

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeitos das suplementações de caseína e da
sua associação com as proteínas do soro do
leite sobre a via de sinalização da mTOR em
músculos esqueléticos de ratos**

Tales Sambrano Vieira

Dissertação apresentada ao
Programa de pós-graduação
em Alimentos e Nutrição para
obtenção do título de Mestre
em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração:
Ciências Nutricionais.

Orientador (a): Profa. Dra.
Ellen Cristini de Freitas.

Araraquara
2019

Efeitos das suplementações de caseína e da sua associação com as proteínas do soro do leite sobre a via de sinalização da mTOR em músculos esqueléticos de ratos

Tales Sambrano Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração:
Ciências Nutricionais.

Orientador (a): Profa. Dra.
Ellen Cristini de Freitas.

Araraquara
2019

V658e Vieira, Tales Sambrano.
Efeitos das suplementações de caseína e da sua associação com as proteínas do soro do leite sobre a via de sinalização da mTOR em músculos esqueléticos de ratos / Tales Sambrano Vieira. – Araraquara, 2019.
59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Ellen Cristini de Freitas.

1. Caseína micelar. 2. *Whey protein*. 3. mTOR. 4. Músculo esquelético. 5. Síntese proteica. I. Freitas, Ellen Cristini de, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos das suplementações de um blend de proteínas e caseína micelar sobre a via de sinalização da mTOR no músculo esquelético de ratos Wistar

AUTOR: TALES SAMBRANO VIEIRA

ORIENTADORA: ELLEN CRISTINI DE FREITAS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciências Nutricionais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELLEN CRISTINI DE FREITAS
Escola de Educação Física e Esporte / Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. DAWIT ALBIEIRO PINHEIRO GONÇALVES
Departamento de Educação Física da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional /
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. ERICK PRADO DE OLIVEIRA
Faculdade de Medicina / Universidade Federal de Uberlândia

Araraquara, 18 de julho de 2019

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me conceder saúde para concretizar esta etapa importante da minha vida. Aos meus pais, Nezinho e Cecília, por sempre me apoiarem nas mais incertas escolhas, pelo alicerce, amor e incentivo.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a minha orientadora Profa. **Ellen** que se dedicou fortemente para que o trabalho fosse concluído da forma como foi planejado mesmo com inúmeros desafios adversos ao longo do processo. Além de ter me dado a oportunidade de primeiro conhecer a minha colega de laboratório e posteriormente a mulher da minha vida, **Gabriela**, que sempre me apoio e incentivou com muito amor e carinho.

Ao prof. **Adelino** que prontamente ofereceu o seu laboratório e material para a realização do trabalho, sem nenhuma restrição.

Aos meus colegas de laboratório **Alisson** e **Ana Paula**, que me ensinaram a metodologia e sem eles a concretização do estudo não seria possível. Sou eternamente grato...

Agradeço imensamente ao Prof. **Dawit** que prontamente se colocou à disposição nos momentos mais difíceis. Mais do que isso, se envolveu e trabalhou ativamente para melhoria do estudo.

Obrigado aos técnicos de laboratório **Giba** (Mestre) e a **Mônica** pela dedicação, aos colegas de grupo **Flávia** e **Bryan**.

Agradeço também à Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto (EEFERP) pelo apoio financeiro.

Finalmente, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Unesp) por possibilitar que eu realizasse um sonho, minha dissertação de MESTRADO.

Obrigado a todos...gratidão!

Resumo

Objetivo: O objetivo do estudo foi comparar os efeitos de uma dose-única de caseína micelar (MCA) com a ingestão de caseína micelar associada à proteína do soro do leite (whey protein) (1:1) sobre a resposta aminoacidêmica e a via de sinalização do alvo da rapamicina (mTOR) em músculos esqueléticos de ratos durante a fase de inatividade (período de luz ambiente).

Métodos: Após 10h de jejum durante a fase ativa, os ratos foram alimentados com MCA ou PB (5,6g proteína por kg de massa corporal) por gavagem e a água foi usada como veículo (grupo controle, PLA). Em 30 e 450 min após a suplementação das proteínas, os animais foram sacrificados e as amostras de sangue e do músculo gastrocnêmio foram coletadas para análises bioquímicas. **Resultados:** Os níveis plasmáticos dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) aumentaram após as suplementações de MCA (3 vezes) e PB (3,2 vezes). Ainda mais relevante, os níveis estimulatórios da fosforilação da mTOR e do seu alvo *downstream* p70S6K foram maiores 30 min após MCA (2,6 e 2,9 vezes, respectivamente) e PB (2,8 e 3,8 vezes, respectivamente) quando comparado com PLA. As concentrações plasmáticas de leucina forma correlacionadas com a ativação da mTOR ($r = 0,60$; $p < 0,05$) e p70S6K ($r = 0,77$; $p < 0,05$) em 30 min. Não existiu diferença para as concentrações plasmáticas de BCAA e a via de sinalização da mTOR em 450 min. **Conclusão:** Nós concluímos que a suplementação de MCA e PB resultaram em um efeito anabólico semelhante no músculo esquelético dos ratos pela indução de um aumento transitório nas concentrações plasmáticas de BCAA e ativação do eixo da mTOR / p70S6K.

Palavras-chave: Caseína micelar; *Whey protein*; mTOR; Músculo esquelético, Síntese proteica

Abstract

Objective: The aim of the study was to compare the effects of single-dose supplementation of a protein blend (PB) composed of micellar casein and whey protein (1:1) with isolated micellar casein (MCA) on aminoacidemic response and the mammalian target of the rapamycin (mTOR) signaling pathway 30 and 450 min after the beginning of the inactive phase in Wistar rats. **Methods:** After 10h of fasting during the active phase, rats were fed with MCA or PB (5.6g protein per kg of body mass) by gavage and water was used as the vehicle (PLA, placebo group). At 30 and 450 min after protein supplementation, the animals were euthanized and blood and gastrocnemius muscle samples were collected for biochemical and immunoblot analysis. **Results:** Plasma BCAA levels increased after MCA (3-fold) and PB (3.2-fold) supplementations. More importantly, the stimulatory phosphorylation levels of mTOR and its downstream target ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) were higher 30 min after MCA (2.6 and 2.9-fold, respectively) and PB (2.8 and 3.8-fold, respectively) when compared with PLA. Plasma leucine levels were correlated with activation of mTOR ($r = 0.60$, $p < 0.05$) and p70S6K ($r = 0.77$; $p < 0.05$) at 30 min. There were no differences for plasma amino acids levels and the mTOR signaling pathway at 450 min. **Conclusions:** MCA and PB supplementations resulted in a similar anabolic milieu in rat skeletal muscle by inducing a transient increase in BCAA plasma levels and activation of the mTOR/p70S6K axis.

Keywords: Micellar casein; whey protein; mTOR; skeletal muscle; protein synthesis.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1.....	14
FIGURA 2.....	31
FIGURA 3.....	34
FIGURA 4.....	35
FIGURA 5.....	36
FIGURA 6.....	37

LISTA DE TABELA

TABELA 1.....	22
TABELA 2.....	30
TABELA 3.....	30

Sumário

INTRODUÇÃO	10
Proteínas do leite	11
Whey protein	11
Via de sinalização da mTOR e leucina	13
Caseína.....	17
<i>Pre Sleep</i>	19
<i>Blend</i> de proteínas	21
Capítulo 1.....	24
ABSTRACT	26
INTRODUCTION.....	27
MATERIALS AND METHODS	29
Experimental animals.....	29
Experimental Protocol	29
Amino acid measurements.....	31
Immunoblotting technique	31
Statistical analysis.....	32
RESULTS	33
DISCUSSION.....	37
CONCLUSION	41
REFERENCES.....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS.....	51

INTRODUÇÃO

A manutenção da massa muscular é regulada pelo balanço entre os processos de síntese proteica e degradação proteica (1, 2). O jejum durante o sono caracteriza-se por um aumento da degradação proteica que excede a síntese, resultando em um balanço negativo (3). A degradação proteica pode resultar em perdas de proteínas musculares (atrofia), uma vez que a velocidade de degradação supera a síntese e o balanço é negativado. Em contrapartida, a ingestão de proteína antes de dormir, seguido ou não ao exercício de força (4), tem demonstrado ser eficiente em estimular a SPM durante todo o período noturno promovendo um balanço proteico positivo (5, 6). O predomínio desse balanço positivo resulta na preservação e aumento do músculo esquelético (7), o qual é de fundamental importância para a manutenção da capacidade funcional e metabólica ao longo da vida (8, 9).

Mais importante, a estimulação da síntese proteica poderia ser benéfica no envelhecimento, que pode ser definida como a perda lenta e progressiva da função e da massa muscular (8), e em inúmeras patologias como câncer e diabetes, uma vez que essas condições apresentam uma resposta de síntese proteica reduzida frente a um estímulo anabólico (ingestão de proteínas) (10, 11). Esse processo pode levar a perda de massa muscular, a qual é associada com um risco maior de quedas, fraturas e morte em idosos sarcopênicos (8), assim como, um desfecho clínico desfavorável em uma variedade de cânceres (12). Além disso, a recorrência do câncer em indivíduos tratados é diretamente relacionada à extensão da perda muscular (13).

A resposta da síntese proteica pode ser modulada por mudanças na quantidade, momento e fonte da proteína ingerida (14, 15). Dessa forma, houve um aumento no interesse em identificar as características da proteína ingerida, isoladamente (16, 17) ou na forma de blend (18, 19), que determinam a magnitude da resposta da síntese proteica pós-prandial para desenvolver estratégias nutricionais mais eficientes que contribuam para a manutenção da massa muscular na saúde e na doença.

Proteínas do leite

Entre as proteínas alimentares mais estudadas, a proteína do leite é a que contém maior *score* de classificação de acordo com o sistema de pontuação que mede a qualidade da proteína baseado nas necessidades de aminoácidos do organismo – PDCAAS (20). A proteína do leite bovino, como o leite de cabra e búfala, contém cerca de 80% de caseínas e 20% de proteína do soro do leite.

As caseínas são as proteínas que precipitam quando o leite é mantido sob pH de 4,6 a 20°C, enquanto que as proteínas do soro do leite permanecem no soro nessas mesmas condições (21). Durante a produção de queijo, as proteínas do soro do leite eram descartadas como um produto residual, no entanto, devido ao seu alto teor nutricional passaram a ser processadas em proteína em pó na forma de suplemento, denominado *whey protein* (21).

