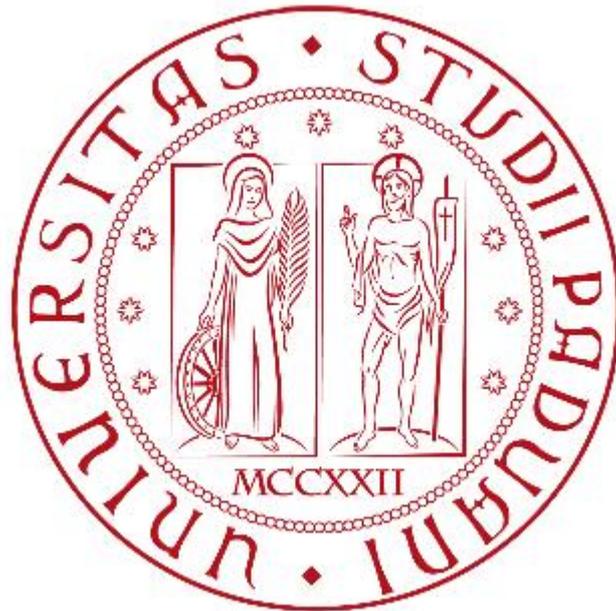


Università degli studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Corso di laurea magistrale in Farmacia



Tesi di laurea

***Razionale della supplementazione
amminoacidica nell'atleta***

Laureando: Alessandro Sturaro

Relatore: Prof. Nicola Sponsiello

Anno accademico: 2023-2024

INDICE

Capitolo I - Integratori alimentari.....	4
1.1. Cosa sono gli integratori alimentari	4
1.2. Mercato degli integratori	5
1.3. Sostanze e preparati vegetali autorizzati	6
Capitolo II - Integratori alimentari aminoacidici.....	8
2.1. Le formulazioni in commercio.....	8
2.1.1. EAA	8
2.1.2. BCAA	10
2.1.3 Proteine in polvere	13
2.1.4 Forme tecniche disponibili sul mercato	14
Capitolo III - Aminoacidi.....	16
3.1. Scoperta e storia degli aminoacidi	16
3.2. Natura chimica e biologica di tali composti	17
3.3. Funzione degli aminoacidi nel corpo umano	22
Capitolo IV - Sintesi proteica.....	23
4.1. Dal DNA all'mRNA: la trascrizione.....	23
4.2. Dall'mRNA agli aminoacidi: la traduzione	25
4.3. Legame peptidico e formazione di proteine.....	27
4.4. Processi di neoformazione muscolare	29
4.4.1 Ipertrofia Muscolare	31
4.4.2 Iperplasia Muscolare.....	32
Capitolo V - Meccanismi di regolazione della sintesi proteica.....	33
5.1. Meccanismi di adattamento fisiologici.....	33
5.2. Aminoacidi nella regolazione dell'espressione proteica	36
5.2.1. Aumento dell'anabolismo proteico.....	36
5.2.2. Diminuzione del catabolismo proteico	43
5.2.3. Aminoacidi vs proteine	47
5.3. Evidenze della supplementazione.....	50
5.3.1. Leucina e contributi aminoacidici	50
5.3.2 Suddivisioni temporali delle assunzioni	52
Capitolo VI - Conclusioni.....	60
Capitolo VII - Bibliografia.....	64
Capitolo VIII - Ringraziamenti.....	83

Capitolo I - Integratori alimentari

1.1. Cosa sono gli integratori alimentari

Gli integratori alimentari sono definiti dalla normativa di settore (Direttiva 2002/46/CE, attuata con il decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169) come: "i prodotti alimentari destinati ad integrare la comune dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali le vitamine e i minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare ma non in via esclusiva aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate". Sono quindi dei prodotti considerati a tutti gli effetti degli alimenti, ma venduti in forme predosate, destinati ad essere assunti in piccole quantità, per integrare la normale dieta alimentare.

I termini: "complemento alimentare" e "supplemento alimentare" sono considerati come sinonimi di "integratore alimentare".

La normazione degli alimenti in Italia fonda le sue origini nel TULS del 1934, in cui gli alimenti venivano inquadrati come quei prodotti che l'organismo necessita per nutrirsi. Da tale data si sono poi susseguite numerose modifiche legislative, che hanno permesso di giungere fino alla definizione accettata in data odierna, ovvero quella sancita dal Regolamento (CE) n. 178/2002, in cui si stabilisce l'alimento come: "qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito, o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito, da esseri umani. Sono comprese le bevande, le gomme da masticare e qualsiasi sostanza, compresa l'acqua, intenzionalmente incorporata negli alimenti nel corso della loro produzione, preparazione o trattamento."

Diversamente dagli alimenti di uso comune, gli integratori devono essere prodotti in officine autorizzate dal Ministero della Salute tramite un'autorizzazione alla produzione. Inoltre, per poter garantire una legale commercializzazione di questi prodotti, l'impresa produttrice deve provvedere a notificare il Ministero della Salute, indicando la natura del prodotto e la relativa etichettatura. Gli integratori alimentari per i quali la procedura ha esito positivo, vengono inclusi in un registro che il Ministero della Salute pubblica ed aggiorna periodicamente.

1.2. Mercato degli integratori

Il mercato degli integratori alimentari ha subito notevoli cambiamenti negli ultimi decenni, che in linea generale sono stati caratterizzati da una crescita significativa e da nuove tendenze di marketing.

Uno dei principali motori che ha permesso l'aumento della popolarità e del consumo degli integratori, è stato l'aumento della consapevolezza della popolazione nei confronti della salute e del benessere personale. Ciò ha portato infatti i consumatori a ricercare prodotti per integrare la loro dieta e per affrontare specifiche esigenze nutrizionali e fisiologiche. Questo fenomeno è particolarmente evidente tra le popolazioni più anziane e nei Paesi con un'infrastruttura sanitaria avanzata come gli Stati Uniti e l'Europa.

Una delle principali tendenze, è l'aumento della domanda di integratori come probiotici, vitamine D e C, o più in generale di prodotti per il potenziamento del sistema immunitario, fenomeno che è stato particolarmente accentuato durante la pandemia di COVID-19, tanto che gli integratori vitaminici hanno raggiunto la quota del 25% del valore del mercato globale. (74)

Al giorno d'oggi gli integratori alimentari presenti in commercio rappresentano un mercato molto ampio e con un peso economico importante, tanto che secondo una

recente ricerca del Future Concept Lab, quasi 30 milioni di italiani adulti (73% degli intervistati) hanno assunto integratori alimentari almeno una volta nel corso del 2023. Ecco che questi numeri sono traducibili in un fatturato nazionale di oltre 4 miliardi di euro per il 2022, numeri molto importanti, grazie anche al fatto che l'Italia risulta essere il Paese leader del mercato Europeo degli integratori, con un volume vendite che si attesta al 29% del valore totale del mercato Europeo (72).

In tutti gli Stati membri dell'Unione, comunque, gli integratori alimentari risultano caratterizzati da una domanda d'acquisto sempre maggiore, cresciuta in Italia del 60% nell'arco dell'ultimo decennio, e con previsione di superare i 5 miliardi di fatturato nel 2025.

