

Efeitos do treinamento resistido e da suplementação com whey proteins sobre os marcadores creatinina e ureia de ratos

Effects of strength training and whey proteins supplementation on the creatinine and urea parameters of rats

Elaine Paiva Vieira¹ , Antonio Coppi Navarro¹ , Alanna Joselle Santiago Silva¹ ,
Francisco Navarro¹ 

1. Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

RESUMO

Introdução: Dietas hiperproteicas aumentam a concentração de ureia e ácidos, provenientes do metabolismo das proteínas. Portanto, o uso de altas doses de whey proteins precisa ser verificado frente aos seus efeitos sob a função renal. **Objetivo:** Avaliar o efeito do consumo de 2 g kg⁻¹ d⁻¹ e 4 g kg⁻¹ d⁻¹ whey proteins sobre marcadores bioquímicos creatinina e ureia após 12 semanas de treinamento resistido em ratos Wistar. **Métodos:** Amostra composta por 52 ratos Wistar machos alocados em 6 grupos. O protocolo teve duração de 12 semanas de treinamento resistido com suplementação diária de whey proteins. A determinação da concentração dos marcadores bioquímicos foi constituída de leitura em absorbância e equação específica dos parâmetros creatinina e ureia. **Resultados:** A relação creatinina foi significativamente maior apenas no grupo controle em relação aos grupos suplementados e ao treinado controle. A maior excreção de creatinina de 24h (mg/kg) no grupo treinamento resistido e suplementado em comparação ao treinamento controle demonstra possível efeito do treinamento resistido sobre o aumento da massa muscular associada a dose de 4 g kg⁻¹ d⁻¹. **Conclusão:** O tratamento de ratos machos Wistar suplementados com whey proteins nas doses de 2 g kg⁻¹ d⁻¹ e 4 g kg⁻¹ d⁻¹ durante 12 semanas não resultou em prejuízo de função renal.

Palavras-chave: proteínas do soro do leite; treinamento de resistência; creatinina; ureia; ratos Wistar.

ABSTRACT

Introduction: High protein diets increase the concentration of urea and acids in protein metabolism. Therefore, the use of high doses whey proteins needs to be checked for their effects on kidney function. **Aims:** To evaluate the effect of whey proteins consumption of 2 g kg⁻¹ d⁻¹ and 4 g kg⁻¹ d⁻¹ on the biochemical marker creatinine and urea after 12 weeks of resistance training in male Wistar rats. **Methods:** The sample consisted of 52 male Wistar rats, distributed in 6 groups. The protocol lasted 12 weeks of resistance training with daily supplementation of whey proteins, in three sessions per day. The determination of the biochemical concentration consisted of reading the absorbance and specific equation for the parameter creatinine and urea. **Results:** The proportion of creatinine was significantly higher only in the control group compared to the supplemented groups and the trained control group. The higher 24-hour creatinine excretion (mg/kg) in the resistance and supplemented training group compared to the control training shows a possible effect of resistance training on the increase in muscle mass associated with a dose 4 g kg⁻¹ d⁻¹. **Conclusion:** The treatment of male Wistar rats supplemented with whey proteins at doses 2 g kg⁻¹ d⁻¹ and 4 g kg⁻¹ d⁻¹ for 12 weeks did not result in impaired renal function.

Keywords: whey proteins; resistance training; creatinine; urea; rats, Wister.

Recebido em: 17 de março de 2020; Aceito em: 27 de fevereiro de 2021.

Correspondência: Elaine Paiva Vieira, Rua da Igreja, 18 Vila Ariri 65082-310 São Luís MA. Vieira: paiva.elainev@gmail.com

Introdução

A proteína do soro do leite, denominada comercialmente como *whey proteins*, é um subproduto da produção de queijo e uma fonte rica em aminoácidos exógenos e proteínas biologicamente ativas, além de possuir aspectos nutricionais amplamente estudados ao longo das últimas décadas [1]. Sabe-se que α -lactalbumina e β -lactoglobulina são as principais proteínas do soro de leite, formando até 80% da massa proteica, além de conter proteínas menores com a lactoferrina e lactoperoxidase [2,3].

Pesquisas têm demonstrado as qualidades nutricionais das proteínas do soro do leite que, devido à sua composição variada, tornou-se comumente utilizado por esportistas com objetivo de aumentar a massa muscular [1,4]. Desta forma, o consumo de *whey proteins* com concentração de 80% ou até superior a 90% vem se tornando cada vez mais constante na população [5].

Porém, o excesso de proteínas do soro na dieta pode afetar adversamente a atividade dos órgãos que participam de seu metabolismo [6]. Uns desses órgãos são os rins. Portanto, o uso indiscriminado de suplementos proteicos e à base de aminoácidos tem despertado o interesse em avaliar possíveis efeitos deletérios à saúde associados à ingestão de doses excessivas, especialmente sobre a função renal [7].