Whey protein

A fração do soro do leite, *whey protein*, é composta por várias proteínas individuais, incluindo β -lactoglobulina, alfa-lactalbumina, albumina de soro bovino, lactoferrina e imunoglobulinas. Entre estas, a β -lactoglobulina é a

proteína mais abundante do whey, correspondente a cerca de 50 – 55% de sua composição, e apresenta um alto teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) (22, 23). Os BCAA, importantes para atletas e indivíduos ativos, são metabolizados no trabalho muscular para o fornecimento de energia. Adicionalmente, a leucina desempenha papel-chave na estimulação da síntese proteica muscular (SPM) (24-26).

Diversos estudos têm demonstrado que a ingestão de *whey protein* é uma estratégia eficiente em estimular a síntese proteica comparado à outras fontes de proteína (14, 27, 28). Tang et al. (14) mostraram que a ingestão de *whey protein* após o exercício de força resultou em uma resposta da síntese proteica 31% e 123% maior comparado a soja e a caseína, respectivamente, em indivíduos jovens saudáveis. Em repouso (perna não exercitada) a síntese proteica apresentou um comportamento similar a condição com exercício (14).

Norton et al. (29) usaram um modelo animal para comparar o efeito anabólico do *whey protein* com outras diferentes fontes proteica, trigo, ovo e soja, sobre as proteínas da via do alvo da rapamicina (mTOR), a proteína quinase ribossomal (p70S6K) e a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e a síntese proteica, usando uma dieta que consistia de três refeições por dia. Trigo e soja não estimularam a síntese proteica acima dos valores basais, enquanto as proteínas do ovo e *whey* significativamente aumentaram a síntese proteica. As respostas de síntese proteica foram relacionadas com as mudanças plasmáticas de leucina e a fosforilação de p70S6K e 4E-BP1. Mais importante, após 2 e 11 semanas da ingestão, foi demonstrado que o conteúdo de leucina das

refeições aumentou a massa muscular e foi inversamente relacionada com a gordura corporal (29). Kanda et al. (19) também encontraram que a suplementação de *whey protein* por gavagem seguida de um protocolo aquático em roedores foi mais eficiente em estimular a síntese proteica comparado a soja isolada.

Ainda mais relevante, recentemente foi demonstrado que 12 semanas de suplementação diária de *whey protein* aumentou a massa muscular e ocasionou maiores reduções de gordura em idosos fisicamente ativos quando comparados com controles (30).

Além de *whey protein* conter todos os aminoácidos essenciais, particularmente leucina, *whey* é rapidamente digerido, o que resulta em um aumento rápido porém transitório na aminoacidemia (31, 32). Possivelmente por esses motivos, *whey* confere a capacidade de ativar rapidamente e em maior grau a síntese proteica comparado à outras fontes de proteína.

Via de sinalização da mTOR e leucina

Whey protein é considerado uma proteína com alto teor de BCAAs, particularmente leucina, sendo que esse aminoácido desempenha papel-chave na estimulação da síntese proteica muscular (SPM) (24-26).

O mecanismo através do qual a leucina regula a sinalização da mTOR são elusivos, mas são independentes da ativação da AKT (33). A suplementação de leucina em animais em jejum promove fosforilação de proteínas que são substratos diretos da mTOR, incluindo 4E-BP1 e S6K1 (33). O suporte para essa sugestão é fornecido por Anthony et al. (34), os quais injetaram um inibidor específico da mTOR (rapamicina) em ratos

anteriormente à suplementação de leucina. O estudo demonstrou que a rapamicina bloqueia totalmente o efeito do aminoácido sobre a síntese proteica no músculo. De acordo com esses resultados, os autores sugerem que a leucina estimula a síntese proteica muscular por meio da ativação da via da mTOR (34).

Provavelmente, esse efeito envolve duas proteínas que diretamente se associam com a mTOR, a Proteína Regulatória Associada a mTOR (raptor) e a Proteína homóloga de ras enriquecida no cérebro (Rheb) (Figura 1) (35).

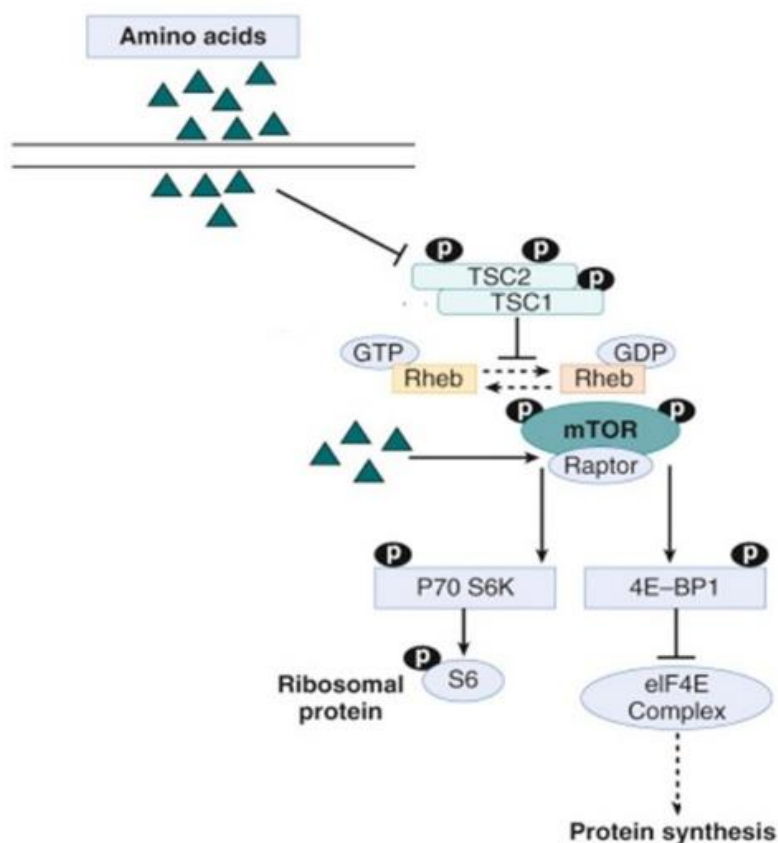


Figura 1. Representação esquemática da ativação do complexo 1 mTOR por meio de aminoácidos (33) ADAPTADO.

Raptor é identificada pela habilidade de se ligar a mTOR e assim, formar um complexo sensível a nutriente (36). Além disso, raptor se liga tanto a 4E-BP1

e S6K1 (36). Estudos subsequentes mostraram que 4E-BP1 e S6K1 compartilham um domínio que contém uma estrutura referida como uma *TOR signaling motif* (TOS), que medeia a associação com raptor. Evidências disponíveis demonstram que raptor atua como um adaptador molecular que recruta substratos para a mTOR, tais como 4E-BP1 e S6K1, para subsequente fosforilação (35).

A interação entre mTOR e raptor é regulada em parte pela mudança na disponibilidade dos aminoácidos. Tem sido sugerido que o aumento na disponibilidade de leucina pode promover uma alteração conformacional no complexo raptor-mTOR, que assim se adapta a uma conformação menos estável quando comparado na ausência desse aminoácido (37). Nesse sentido, tem sido proposto que os aminoácidos, particularmente leucina, promovem uma mudança no complexo raptor-mTOR que muda de um estável e inativo para um instável e ativo complexo (37). Embora os detalhes moleculares de tal mudança conformacional não tenha sido elucidada, uma possível explicação para essa observação é que, em células privadas de leucina, a *TOS-binding domain* em raptor é bloqueada pela mTOR. Dessa forma, o fornecimento de leucina através de um mecanismo induziria a uma mudança conformacional em raptor e/ou mTOR que resulta na exposição de *TOS-binding domain* em raptor, permitindo que se ligue a 4E-BP1 e a S6K1, recrutando os ao complexo para serem fosforilados (37).

A atividade da mTOR também é regulada por uma pequena proteína G monomérica da família de proteínas Ras, chamada Rheb. Assim como outras proteínas G pequenas, Rheb se encontra na conformação ativa quando

estiver ligada a um trifosfato de guanosina (GTP) (35). Rheb-GTP se liga ao complexo mTOR, estimulando sua atividade cinase, provavelmente pela indução de uma alteração conformacional no seu domínio cinase (38). Por sua vez, a Rheb é regulada por um heterodímero composto pelas subunidades TSC1/TSC2, nomeados pelo seu envolvimento na síndrome médica complexo esclerose tuberosa, descrita a seguir. Na sua conformação ativa, o heterodímero TSC1/TSC2 atua como proteína de ativação de GTPase para Rheb (Rheb-GAP), causando a hidrólise da molécula de GTP ligada à Rheb em difosfato de guanosina (GDP). Essa reação converte Rheb para sua conformação ligada a GDP, que se liga ao complexo mTOR e inibi sua atividade cinase. Por fim a atividade do complexo TSC1/TSC2 Rheb-GAP é regulada por diversos sinais, permitindo que a célula integre diferentes vias de sinalização celular para controlar a taxa geral de síntese proteica (39).

A sinalização eficiente induzida pelos aminoácidos via mTOR requer tanto Rheb e TSC1/TSC2. Por exemplo, em células super expressando Rheb, a fosforilação de S6K1 é mantida durante a privação de aminoácido, o que sugere que Rheb é envolvida na transdução de sinais a partir dos aminoácidos via mTOR (40, 41). Esses achados podem ser interpretados como evidência que os aminoácidos, particularmente leucina, regulam a sinalização através da mTOR por repressão do complexo TSC1/TSC2. No entanto, uma interpretação alternativa é que o aumento na atividade de Rheb-GAP causada pela maior expressão de TSC1/TSC2 é dominante para a entrada de aminoácidos na mTOR (40). Assim, os aminoácidos podem ativar os fatores de troca de nucleotídeo de guanina (GEF) 41.

Evidências sugerem que os aminoácidos não modulam a sinalização de mTOR pela regulação da atividade de TCS1/TCS2-GAP sentido a Rheb. Estudos demonstram que a privação de aminoácidos não altera a proporção de Rheb ligado a forma GTP (42, 43). Mas sim, os aminoácidos podem regular a função de Rheb modulando a ligação dessa proteína com mTOR. Nesse sentido, um estudo mostrou que a privação de todos os aminoácidos ou apenas leucina resulta na dissociação do complexo Rheb-mTOR (42). Sendo que a adição dos aminoácidos reverte o efeito.

Nesse sentido, a proteína cinase mTOR, e mais especificamente o complexo 1 mTOR, desempenha papel central na resposta do metabolismo proteico para os efeitos regulatórios da leucina, conforme ilustrado na figura 1 (44).

Caseína

A caseína (do latim “caesus”, queijo) é a outra grande fração proteica do leite, compondo aproximadamente 80% das proteínas lácteas. Cerca de 95% da caseína do leite estão na forma de micelas, que permitem que o leite coagule para o processo de fabricação do queijo (45).