Tra le categorie più richieste dai consumatori, al primo posto si trovano gli integratori a base di probiotici, che si riconfermano come 10 anni fa, la tipologia maggiormente popolare, con 26,5 milioni di confezioni vendute (+40% rispetto al 2013). Seguono i sali minerali, che si attestano a 14 milioni di confezioni e le vitamine che, con 13,1 milioni di vendite, sono il prodotto che ha compiuto il passo in avanti più grande (+157% in 10 anni). Completano il quarto e quinto posto i prodotti per la tosse ed i lassativi, che si attestano rispettivamente a 11,8 milioni di confezioni vendute (73).

1.3. Sostanze e preparati vegetali autorizzati

Il Decreto Legislativo 169/2004, è stato successivamente modificato dal Decreto del Ministero della Salute del 10 agosto 2018, relativo alla "Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali".

Il mercato degli integratori è molto ampio ed una fetta importante risulta occupata dalle sostanze ed i preparati vegetali a base di piante, alghe, funghi o licheni. Questa ampia categoria di preparati ricade sotto il termine, coniato dall'EFSA, di "Botanicals".

Per quanto riguarda l'impiego di queste categorie di sostanze e preparati, il quadro normativo di riferimento risulta essere il DM 9 luglio 2012.

Un'importante revisione di quelle che sono le componenti autorizzate negli integratori alimentari, è avvenuta con il decreto 9 gennaio 2019, il quale riporta l'elenco completo dei preparati vegetali impiegabili negli integratori alimentari. Vengono inoltre riportate le indicazioni di riferimento ammesse per gli effetti fisiologici. Per quanto concerne l'impiego di vitamine e Sali minerali l'autorità fa invece riferimento al regolamento CE 1170/2009, documento in cui si trovano quelle che tra tali sostanze, sono ammesse nella fabbricazione di integratori alimentari a livello europeo. Infine, L'elenco "Altri nutrienti e altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico", da considerarsi comunque non esaustivo, include nutrienti differenti dalle vitamine e dai minerali, nonché altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico, ammessi nella composizione degli integratori alimentari. Ove stabiliti, sono indicati anche i limiti di apporto ammessi con la dose giornaliera e le avvertenze supplementari.

Occorre comunque ricordare che qualsiasi sostanza, per potere essere utilizzata all'interno della formulazione di un integratore alimentare, deve essere stata consumata in maniera significativa all'interno dell'UE, in data antecedente al maggio 1997. Questo, infatti, secondo la normativa vigente, costituisce prova di sicurezza e legittima l'impiego della sostanza, in quanto intrinsecamente sicura.

Nei casi in cui questa condizione non è verificata, la sostanza verrà invece classificata come "novel food", ovvero come un alimento di nuova concezione, che ricade quindi sotto la normazione del Regolamento 2283 del 2015.

La sostanza in questione per potere essere impiegata nella formulazione di un integratore alimentare, dovrà quindi ottenere un'autorizzazione a livello comunitario, al fine di garantirne un impiego sicuro.

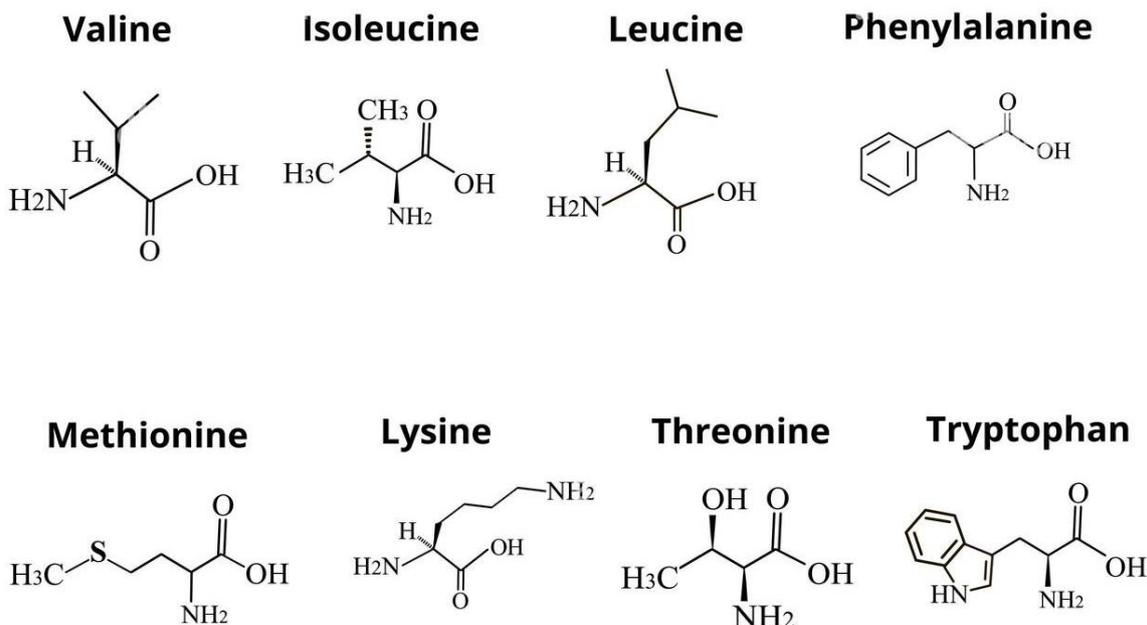
Caso diverso risulta essere quando il consumo pregresso di una sostanza è avvenuto solamente all'interno di integratori. In tal caso dovrà essere applicato il Regolamento CE 258 1997.

Capitolo II - Integratori alimentari amminoacidici

2.1. Le formulazioni in commercio

2.1.1. EAA

Gli aminoacidi essenziali (EAA, Essential Amino Acids) sono un gruppo di aminoacidi che non possono essere sintetizzati in modo endogeno dall'organismo umano e devono quindi essere introdotti attraverso la dieta. Sono riconosciuti nove aminoacidi essenziali nell'uomo, rappresentati da: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e istidina. Tuttavia, l'istidina non è presente negli adulti né in età adolescenziale, bensì si trova a fare parte del corredo amminoacidico solo durante la prima infanzia. Tra questi aminoacidi, leucina, isoleucina e valina, noti come aminoacidi a catena ramificata (BCAA), sono particolarmente importanti per il metabolismo muscolare e sono ampiamente studiati nel contesto dell'attività fisica e del recupero muscolare.



La ragione per cui il corpo umano non può sintetizzare gli EAA risiede nelle specificità delle vie metaboliche coinvolte nella loro biosintesi. Gli organismi autotrofi, come le piante, possiedono vie metaboliche complesse che consentono loro di sintetizzare tutti gli aminoacidi necessari a partire da precursori inorganici o da composti organici semplici. Al contrario, gli esseri umani e altri animali hanno perso queste vie enzimatiche nel corso dell'evoluzione, in quanto la sintesi di questi aminoacidi richiede una notevole quantità di energia e risorse.

In particolare, la sintesi degli EAA richiede numerose reazioni enzimatiche complesse che coinvolgono composti come acidi grassi e intermedi del ciclo dell'acido citrico. Questi processi necessitano cofattori e substrati che non sono facilmente disponibili o che sono destinati ad altri processi vitali nel corpo umano. Di conseguenza, gli esseri umani sono evolutivamente dipendenti dall'acquisizione di questi aminoacidi direttamente dalla dieta.

Le principali fonti alimentari di EAA includono proteine di origine animale, come carne, pesce, uova e latticini, nonché alcune fonti vegetali, come la soia e la quinoa, che contengono profili amminoacidici completi.