Devido aos elevados índices de prevalência e incidência, a doença renal crônica constitui um relevante problema de saúde pública, atingindo milhares de pessoas no Brasil e no mundo [8]. Desta forma, o uso de marcadores permite analisar se há lesão e em qual estágio se encontra, como é o caso da ureia e creatinina que são metabólitos utilizados como marcadores renais [9]. Portanto, quando se avaliam pacientes com quedas abruptas da taxa de filtração glomerular, a relação entre ureia e creatinina pode ser útil podendo apresentar-se alterada em estados patológicos diferentes [10].

Logo, as concentrações desses marcadores possibilitam informações importantes sobre a função renal, valores elevados de creatinina e ureia no soro podem ser indicativos de lesão renal [11]. Desta forma, os efeitos de dietas com altas doses de *whey proteins* precisam ser verificados frente às alterações patológicas que possam causar interferência na função renal [12-13], derivada do aumento da taxa de filtração glomerular e da carga ácida renal [14-15].

À vista disso, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do consumo de $2 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $4 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de *whey proteins* sobre marcadores bioquímicos creatinina e ureia após 12 semanas de treinamento resistido em ratos sedentários em comparação a ratos submetidos ao treinamento resistido.

Métodos

Considerações éticas

Os ensaios biológicos foram de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório [16]. O projeto de pesquisa obteve

aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Maranhão, sob o número de registro: 23115.01804/2017-91.

Amostra

Foram utilizados 52 *Rattus Novergicus Wistar Albinus* machos com idade inicial de 60 dias e massa corporal aproximada de 250 a 350 g. Os ratos foram alocados em 6 grupos, sendo: suplementado com 2 g⁻¹ kg⁻¹ dia (W2) (n = 10), suplementado com 4 g⁻¹ kg⁻¹ dia (W4) (n = 7), treinamento resistido e suplementado com 2 g/kg/dia (TW2) (n = 9), treinamento resistido e suplementado com 4 g⁻¹ kg⁻¹ dia (TW4) (n = 6), treinamento controle (TC) (n = 10) e controle (C) (n = 10).

Os ratos permaneceram sob condições higiênicas em gaiolas coletivas, mantidos em uma sala climatizada com controle de temperatura entre 24°C a 28°C, e sob ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas. Foram alimentados ad libitum com água e ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1®).

Análise estatística

Inicialmente a normalidade foi avaliada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, constatada a normalidade dos mesmos, foi utilizado o teste ANOVA *Two-Way* para comparação das variáveis de medidas. O *post-hoc* de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças estatísticas entre todas as análises com nível significância de $p < 0,05$, por meio do software estatístico *GraphPad Prism8.1.0*.

Treinamento resistido

Na semana 0, antes do início do protocolo experimental, foi realizada a adaptação ao treinamento. O teste de peso máximo carregado (PMC), que consistiu em até 9 escaladas com intervalo de 120 segundos entre as tentativas, foi aplicado 48 h após a última sessão de familiarização do treinamento. Adotando-se como carga inicial para a primeira escalada 75% da massa corporal total do rato e o incremento de 30 g sendo acrescido a cada tentativa.

A carga máxima adotada era estipulada de acordo com a carga da última escalada completa em toda a extensão da escala. O teste foi considerado válido apenas quando a carga máxima era identificada entre 4 e 9 escaladas. Do contrário, o teste era refeito após 48 h [17].

A aplicação do teste de PCM foi realizada a cada duas semanas, durante as 12 semanas de treinamento nos grupos TC, TW2 e TW4, a fim de identificar a carga máxima para realizar-se as adaptações da força máxima ao longo tempo e a prescrição da intensidade de carga para o treinamento resistido.

O treinamento resistido teve frequência de 3 sessões semanais, não consecutivas. O protocolo utilizado foi de acordo com a padronização [18], que consiste em 4 escaladas na escada por sessão de treinamento com intensidade crescente de 50%, 75%, 90% e 100% do Peso Máximo Carregado determinado em teste [17], caracterizando um treinamento resistido intenso.

Suplementação com *whey proteins*

A solução padrão foi calculada com base na quantidade de proteínas (22 g) por porção (25 g) do suplemento (*H.I Whey: Essencial Nutrition*®) de acordo com a descrição de composição, utilizando balança de precisão para mensuração do soluto.

