, K.M., et al. The Effects of Phosphatidyl Serine on Markers of Muscular Stress in Endurance Runners [abstract]. **Med Sci Sports Exerc** ,v. 32, n.5, 2000.

FOURNIER, P.A. et al. Post-exercise muscle glycogen repletion in the extreme: effect of food absence and active recovery. **J.Sports Sci Med**, v.1, n.3, p.139–146, 2004.

HELLHAMMER, J. et al. Effects of soy lecithin phosphatidic acid and phosphatidylserine complex (PAS) on the endocrine and psychological responses to mental stress. **Stress**, v.7, n.2, p.119-126, 2004.

HIGUCHI, N. et al. Potential Role of Branched-Chain Amino Acids in Glucose Metabolism Through the Accelerated Induction of the Glucose-Sensing Apparatus in the Liver. **J Cell Biochem**, v.112, n.1, p. 30-38, 2011.

HOHL, R. et al. Development and characterization of an overtraining animal model. **Med.Sci.SportsExerc**, v.41, n.5, p.1155–1163. 2009.

HOWARTH, K.R. et al. Coingestion of protein with carbohydrate during recovery from endurance exercise stimulates skeletal muscle protein synthesis in humans. **J Appl Physiol**, v. 106, n.4, p.1394–1402, 2009.

JÄGER, R., PURPURA, M., KINGSLEY, M. Phospholipids and sports performance. **J Int Soc Sports Nutr** ,v.4, n.5, 2007.

Ji,LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.25, n.2, p.225–231.1993.

JORISSEN, B.L, et al. Safety of soy derived phosphatidylserine in elderly people. *Nutr Neurosci*, v. 5, p. 337-343, 2002.

KINGSLEY, M. Effects of phosphatidylserine supplementation on exercising humans. **Sports Med.**, v.36, n.8, p. 657-69, 2006c.

KINGSLEY, M. et al. Effects of phosphatidylserine on exercise capacity during cycling in active males. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, p. 64-71, 2006a.

KINGSLEY, M. et al. Phosphatidylserine Supplementation and Recovery following Downhill Running. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 38, n. 9, p. 1617–1625, 2006b.

KINGSLEY, M. et al.Effects of Phosphatidylserine on Oxidative Stress following Intermittent Running. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.37, n. 8, p. 1300–1306, 2005.

LAURSEN, P.B., JENKINS, D.G. The scientific basis for high- intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. **Sports Med**, v.32, n.1, p.53–73, 2002.

LAURSEN, P.B.Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training? **Scand J Med Sci Sports**, v.2, p. 1 – 10, 2010.

LIU, S.H. et al. Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylenetetrazol-induced seizure model. **Brain Res**, v. 1451, p. 19-26, 2012.

MANCHADO, F.B. et al. Nonexhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n.6, p.731–736, 2006.

MATSCHINSKY, F.M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v.8, n.5, p.399–416, 2009.

MEI-CHICH, H. et al. Effects of BCAA, Arginine and Carbohydrate Combined Drink on Post-Exercise Biochemical Response and Psychological Condition. **Chin J Physiol**, v.54, n.2, p.71-78, 2011.

MILLARD-STAFFORD, M. et al. Recovery from run training: efficacy of a carbohydrate-protein beverage? **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v.15, n.6, p.610–624, 2005.

MONTELEONE P. et al. Blunting by chronic phosphatidylserine administration of the stress-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in healthy men. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 42, n.4, p. 385-388, 1992.

MONTELEONE, P, et al. Effects of Phosphatidylserine on the Neuroendocrine Response to Physical Stress in Humans. **Neuroendocrinology**, v. 52, n.3, p. 243-248, 1990

MOORE, D.R, et.al. Beyond muscle hypertrophy: why dietary protein is important for endurance athletes. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.39, n.9, p.987-997, 2014.

MORIFUJI, M. et al. Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. **Amino Acids**, v. 38, n.4, p. 1109–1115, 2010.

MORROT, G. et al. Partial purification and characterization of the human erythrocyte mg2(+)-atpase. A candidate aminophospholipid translocase. **FEBS Lett**, v.266, n.1-2, p.29-32, 1990.