Dato che gli amminoacidi sono raramente introdotti come singole componenti, ma sempre sottoforma di proteine più complesse, risulta difficile determinare le quantità che rappresentano il fabbisogno giornaliero medio. I requisiti medi sono comunque stati stimati dal report WHO/FAO/UNU (2007):

Mean requirements for indispensable amino acids in adults (WHO/FAO/UNU, 2007).

	mg/kg x d ⁻¹		mg/kg x d ⁻¹
Histidine	10	Phenylalanine+tyrosine	25
Isoleucine	20	Threonine	15
Leucine	39	Tryptophan	4
Lysine	30	Valine	26
Methionine+cysteine	15 ¹	Total	184
<i>methionine</i>	10.4		
<i>cysteine</i>	4.1		

¹ resulting from rounding

2.1.2. BCAA

Con BCAA (Breachhead chain amino acids) si intende un pool di tre amminoacidi essenziali: leucina, isoleucina e valina; che risultano quindi essere un sottogruppo degli EAA.

Il nome deriva dalla catena alifatica laterale che questi presentano, caratterizzata da una conformazione non lineare (breached). Questi amminoacidi costituiscono un supplemento alimentare molto popolare tra gli sportivi: il razionale del loro utilizzo si basa sul fatto che questi sembrano capaci di poter aumentare la sintesi proteica a livello muscolare (SPM) ed al contempo diminuire il catabolismo proteico in tale sede (CPM). L'insieme di queste due funzioni si traduce in un incremento netto della massa muscolare.

I BCAA sono disponibili in commercio in diversi rapporti che rispondono a specifiche esigenze nutrizionali e di allenamento. I rapporti più comuni si riferiscono a quello di leucina rispetto a isoleucina e valina. La prima, è considerata l'aminoacido

maggiormente capace dello stimolo anabolico, è quindi spesso presente in quantità maggiori.

- Rapporto 2:1:1

Questo è il rapporto più comune e tradizionale di BCAA disponibile sul mercato. È basato sull'equilibrio naturale presente in molte fonti alimentari di proteine.

Favorisce un equilibrio tra l'efficacia anabolica della leucina e il supporto metabolico fornito da isoleucina e valina. È ampiamente utilizzato sia da atleti che da persone che cercano un supporto generale alla sintesi proteica.

- Rapporto 4:1:1

In questo rapporto, la quantità di leucina è aumentata rispetto al rapporto 2:1:1.

Può essere particolarmente utile per chi desidera massimizzare l'anabolismo muscolare, poiché la leucina ha un ruolo chiave nel segnalare l'inizio della sintesi proteica.

- Rapporto 8:1:1

Questo rapporto enfatizza ancora di più la leucina, con una concentrazione otto volte superiore rispetto a isoleucina e valina.

È destinato principalmente a coloro che cercano un forte stimolo anabolico e un supporto alla crescita muscolare. Tuttavia, l'eccesso di leucina potrebbe non essere necessario per tutti gli utenti e potrebbe non essere l'opzione migliore per chi cerca un'integrazione bilanciata.

- Rapporto 10:1:1

È uno dei rapporti più estremi, con una predominanza marcata di leucina.

Progettato per atleti che desiderano massimizzare l'anabolismo muscolare. Tuttavia, l'efficacia aggiuntiva rispetto a rapporti meno sbilanciati è ancora oggetto di dibattito scientifico.

Complessivamente, possiamo affermare che il rapporto di BCAA dipende dagli obiettivi individuali, dal tipo di allenamento e dalla dieta complessiva. Sebbene la leucina sia cruciale per la sintesi proteica, un eccesso potrebbe non garantire risultati migliori e potrebbe sbilanciare l'assunzione degli altri aminoacidi essenziali. Isoleucina e valina, giocano ruoli importanti nel metabolismo energetico e nella regolazione del glucosio. Inoltre, è importante considerare che un'integrazione troppo elevata di leucina potrebbe aumentare il rischio di eccesso di azoto che deve essere eliminato dall'organismo, potenzialmente sovraccaricando i reni, specialmente in persone con problemi renali preesistenti.

I BCAA sono contenuti in qualunque alimento di uso comune, con le più alte concentrazioni (rispetto alla quota amminoacidica totale) in latte (26%), uova (22%) e granoturco (21%). Le linee guida fornite dalla WHO (World Health Organization) raccomandano un intake giornaliero di $85 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ di questi aminoacidi.

Nello specifico: leucina $39 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$; isoleucina $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$; valina $26 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ per adulti sani (81).

Tuttavia, nuove evidenze ottenute utilizzando la tecnica dell'indicatore dell'ossidazione amminoacidica IAAO, raccomandano dosaggi ben più elevati: $\sim 337 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ per atleti di resistenza di sesso femminile (1), $440 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ per quelli di sesso maschile (2) e per entrambi i sessi le dosi aumentano in atleti di endurance (3).

Studiando questi dati bisogna comunque ricordare che la tecnica IAAO tiene conto dell'assunzione degli aminoacidi come tali e non come proteine intatte, il che si traduce in un assorbimento più rapido ed una maggiore disponibilità plasmatica in seguito ad allenamento (4). Inoltre, lo schema di assunzione IAAO prevede un'assunzione a determinati intervalli temporali, che non rispecchia i normali schemi di assunzione degli alimenti (5).

2.1.3 Proteine in polvere

Le proteine in polvere costituiscono un supplemento alimentare comunemente impiegato da atleti e sportivi amatoriali; tuttavia, trovano ampio impiego anche in ambito clinico: vengono infatti utilizzate per l'integrazione della normale dieta in soggetti anziani, disfagici, in presenza di malnutrizione o per supportare pazienti con patologie croniche.

Esistono diverse forme di proteine in polvere in commercio, classificate principalmente in base alla loro origine e al processo di produzione. Per quanto concerne l'origine, le più comuni sono le proteine del siero di latte (o whey): questi supplementi sono caratterizzati dal rapido assorbimento, dall'elevato contenuto di aminoacidi essenziali (soprattutto di leucina) e dalla presenza di caseina, una proteina a lento rilascio che fornisce un apporto costante di aminoacidi nel tempo.

Si trovano però anche formulazioni in polvere ottenute a partire dalle proteine dell'uovo, considerate la più nobile fonte proteica per via del loro eccellente profilo amminoacidico e della facile digestione.

Ancora, sono presenti proteine in polvere ricavate da proteine vegetali, come quelle derivate da soia, pisello, riso e canapa, che rappresentano un'alternativa per vegani, vegetariani o persone intolleranti al lattosio.

I diversi processi produttivi a livello industriale permettono di ottenere proteine in polvere che sottendano diverse caratteristiche nutrizionali:

Le proteine concentrate rappresentano la forma tecnicamente più semplice da realizzare, sono le più economiche e le meno lavorate.

Questi supplementi sono ottenuti tramite un processo di filtrazione meccanica del latte, che rimuove parte del contenuto di grassi e carboidrati, mantenendo però una certa percentuale di questi macronutrienti. Generalmente, contengono concentrazioni del

70-80% di proteine, con il restante 20%-30% costituito da grassi, carboidrati (incluso il lattosio) e minerali. Per chi è intollerante al lattosio o segue un regime alimentare con ridotto contenuto di carboidrati o grassi, le proteine concentrate potrebbero non essere l'opzione ideale.

Le proteine isolate sono una forma più purificata rispetto alle proteine concentrate, ottenute attraverso processi di microfiltrazione o scambio ionico capaci di rimuovere quasi totalmente grassi e carboidrati, incluse tracce di lattosio, garantendo un contenuto proteico che supera il 90%. Questo le rende particolarmente adatte a soggetti intolleranti al lattosio o con esigenze specifiche di alimentazione a ridotto contenuto di grassi e carboidrati. Sono comunemente utilizzate dagli atleti nel post-allenamento grazie alla loro rapida digeribilità. La lavorazione più complessa e l'elevata purezza tendono tuttavia a renderle più costose.