Em contrapartida ao *whey protein*, a caseína é ácido-insolúvel, coagula no estômago retardando a digestão e o trânsito para o intestino, o que resulta em uma aminoacidemia reduzida em amplitude, porém maior em permanência sanguínea (31, 32). Além disso, a caseína apresenta características intrínsecas, tais como peptídeos opióides que diminuem a motilidade gástrica (46). Boirie et al. (31) demonstraram que a ingestão de caseína aumentou moderadamente e de forma prolongada a concentração

plasmática dos aminoácidos, além disso, inibiu a degradação proteica total em 34%. No entanto, apresentou uma velocidade de síntese proteica inferior quando comparado à ingestão de *whey protein* por adultos saudáveis (31).

Reitelseder et al. (16) constataram que a suplementação de caseína após uma única sessão de exercício de força apresentou resultados similares quanto ao grau da extensão da resposta de SPM comparado ao *whey protein* durante um período de 6h. No entanto, a suplementação de *whey* resultou em um maior aumento na síntese proteica no período *early* pós-intervenção, enquanto a caseína demonstrou um moderado mas prolongado aumento (3.5 - 6h).

A ingestão de caseína também tem sido testada em indivíduos idosos (17, 27, 28), uma vez que estes apresentam uma resposta de síntese proteica minimizada frente a ingestão de proteínas seguida ou não ao exercício de força (11). Dessa forma, identificar o tipo de proteína que confere maior capacidade em estimular a síntese proteica pode ser crucial para manutenção da massa muscular e qualidade de vida desses indivíduos.

Pennings et al. (28) mostraram que a suplementação de caseína resulta em uma resposta da síntese proteica minimizada quando comparado a ingestão de *whey protein* em indivíduos idosos após o exercício de força. Burd et al. (27) corroboram o estudo anterior ao observarem que a caseína foi menos eficiente (65%) em estimular a síntese proteica comparado a ingestão de *whey* tanto após o exercício de força como em repouso. Os resultados encontrados em ambos os estudos são provavelmente atribuídos ao fato do

whey ser uma proteína digerida mais rapidamente e ainda apresentar um conteúdo maior de leucina comparado a caseína.

Recentemente, Gorissen et al. (17) avaliaram a aminoacidemia e a síntese proteica após a ingestão de 35g de proteína isolada de trigo comparada a caseína e ao *whey protein*. Os autores observaram que a ingestão de caseína resultou em um aumento mais prolongado na concentração dos aminoácidos circulantes, similarmente à proteína isolada de trigo, enquanto que *whey* causou um aumento mais robusto na aminoacidemia. No entanto, interessante, apenas a ingestão de caseína apresentou uma resposta de síntese proteica maior comparado ao basal (48%). Os autores sugerem que a caseína por ser uma proteína digerida lentamente possa ter fornecido substrato no momento em que as proteínas que regulam a síntese proteica estivessem mais ativadas, uma vez que os indivíduos idosos apresentam um atraso na ativação dessas proteínas frente a um estímulo anabólico (47), o que pode ter resultado em uma maior estimulação da síntese proteica (17).

Possivelmente por essas características citadas acima, a caseína tem sido eficiente em sustentar o fornecimento de AAes, prolongando a resposta de SPM no músculo esquelético tanto de sujeitos jovens (5) como de idosos (6).

Pre Sleep

Durante o sono noturno, em um estado pós-absortivo, a disponibilidade plasmática de AAes é diminuída, a degradação proteica excede a síntese proteica e o balanço proteico se torna negativo. Este desequilíbrio entre a

degradação e a síntese contribui para a perda de massa muscular, o que pode resultar em uma capacidade funcional e saúde metabólica reduzidas (48, 49). No entanto, mais recentemente, Res et al. (5) identificaram que o período de sono durante a noite pode ser uma nova janela de oportunidade para potencializar as adaptações do treinamento após o exercício de força. Essa janela acontece porque a ingestão de caseína (40g) antes de dormir, seguida ou não do exercício, demonstrou ser eficiente em prolongar a aminoacidemia e manter estimulada a resposta de síntese proteica durante toda a noite (0 - 7.5h), tanto em indivíduos jovens como em idosos (5, 6, 50).

Além disso, a ingestão crônica de ~ 30g de caseína antes de dormir, durante 3 meses, resultou em um aumento da força e da massa muscular após 12 semanas de exercício de força em sujeitos jovens saudáveis (7). Em contrapartida, Trommelen et al. (51) observaram que a ingestão de 30g de caseína antes de dormir, com ou sem um adicional de leucina (2g), não aumentou a síntese proteica durante o período de recuperação após o exercício (0 - 7.5h). Esses resultados sugerem existir uma relação entre dose de proteína ingerida antes de dormir e a resposta da síntese proteica. Essa dose difere da quantidade consumida no momento em que se inicia o período de recuperação pós-exercício, no qual a ingestão de uma quantidade moderada de proteína, 20g, é capaz de maximizar a resposta de síntese proteica (0-4h) em jovens adultos (14, 15).

Embora a ingestão de 30g de caseína antes de dormir pareça não ser suficiente para estimular a síntese proteica durante todo o período de sono (0 - 7.5h), Trommelen et al. (51) demonstraram que a proteína ingerida forneceu

aminoácidos como precursores para um *novo* acréscimo de proteínas miofibrilares durante todo o período noturno. Devido à extensão desse período se comparado ao típico período pós-prandial (8h vs. 4h), é possível especular que grandes quantidades de proteína ($\geq 40\text{g}$) sejam necessárias para maximizar a resposta da síntese proteica durante o sono noturno (50).

***Blend* de proteínas**

Caseína e *whey* são proteínas de alta qualidade compostas por todos os aminoácidos essenciais (AAEs) (tabela 1) em diferentes proporções, e a ingestão de um *blend* composto por essas proteínas pode oferecer uma concentração média alta desses aminoácidos, os quais desempenham inúmeras funções específicas, como impulsionar e prolongar a síntese proteica (52). Além disso, suplementos compostos por proteínas lácteas com diferentes velocidades de digestão e absorção possivelmente apresentam a capacidade de aumentar as adaptações do treinamento físico (53). Ainda nesse sentido, estudos demonstram que a ingestão de um *blend* de proteínas após o exercício de força pode prolongar a aminoacidemia e a síntese proteica (18, 54), acelerar a recuperação muscular (55), aumentar o reabastecimento de glicogênio (56) e a hidratação em um ambiente úmido e quente (57).

Tabela 1. Classificação dos Aminoácidos

Essenciais	Condicionalmente Essenciais	Não Essenciais
Fenilalanina	Arginina	Ácido aspártico
Histidina		Ácido Glutâmico
Isoleucina		Alanina
Leucina		Arginina
Metionina		Asparagina
Treonina		Cisteína
Triptofano		Glicina
Valina		Glutamina
		Prolina
		Serina
		Tirosina

Recentemente, Traylor et al. (18) compararam os efeitos da ingestão de um *blend* de proteínas, composto por caseína micelar e *whey protein* (1:1), com as proteínas isoladas caseína micelar e *whey protein* sobre a resposta aminoacidêmica em sujeitos jovens em repouso. Os autores demonstraram que o *blend* foi mais eficiente em sustentar elevados os níveis plasmáticos de BCAA após 300 e 360 min comparado à caseína isolada. Além do mais, a área sob a curva do período total de 6h para o nível de BCAA foi maior após a ingestão do *blend*.

Em um estudo realizado com roedores, Kanda et al. (19) investigaram os efeitos da suplementação de uma dose única de proteínas do leite (80% caseína e 20% *whey*), de caseinato de cálcio, de *whey protein* e de soja seguida de um protocolo aquático sobre a síntese de proteínas. Os autores encontraram que o *blend* de proteínas lácteas foi mais eficiente em estimular a síntese proteica comparado à soja isolada em 90 e 120 min. Ademais, embora não tenha sido realizada uma análise estatística, a área sob a curva

para o período de 6 horas após a suplementação das proteínas derivadas do leite apresentou uma tendência em ser maior comparada à da soja isolada.

Dessa forma, a coingestão de proteínas lácteas com diferentes velocidades de digestão e absorção tem demonstrado a capacidade de prolongar o fornecimento de aminoácidos, mTOR e a síntese proteica tanto em modelos animais (58) como em humanos (54). No entanto, até o presente conhecimento, nenhum estudo avaliou o efeito potencial da suplementação de uma única dose de um blend de proteínas composto por caseína micelar e *whey protein* (1:1) sobre a aminoacidemia e a via de sinalização da mTOR comparado a CA isolada. Dessa forma, nós comparamos os efeitos da suplementação de MCa com um *blend* de proteínas composto por MCa e *whey protein* (1:1) sobre as concentrações de BCAA e a via de sinalização da mTOR 30 e 450 min após o início da fase inativa de rator Wistar.

Capítulo 1.

As suplementações de um blend de proteínas e caseína micelar ativam similarmente a via de sinalização da mTOR no músculo esquelético de ratos Wistar.

O presente artigo foi submetido para publicação em julho de 2019 para “Journal of the American College of Nutrition”

**Protein Blend and Micellar Casein Supplementations Similarly Activate mTOR
Signalling Pathway in Rat Skeletal Muscle**

Tales Sambrano-Vieira¹, Ana P. Pinto², Gabriela Batitucci¹, Alisson L. da Rocha²,
Dawit A. Gonçalves^{3,4}, Hugo T. Filho⁵, Adelino S. R. da Silva^{2,5} and Ellen C. de
Freitas^{*1,5}

¹Postgraduate Program in Nutritional Science, State University of São Paulo Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Araraquara, São Paulo, Brazil. ²Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ³Departments of Physiology and Biochemistry & Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ⁴Present address: Department of Physical Education, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁵School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:** Ellen Cristini de Freitas.

E-mail: ellenfreitas@usp.br Address: Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to compare the effects of single-dose supplementation of a protein blend (PB) composed of micellar casein and whey protein (1:1) with isolated micellar casein (MCA) on aminoacidemic response and the mammalian target of the rapamycin (mTOR) signaling pathway 30 and 450 min after the beginning of the inactive phase in Wistar rats. **Methods:** After 10h of fasting during the active phase, rats were fed with MCA or PB (5.6g protein per kg of body mass) by gavage and water was used as the vehicle (PLA, placebo group). At 30 and 450 min after protein supplementation, the animals were euthanized and blood and gastrocnemius muscle samples were collected for biochemical analysis and immunoblot. **Results:** Plasma BCAA levels increased after MCA (3-fold) and PB (3.2-fold) supplementations. More importantly, the stimulatory phosphorylation levels of mTOR and its downstream target ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) were higher 30 min after MCA (2.6 and 2.9-fold, respectively) and PB (2.8 and 3.8-fold, respectively) when compared with PLA. Plasma leucine levels were correlated with activation of mTOR ($r = 0.60$; $p < 0.05$) and p70S6K ($r = 0.77$; $p < 0.05$) at 30 min. There were no differences for plasma amino acids levels and the mTOR signaling pathway at 450 min. **Conclusions:** MCA and PB supplementations resulted in a similar anabolic milieu in rat skeletal muscle by inducing a transient increase in BCAA plasma levels and activation of the mTOR/p70S6K axis.