PARKER, A.G. et al. The effects on IQPLUS focus on cognitive function, mood, and endocrine response before and following acute exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v.8, n.16, 2011.

PEPEU, G. et al. A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects: is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? **Pharmacol Res.**, v.33, n.2, p. 73-80, 1996.

RASMUSSEN, B.B. et al. An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. **J Appl Physiol.**, v.88, n.2, p.386-392, 2000.

RUFFO, A.M. **Efeitos da suplementação de diferentes concentrações de maltodextrina em ratos submetidos a exercício contínuo e prolongado.** Dissertação de Mestrado, 2004.

SCARIOT, P.P. et al. Continuous aerobic training in individualized intensity avoids spontaneous physical activity decline and improves mct1 expression in oxidative muscle of swimming rats. **Front Physiol**, v.7, n.132. 2016.

SHARP, C.P.M, PEARSON, D.R. Amino acid supplements and recovery from high-intensity resistance training. **J Strength and Cond Res**, v.24, n.4, p.1125-1130, 2010.

SPECHT, S.C, ROBINSON, J.D. Stimulation of the (Na⁺⁺K⁺)- dependent adenosine triphosphatase by amino acids and phosphatidylserine: chelation of trace metal inhibitors. **Arch Biochem Biophys.**, v. 154, n. 314–23, 1973.

STARKS, et al. The effects of phosphatidylserine on endocrine response to moderate intensity exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v.5, n.11, 2008.

TIPTON, K.D. et al. Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.81, n.2, p.197-206, 2001.

TOTSUKA, M. et al. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. **J Appl Physiol.**, v.93, n.4, p.1280-1286, 2002.

TSAKIRIS, S, DELICONSTANTINOS, G. Influence of phosphatidylserine on (Na₊/K₊)-stimulated atpase and acetylcholinesterase activities in dog brain synaptosomal plasma membranes. **Biochem J**, v.220, n.1, p.:301–307, 1984.

TYURINA, Y. et al. Phospholipid signaling in apoptosis: Peroxidation and externalization of phosphatidylserine. **Toxicology**, v.148, n.2-3, p. 93–101, 2000.

VAN MEER, G.et al. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.2 p.112–124, 2008.

WEINHAUS, A.J. et al. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactina: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. **J Endocrinol**, v.193, n.3, p.367-381, 2007.

WILLIAMS, M. et al. Effects of recovery beverages on glycogen restoration and endurance exercise performance. **J Strength Cond Res**, v.17, n.1, p.12–19, 2003.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos acerca da FS envolvida no ciclismo, treinamento de força e corrida sugerem que a FS pode acelerar a recuperação, prevenir dor muscular, melhorar o bem-estar e ainda possuir propriedades ergogênicas. A FS parece demonstrar efeito positivo para combater o estresse induzido pelo exercício e prevenir a deterioração fisiológica que acompanha o *overtraining*. Porém, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, constatou-se que, em ratos Wistar submetidos ao HIIT, a suplementação crônica de FS de forma isolada ou combinada com BCAA ou BCAA e CHO não é capaz de melhorar capacidade aeróbia e anaeróbia, apesar do aumento da carga e volume de treinamento quando comparado com o PLA, sugerindo que o grupo PLA demorou um tempo maior para sofrer as adaptações ao HIIT comparado com os grupos suplementados.

A FS também não foi capaz de atenuar os níveis de cortisol durante a atividade física e aumentar a razão T/C, nem aumentar a atividade da enzima CAT ou diminuir a concentração de CK, pode-se dizer que a FS não foi capaz de atenuar o estresse oxidativo nesse tipo de protocolo de treinamento. O conteúdo de glicogênio muscular e hepático não foi poupado pela utilização de FS de forma crônica. Essas discrepâncias dos resultados encontrados podem resultar de diferenças na quantidade de FS fornecida, sua composição ou que os modelos de exercícios utilizados podem não ser adequados para detectar os efeitos no desempenho e recuperação muscular. Existem protocolos bastante diferentes em relação à intensidade e duração antes da intervenção da suplementação e para avaliar o desempenho após o período de intervenção. Um modelo experimental com intensidade de exercício similar antes e após a intervenção da dieta representaria uma abordagem mais apropriada para obter resultados mais coerentes.