Le proteine idrolizzate, sono proteine isolate sottoposte ad un processo di idrolisi capace di frammentare le catene proteiche in peptidi di dimensioni ridotte. Tale processo imita il naturale processo digestivo delle proteine, rendendole estremamente rapide da assorbire e altamente biodisponibili. Nonostante i vantaggi legati alla velocità di assorbimento, le proteine idrolizzate tendono ad avere un sapore più amaro ed un costo significativamente più elevato, dovuto al processo tecnologico avanzato necessario per la loro produzione.

2.1.4 Forme tecniche disponibili sul mercato

Gli integratori alimentari proteici si trovano comunemente in commercio sottoforma di polveri. Quelli a base amminoacidica, invece, sia che siano formulazioni a base di EAA che di BCAA, si possono trovare in commercio in diverse forme tecnologiche, ognuna delle quali presenta i propri vantaggi e caratteristiche.

- Polveri:

Le polveri di EAA e proteine del latte sono tra le formulazioni più comuni. Possono essere miscelate con acqua o altri liquidi e sono spesso assunte prima, durante o dopo l'allenamento per massimizzare la disponibilità di aminoacidi essenziali, la cui presenza in circolo ed intramuscolo risulta fondamentale per permettere i processi di ipertrofia muscolare che seguono l'allenamento fisico.

Offrono flessibilità nel dosaggio e possono essere aromatizzate in vari gusti per migliorarne il sapore. Sono facili da combinare con altri integratori, come creatina o BCAA.

- Capsule e Compresse

Gli EAA in capsule o compresse offrono una modalità di assunzione comoda e precisa, particolarmente utile per chi preferisce evitare polveri o per chi ha bisogno di un dosaggio preciso durante il giorno.

Ideali per chi è in movimento o non ha accesso immediato a liquidi per miscelare polveri.

- Bevande Pronte

Le bevande pronte a base di EAA sono soluzioni pre-miscelate, disponibili in lattine o bottiglie, e sono progettate per essere consumate rapidamente e convenientemente. Presentano massima praticità e disponibilità e sono ideali per il consumo sia pre- che post- allenamento; tuttavia, spesso richiedono di essere conservate in frigorifero per via della minore stabilità. Sono spesso arricchite con elettroliti e altre sostanze nutritive per migliorare il recupero e la reidratazione.

- Formulazioni in Polvere con Ingredienti Aggiuntivi

Molti prodotti combinano EAA con altri ingredienti come BCAA, elettroliti, vitamine, minerali, o stimolanti come la caffeina per migliorare l'energia e il recupero.

Forniscono un supporto più completo durante l'allenamento, combinando i benefici degli EAA con altre sostanze che migliorano la performance o il recupero.

- **Polveri Aromatizzate Senza Zucchero**

Queste formulazioni sono aromatizzate ma non contengono zucchero, utilizzando invece dolcificanti naturali o artificiali per mantenere un profilo calorico basso.

Ideali per chi è in dieta o vuole evitare zuccheri aggiunti, mantenendo comunque un'esperienza di consumo piacevole. Occorre comunque ricordare che i dolcificanti artificiali, se assunti in eccessive quantità, non risultano salutari per l'organismo.

- **Barrette e Snack**

Alcuni snack proteici sono formulati sotto forma di barrette o masticabili, offrendo una comoda alternativa alla polvere o alle capsule.

Combinano il supporto proteico con un apporto calorico e di nutrienti più sostanziale, utile per uno spuntino post-allenamento o come sostitutivo di un pasto leggero.

Capitolo III - Amminoacidi

3.1. Scoperta e storia degli amminoacidi

La scoperta degli amminoacidi risale al 1806, anno in cui i chimici francesi Louis-Nicolas Vauquelin e Pierre Jean Robiquet riuscirono nell'impresa di isolare il primo amminoacido in assoluto. Questa scoperta avvenne quando i chimici, durante i loro studi sulle piante di asparagi, lasciarono per alcuni giorni nel loro laboratorio del succo concentrato di asparagi ottenuto per evaporazione. I chimici si trovarono di fronte a numerosi cristalli, la cui identificazione risultava particolarmente estrusa: tale prodotto non rilasciava alcuna cenere in seguito a combustione e quando trattato con acido nitrico, si decomponeva con rilascio di azoto. Identificarono questi cristalli con il nome

di "asparagina". Seguirono poi diverse ricerche in merito e verso la metà del diciottesimo secolo venne identificato anche l'acido aspartico.

Seguì successivamente la scoperta della cisteina, nel 1810, ad opera di Wollaston, contenuta all'interno dei calcoli renali.

Una scoperta molto interessante e che caratterizzerà il mondo orientale, fu invece quella del glutammato. Il chimico Ritthausen lo isolò dal glutine di grano nel 1866 (da qui il nome) e successivamente, nel 1908 il Giapponese Ikeda correlò questo amminoacido al caratteristico sapore umami di alcuni piatti orientali. Da questa scoperta iniziarono grandi ricerche in Giappone e nel mondo Asiatico, per ottenere maggiori informazioni su quali altre proprietà, oltre a quelle culinarie, avessero gli amminoacidi.

La ricerca proseguì per più di un secolo, fino al 1935, quando Cumming William Rose identificò come ultimo dei venti amminoacidi proteinogenici la treonina.

Durante i suoi studi, Rose riuscì anche ad identificare quali fossero gli otto amminoacidi essenziali nell'adulto e ne determinò anche il fabbisogno giornaliero minimo per l'essere umano.

3.2. Natura chimica e biologica di tali composti

Con il termine "amminoacidi" si intende una vasta classe di molecole organiche, accumulate esclusivamente dal fatto di essere costituite da un gruppo amminico ($-NH_2$), un gruppo carbossilico ($-COOH$), un atomo di idrogeno e una catena laterale distintiva (R) legata allo stesso atomo di carbonio centrale, chiamato carbonio α .

La varietà nella struttura della catena laterale R determina le proprietà chimiche e fisiche degli amminoacidi e, di conseguenza, delle proteine di cui fanno parte.

Le caratteristiche di basicità del gruppo amminico e di acidità del gruppo carbossilico determinano alcune delle caratteristiche peculiari degli amminoacidi, quali

l'anfotericità e la possibilità di passare dalla forma zwitterionica a quella carica; ma soprattutto quella di poter formare legami chimici di tipo peptidico.

Il prodotto che si ottiene in seguito alla formazione di questo legame prende il nome di dipeptide e dalla continua condensazione successiva di diversi amminoacidi si arriva ad ottenere una proteina.

A data odierna sono conosciute diverse centinaia di amminoacidi, ma tutte le proteine costituenti ogni organismo vivente conosciuto sono formate da un pool di soli ventidue amminoacidi, che prendono il nome di amminoacidi proteinogenici, ognuno dei quali è codificato da determinate triplette di basi azotate a livello genetico.

Gli amminoacidi proteinogenici, sono tutti α -amminoacidi, ovvero presentano il gruppo amminico legato al carbonio numero 2 della catena principale.