Keywords: Micellar casein; Whey protein; mTOR; Skeletal muscle; Protein synthesis.

INTRODUCTION

Muscle mass is regulated by the balance between the processes of protein synthesis and protein breakdown [1, 2]. During overnight fasting, protein breakdown exceeds protein synthesis rates [3]. In contrast, protein (casein) ingestion before sleeping, with or without exercise [4], has been shown to be efficient in stimulating protein synthesis rates throughout the night [5, 6]. The predominance of this positive protein balance may preserve or even increase skeletal muscle mass [7], which is of fundamental importance for the maintenance of functional and metabolic capacity throughout life [8-10]. More importantly, protein synthesis stimulation could be beneficial for sarcopenic elderly, who present a loss of muscle mass and function, associated with several adverse health outcomes [10]. In addition, diabetics and cancer patients could also benefit, since these individuals have shown a reduced protein synthesis response [11, 12].

Protein synthesis response (overnight) to pre-sleep protein intake may be determined by the type and amount of protein consumed [5, 13], which has led to increased interest in investigating the characteristics of the protein ingested (digestion rate and amino acid composition) and its effects on aminoacidemia and the magnitude of overnight protein synthesis [5, 6, 13-16].

Among dairy proteins, casein has been cited as a “slow” protein since it precipitates in the stomach and is more slowly digested, which results in a modest but prolonged increase in amino acid levels [17], conferring on casein the ability to prolong muscle protein synthesis stimulation [5, 18]. In contrast to casein, whey protein has high leucine content and has been referred to as a “fast” protein according to its digestion and absorption rates, resulting in a pronounced and transient increase

in plasma levels of leucine that peaks at 40 – 60 min [17, 19-21]. In addition, whey protein ingestion has been shown to stimulate muscle protein synthesis rates to a greater extent compared with casein when evaluated for up to 4 hours [22-24].

Among essential amino acids, the branched chain amino acid (BCAA) leucine can activate the mammalian target of rapamycin (mTOR), a key intracellular regulator of muscle protein synthesis [25]. Activation of mTOR with subsequent phosphorylation of its downstream targets p70 ribosomal protein S6 Kinase (p70S6K) and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) [26] plays an important role in the initiation of the mRNA translation and *de novo* muscle protein synthesis [27]. Due to its protein anabolic role, mTOR signaling has been considered an indirect indicative of muscle growth [28].

Since milk proteins (casein and whey) present different features of digestibility and absorption, interest in evaluating the co-ingestion of these proteins in the form of a blend on aminoacidemia and muscle protein synthesis has increased [19, 21, 29, 30]. These kinds of nutrients are high-quality proteins composed of all essential amino acids, but in a different proportion for each protein [31]. It is of note that ingestion of a protein blend (PB) composed of casein (50 %) and whey protein (50 %) provides a higher average concentration of essential amino acids, which may directly stimulate and extend protein synthesis in rest [32] and post-exercise [28] conditions. However, few studies have tested the possible synergistic action of co-ingestion of casein and whey protein, in similar proportions, on protein anabolism.

The purpose of this study was to compare the effects of single-dose supplementation of a protein blend (PB) composed of micellar casein and whey protein (1:1) with isolated micellar casein (MCa) on aminoacidemic response and the mTOR

signaling pathway 30 and 450 min after the beginning of the inactive phase in Wistar rats. We hypothesized that PB would result in higher and prolonged BCAA levels and mTOR signaling pathway activation compared with MCa.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Male Wistar rats (8 weeks old; ~250g; n = 30) from São Paulo State University (Botucatu, Brazil) were used in the study. All animals were housed in polypropylene cages (three animals per cage) in a rack with controlled temperature (22 ± 2 °C), with lighting on from 8 a.m. to 8 p.m. and off from 8 p.m. to 8 a.m. The animals had free access to water and food (Purina chow). All experimental procedures were performed according to the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee of the University of São Paulo (2018.5.14.90.3).

Experimental Protocol

The night before the experiment, the animals were fasted for 10 h. Subsequently, at 8 a.m., the rats were supplemented with MCa (Grow Dietary Supplements, USA), PB (MCa with isolated whey, Grow Dietary Supplements, USA), or water (PLA) by gavage, as summarized in Figure 1. The protein blend was composed of equivalent amounts of micellar casein (50%) and whey protein (50%). The amino acid composition of each supplement is shown in Table 2. The macronutrient composition of each supplement is shown in Table 3. Each rat was supplemented with an equal amount of protein [2.4 ml/100 g of body mass (BM), 5.6 g protein/kg of BM].

Table II. Amino acid composition of the supplements

	MCa	PB
	g/100g	
Alanine	2.55	3.12
Arginine	3.01	2.53
Aspartic Acid	5.93	6.85
Cystine	0.48	1.02
Glutamic Acid	15.93	14.54
Glycine	1.42	1.39
Histidine	3.62	2.47
Isoleucine	3.75	4.00
Leucine	7.43	7.71
Lysine	6.24	6.62
Methionine	2.16	1.90
Phenylalanine	3.40	2.86
Proline	7.45	5.87
Serine	4.15	3.95
Threonine	3.40	4.27
Tryptophan	1.31	1.27
Tyrosine	3.95	3.07
Valine	4.73	4.52
Overall BCAA	15.91	16.23

MCa, isolated micellar casein; PB, protein blend (micellar casein and whey protein); BCAAs, branch chain amino acids (leucine, isoleucine, and valine); EAAs, essential amino acids.

Table III. Macronutrient composition of the supplements

	Carbohydrate	Protein	Lipids	Energy
	(g/100g)			(kcal/100g)
MCa	5.7	80.9	2.9	372.5
PB	7.6	77.9	3.85	376.6

MCa, isolated micellar casein; PB, protein blend (micellar casein and whey protein)

The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (10 mg / kg of BM) and ketamine (100 mg / kg of BM), and euthanized by exsanguination 30 min (n = 15) and 450 min (n = 15) after supplementation. Blood was taken by cardiac and plasma collection. Gastrocnemius muscles were collected and immediately frozen in liquid nitrogen for future biochemical analysis and immunoblotting.

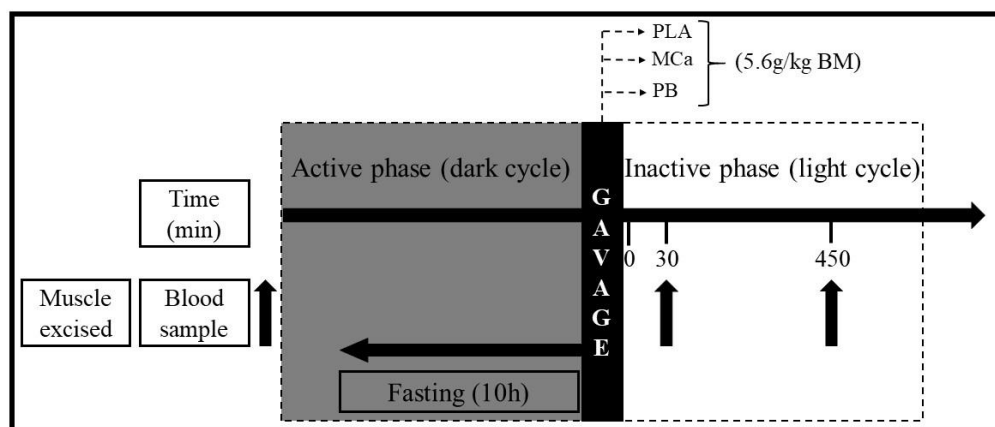


Figure 2. Experimental design. PLA, placebo, MCa, isolated micellar casein; PB, protein blend (micellar casein and whey protein); BM, body mass.

Amino acid measurements

Plasma leucine, isoleucine, and valine analysis were performed by Shimadzu® High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), model LC 10 AD, using the Deyl method. Leucine (99%), isoleucine (99%), and valine (99%) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) were used as standard and values were expressed in $\mu\text{mol} / \text{L}$.

Immunoblotting technique

Gastrocnemius muscles were homogenized in extraction buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg ml^{-1} aprotinin) at 4°C with a Polytron PTA 20S generator (model PT 10/35); Brinkmann Instruments, Westbury, NY), operated at maximum speed for 30 sec. The

extracts were centrifuged (9,900g) for 40 min at 4°C to remove insoluble material, and the supernatants were used for protein quantification using the Bradford method as previously described (Bradford, 1976). Proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT, run on an SDS-PAGE gel, and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Hybond ECL, RPN303D). The transfer efficiency onto nitrocellulose membranes was confirmed by brief staining of the blots with de Ponceau red stain. These membranes were then blocked with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% BSA and 0.1 Tween -20 for 50 min at room temperature.

Antibodies used for immunoblotting overnight at 4°C were phospho-4E-BP1 (Thr70; CELL 9455S), phospho-mTOR (Ser2448; CELL 2971S), mTOR (CELL 2972S) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) at a dilution of 1:1000 as well as 4E-BP1 (SC6936), p70S6k (SC230), phospho-p70S6K (Thr389; SC11759) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) at a dilution of 1:750. After the membranes were washed with TBS containing 0.1% Tween-20, they were incubated for 1h at 4°C with secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. The specific immune reactive bands were detected using chemiluminescence (GE Healthcare, ECL Plus Western Blotting Detection System, RPN2132). Images were acquired by the C-DiGit™ Blot scanner (LI-COR^R, Lincon, NE) and quantified using the software Image Studio for C-DiGit Blot Scanner.

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm standard error of the mean (SE). Multiple comparisons were made using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *post hoc* test in normally distributed variables or those that showed a

normal distribution after log₁₀ transformation. The normality of the dependent variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics (version 19; SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

MCa and PB supplementations induce a similar and transient increase in plasma aminoacidemia

Plasma levels of leucine (3.4 and 3.7-fold), isoleucine (2.4 and 2.3-fold), valine (2.3 and 2.3-fold), and overall BCAA (3 and 3.2-fold) were higher 30 min after MCa and PB supplementations, respectively, compared with PLA ($p < 0.001$). However, at the same time point, there were no differences between MCa and PB for plasma levels of leucine, isoleucine, valine, or overall BCAA. At 450 min, no difference was observed between groups for the analyzed amino acids. Conversely, plasma leucine, isoleucine, valine, and overall BCAA significantly decreased after MCa and PB supplementations at 450 min compared with 30 min (Figure 2; A - D). Altogether, these findings suggest that MCa and PB ingestion is capable of transiently increasing plasma BCAA levels, which possibly induces the activation of the mTOR signaling pathway, particularly through the anabolic action of leucine.