As doses administradas foram de 2 g kg⁻¹ d⁻¹ e 4 g kg⁻¹ d⁻¹ de *whey proteins*, distribuídas aos ratos, por grupo, conforme descrito no treinamento resistido. As doses foram administradas via gavagem de solução padrão de *whey proteins* dissolvido em água com concentração comum de 0,323 g/ml do Suplemento (*H.I Whey: Essencial Nutrition*®), que corresponde a 0,284 g/ml de *Whey proteins*, tendo reajuste semanal com base na massa corporal total do rato.

O tratamento foi realizado durante 12 semanas, com três sessões de gavagem por dia com intervalo de 60 minutos. Cada gavagem foi determinada de acordo com a massa corporal total do rato, sendo 2 ml para cada 100 g de peso corporal do rato, padronizando-se um volume total de 5 ml por sessão de gavagem conforme o estipulado para administrações de soluções aquosas [19]. Os grupos controle (C) e treinamento controle (TC) tiveram tratamento com água com mesmo volume de gavagem (5 ml).

Vinte e quatro horas após os procedimentos experimentais finais e com 12 horas de privação de alimentos, os ratos foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de cetamina e xilazina a 70 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente [20]. Esses critérios de eutanásia foram eleitos por não causar dor aos animais contemplando assim as Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [21].

Material biológico

Ao término das 12 semanas de experimento, os ratos foram alocados em gaiolas metabólicas individuais por 24 horas, previamente higienizadas para coleta de urina, em ambiente com ciclo claro/escuro, com livre acesso à ração e água [22].

Para determinação da concentração de creatinina, inicialmente a urina foi diluída em água destilada com proporção de 1:25 ml e em seguida realizou-se o procedimento de desproteinização da amostra de urina em ácido pícrico, sendo agitada e centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, utilizou-se para análise o sobrenadante para a determinação da concentração de creatinina por cinética de dois pontos conforme a reação com o hidróxido de sódio. Foram realizadas duas leituras em absorvância de 510 nm nos tempos 30 e 90 segundos, que foram utilizados em equação específica para determinação da concentração. O resultado obtido foi multiplicado por 25 (*Labtest*® - *Creatinina K Ref. 96*).

Para determinação da ureia urinária utilizou-se sistema enzimático por cinética de dois pontos, tendo como princípio hidrolização da ureia pela urease. A princípio a urina foi diluída em água destilada com proporção de 1:50 ml e sendo realizadas duas leituras em absorvância de 340 nm nos tempos de 30 e 90 segundos, que foram utilizadas em equação específica para determinação da concentração. O resultado obtido foi multiplicado por 50 (*Labtest*® - *Creatinina K Ref. 96*).

Após a eutanásia, foi realizada a coleta de sangue por decapitação em guilhotina. Para análise da creatinina sérica, foi realizado o procedimento de desproteinização da amostra de soro em ácido pícrico, sendo agitado e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, utilizou-se para análise o sobrenadante líquido para a determinação da concentração de creatinina por cinética de dois pontos conforme a reação com o hidróxido de sódio. Foram realizadas duas leituras em absorbância de 510 nm nos tempos de 30 e 90 segundos, que foram utilizadas em equação específica para determinação da concentração (*Labtest® - Creatinina K Ref. 96*).

Para determinar a concentração de ureia no soro, utilizou-se sistema enzimático por cinética de dois pontos, tendo como princípio hidrólise da ureia pela urease, sendo realizadas duas leituras em absorbância de 340 nm nos tempos de 30 e 90 segundos, que foram utilizadas em equação específica para determinação da concentração (*Labtest® - Creatinina K Ref. 96*).

Resultados

Tabela I - Concentração dos marcadores urinários creatinina e ureia (absolutos e por 24h), apresentados em média e erro padrão da média

	C (n=10)	W2 (n=10)	W4 (n=7)	TC (n=10)	TW2 (n=9)	TW4 (n=6)
Creatinina (mg/dl)	102,02 ± 22,29	132,81 ± 141,84	105,25 ± 6,41	83,12 ± 6,35	187,08*# ± 30,33	206,98*# ± 14,11
Creatinina de 24h^a (mg/24h)	14,18 ± 3,69	13,75 ± 1,32	12,23 ± 1,30	8,70 ± 0,89	12,67 ± 1,29	15,48 ± 0,87
Ureia (mg/dl)	2704,96 ± 842,42	5768,06 ± 1078,52	3774,79 ± 322,31	4524,81 ± 334,54	8809,41*# ± 1744,99	8620,60* ± 1171,09
Ureia de 24h^b (mg/24h)	343,44 ± 122,42	583,15 ± 66,73	376,28 ± 25,14	480,34 ± 60,58	608,56 ± 122,04	723,90 ± 130,57