Molecole di natura amminoacidica ma che non rientrano tra le proteine, possono presentare tale gruppo legato anche in posizioni diverse, un esempio risulta essere l'acido γ -amminobutirrico (GABA): un neurotrasmettitore ad azione inibitoria che presenta il gruppo amminico legato al C in posizione 4.

Occorre ricordare che gli amminoacidi sono tutti delle molecole chirali (con la sola eccezione della glicina) e che quindi possono essere raffigurati come molecole attraverso le proiezioni di Fischer. In questa rappresentazione, ogni amminoacido può esistere in conformazione L o D.

Questo si verifica in quanto il carbonio α è un atomo chirale a cui si trovano legati quattro sostituenti diversi. Tale carbonio prende il nome di centro stereogenico, in quanto in base alla geometria con cui vi si legano i diversi sostituenti si possono generare diversi stereoisomeri.

La configurazione va attribuita in base alla posizione del gruppo amminico che si trova legato al primo carbonio chirale α : se si trova a sinistra del carbonio, l'amminoacido sarà in conformazione L e viceversa.

In natura gli amminoacidi si trovano quasi per la totalità in conformazione L. Esistono alcune eccezioni a questa affermazione nel mondo procariotico, come ad esempio, il peptidoglicano batterico che è costituito da D-alanina.

I 20 amminoacidi standard sono codificati geneticamente ed utilizzati nella sintesi proteica. A questi si aggiungono il 21° amminoacido rappresentato dalla selenocisteina ed il 22°, o pirrolisina, in quanto sono prodotti da codoni di mRNA formati dalla tripletta UGA, che normalmente codifica per lo stop della traduzione proteica, ma che in presenza di particolari sequenze nucleotidiche, può codificare per tali amminoacidi.

I 20 amminoacidi standard possono essere classificati in tre categorie principali:

Amminoacidi essenziali: non possono essere sintetizzati dall'organismo umano in quantità sufficienti e devono quindi essere ottenuti attraverso la dieta. I principali sono:

- Leucina
- Isoleucina
- Valina
- Lisina
- Metionina
- Fenilalanina
- Treonina
- Triptofano
- Istidina

Amminoacidi non essenziali: possono essere sintetizzati dal corpo umano e non è quindi indispensabile assumerli tramite l'alimentazione. Sono rappresentati da:

- Alanina
- Asparagina
- Acido aspartico

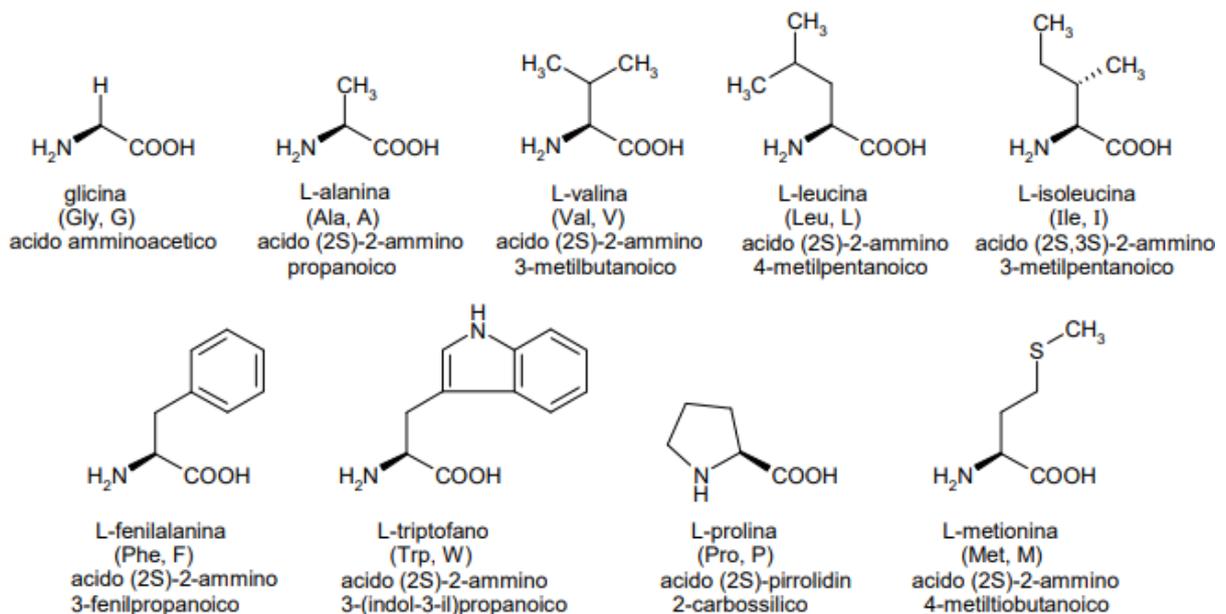
- Acido glutammico
- Serina

Amminoacidi condizionalmente essenziali: in condizioni fisiologiche non sono essenziali, ma possono divenirlo in determinate condizioni patologiche, durante periodi di rapida crescita o di stress metabolico. Tra questi vi sono:

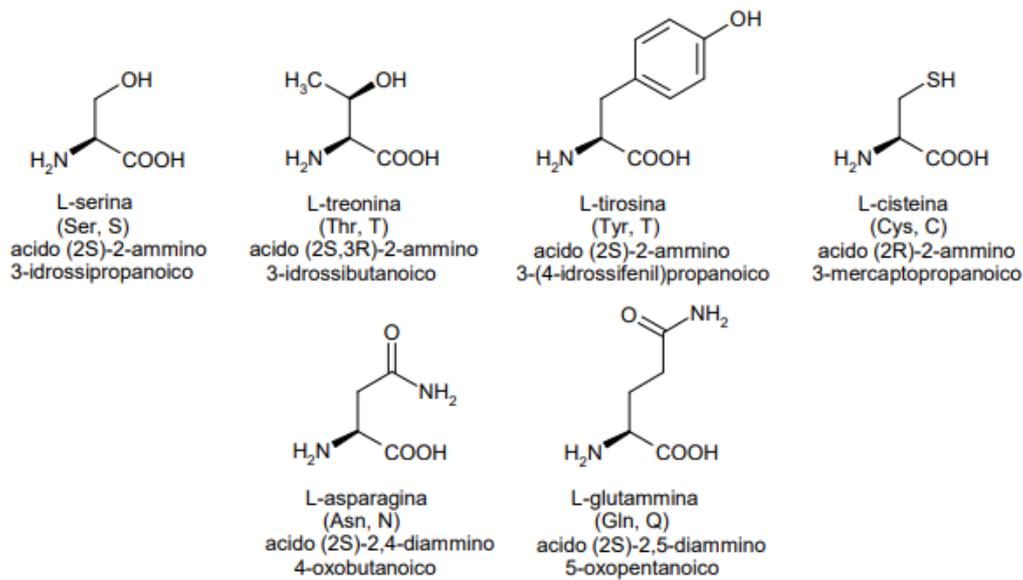
- Arginina
- Cisteina
- Glutammina
- Glicina
- Prolina
- Tirosina

Dal punto di vista della struttura chimica, gli amminoacidi si differenziano l'uno dall'altro per via della struttura della catena laterale L, che risulta altamente variabile. Possono essere infatti suddivisi in quattro categorie:

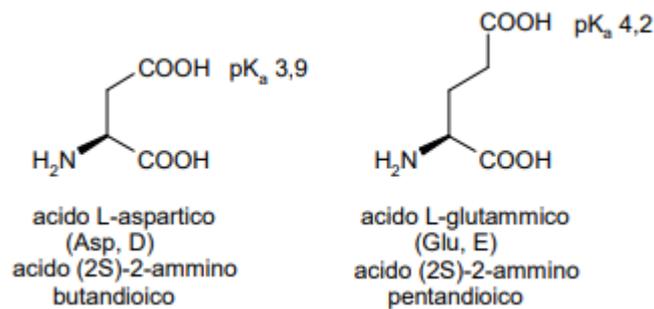
Amminoacidi apolari: appartengono a questo gruppo nove amminoacidi



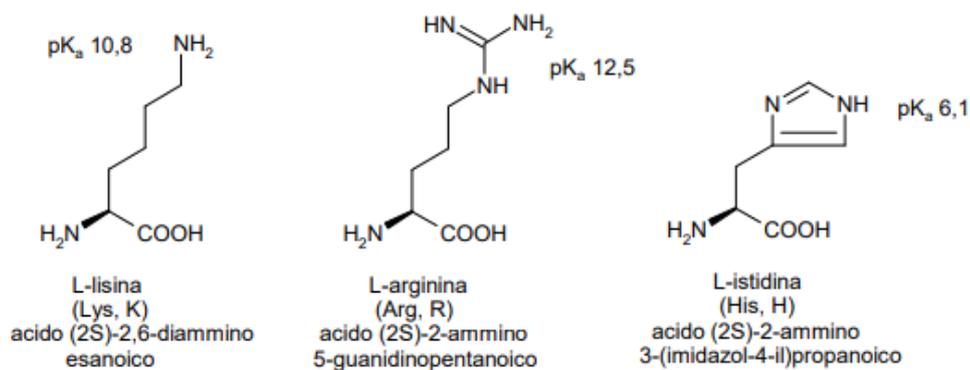
Amminoacidi polari: il gruppo è composto da sei molecole



Amminoacidi acidi: vi fanno parte due amminoacidi, classificati come acidi deboli



Amminoacidi basici: vi si ritrovano i seguenti tre amminoacidi



3.3. Funzione degli amminoacidi nel corpo umano

Gli amminoacidi rivestono un ruolo poliedrico ed imprescindibile all'interno dell'organismo umano, partecipando a numerosi processi biochimici fondamentali:

Biosintesi Proteica: gli amminoacidi costituiscono i monomeri delle proteine, polimeri organici essenziali per l'architettura strutturale, la funzionalità e la regolazione dei vari tessuti e organi degli esseri viventi. Ogni proteina è caratterizzata da una sequenza specifica di residui amminoacidici, la quale ne determina la conformazione tridimensionale e, di conseguenza, la funzione fisiologica.

Produzione Enzimatica: gli enzimi, che agiscono come catalizzatori delle reazioni biochimiche, sono generalmente proteine la cui attività è indispensabile per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. In assenza di questi, numerose reazioni metaboliche risulterebbero estremamente lente o inibite, tanto da risultare incompatibili con la vita.

Regolazione del Metabolismo: alcuni amminoacidi fungono da precursori per la sintesi di importanti molecole segnale, come ormoni e neurotrasmettitori. Ad esempio, la fenilalanina è il precursore della dopamina, un neurotrasmettitore chiave nel sistema nervoso centrale, mentre il triptofano è essenziale per la sintesi della serotonina, implicata nella regolazione dell'umore.

Sostegno del Sistema Immunitario: amminoacidi come la glutammina svolgono un ruolo cruciale nel supporto delle funzioni immunitarie, facilitando la sintesi di nucleotidi e altre molecole bioattive necessarie per la proliferazione e l'attivazione delle cellule immunitarie.

Generazione di Energia: in condizioni di deficit energetico, gli amminoacidi possono essere catabolizzati attraverso un processo di deaminazione e successiva conversione in intermedi del ciclo dell'acido citrico, contribuendo così alla produzione di ATP, la principale valuta energetica della cellula.

L'importanza biochimica e fisiologica degli amminoacidi è quindi innegabile, in quanto costituiscono gli elementi fondamentali per la sostenibilità della vita e per l'efficienza dei processi metabolici cellulari.

Capitolo IV - Sintesi proteica

4.1. Dal DNA all'mRNA: la trascrizione

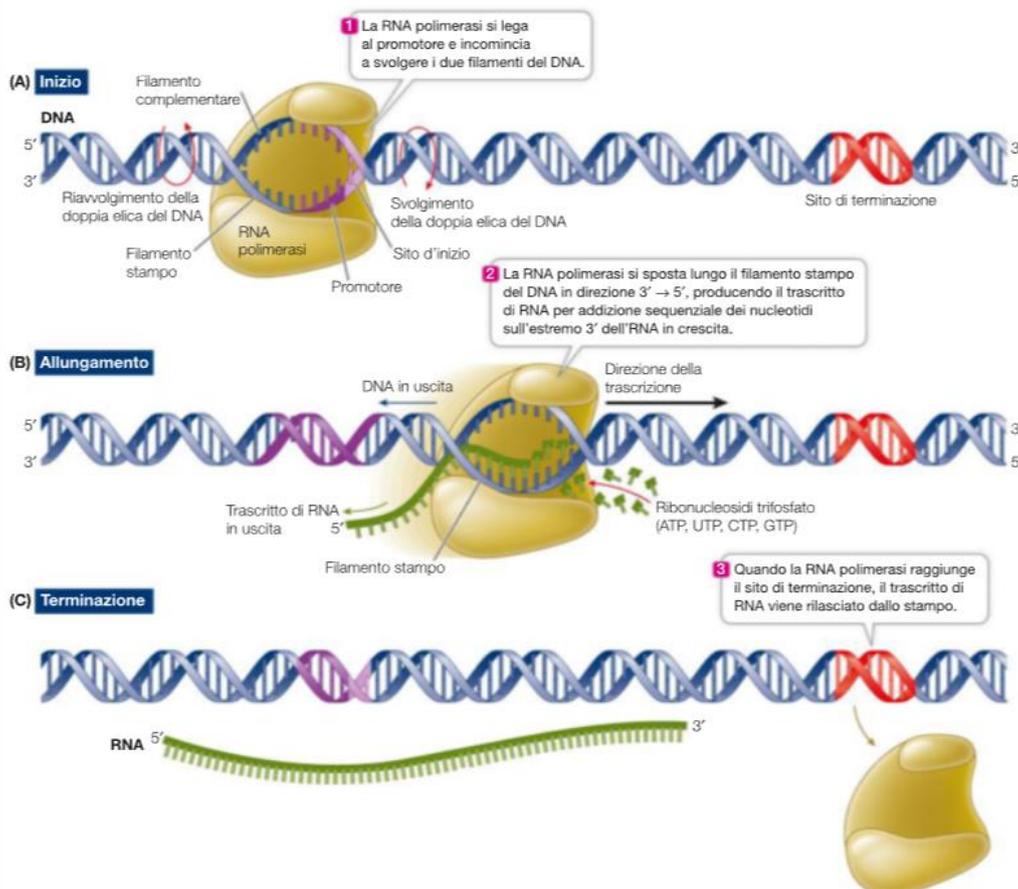
Francis Crick e James Watson furono due personaggi cardine per quanto riguarda lo studio del materiale genetico. I due scienziati riuscirono infatti nella scoperta di indentificare il DNA come portatore dell'informazione genetica e come questo possa essere utilizzato per la produzione di proteine. Quando un particolare gene viene espresso, uno dei due filamenti di è utilizzato come stampo per produrre una copia complementare di RNA, che viene processata fino ad ottenere un filamento di RNA messaggero (o mRNA) maturo. L'mRNA prodotto è esattamente complementare al filamento di DNA stampo, con la sola differenza che nel primo le basi pirimidiniche di timina (T), risultano sostituite da quelle di uracile (U) e che lo scheletro zuccherino costituente l'RNA è formato dal ribosio invece che dal desossiribosio.