Por fim, sugerimos mais estudos para fundamentar e investigar os potenciais usos da FS no exercício e o mecanismo pelo qual a FS pode atuar fisiologicamente. Não deve ser negligenciado que nosso estudo traz novos resultados sobre o impacto positivo da FS em exercício de alta intensidade.

4. REFERÊNCIAS

ALBERIO L. et al. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. **Blood**, v.95, n.5, p. 1694–1702, 2000.

ALLEGRO L, FAVARETTO V, ZILIOGTO G. Oral phosphatidylserine in elderly patients with cognitive deterioration. An open study. **Clin Trials J**, v.24, p.104–108, 1987.

AMADUCCI, L. Phosphatidylserine in the treatment of alzheimer's disease: results of a multicenter study. **Psychopharmacol. Bull**, v.24, n.1, p.130–134, 1998.

ARAMAKI, Y. et al. Negatively charged liposomes inhibit tyrosine phosphorylation of 41-kDa protein in murine macrophages stimulated with LPS. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 231: p. 827-830, 1997.

BABCOCK, G.T. How oxygen is activated and reduced in respiration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, n.23, p.12971-12973, 1999.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int J Food Sci Nutr**, v.47, n.3, p.233-61, 1996.

BEVERS E.M., WILLIAMSON P.L. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. **Physiol Rev**, v. 96, p. 605-645, 2016.

BLOKLAND, A. et al. Cognition-enhancing properties of subchronic phosphatidylserine (PS) treatment middle-aged rats: comparison of bovine cortex PS and soybean PS. **Nutrition**, v.15, p. 778-783, 1999.

BLOMSTRAND, E, SALTIN, B. BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 281, p.365–374, 2011.

BRUNI, A. et al. Phospholipid metabolism in rat intestinal mucosa after oral administration of lysophospholipids. **Adv Exp Med Bio**, v. 318, p. 243-249, 1992.

CAMPOS-FERRAZ, P.L., et al. Distinct effects of leucine or a mixture of the branched branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, and valine) supplementation on resistance to fatigue, and muscle and liver-glycogen degradation, in trained rats. **Nutrition**, v.29, n.11, p.1388-1294, 2013.

CENACCHI, T. et al. Cognitive decline in the elderly: a double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration. **Aging**, v.5, p.23-33, 1993.

CENACCHI, T., BAGGIO, C, PALIN, E. Human tolerability of oral investiphosphatidylserine assessed through laboratory examinations. **Clin Trials J** v. 21, p.125-130, 1987.

DE ARAUJO J.A., et al. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. **Life Sci**, v.79, n.14, p. 1343–1348, 2006.

DE ARAUJO, G.G. et al. Interval versus continuous training with identical workload: physiological and aerobic capacity adaptations. **Physiol.Res**, v.64, n.2, p. 209–219, 2015.

DE ARAUJO, G.G. et al. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 148, n.4, p. 888- 892, 2007.

DE ARAUJO, G.G. et al. Short and long term effects of high-intensity interval training on hormones, metabolites, antioxidant system, glycogen concentration and aerobic performance adaptation in rats. **Front Physiol**, v.7, n.505, 2016.

DONG-HEE, K. et al. Effect of BCAA intake during endurance exercises on fatigue substances, muscle damage substances, and energy metabolism substances. **J Exerc Nutr Biochem**, v.17, n.4. p. 169-180, 2013.

FAHEY, T.D. Biological markers of overtraining. **Biof Sport**, v.14, p. 1-19, 1997.

FAHEY, T.D., PEARL, M.S. The hormonal and perceptive effects of phosphatidylserine administration during two weeks of resistive exercise-induced overtraining. **Biol Sport**, v. 15, n.3, p. 135-144, 1998.

FERGUSON-STEAGALL, L. et al. Postexercise carbohydrate-protein supplementation improves subsequent exercise performance and intracellular signaling for protein synthesis. **J Strength Cond Res**, v.25, p. 1210–1224, 2011.