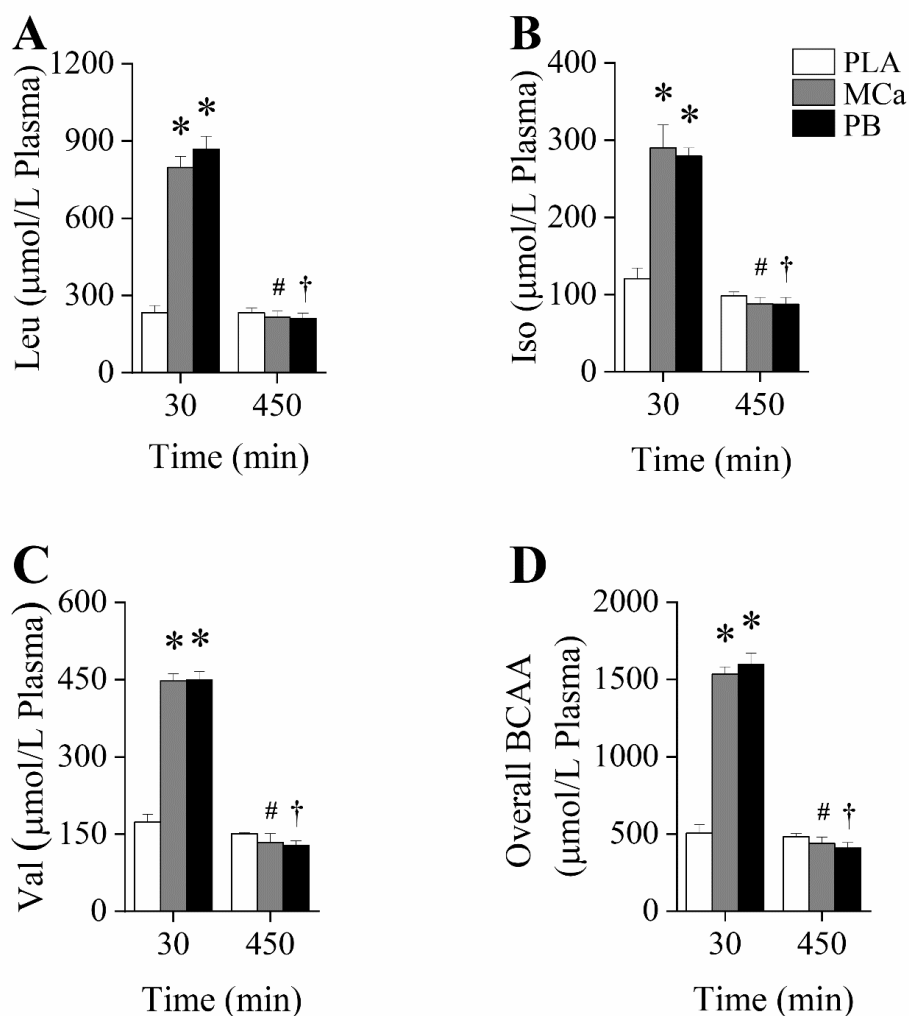


Figure 3. Effects of PLA, MCa, and PB supplementation on plasma Leu (A), Iso (B), Val (C), and overall BCAA (Leu, Iso, and Val; D) levels of Wistar rats. Significant group*time interactions ($p < 0.001$) were found (A, B, C, and D). Values are presented as means \pm SE of 5 animals. * $p < 0.05$, vs PLA (30 min); # $p < 0.05$, 450 vs 30 min (MCa); † $p < 0.05$, 450 vs 30 min (PB). Leu, leucine; Iso, isoleucine; Val, valine; BCAA, branched-chain amino acids; PLA, placebo; MCa, isolated micellar casein; PB, protein blend (micellar casein and whey protein).

MCa and PB supplementations similarly promote an anabolic status by stimulating p70S6K branch of mTOR signaling in skeletal muscle

The anabolic actions of BCCAs, particularly leucine, activate mTOR, which in turn can phosphorylate two downstream targets such as p70S6K and 4E-BP1. In the present study the phosphorylated mTOR was higher 30 min after MCa (2.6-fold) and PB (2.8-fold) supplementations compared with PLA ($p < 0.05$), with no differences

between protein treatments ($p = 0.70$; Figure 3B). At 450 min, phosphorylated mTOR in MCa- and PB-supplemented rats returned to basal values. There were no differences for the total mTOR among the groups at any studied period (Figure 3C).

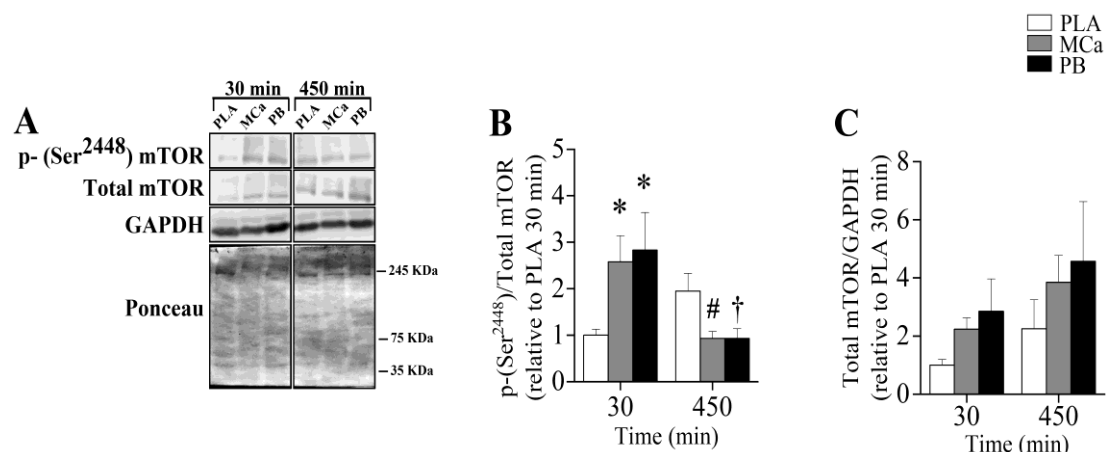


Figure 4. Effects of PLA, MCa, and PB supplementations on phosphorylation levels of mTOR (p-Ser²⁴⁴⁸; B) and total protein content (C) in gastrocnemius muscle from Wistar rats. Phosphorylated protein was normalized to total protein and relative to PLA 30 min. Total protein, in turn, was normalized to GAPDH and relative to PLA 30 min. Representative immunoblot (A) is shown. Significant group*time interactions ($p < 0.05$) were found (B). Values are presented as means \pm SE of 5 animals. Black lines between lanes indicate that samples were run on the same gel but were noncontiguous. * $p < 0.05$, vs PLA (30 min); # $p < 0.05$, 450 vs 30 min (MCa); † $p < 0.05$, 450 vs 30 min (PB). PLA, placebo; MCa, isolated micellar casein; PB, protein blend (micellar casein and whey protein).

Similar to mTOR, phosphorylated p70S6K was higher 30 min after MCa (2.9-fold; $p < 0.05$) and PB (3.8-fold; $p < 0.05$) compared with PLA and no differences were observed between supplementation protocols ($p = 0.16$; Figure 4B). At 450 min, there were no differences ($p = 0.725$) in phosphorylated p70S6K between the groups and levels returned to basal values in MCa- and PB-supplemented rats (Figure 4B). Total p70S6K was unaffected in any group (Figure 4C).

Another branch of mTOR signaling is the 4E-BP1 protein, however, MCa and PB supplementations did not alter phosphorylation or total content levels of 4E-BP1 protein at any period (Figure 4; E and F).

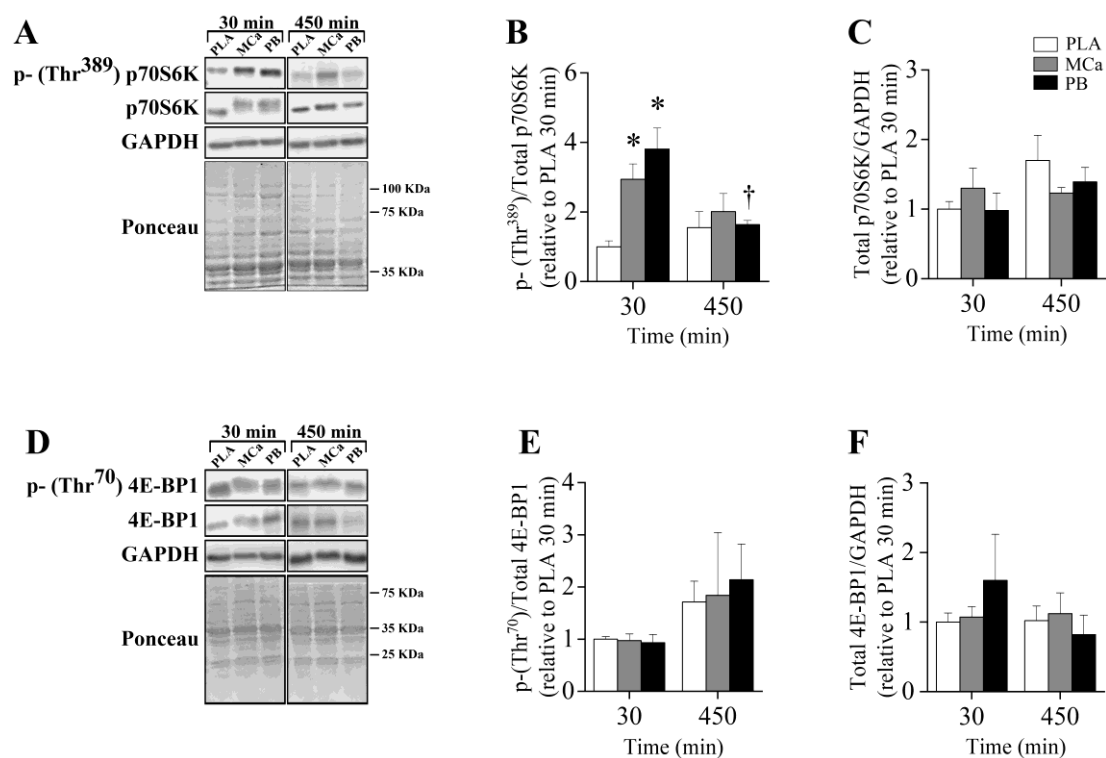


Figure 5. Effects of PLA, MCa, and PB supplementations on phosphorylation levels of p70S6K (p-Thr³⁸⁹; B) and 4E-BP1 (p-Thr⁷⁰; E), and total protein content of p70S6K (C) and 4E-BP1 (F) in gastrocnemius muscle from Wistar rats. Membranes were stripped and reprobbed for GAPDH as a loading control. Phosphorylated proteins were normalized to total proteins and relative to PLA 30 min. Total proteins were normalized to GAPDH and relative to PLA 30 min. Representative immunoblots (A and D) are shown. Significant group*time interactions ($p < 0.05$) were found (B). Values are presented as means \pm SE of 5 animals. Black lines between lanes indicate that samples were run on the same gel but were noncontiguous. * $p < 0.05$, vs PLA (30 min). † $p < 0.05$, 450 vs 30 min (PB). PLA, placebo; MCa, isolated micellar casein; PB, protein blend (micellar casein and whey protein).