Nelle cellule eucariotiche questo mRNA viaggia dal nucleo al citoplasma. Qui, in base alla sequenza per cui questo filamento codifica, verrà tradotto in un polipeptide.

Perché possa aver inizio il processo di trascrizione, risulta necessaria la presenza di diversi elementi:

- Un filamento di DNA che funge da stampo per il successivo appaiamento delle basi
- La presenza dei quattro ribonucleosidi trifosfato: ATP, GTP, CTP ed UTP
- La presenza di enzimi RNA polimerasi
- La regolazione da parte dei fattori di trascrizione
- Sistemi tampone per garantire le appropriate condizioni chimiche per l'avvenimento della reazione.

Il processo di allungamento ha inizio con il legame di RNAPol II a livello della regione promotoriale (nel dettaglio, con la regione TATA-box). È solo in seguito a legame avvenuto che può iniziare la fase di allungamento: la RNA polimerasi, svolge il DNA andando a creare la cosiddetta bolla di trascrizione. Abbina quindi al filamento stampo le basi complementari che andranno a formare il nuovo filamento in direzione 5'-3'. L'energia necessaria all'allungamento risiede negli stessi nucleosidi: per via del fatto che i nucleosidi utilizzati sono trifosfato, l'energia generata dal rilascio di due gruppi fosfato, catalizza la formazione del nuovo legame fosfodiesterico.



Lo splicing dell'RNA avviene contemporaneamente alla sua sintesi per via di un complesso associato al dominio C-terminale di RNAPol II. Negli eucarioti è infatti necessario rimuovere gli introni per ottenere RNA maturo.

Successivamente alla fase di allungamento, proprio come specifiche sequenze catalizzano l'inizio di questa, altre ne catalizzano la terminazione. Questa avviene con metodologie differenti in base alla tipologia di RNAPol che ha svolto l'allungamento (209).

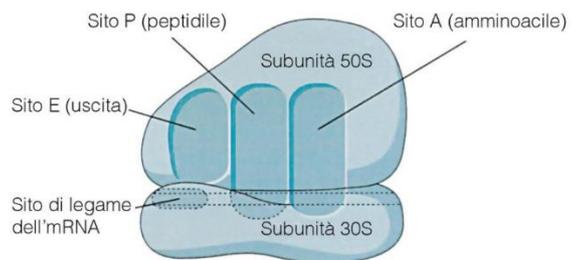
4.2. Dall'mRNA agli amminoacidi: la traduzione

Durante il processo di traduzione l'informazione genetica codificata dall'RNA messaggero (mRNA) viene convertita in una sequenza specifica di amminoacidi, portando alla formazione di proteine funzionali. Il codice genetico è costituito da triplette di nucleotidi, denominate codoni, presenti nell'mRNA. Ogni codone specifica un determinato amminoacido o un segnale di stop per la sintesi proteica.

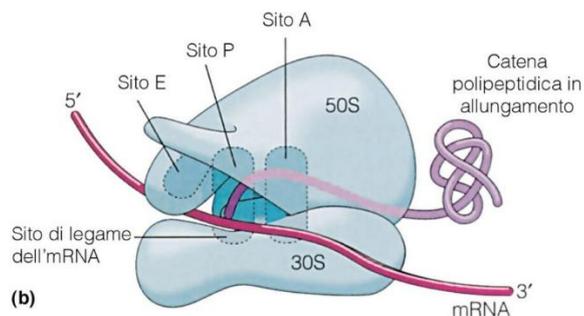
		secondo nucleotide											
		A	G	T	C								
primo nucleotide	A	AAA } phe AAG }	AGA } AGG } ser	ATA } tyr ATG }	ACA } cys ACG }	A	G						
		AAT } AAC }	AGT } AGC }	ATT } ATC }	ACT } ACC }	termine	try						
	G	GAA } GAG } GAT } GAC }	GGA } GGG } GGT } GGC }	GTA } GTG } GTT } GTC }	GCA } GCG } GCT } GCC }	leu	pro	his	arg	A	G	T	C
	T	TAA } TAG } TAT }	TGA } TGG } TGT } TGC }	TTA } TTG } TTT } TTC }	TCA } TCG } TCT } TCC }	ile	thr	asn	ser	A	G	T	C
	TAC }				met o iniziatore	lys	arg						
C	CAA } CAG } CAT } CAC }	CGA } CGG } CGT } CGC }	CTA } CTG } CTT } CTC }	CCA } CCG } CCT } CCC }	val	ala	asp	gly	A	G	T	C	

amminoacidi: ala, alanina; arginina; asn, asparagina; asp, acido aspartico; cys, cisteina; gin, glutammina; glu, acido glutammico; gly, glicina; his, istidina; ile, isoleucina; leu, leucina; lys, lisina; met, metiodina; phe, fenilalanina; pro, prolina; ser, serina; thr, treonina; try, triptofano; tyr, tirosina; val, valina.

I ribosomi eucariotici, costituiti da una subunità maggiore (60S) e una subunità minore (40S), sono i complessi molecolari responsabili della catalisi del legame peptidico tra amminoacidi. Durante l'allungamento, ogni nuovo amminoacido viene aggiunto alla catena polipeptidica crescente attraverso un ciclo che coinvolge tre fasi principali: Il tRNA caricato con il corretto amminoacido entra nel sito A (aminoacilico) del ribosoma, dove il suo anticodone si appaia con il codone dell'mRNA. Successivamente, l'amminoacido viene trasferito dalla subunità P (peptidica) al sito A, formando un nuovo legame peptidico. Infine, il ribosoma trasloca, spostando il tRNA vuoto dal sito P al sito E (exit), mentre il tRNA caricato con la catena polipeptidica nascente si sposta dal sito A al sito P, rendendo disponibile il sito A per l'ingresso del nuovo tRNA.



(a)

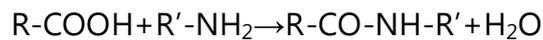


(b)

La terminazione della traduzione avviene quando un codone di stop (UAA, UAG, UGA) entra nel sito A del ribosoma. Questi codoni non codificano per alcun amminoacido e sono riconosciuti dai fattori di rilascio (eRFs), che inducono il distacco della catena polipeptidica dal tRNA e la successiva dissociazione del complesso di traduzione.

4.3. Legame peptidico e formazione di proteine

Il legame peptidico è un legame covalente che si forma tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e il gruppo amminico di un altro. Questo legame avviene tramite una reazione di condensazione, che comporta quindi la perdita di una molecola d'acqua. La formula generale della reazione può essere scritta come segue:



Il legame risultante, $-CO-NH-$, è planarizzato, con una lunghezza del legame intermedia tra un legame singolo e un doppio legame (1,32 Å), a causa della parziale delocalizzazione degli elettroni tra l'ossigeno del gruppo carbonilico e l'azoto dell'ammide. Questa caratteristica conferisce al legame peptidico una stabilità termodinamica e una rigidità strutturale uniche e che influiscono sulla conformazione delle catene proteiche. La formazione del legame peptidico è un processo endoergonico, che richiede quindi apporto di energia. Negli organismi viventi questa energia viene fornita dall'idrolisi dell'ATP e altre molecole energetiche durante la sintesi proteica nei ribosomi. La reazione di condensazione è catalizzata dall'enzima peptidil transferasi, che permette l'allungamento della catena polipeptidica.