FERNHOLZ, K.M., et al. The Effects of Phosphatidyl Serine on Markers of Muscular Stress in Endurance Runners [abstract]. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n.5, 2000.

FOURNIER, P.A. et al. Post-exercise muscle glycogen repletion in the extreme: effect of food absence and active recovery. **J.Sports Sci Med**, v.1, n.3, p.139–146, 2004.

FREYSZ, L. DREYFUS, C. VINCENDON, C. Asymmetry of brain microsomal membranes. In: Horrocks L, ed. **Phospholipids in the nervous system**. New York: Raven Press, v. 1, p. 37–47, 1982.

GAETANI, G.F., et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood Journal**, v.73, n.1, p.334–339, 1989.

HANAHAN, D.J., NELSON, D.R. Phospholipids as dynamic participants in biological processes. **J Lipid Res**, v. 25, p. 1528-1535, 1984.

HELLHAMMER, J. et al. Effects of soy lecithin phosphatidic acid and phosphatidylserine complex (PAS) on the endocrine and psychological responses to mental stress. **Stress**, v.7, n.2, p.119-126, 2004.

HIGUCHI, N. et al. Potential Role of Branched-Chain Amino Acids in Glucose Metabolism Through the Accelerated Induction of the Glucose-Sensing Apparatus in the Liver. **J Cell Biochem**, v.112, n.1, p. 30-38, 2011.

HOFFMAN J., et al. Efficacy of phosphatidic acid ingestion on lean body mass, muscle thickness and strength gains in resistance-trained men. **J Int Soc Sports Nutr.**, v.6, n.47, 2012.

HOHL, R. et al. Development and characterization of an overtraining animal model. **Med.Sci.SportsExerc**, v.41, n.5, p.1155–1163. 2009.

HOWARTH, K.R. et al. Coingestion of protein with carbohydrate during recovery from endurance exercise stimulates skeletal muscle protein synthesis in humans. **J Appl Physiol**, v. 106, n.4, p.1394–1402, 2009.

HU"BSCHER, R.R., et al. Studies on the biosynthesis of phosphatidylserine, **Biochim Biophys. Acta**, v. 36, p. 518–528,1959.

HUYNH, M.L. et al. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 and the resolution of inflammation. **J Clin Invest**, v. 109, p. 41-50, 2002.

JÄGER, R., PURPURA, M., KINGSLEY, M. Phospholipids and sports performance. **J Int Soc Sports Nutr** ,v.4, n.5, 2007.

Ji,LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.25, n.2, p.225–231.1993.

JORISSEN, B.L, et al. Safety of soy derived phosphatidylserine in elderly people. **Nutr Neurosci**, v. 5, p. 337-343, 2002.

JOY, J., et al. Phosphatidic acid enhances mTOR signaling and resistance exercise induced hypertrophy. **Nutr Metab.** v,11. n, 29, 2014.

KAIBUCHI, K., TAKAY, Y., NISHIZUKA, Y. Cooperative roles of various membrane phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. **J Biol Chem** v. 256, p. 7146–7149, 1981.

KAY J.G, GRINSTEIN S. Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. **Adv Exp Med Biol** ,v. 991, p. 177–193, 2013.

KIM, H.Y., et al. Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3): role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. **J Biol Chem**, v.275, p. 35215-3523, 2000.

KINGSLEY, M. Effects of phosphatidylserine supplementation on exercising humans. **Sports Med.**, v.36, n.8, p. 657-69, 2006c.

KINGSLEY, M. et al. Effects of phosphatidylserine on exercise capacity during cycling in active males. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 38, p. 64-71, 2006a.

KINGSLEY, M. et al. Phosphatidylserine Supplementation and Recovery following Downhill Running. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 38, n. 9, p. 1617–1625, 2006b.

KINGSLEY, M. et al. Effects of Phosphatidylserine on Oxidative Stress following Intermittent Running. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.37, n. 8, p. 1300–1306, 2005.

KUGE, O., NISHIJIMA M. Phosphatidylserine synthase I and II of mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1348, n.1, p. 151-156, 1997.

KUIPERS H., KEIZER HA, Overtraining and elite athletes: Review and directions for the future. **Sports Med**, v.6, n.2,p. 79-92, 1988.