C = Controle sedentário não suplementado; W2 = Sedentário suplementado com 2 g kg⁻¹ d⁻¹; W4 = Sedentário suplementado com 4g/kg/dia; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado suplementado com 2 g kg⁻¹ d⁻¹; TW4 = Treinado suplementado com 4 g kg⁻¹ d⁻¹. ANOVA Two-Way post hoc Tukey (intergrupos): Símbolos na horizontal indicam maior média (p < 0,05) = * vs. C; # vs. TC; α vs W4. Equações: a = [Creatinina (mg/dl) x Volume (ml/24h) / 100]; b= [Ureia (mg/dl) x Volume (ml/24h) / 100]

Conforme a tabela I, no marcador creatinina (mg/dl), houve maior concentração na urina dos ratos dos grupos TW2 e TW4 em relação ao grupo controle (p = 0,0196) e (p = 0,072,) respectivamente. Similarmente, os grupos TW2 e TW4 também apresentaram maiores valores de concentração de creatinina na urina do que o grupo TC (p = 0,0018) e (p = 0,0008) respectivamente.

Não houve diferença (p > 0,05) entre as concentrações de creatinina para os grupos suplementados com 2 g kg⁻¹ d⁻¹. Porém, para a dose de 4 g kg⁻¹ d⁻¹ houve diferença entre os grupos havendo maior excreção de creatinina para o grupo submetido ao treinamento. Os grupos TW2 e TW4 não apresentaram diferenças entre si (p > 0,05) na creatinina urinária. Os grupos W2 e W4 também não apresentaram diferença entre si (p > 0,05).

Nos resultados do marcador ureia (mg/dl), os grupos TW2 e TW4 apresentaram maior concentração na urina em comparação ao grupo controle ($p = 0,0018$) e ($p = 0,0169$) respectivamente. Similarmente, TW2 teve maior concentração de ureia em relação ao grupo TC ($p = 0,447$).

O grupo controle e os grupos suplementados não apresentaram diferença entre si, da mesma forma os grupos treinados e suplementados não apresentaram diferenças entre si na ureia urinária. Quando observada, porém, a creatinina e a ureia normalizadas pelo volume de urina de 24h (mg/24h), todas as diferenças apresentadas na creatinina e na ureia em mg/dl foram normalizadas.

Tabela II - Concentração dos biomarcadores séricos creatinina e ureia apresentados em média e erro padrão da média

	C (n=10)	W2 (n=10)	W4 (n=7)	TC (n=10)	TW2 (n=9)	TW4 (n=6)
Creatinina sérica (mg/dl)	0,35 ± 0,8	0,30 ± 0,04	0,48 ± 0,07	0,35 ± 0,02	0,50 ± 0,05	0,51 ± 0,08
Ureia sérica (mg/dl)	50,44* ^{#α} ± 7,19	33,74 ± 1,73	27,98 ± 1,01	37,19 ± 1,36	34,09 ± 2,02	34,70 ± 1,20

C = Controle sedentário não suplementado; W2 = Sedentário suplementado com 2 g kg⁻¹ d⁻¹; W4 = Sedentário suplementado com 4 g kg⁻¹ d⁻¹; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado suplementado com 2 g kg⁻¹ d⁻¹; TW4 = Treinado suplementado com 4 g kg⁻¹ d⁻¹. ANOVA Two-Way post hoc Tukey (intergrupos): Símbolos na horizontal indicam maior média ($p < 0,05$) = * vs. W2; # vs. W4; α vs. TW2. Equações: a= [Creatinina (mg/dl) x Volume (mL/24h / 100)]; b= [Ureia (mg/dl) x Volume (ml/24h) / 100]

De acordo com a tabela II, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de creatinina sérica (mg/dl) entre os grupos. No marcador ureia sérica, o grupo controle apresentou maior média em comparação à W2, W4 e TW2 ($p = 0,0190$), ($p = 0,0018$) e ($p = 0,0301$) respectivamente. Não houve diferença entre o grupo TC os demais grupos ($p > 0,05$). Da mesma forma, os grupos TW2 e TW4 não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$).