Phosphorylated mTOR and p70S6k were correlated with plasma leucine ($r = 0.60$, $p < 0.05$; $r = 0.77$, $p < 0.05$ respectively) and overall BCAA ($r = 0.79$, $p < 0.001$; $r = 0.60$, $p < 0.05$, respectively) levels, at 30 min (Figure 5; A - D). However, at the

same time-point, no correlations were observed between phosphorylated 4E-BP1 and plasma leucine ($p = 0.43$) and BCAA ($p = 0.44$) levels.

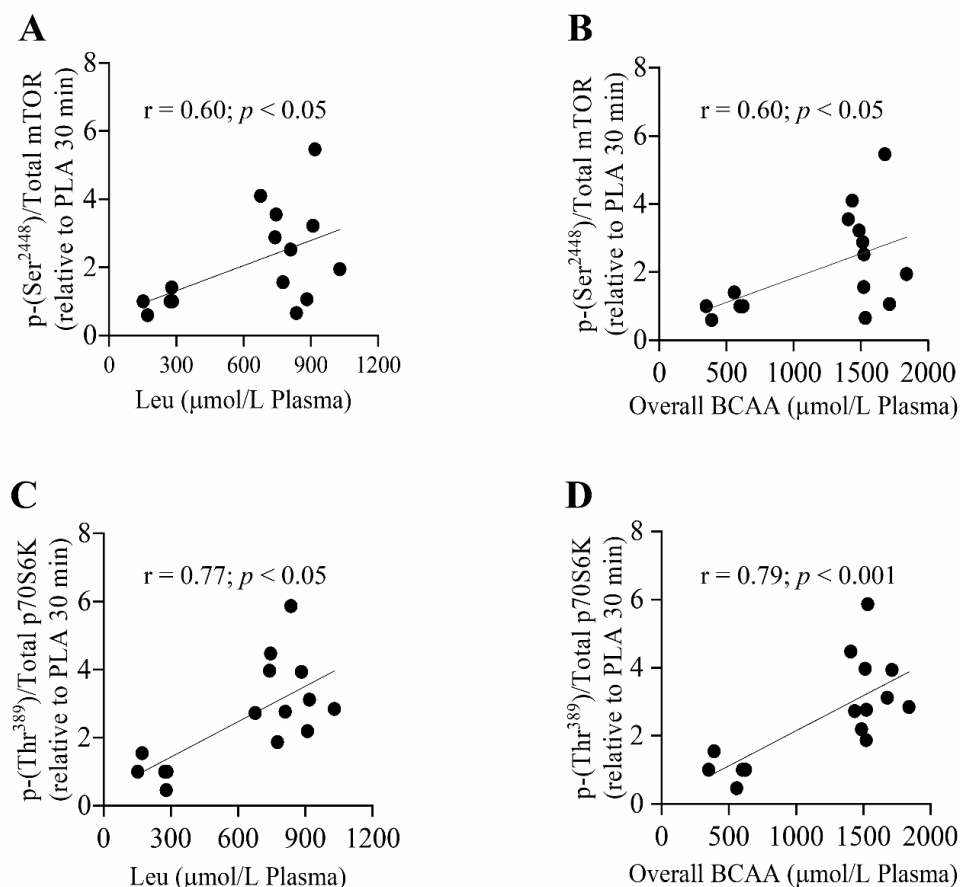


Figure 6. Correlations between phosphorylated mTOR and plasma leucine ($r = 0.60$, $p < 0.05$; A) and overall BCAA ($r = 0.60$, $p < 0.05$; B) levels. Phosphorylated p70S6K and plasma leucine ($r = 0.77$, $p < 0.05$; C) and overall BCAA ($r = 0.79$, $p < 0.001$; D) levels. Data were analyzed as 2-tailed of significance using Pearson's correlation coefficients ($n = 15$). PLA, placebo; BCAA, branched-chain amino acids; Leu, leucine.

DISCUSSION

The present study shows that both PB and MCA supplementations caused a similar, fast, and transient anabolic status involving the increase in circulating levels of BCAA and activation of mTOR signaling in rat skeletal muscle. However, these findings contradict our hypothesis that PB supplementation would promote more potent and prolonged anabolic effects than MCA.

Casein and whey protein are considered high quality proteins since they contain all the essential amino acids [33], although in different proportions for each protein. In this sense, whey protein has a greater content of BCAAs, particularly leucine, besides being rapidly digested, which results in a rapid increase in the plasma levels of this branched chain amino acid, with a peak at around 45 - 60 min [34]. However, this effect is transient, thus, plasma levels return to baseline after 2-3 hours [21, 24]. In contrast to whey, casein is slowly digested, which causes smaller but more prolonged aminoacidemia [22].

In this line, the co-ingestion of these proteins with specific characteristics, in the form of a blend, could confer a synergic effect of greater amplitude and more prolonged aminoacidemia [34], besides offering a higher average of the essential amino acids. According to previous studies [21, 34], we demonstrated that PB and MCa supplementations caused rapid (30 min) and similar increases in BCAA and leucine plasma levels, and this effect was lost over time for both supplements, contrary to the hypothesis of this study. However, we cannot rule out that PB supplementation could have resulted in higher and longer concentrations of BCAA and leucine between 30 and 450 min, as reported by Traylor et. al. [34], who observed higher levels of BCAA at 300 and 360 min after supplementation with a blend compared to isolated casein.

It is known that the increase in plasma availability of essential amino acids [35, 36], followed by ingestion of either isolated casein or a blend of proteins, is effective in activating and prolonging the stimulation of protein synthesis [5, 32]. Although the present study did not measure protein synthesis, an important marker of muscle cell pro-synthetic activity was evaluated, mTOR. Activation of mTOR signaling can

phosphorylate and activate its downstream target, p70S6K, which, in turn, phosphorylates the ribosomal S6. mTOR can also induce inhibitory phosphorylation its other branch, 4E-BP1, which inhibits eIF4E. Both downstream targets of mTOR, p70S6K and 4E-BP1, are crucial to promote translation initiation and elongation [37].

In the current study, both supplementation protocols (PB and MCa) were able to similarly activate the mTOR signaling and its downstream target p70S6K at 30 min compared with the PLA group. However, this signaling returned to baseline levels, as did aminoacidemia, 450 min after supplementations. The results of the present study contradict our hypothesis because, although both supplements are composed of similar amounts of essential amino acids and leucine, PB consists of proteins with different digestion kinetics, which also modulate the anabolic response, and may confer more robust and prolonged activation of the mTOR signaling pathway [28] compared to MCa. In disagreement with our results, previous studies demonstrated that blend intake was more efficient in extending mTOR activation and muscle protein synthesis compared to isolated whey and soy protein in both human [28] and animal models [21, 32]. This discrepancy can be explained by the different methodologies adopted in each study.

Several studies have shown the anabolic potency of BCAAs, particularly leucine, on mTOR signaling and skeletal muscle protein synthesis in both rodents [27, 38] and humans [39, 40]. Crozier et al. [38] demonstrated that following incremental amounts of leucine administration in rats, a dose of 0.14 g / kg BM produced a near maximal increase in protein synthesis. Norton et al. [41] showed that a specific threshold of leucine intake is needed (47 mg) to boost protein synthesis in the skeletal muscle of rodents [41]. In addition, Kanda et al. [21] observed that mTOR reached a

plateau after casein and whey protein co-ingestion containing ~ 43 mg of leucine (0.29 g / kg of BM) and that higher amounts of leucine ingested were not efficient in further stimulating mTOR. Therefore, although the amount of leucine present in the groups supplemented with MCa (133 mg, 0.51 g / kg of BW) and PB (143 mg, 0.53 g / kg of BW) was not matched, both groups provided similar and sufficient amounts of circulating leucine to completely activate mTOR, phosphorylate p70S6K and, according to previous studies [21, 38, 41], similarly stimulate protein synthesis. These results provide support for the role of leucine as a key trigger for postprandial stimulation of protein synthesis after supplementation with PB and MCa. In this line, the present study demonstrated a strong positive correlation between plasma leucine levels with mTOR and p70S6K activation.

The importance of p70S6K in muscle physiology has been shown in knockout animals that present muscle atrophy [42]. Marabita et al. [43] showed that p70S6K can independently mediate rapamycin-sensitive muscle growth and is required to increase adult muscle strength in rats. Thus, the phosphorylation and activation of the p70S6k component of the mTOR pathway, as demonstrated in the present study, is essential to promote an anabolic effect on rat skeletal muscle.

Human clinical trials are needed to confirm the observation made in the present study that supplementations of MCa and PB consisting of whey protein and micellar casein cause a similar amino acid response and activation of mTOR signaling. These data suggest that both supplements may be efficient anabolic stimuli for protein synthesis in healthy young subjects. In this line, it is important to emphasize that recently Gorissen et al. [44] demonstrated that ingestion of isolated casein was more efficient in stimulating protein synthesis in older adults compared to isolated whey and

soy protein. Thus, our results also suggest that PB supplementation may possibly be an efficient strategy, like MCa, in the stimulation of protein synthesis in older adults. In addition, another possible advantage is the use of PB in cancer patients where supplementation with a protein blend has shown a positive effect [45]. From an economic point of view, PB supplementation may be a less costly strategy when compared to isolated casein, since the costs of casein production are higher [29]. In addition, casein can be difficult to work with as it is non-water soluble, making PB a more viable and more applicable supplement [29]. More research is needed to confirm that protein blends in general can induce muscle growth in the long-term and whether the results can be replicated in elderly or cancer patients.