LAURSEN, P.B., JENKINS, D.G. The scientific basis for high- intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. **Sports Med**, v.32, n.1, p.53–73, 2002.

LAURSEN, P.B. Training for intense exercise performance: high-intensity or high-volume training? **Scand J Med Sci Sports**, v.2, p. 1 – 10, 2010.

LIU, S.H. et al. Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylenetetrazol-induced seizure model. **Brain Res**, v. 1451, p. 19-26, 2012.

MANCHADO, F.B. et al. Nonexhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 31, n.6, p.731–736, 2006.

MATSCHINSKY, F.M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v.8, n.5, p.399–416, 2009.

MEI-CHICH, H. et al. Effects of BCAA, Arginine and Carbohydrate Combined Drink on Post-Exercise Biochemical Response and Psychological Condition. **Chin J Physiol**, v.54, n.2, p.71-78, 2011.

MILLARD-STAFFORD, M. et al. Recovery from run training: efficacy of a carbohydrate-protein beverage? **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v.15, n.6, p.610–624, 2005.

MONGAR, J.L, SVEC, P. The effect of phospholipids on histamine release. **Br J Pharmacol**, v.46, n.4, p. 741-752, 1972.

MONTELEONE P. et al. Blunting by chronic phosphatidylserine administration of the stress-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in healthy men. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 42, n.4, p. 385-388, 1992.

MONTELEONE, P, et al. Effects of Phosphatidylserine on the Neuroendocrine Response to Physical Stress in Humans. **Neuroendocrinology**, v. 52, n.3, p. 243-248, 1990.

MOORE, D.R. et.al. Beyond muscle hypertrophy: why dietary protein is important for endurance athletes. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.39, n.9, p.987-997, 2014.

MORIFUJI, M. et al. Post-exercise carbohydrate plus whey protein hydrolysates supplementation increases skeletal muscle glycogen level in rats. **Amino Acids**, v. 38, n.4, p. 1109–1115, 2010.

MORROT, G. et al. Partial purification and characterization of the human erythrocyte mg2(+)-atpase. A candidate aminophospholipid translocase. **FEBS Lett**, v.266, n.1-2, p.29-32, 1990.

NAGAI, Y. et al. An alternative splicing form phosphatidylserine-specific phospholipase A1 that exhibits lysophosphatidylserine-specific lysophospholipase activity in humans. **J Biol Chem.**, v.274, n.16, p.11053-11059, 1999.

PARKER, A.G. et al. The effects on IQPLUS focus on cognitive function, mood, and endocrine response before and following acute exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v.8, n.16, 2011.

PEPEU, G. et al. A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects: is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? **Pharmacol Res.**, v.33, n.2, p. 73-80, 1996.

PURDUE, P.E.; LAZAROW, P.B. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. **J Cell Biol**, v.134, n.4, p.849-862, 1996.

RASMUSSEN, B.B. et al. An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. **J Appl Physiol.**, v.88, n.2, p.386-392, 2000.

ROSADINI G, et al. Phosphatidylserine: quantitative EEG effects in healthy volunteers. **Neuropsychobiology**, v.24, n.1, p.42-48, 1987.

RUFFO, A.M. **Efeitos da suplementação de diferentes concentrações de maltodextrina em ratos submetidos a exercício contínuo e prolongado.** 2004. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

SANCHO, P. et al. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. **Mol Pharmacol**, v.63, n.3, p. 581-589, 2003.

SCARIOT, P.P. et al. Continuous aerobic training in individualized intensity avoids spontaneous physical activity decline and improves mct1 expression in oxidative muscle of swimming rats. **Front Physiol**, v.7, n.132. 2016.

SCHENKEL L.C., BAKOVIC M. Formation and regulation of mitochondrial membranes. **Int J Cell Biol**, 2014.

SEPULVEDA, M.R. MATA, A.M. The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1665, n.1, p. 75-80, 2004.

SHARP, C.P.M, PEARSON, D.R. Amino acid supplements and recovery from high-intensity resistance training. **J Strength and Cond Res**, v.24, n.4, p.1125-1130, 2010.