Tabela III - Equações de estimativa da função renal, com resultados apresentados em média e erro padrão

	C (n=10)	W2 (n=10)	W4 (n=7)	TC (n=10)	TW2 (n=9)	TW4 (n=6)
Creatinina de 24h^a (mg/kg)	31,14 ± 7,74	38,31 ± 2,32	24,24 ± 2,59	18,05 ± 1,60	28,51 ± 2,55	37,89* ± 1,57
Depuração de Creatinina^b (ml/min)	4,47 ± 2,20	3,57 ± 0,54	2,34 ± 0,49	1,77 ± 0,19	1,87 ± 0,27	2,61 ± 0,70
Relação Ureia/Creatinina^c (mg/g)	236,40 ^{#α*βΩ} ± 52,75	121,63 ± 11,05	76,88 ± 15,97	110,06 ± 7,67	72,58 ± 7,12	84,93 ± 23,38

C = Controle sedentário não suplementado; W2 = Sedentário suplementado com 2 g kg⁻¹ d⁻¹; W4 = Sedentário suplementado com 4 g kg⁻¹ d⁻¹; TC = Treinado não suplementado; TW2 = Treinado suplementado com 2 g kg⁻¹ d⁻¹; TW4 = Treinado suplementado com 4 g kg⁻¹ d⁻¹. ANOVA Two-Way post hoc Tukey (intergrupos): Símbolos na horizontal indicam maior média ($p < 0,05$) = # vs. W2; α vs. W4; * vs. TC; β vs. TW2; Ω vs. TW4. Equações: a= [Creatinina de 24h (mg/24h) / Massa Corporal (Kg)]; b= [Creatinina Urinária (mg/dl) x Volume (ml/24h) / Creatinina Sérica (mg/dl)]; c= [Ureia Sérica (mg/dl)/Creatinina Sérica (mg/dl)]

Conforme apresentado na tabela III, a creatinina de 24h em mg/kg apresentou diferença significativa entre os grupos TW4 e TC, tendo TW4 maior média que TC ($p = 0,0378$). Os grupos TW2 e TW4 não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) em relação a creatinina de 24h relativa à massa corporal. O grupo controle e o grupo TC não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$). E, não ocorreu diferença significativa na concentração de depuração de creatinina (mL/min) entre os grupos ($p > 0,05$). Quando observada a relação ureia/creatinina (mg/g), nota-se que no grupo controle há maior concentração em comparação aos grupos W2 ($p = 0,0373$), W4 ($p = 0,0031$), TC ($p = 0,0150$), TW2 ($p = 0,0008$) e TW4 ($p = 0,0100$). Havendo, desta forma, todos os grupos apresentaram diferença em relação ao controle. Porém, não tiveram diferença entre si ($p > 0,05$).

Discussão

No presente estudo expomos as alterações dos marcadores creatinina e ureia para as doses de $2 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $4 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Trabalhos anteriores também utilizaram doses de *whey proteins* em modelo animal, apresentando em sua maioria dosagens inferiores às apresentadas. Haraguchi *et al.* [23] investigaram a influência das *whey proteins* sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos Fisher hipercolesterolêmicos. A concentração sérica de creatinina nos grupos com dietas *whey proteins* e *whey proteins* hipercolesterolemiantes não apresentou diferença significativa, estando de acordo com os nossos achados. Com relação à concentração sérica de ureia, os resultados foram semelhantes entre os grupos, diferentemente dos nossos resultados, pois o grupo controle sedentário não suplementado apresentou maior média de concentração em comparação com W2, W4 e TW2. Porém, em nosso estudo não fizemos uso da dieta hipercolesterolemiantes, as quais podem ter gerado um efeito protetor do comprometimento da função renal, como sugerido pelos autores [23].

Os resultados encontrados por Athira *et al.* [24], ao analisarem o potencial de melhoria de hidrolisado das *whey proteins* (WPH) contra o stress oxidativo induzido pelo paracetamol em 24 camundongos, mostraram semelhantes aos nossos, uma vez que a administração de WPH (4mg/kg) diminuiu significativamente a concentração de creatinina sérica. A redução nos valores de creatinina sérica após tratamento intraperitoneal e oral com WPH estabeleceu o efeito antioxidante *in vivo*. Diante disso, concluiu-se que WPH desenvolve um efeito protetor do comprometimento da função renal induzida por paracetamol [24].

Chen *et al.* [25], ao examinarem a melhora do desempenho no exercício e perfis bioquímicos em camundongos suplementados com *whey proteins* (dose de $4,1 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$), não identificaram diferenças significativas na creatinina sérica entre os grupos sedentário suplementado e treinado suplementado. Porém, vale ressaltar que esse estudo teve duração de 6 semanas, sendo, portanto, um período inferior ao adotado em nosso estudo. Lollo *et al.* [26] averiguaram os efeitos de *whey proteins* (17% de proteína) e de caseína mais leucina em ratos Wistar treinados, porém, não foram

detectadas mudanças claras nos valores de creatinina sérica, não sendo percebidas alterações nesse marcador, similarmente aos achados deste estudo.