CONCLUSION

This study compared the effects of ingestion of PB with MCa alone on aminoacidemia and the mTOR signaling pathway. We demonstrated that both PB and MCa supplementations caused a similar, fast, and transient anabolic status involving the increase in circulating levels of BCAA and the activation of mTOR signaling in rat skeletal muscle. The findings of the present study provide new insights into the effects of protein supplementation for use in sports nutrition and especially under conditions of muscle wasting, such as sarcopenia and cancer.

DECLARATION OF INTEREST

The authors do not have a conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, under Grant 12/18861-0 and 2018/19107-3, and “*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)*” – Finance Code 001. The authors are thankful to Gilberto Padovan and Mônica Meirelles for their contribution in the analyses of amino acids in HPLC.

ABBREVIATIONS

The following abbreviations are used in this manuscript:

BCAA	branch-chain amino acids
MCa	isolated micellar casein
mTOR	mammalian target of rapamycin
PB	protein blend
p70S6K	ribosomal protein S6 kinase
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

REFERENCES

1. Phillips SM. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: Impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009; 34(3):403-410. doi:10.1139/h09-042.
2. Stokes T, Hector AJ, Morton RW, McGlory C, Phillips SM. Recent perspectives regarding the role of dietary protein for the promotion of muscle hypertrophy with resistance exercise training. *Nutrients*. 2018; 10(2). doi:10.3390/nu10020180.
3. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol*. 1997; 273(1 Pt 1):E99-107. doi: 10.1152/ajpendo.1997.273.1.E99.
4. Trommelen J, Holwerda AM, Kouw IW, Langer H, Halson SL, Rollo I, Verdijk LB, LJ VANL. Resistance exercise augments postprandial overnight muscle protein synthesis rates. *Med Sci Sports Exerc*. 2016; 48(12):2517-2525: doi:10.1249/MSS.0000000000001045.
5. Res PT, Groen B, Pennings B, Beelen M, Wallis GA, Gijsen AP, Senden JM, LJ VANL. Protein ingestion before sleep improves postexercise overnight recovery. *Med Sci Sports Exerc*. 2012; 44(8):1560-1569. doi:10.1249/MSS.0b013e31824cc363.
6. Kouw IW, Holwerda AM, Trommelen J, Kramer IF, Bastiaanse J, Halson SL, Wodzig WK, Verdijk LB, van Loon LJ. Protein ingestion before sleep increases overnight muscle protein synthesis rates in healthy older men: A randomized controlled trial. *J Nutr*. 2017; 147(12):2252-2261. doi: 10.3945/jn.117.254532.
7. Snijders T, Res PT, Smeets JS, van Vliet S, van Kranenburg J, Maase K, Kies AK, Verdijk LB, van Loon LJ. Protein ingestion before sleep increases muscle mass and

strength gains during prolonged resistance-type exercise training in healthy young men. *J Nutr*. 2015; 145(6):1178-1184. doi:10.3945/jn.114.208371.

8. Wolfe RR. The role of dietary protein in optimizing muscle mass, function and health outcomes in older individuals. *Br J Nutr*. 2012; 108 Suppl 2:S88-93. doi:10.1017/s0007114512002590.

9. Bauer J, Biolo G, Cederholm T, Cesari M, Cruz-Jentoft AJ, Morley JE, Phillips S, Sieber C, Stehle P, Teta D, Visvanathan R, Volpi E, Boirie Y. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: A position paper from the prot-age study group. *J Am Med Dir Assoc*. 2013; 14(8):542-559. doi:10.1016/j.jamda.2013.05.021.

10. Baum JJ, Wolfe RR: The link between dietary protein intake, skeletal muscle function and health in older adults. *Healthcare (Basel)*. 2015; 3(3):529-543. doi:10.3390/healthcare3030529.

11. Emery PW, Edwards RH, Rennie MJ, Souhami RL, Halliday D. Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984; 289(6445):584-586. doi:10.1136/bmj.289.6445.584.

12. Moore DR, Churchward-Venne TA, Witard O, Breen L, Burd NA, Tipton KD, Phillips SM. Protein ingestion to stimulate myofibrillar protein synthesis requires greater relative protein intakes in healthy older versus younger men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(1):57-62. doi:10.1093/gerona/glu103.

13. Trommelen J, Kow IWK, Holwerda AM, Snijders T, Halson SL, Rollo I, Verdijk LB, van Loon LJC. Presleep dietary protein-derived amino acids are incorporated in myofibrillar protein during postexercise overnight recovery. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018; 314(5):E457-e467. doi:10.1152/ajpendo.00273.2016.

14. Groen BB, Res PT, Pennings B, Hertle E, Senden JM, Saris WH, van Loon LJ. Intra-gastric protein administration stimulates overnight muscle protein synthesis in elderly men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302(1):E52-60. doi:10.1152/ajpendo.00321.2011.
15. Madzima TA, Panton LB, Fretti SK, Kinsey AW, Ormsbee MJ. Night-time consumption of protein or carbohydrate results in increased morning resting energy expenditure in active college-aged men. *Br J Nutr.* 2014; 111(1):71-77. doi:10.1017/s000711451300192x.
16. Snijders T, Trommelen J, Kouw IWK, Holwerda AM, Verdijk LB, van Loon LJC. The impact of pre-sleep protein ingestion on the skeletal muscle adaptive response to exercise in humans: An update. *Front Nutr.* 2019; 6:17. doi: 10.3389/fnut.2019.00017
17. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(26):14930-14935. doi:10.1073/pnas.94.26.14930.
18. Reitelseder S, Agergaard J, Doessing S, Helmark IC, Lund P, Kristensen NB, Frystyk J, Flyvbjerg A, Schjerling P, van Hall G, Kjaer M, Holm L. Whey and casein labeled with l-[1-13c]leucine and muscle protein synthesis: Effect of resistance exercise and protein ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300(1):E231-242. doi:10.1152/ajpendo.00513.2010.
19. Mitchell CJ, McGregor RA, D'Souza RF, Thorstensen EB, Markworth JF, Fanning AC, Poppitt SD, Cameron-Smith D. Consumption of milk protein or whey protein results in a similar increase in muscle protein synthesis in middle aged men. *Nutrients.* 2015; 7(10):8685-8699. doi:10.3390/nu7105420.

20. Hamarsland H, Nordengen AL, Nyvik Aas S, Holte K, Garthe I, Paulsen G, Cotter M, Børsheim E, Benestad HB, Raastad T: Native whey protein with high levels of leucine results in similar post-exercise muscular anabolic responses as regular whey protein: A randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.* 2017; 14:43. doi:10.1186/s12970-017-0202-y.
21. Kanda A, Nakayama K, Sanbongi C, Nagata M, Ikegami S, Itoh H. Effects of whey, caseinate, or milk protein ingestion on muscle protein synthesis after exercise. *Nutrients.* 2016; 8(6). doi:10.3390/nu8060339.
22. Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H, van Loon LJ. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(5):997-1005. doi:10.3945/ajcn.110.008102.
23. Burd NA, Yang Y, Moore DR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. Micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men. *Br J Nutr.* 2012; 108(6):958-962. doi: 10.1017/s0007114511006271.
24. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: Effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol.* 2009; 107(3):987-992. doi: 10.1152/jappphysiol.00076.2009.
25. Drummond MJ, Rasmussen BB. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signalling and human skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; 11(3):222-6. doi:10.1097/MCO.0b013e3282fa17fb.

26. Dijk FJ, van Dijk M, Walrand S, van Loon LJC, van Norren K, Luiking YC. Differential effects of leucine and leucine-enriched whey protein on skeletal muscle protein synthesis in aged mice. *Clin Nutr ESPEN*. 2018; 24:127-133. doi: 10.1016/j.clnesp.2017.12.013.
27. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr*. 2000; 130(10):2413-9. doi:10.1093/jn/130.10.2413.
28. Reidy PT, Walker DK, Dickinson JM, Gundermann DM, Drummond MJ, Timmerman KL, Fry CS, Borack MS, Cope MB, Mukherjea R, Jennings K, Volpi E, Rasmussen BB. Protein blend ingestion following resistance exercise promotes human muscle protein synthesis. *J Nutr*. 2013; 143(4):410-6. doi: 10.3945/jn.112.168021.
29. Paul GL. The rationale for consuming protein blends in sports nutrition. *J Am Coll Nutr*. 2009; 28 Suppl:464s-472s. doi:10.1080/07315724.2009.10718113.
30. Soop M, Nehra V, Henderson GC, Boirie Y, Ford GC, Nair KS. Coingestion of whey protein and casein in a mixed meal: Demonstration of a more sustained anabolic effect of casein. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 303(1):E152-62. doi:10.1152/ajpendo.00106.2012.
31. Hughes GJ, Ryan DJ, Mukherjea R, Schasteen CS. Protein digestibility-corrected amino acid scores (pdcaas) for soy protein isolates and concentrate: Criteria for evaluation. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(23):12707-12. doi: 10.1021/jf203220v.
32. Butteiger D, Cope M, Liu P, Mukherjea R, Volpi E, Rasmussen B, Krul E. A soy, whey and caseinate blend extends postprandial skeletal muscle protein synthesis in rats^{1,2}. *Clin Nutr*. 2013; 32(4):585-59. doi:10.1016/j.clnu.2012.10.001.

33. Huang S, Wang LM, Sivendiran T, Bohrer BM. Review: Amino acid concentration of high protein food products and an overview of the current methods used to determine protein quality. *Crit Rev Food Nutr.* 2018; 58(15):2673-2678. doi:10.1080/10408398.2017.1396202.
34. Traylor DA, Gorissen SHM, Hopper H, Prior T, McGlory C, Phillips SM. Aminoacidemia following ingestion of native whey protein, micellar casein, and a whey-casein blend in young men. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2019; 44(1):103-106. doi:10.1139/apnm-2018-0240.
35. Volpi E, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Mittendorfer B, Wolfe RR. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78(2):250-258. doi:10.1093/ajcn/78.2.250.
36. Rasmussen BB, Tipton KD, Miller SL, Wolf SE, Wolfe RR. An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2000; 88(2):386-392. doi:10.1152/jappl.2000.88.2.386.
37. Wang X, Proud CG. The mtor pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda, Md).* 2006; 21:362-369. doi:10.1152/physiol.00024.2006.
38. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2005; 135(3):376-382. doi:10.1093/jn/135.3.376.
39. Churchward-Venne TA, Burd NA, Mitchell CJ, West DW, Philp A, Marcotte GR, Baker SK, Baar K, Phillips SM. Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: Effects on myofibrillar protein synthesis at rest and

following resistance exercise in men. *J Physiol.* 2012; 590(11):2751-2765. doi:10.1113/jphysiol.2012.228833.