SHIRATSUCHI A, UMEDA M, OHBA Y, NAKANISHI Y. Recognition of phosphatidylserine on the surface of apoptotic spermatogenic cells and subsequent phagocytosis by Sertoli cells of the rat. **J Biol Chem**, v.272, n.4, p. 2354-2358, 1997.

SPECHT, S.C, ROBINSON, J.D. Stimulation of the (Na⁺+K⁺)- dependent adenosine triphosphatase by amino acids and phosphatidylserine:chelation of trace metal inhibitors. **Arch Biochem Biophys.**, v. 154, n. 314–23, 1973.

STARKS, et al. The effects of phosphatidylserine on endocrine response to moderate intensity exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v.5, n.11, 2008.

STOCKERT M, BUSCAGLIA V, DE ROBERTIS E. In vivo action of phosphatidylserine, amitriptyline and stress on the binding of [3H]imipramine to membranes of the rat cerebral cortex. **Eur J Pharmacol**, v.160, n.1, p. 11-16, 1989.

SUMNER, J.B.; DOUNCE, A.L. Crystalline Catalase. **Science**, v.85, n. 2206, p.366-7, 1937.

TAYLOR, C.L. Letter regarding phosphatidylserine and cognitive dysfunction and dementia. Bethesda, MD: US **Food and Drug Administration**; 2003.

TIPTON, K.D. et al. Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.81, n.2, p.197-206, 2001.

TOTSUKA, M. et al. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. **J Appl Physiol.**, v.93, n.4, p.1280-1286, 2002.

TSAKIRIS, S, DELICONSTANTINOS, G. Influence of phosphatidylserine on (Na_K)-stimulated atpase and acetylcholinesterase activities in dog brain synaptosomal plasma membranes. **Biochem J**, v.220, n.1, p.:301–307, 1984.

TYURINA, Y. et al. Phospholipid signaling in apoptosis: Peroxidation and externalization of phosphatidylserine. **Toxicology**, v.148, n.2-3, p. 93–101, 2000.

VAKHAPOVA V, et al. Safety of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids in non-demented elderly: a double-blind placebo-controlled trial followed by an open-label extension. **BMC Neurol**, v.11, n.79, 2011.

VAN MEER, G.et al. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.2 p.112–124, 2008.

VANCE J.E, STEENBERGEN R. Metabolism and functions phosphatidylserine. **Prog Lipid Res**, v. 44, p. 207-234, 2005.

VANCE J.E, TASSEVA G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, p. 543–554, 2013.

VIRU, A.T., SMIRNOVA, K., KARELSON, V., SNEGOVSKAYA, M. Determinants and modulators of hormonal responses to exercise. **Biol sport.**, v.13, p. 169-187, 1996.

VOELKER, D.R.; FRAZIER, J.L. Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary cell line requiring ethanolamine or phosphatidylserine for growth and exhibiting defective phosphatidylserine synthase activity. **J Biol Chem.**, v. 261, p.1002-1008, 1986.

WEINHAUS, A.J. et al. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactina: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. **J Endocrinol**, v.193, n.3, p.367-381, 2007.

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.10, n. 1016, p. 1-6, 2012.

WILLIAMS, M. et al. Effects of recovery beverages on glycogen restoration and endurance exercise performance. **J Strength Cond Res**, v.17, n.1, p.12–19, 2003.

XIAOCHUN, B.; JIANG, Y. Key factors in mTOR regulation. **Cell Mol Life Sci.**, v. 67, p. 239–253, 2009.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da suplementação de fosfatidilserina isolada ou associada à maltodextrina e/ou aminoácidos de cadeia ramificada sobre desempenho aeróbio e anaeróbio e biomarcadores de estresse fisiológico em ratos", registrada com o nº **10/2016**, sob a responsabilidade de **Gustavo Gomes de Araújo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas - CEUA/UFAL, em reunião de 06/05/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01.08.2016 a 01.08.2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de animais	130
Peso/idade	250-300g/10 semanas
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da UFAL/Biotério do Laboratório de Nutrição da Faculdade de Nutrição da UFAL - FANUT

Maceió, 13 de maio de 2016.

Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof. Dr. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
SIAPE 1170532