Franzen *et al.* [27], em seu estudo crônico com ratos Wistar tratados com doses baixas de proteína (10% de whey em ração), não encontraram diferenças significativas entre os valores basais e no fim do tratamento em nenhum grupo experimental em relação aos valores de ureia e creatinina séricas. Portanto, não foram percebidas alterações nos valores destes marcadores, semelhantemente aos nossos achados no marcador creatinina sérica e divergindo no marcador ureia sérica. Destacamos, ainda, que a dose adotada neste achado foi inferior à dosagem adotada em nosso estudo.

Santos *et al.* [7], ao pesquisarem sobre efeitos da suplementação alimentar com dose de *whey proteins* a $1,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ratos Wistar sedentários, mostraram que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle para os valores séricos de creatinina e ureia, indicando que não houve prejuízo sobre a função renal. Estes resultados corroboram os achados neste estudo, não havendo alterações significantes nos valores séricos de creatinina, porém diverge como valores na concentração de ureia sérica. Entretanto, nosso estudo apresentou duração e dosagem consideravelmente superior.

Khairallah *et al.* [28] investigaram o efeito de dietas contendo 22,5 (g%) de proteína como isolado de proteína de leite (MPI), isolado das *whey proteins* (WPI), proteína de soja isolado (SPI), concentrado de proteína de soja (SPC) e proteína de soja tratada com enzima (SPE) sobre função muscular em 50 ratos Sprague-Dawley. Todavia, similarmente ao nosso estudo, não houve diferenças significativas na creatinina sérica entre os grupos no final do estudo. Desta forma, não se perceberam alterações nas concentrações deste marcador. Porém, enquanto nosso estudo teve duração de 12 semanas, esse estudo administrou as dietas por 8 semanas [28].

Quando analisamos os dados de ureia sérica, os resultados deste estudo apresentaram diferença significativa entre o grupo controle sedentário e quase todos os grupos suplementados, com exceção apenas de TW4, diferentemente dos achados de Aparicio *et al.* [29] que não identificaram diferença significativa na ureia sérica entre os grupos ao examinar os efeitos das *whey proteins* e ingestão de proteína de soja nos parâmetros renais plasmáticos.

Por sua vez, os resultados apresentados por Aparicio *et al.* [30], ao examinarem os efeitos do consumo de altas doses de proteína sobre parâmetros renais em ratas, não corroboram os nossos achados, pois os grupos com dietas enriquecidas com whey apresentaram valores maiores de ureia sérica em comparação com os grupos com dieta normoproteica. Em conformidade, Nebot *et al.* [31] que examinaram os efeitos da quantidade da dieta e fonte de proteína no estado ósseo de ratos e as interações que ocorrem entre esses fatores nutricionais, encontraram valores maiores de ureia sérica nos grupos com dietas a base das *whey proteins* (45%) em comparação ao grupo normoproteico. Apesar dos achados divergirem dos resultados deste estudo, tanto os valores de ureia sérica quanto de creatinina sérica permanecem dentro da faixa dos valores de referência estabelecido [32-34].

Em relação aos biomarcadores urinários, verificamos neste estudo que os valores de creatinina (mg/dl) apresentam diferença significativa nos grupos TW2 e TW4 com os grupos controle sedentário e controle treinado. Similarmente, os valores de ureia (mg/dl) se mostram diferentes significativamente entre os grupos TW2 e TW4 com controle sedentário e entre TW2 e controle sedentário. Porém, quando verificamos os resultados tanto de creatinina de 24 horas quanto ureia de 24 horas não foram encontrados resultados com diferenças significativas entre os grupos.

Por fim, quando analisamos a relação ureia/creatinina séricas verificamos valores significativamente menores nos grupos suplementados em relação ao grupo controle. Todavia, novamente não foi possível realizar comparações destes resultados com resultados da literatura, pois, diferentemente deste estudo, em nenhum dos estudos que compõe a revisão sistemática calculou estas variáveis, bem como os biomarcadores urinários.

Destaca-se, desta forma, a importância dos achados de maneira a contribuir na busca da presença ou não de um limiar proteico que possa causar efeitos deletérios sobre a função renal, podendo ser indicado através da alteração dos biomarcadores investigados.

Todavia, é importante ressaltar que algumas limitações do presente estudo devem ser levadas em consideração. Desta forma, estudos adicionais devem ser realizados em um maior período para esta dose, bem como para doses mais elevadas com a finalidade de verificar com precisão se existe um limiar na dose desta substância que acarrete alterações e/ou efeitos colaterais na função renal de indivíduos saudáveis.

Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que o tratamento de ratos machos Wistar com treinamento resistido e suplementação com *whey proteins* nas doses de $2 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $4 \text{ g kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ durante 12 semanas não resultou em prejuízo de função renal, pois os valores dos biomarcadores séricos se apresentaram dentro das faixas de valores de referência. Enquanto os biomarcadores urinários, embora tenham apresentado diferença significativa entre os grupos, quando normalizados pelo volume de urina de 24 h (mg/24h) foram normalizadas todas as diferenças apresentadas na creatinina e na ureia em mg/dl.