40. Churchward-Venne TA, Breen L, Di Donato DM, Hector AJ, Mitchell CJ, Moore DR, Stellingwerff T, Breuille D, Offord EA, Baker SK, Phillips SM. Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: A double-blind, randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99(2):276-286. doi:10.3945/ajcn.113.068775.

41. Norton LE, Layman DK, Bunpo P, Anthony TG, Brana DV, Garlick PJ. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. *J Nutr.* 2009; 139(6):1103-1109. doi:10.3945/jn.108.103853.

42. Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A, Pende M. Atrophy of s6k1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mtor effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol.* 2005; 7(3):286-294. doi:10.1038/nbc1231.

43. Marabita M, Baraldo M, Solagna F, Ceelen JJM, Sartori R, Nolte H, Nemazanyy I, Pyronnet S, Kruger M, Pende M, Blaauw B. S6k1 is required for increasing skeletal muscle force during hypertrophy. *Cell rep.* 2016; 17(2):501-513. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.020.

44. Gorissen SH, Horstman AM, Franssen R, Crombag JJ, Langer H, Bierau J, Respondek F, van Loon LJ. Ingestion of wheat protein increases in vivo muscle protein synthesis rates in healthy older men in a randomized trial. *J Nutr.* 2016; 146(9):1651-1659. doi:10.3945/jn.116.231340.

45. Deutz NE, Safar A, Schutzler S, Memelink R, Ferrando A, Spencer H, van Helvoort A, Wolfe RR. Muscle protein synthesis in cancer patients can be stimulated with a specially formulated medical food. *Clin Nutr.* 2011; 30(6):759-768. doi:10.1016/j.clnu.2011.05.008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra que as suplementações de PB e MCA antes de dormir resultaram em um estado anabólico rápido, transitório e similar envolvendo o aumento nos níveis circulantes de BCAAs e na ativação

da via de sinalização da mTOR no músculo esquelético de ratos Wistar. Estes resultados oferecem novas implicações na utilização de *blends* de proteínas para a manutenção e o aumento da massa muscular de atletas engajados no exercício de força e potência, contribuindo para uma melhor performance, assim como populações em condições clínicas específicas como indivíduos idosos e pacientes com câncer onde a suplementação de um *blend* de proteínas foi eficiente em estimular a SPM.

REFERÊNCIAS

1. Phillips SM. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009;34(3):403-10.
2. Stokes T, Hector AJ, Morton RW, McGlory C, Phillips SM. Recent Perspectives Regarding the Role of Dietary Protein for the Promotion of Muscle Hypertrophy with Resistance Exercise Training. *Nutrients.* 2018;10(2).

3. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 1):E99-107.
4. Trommelen J, Holwerda AM, Kouw IW, Langer H, Halson SL, Rollo I, et al. Resistance Exercise Augments Postprandial Overnight Muscle Protein Synthesis Rates. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(12):2517-25.
5. Res PT, Groen B, Pennings B, Beelen M, Wallis GA, Gijzen AP, et al. Protein ingestion before sleep improves postexercise overnight recovery. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(8):1560-9.
6. Kouw IW, Holwerda AM, Trommelen J, Kramer IF, Bastiaanse J, Halson SL, et al. Protein Ingestion before Sleep Increases Overnight Muscle Protein Synthesis Rates in Healthy Older Men: A Randomized Controlled Trial. *J Nutr.* 2017;147(12):2252-61.
7. Snijders T, Res PT, Smeets JS, van Vliet S, van Kranenburg J, Maase K, et al. Protein Ingestion before Sleep Increases Muscle Mass and Strength Gains during Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Healthy Young Men. *J Nutr.* 2015;145(6):1178-84.
8. Baum JI, Wolfe RR. The Link between Dietary Protein Intake, Skeletal Muscle Function and Health in Older Adults. *Healthcare (Basel).* 2015. p. 529-43.
9. Bauer J, Biolo G, Cederholm T, Cesari M, Cruz-Jentoft AJ, Morley JE, et al. Evidence-based recommendations for optimal dietary protein intake in older people: a position paper from the PROT-AGE Study Group. *J Am Med Dir Assoc.* 2013;14(8):542-59.

10. Emery PW, Edwards RH, Rennie MJ, Souhami RL, Halliday D. Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6445):584-6.
11. Moore DR, Churchward-Venne TA, Witard O, Breen L, Burd NA, Tipton KD, et al. Protein ingestion to stimulate myofibrillar protein synthesis requires greater relative protein intakes in healthy older versus younger men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(1):57-62.
12. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiological reviews*. 2009;89(2):381-410.
13. Kadar L, Albertsson M, Areberg J, Landberg T, Mattsson S. The prognostic value of body protein in patients with lung cancer. *Ann N Y Sci*. 2000;904:584-91.
14. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107(3):987-92.
15. Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, Tang JE, Glover EI, Wilkinson SB, et al. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):161-8.
16. Reitelseder S, Agergaard J, Doessing S, Helmark IC, Lund P, Kristensen NB, et al. Whey and casein labeled with L-[1-13C]leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(1):E231-42.

17. Gorissen SH, Horstman AM, Franssen R, Crombag JJ, Langer H, Bierau J, et al. Ingestion of Wheat Protein Increases In Vivo Muscle Protein Synthesis Rates in Healthy Older Men in a Randomized Trial. *J Nutr.* 2016;146(9):1651-9.
18. Traylor DA, Gorissen SHM, Hopper H, Prior T, McGlory C, Phillips SM. Aminoacidemia following ingestion of native whey protein, micellar casein, and a whey-casein blend in young men. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2019;44(1):103-6.
19. Kanda A, Nakayama K, Sanbongi C, Nagata M, Ikegami S, Itoh H. Effects of Whey, Caseinate, or Milk Protein Ingestion on Muscle Protein Synthesis after Exercise. *Nutrients.* 2016;8(6).
20. Jager R, Kerksick CM, Campbell BI, Cribb PJ, Wells SD, Skwiat TM, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: protein and exercise. *J Int Soc Sports Nutr* 2017;14:20.
21. Tarnopolski MA, Timmons BW. Protein: Quantity and Quality. In: *Sports Nutrition: Fats and Proteins*, Driskell JA. Boca Raton; London; New York: CRC Press. 2007.p. 110-36.
22. Etzel MR. Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr.* 2004;134(4):996s-1002s.
23. Walzem RL, Dillard CJ, German JB. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2002;42(4):353-75.

24. Churchward-Venne TA, Breen L, Di Donato DM, Hector AJ, Mitchell CJ, Moore DR, et al. Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(2):276-86.
25. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2005;135(3):376-82.
26. Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(2):E381-7.
27. Burd NA, Yang Y, Moore DR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men. *Br J Nutr.* 2012;108(6):958-62.
28. Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijzen AP, Kuipers H, van Loon LJ. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(5):997-1005.
29. Norton LE, Wilson GJ, Layman DK, Moulton CJ, Garlick PJ. Leucine content of dietary proteins is a determinant of postprandial skeletal muscle protein synthesis in adult rats. *Nutr Metab.* 2012;9(1):67.

30. Ten Haaf DSM, Eijsvogels TMH. Protein supplementation improves lean body mass in physically active older adults: a randomized placebo-controlled trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2019;10(2):298-310.
31. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14930-5.
32. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, et al. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(2):E340-8.
33. Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2006;21:362-9.
34. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr*. 2000;130(10):2413-9.
35. Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J Nutr*. 2006;136(1 Suppl):227s-31s.
36. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002;110(2):177-89.

37. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-75.
38. Aspuria PJ, Tamanoi F. The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal*. 2004;16(10):1105-12.
39. Huang J, Manning BD. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*. 2008;412(2):179-90.
40. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*. 2003;5(6):566-71.
41. Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, et al. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol cell*. 2003;11(6):1457-66.
42. Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem*. 2005;280(25):23433-6.
43. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat cell biol*. 2003;5(6):578-81.
44. Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32493-6.
45. Fox PF, Brodtkorb A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *Int Dairy J*. 2008;18:677– 84.

46. Wilson J, Wilson GJ. Contemporary issues in protein requirements and consumption for resistance trained athletes. *J Int Soc Sports Nutr.* 2006;3:7-27.
47. Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, et al. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(5):1452-61.
48. Baum JI, Wolfe RR. The Link between Dietary Protein Intake, Skeletal Muscle Function and Health in Older Adults. *Healthcare.* 2015;3(3):529-43.
49. Haruna Y, Suzuki Y, Kawakubo K, Yanagibori R, Gunji A. Decremental reset in basal metabolism during 20-days bed rest. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1994;616:43-9.
50. Trommelen J, van Loon LJ. Pre-Sleep Protein Ingestion to Improve the Skeletal Muscle Adaptive Response to Exercise Training. *Nutrients.* 2016;8(12).
51. Trommelen J, Kouw IWK, Holwerda AM, Snijders T, Halson SL, Rollo I, et al. Presleep dietary protein-derived amino acids are incorporated in myofibrillar protein during postexercise overnight recovery. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;314(5):E457-e67.
52. Tipton KD, Gurkin BE, Matin S, Wolfe RR. Nonessential amino acids are not necessary to stimulate net muscle protein synthesis in healthy volunteers. *J Nutr Biochem.* 1999;10(2):89-95.
53. Paul GL. The rationale for consuming protein blends in sports nutrition. *J Am Coll Nutr.* 2009;28 Suppl:464s-72s.

54. Reidy PT, Walker DK, Dickinson JM, Gundermann DM, Drummond MJ, Timmerman KL, et al. Protein blend ingestion following resistance exercise promotes human muscle protein synthesis. *J Nutr.* 2013;143(4):410-6.
55. Cockburn E, Stevenson E, Hayes PR, Robson-Ansley P, Howatson G. Effect of milk-based carbohydrate-protein supplement timing on the attenuation of exercise-induced muscle damage. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2010;35(3):270-7.
56. Wojcik JR, Walber-Rankin J, Smith LL, Gwazdauskas FC. Comparison of carbohydrate and milk-based beverages on muscle damage and glycogen following exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2001;11(4):406-19.
57. Watson P, Love TD, Maughan RJ, Shirreffs SM. A comparison of the effects of milk and a carbohydrate-electrolyte drink on the restoration of fluid balance and exercise capacity in a hot, humid environment. *Eur J Appl Physiol.* 2008;104(4):633-42.
58. Butteiger D, Cope M, Liu P, Mukherjea R, Volpi E, Rasmussen B, et al. A soy, whey and caseinate blend extends postprandial skeletal muscle protein synthesis in rats^{1,2}. *Clin Nutr.* 2013;32(4):585-91.