Potencial conflito de interesse

Nenhum conflito de interesses com potencial relevante para este artigo foi reportado.

Fontes de financiamento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Navarro F, Navarro AC, Silva AJS, Vieira EP. **Obtenção dos dados, análise estatística e redação do manuscrito:** Vieira EP, Silva AJS. **Revisão crítica do manuscrito:** Vieira, EP, Navarro AC, Navarro F.

Referências

1. Haraguchi FK, Abreu WC, Paula H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr* 2006;19(4):479-88. doi: 10.1590/S1415-52732006000400007
2. Teba CD, Silva EMM, Chávez DWH, Carvalho CWP, Ascheri JLR. Effects of whey protein concentrate, feed moisture and temperature on the physicochemical characteristics of a rice-based extruded flour. *Food Chem* 2017;228:287-96. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.145
3. Falkowski M, Maciejczyk M, Koprowicz T, Mikołuc B, Milewska A, Zalewska A, et al. Whey Protein concentrate WPC-80 improves antioxidant defense systems in the salivary glands of 14-month Wistar rats. *Nutrientes* 2018;10(6):782. doi: 10.3390/nu10060782
4. Nabuco HCG, Tomeleri CM, Sugihara Junior P, Fernandes RR, Cavalcante EF, Antunes M, et al. Effects of Whey protein supplementation pre- or post-resistance training on muscle mass, muscular strength, and functional capacity in pre-conditioned older women: a randomized clinical trial. *Nutrientes* 2018;10(15):563. doi: 10.3390/nu10050563
5. Cribb PJ. US *Whey proteins* in sports nutrition. Applications Monograph Sports Nutrition. US Dairy Export Council 2005 [Internet];4:1-12. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <http://wheyproteininstitute.org/sites/default/files/us-whey-proteins-in-sports-nutrition.pdf>
6. Díaz-Rúa R, Keijer J, Palou A, van Schothorst EM, Oliver P. Long-term intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats. *J Nutr Biochem* 2017;46:39-48. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.04.008
7. Santos ACA, Martins MCC, Pereira LAC, Barros NS, Carvalho ML. Efeitos da suplementação alimentar com Whey Protein e leucina em ratos normais. *J Health Sci* 2016;18(2):121-8. doi: 10.17921/2447-8938.2016v18n2p121-128
8. Romão Junior J, Pinto SWL, Canziani ME, Praxedes JN, Santello JL, Moreira JCM. Censo SBN 2002: Informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil. *J Bras Nefrol* 2003 [Internet];25(4):188-99. [cited 2020 Jan 15]. Available from: https://bjnephrology.org/wp-content/uploads/2019/11/jbn_v25n4a04.pdf
9. Silva EIV, Sousa LNC, Rocha AA. Biomarcadores renais e sua importância no diagnóstico de nefropatias. *Revista Científica da FASETE* 2017 [Internet];1:162-76. [cited 2020 Jan 15]. Available from: https://www.unirios.edu.br/revistarios/media/revistas/2017/12/biomarcadores_renais_e_sua_importancia_no_diagnostico_de_nefropatias.pdf
10. Dusse LMS, Rios DRA, Sousa LPN, Moraes RMMS, Domingueti CP, Gomes KB. Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente? *RBAC* 2016;49(1):41-51. doi: 10.21877/2448-3877.201600427
11. Almeida, M.L. Dosagem de ureia e creatinina em soro humano através da técnica de espectroscopia Raman comparada com o método bioquímico [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade Camilo Castelo Branco; 2014. [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=2254451
12. Santesso N, Akl EA, Bianchi M, Mente A, Mustafa R, Heels-Ansdell D, Schünemann HJ. Effects of higher-versus lower-proteins diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr* 2012;66(7):780-8. doi: 10.1038/ejcn.2012.37
13. Martin WF, Armstrong LE, Rodriguez NR. Dietary proteins intake and renal function. *Nutr Metabol* 2005;2:5. doi: 10.1186/1743-7075-2-25
14. Van Den Berg E, Hospers FA, Navis G, Engberink MF, Brink EJ, Geleijnsen JM, et al. Dietary acid load and rapid progression to endstage renal disease of diabetic nephropathy in Westernized South Asian people. *J Nephrol* 2011;24(1):11-7. doi: 10.5301/JN.2010.5711
15. Goraya N, Wesson DE. Dietary management of chronic kidney disease: Proteins restriction and beyond. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21(6):635-40. doi: 10.1097/MNH.0b013e328357a69b
16. SBCAL/CONCEA. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório: Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação; 2013 [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65
17. Leite RD, Durigan RCM, Lino ADS, Campos MVS, Souza MGS, Selistre-de-Araújo HS, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism* 2013;62(10):1477-84. doi: 10.1016/j.meta-

bol.2013.05.009

18. Hornberger TAJR, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* 2004;29(1):16-31. doi: 10.1139/h04-002
19. Andersen ML, D'almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Procedimentos experimentais. In: Andersen ML, D'almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. Departamento de Psicobiologia. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 2004.
20. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, et al. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals. American Veterinary Medical Association. Version ; 2020 [Internet]. [cited 2021 Apr 2]. Available from: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-01/2020-Euthanasia-Final-1-17-20.pdf>
21. CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal: Resolução normativa n° 25 de 29 de setembro de 2015. Brasília: Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação; 2015 [Internet]. [cited 2020 Jan 15]. Available from: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/33252781/do1-2015-10-02-resolucao-normativa-n-25-de-29-de-setembro-de-2015-33252777
22. Togashi Y, Miyamoto Y. Urinary cystatin C as a biomarker for diabetic nephropathy and its immunohistochemical localization in kidney in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Exp Toxicol Pathol* 2013;65(5):615-22. doi: 10.1016/j.etp.2012.06.005
23. Haraguchi FK, Pedrosa ML, Paula H, Santos RC, Silva ME. Influência das proteínas do soro sobre enzimas hepáticas, perfil lipídico e formação óssea de ratos hipercolesterolêmicos. *Rev Nutr* 2009;22(4):517-25. doi: 10.1590/S1415-52732009000400007
24. Athira S, Mann B, Sharma R, Kumar R. Ameliorative potential of whey protein hydrolysate against paracetamol-induced oxidative stress. *J Dairy Sci* 2013;96(3):1431-37. doi: 10.3168/jds.2012-6080
25. Chen WC, Wen-Ching H, Chien-Chao C, Yu-Kai C, Chi-Chang H. Whey protein improves exercise performance and biochemical profiles in trained mice. *Med Sci Sports Exerc* 2014;250:1518-24. doi: 10.1249/MSS.0000000000000272
26. Lollo PCB, Silva LBC, Batista TM, Morato PN, Moura CS, Cruz AG, et al. Effects of whey protein and casein plus leucine on diaphragm the mTOR pathway of sedentary, trained rats. *Food Research International* 2012;49:416-24. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.024
27. Franzen JM, Vaz JG, Zancanaro V, Bitencourt RM. Baixa dose de whey protein reduz glicose, triglicérides e controla o peso corporal em ratos wistar. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento* 2016 [Internet];10(57):133-44. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/425>
28. Khairallah RJ, O'shea KM, Ward CW, Butteiger DN, Mukherjea R, Krul ES. Chronic dietary supplementation with soy protein improves muscle function in rats. *PLoS One* 2017;12(12):1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0189246
29. Aparicio VA, Nebot E, Tassi M, Camiletti-Moirón D, Sanchez-Gonzalez C, Porres JM, et al. Whey versus soy protein diets and renal status in rats. *J Med Food* 2014;17(9):1011-16. doi: 10.1089/jmf.2013.0117
30. Aparicio VA, Nebot E, Kapravelou G, Sánchez C, Porres JM, López Jurado M, et al. El entrenamiento de fuerza reduce la acidosis metabólica y la hipertrofia hepática y renal consecuentes del consumo de una dieta hiperproteica en ratas. *Nutr Hosp* 2011 [Internet];26(6):1478-86. [cited 2020 Jan 15]. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600040
31. Nebot E, Erben RG, Porres JM, Femia P, Camiletti-Moirón D, Aranda P, et al. Effects of the amount and source of dietary protein on bone status in rats. *Food Funct* 2014;5(4):716-23. doi: 10.1039/c3fo60525f
32. Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci* 2006;28(2):165-170. doi: 10.4025/actascihealthsci.v28i2.1099
33. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Leite BLS, Serafini MR, et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 2014 [Internet];10(3):1-9. [cited 2020 Jan 15]. Available from: <https://www.scientiaplenua.org.br/sp/article/view/494>
34. Torres LV, Rodrigues DHA, Carlos LE, Sarmento TAB, Abrantes VEF. Padronização dos valores de referência de marcadores hepáticos e renais em ratos fêmeas da linhagem Wistar provenientes do biotério da Faculdade Santa Maria. *Revista Interdisciplinar em Saúde* 2017 [Internet];4(1):171-9. [cited 2020 Jan 15]. Available from: http://interdisciplinaremsaude.com.br/Volume_14/Trabalho_13.pdf