Una volta che gli amminoacidi sono legati a formare una catena polipeptidica, la struttura della proteina risultante si organizza su più livelli, che vanno dalla sequenza primaria alla struttura quaternaria. Ogni livello di organizzazione è critico per la funzione della proteina, ed è proprio grazie a questa elevata plasticità che le proteine possono assumere funzioni estremamente variegata all'interno degli organismi.

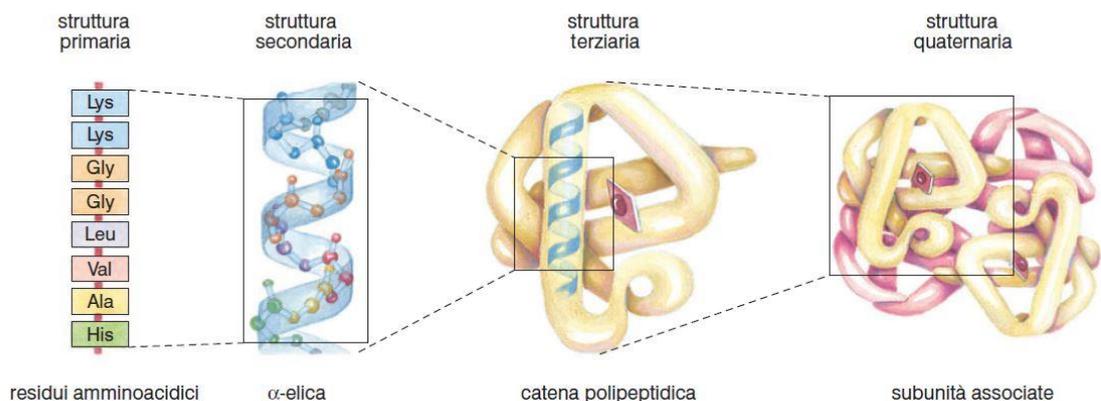
1. La struttura primaria di una proteina è costituita dalla sequenza lineare di amminoacidi uniti tramite legami peptidici. Ogni proteina ha una sequenza specifica, determinata dall'informazione genetica codificata dal DNA. La

sequenza degli amminoacidi determina le proprietà chimico-fisiche della proteina e costituisce la base su cui si sviluppano le strutture superiori.

2. La struttura secondaria delle proteine riguarda l'organizzazione locale della catena polipeptidica in motivi ripetuti, stabilizzati da legami a idrogeno tra il gruppo carbonilico (C=O) e il gruppo amminico (N-H) del backbone peptidico. I due principali tipi di struttura secondaria sono l'alfa-elica ed il foglietto beta.

L'alfa-elica è una struttura a spirale, dove ogni legame a idrogeno si forma tra il gruppo carbonilico di un amminoacido e il gruppo amminico dell'amminoacido situato a quattro residui di distanza lungo la catena.

Il foglietto beta è una struttura più distesa rispetto all'alfa-elica e si forma quando segmenti della catena polipeptidica si allineano fianco a fianco, stabilizzati da legami a idrogeno tra i gruppi carbonilici e amminici dei residui adiacenti. I foglietti beta possono essere paralleli o antiparalleli, a seconda della direzione delle catene polipeptidiche adiacenti.



3. La struttura terziaria si riferisce al ripiegamento tridimensionale completo di una singola catena polipeptidica, risultante da una combinazione di alfa-eliche, foglietti beta e altre strutture, e dalle interazioni tra le catene laterali degli amminoacidi. La stabilità della struttura terziaria è garantita da diversi tipi di

interazioni: interazioni idrofobiche, legami a idrogeno, legami ionici o ponti disolfuro.

La struttura terziaria è essenziale per garantire la funzione biologica della proteina, poiché determina la configurazione del sito attivo (per gli enzimi), le superfici di interazione molecolare e la capacità della proteina di subire cambiamenti conformazionali necessari per la sua attività.

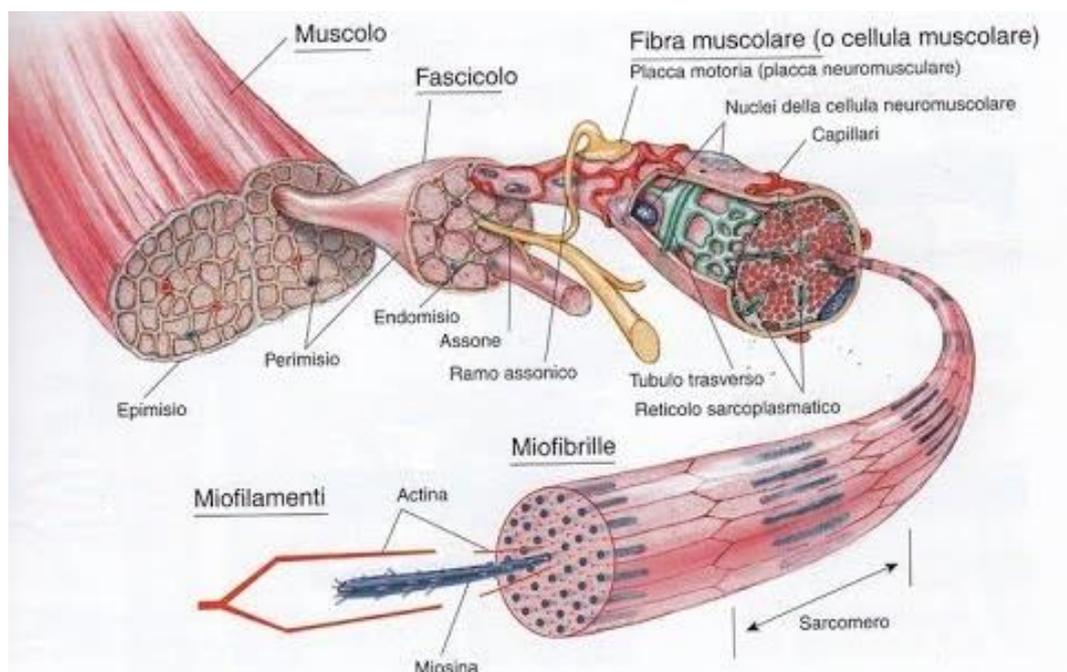
4. La struttura quaternaria si riferisce all'organizzazione di più catene polipeptidiche (subunità) in un complesso proteico funzionale. Non tutte le proteine presentano una struttura quaternaria, ma per quelle che la possiedono, questa aggiunge un ulteriore livello di complessità e regolazione. Le interazioni tra subunità possono essere deboli (come nel caso di molte proteine regolatorie) o forti (come nelle proteine strutturali e negli enzimi multimerici).

4.4. Processi di neoformazione muscolare

L'attivazione del processo di miogenesi può essere identificata con l'attivazione delle cellule satelliti. Queste sono una popolazione di cellule staminali residenti nel muscolo. Normalmente risultano quiescenti ma possono essere attivate in risposta a danni muscolari o a stimoli di crescita. Una volta attivate, queste cellule proliferano e si differenziano in mioblasti, che si fondono per formare nuove fibre muscolari (iperplasia) o per riparare quelle danneggiate (ipertrofia) (172, 177).



Ogni fibra muscolare è una cellula multinucleata allungata, formata dalla fusione di diversi mioblasti e contenente numerose miofibrille (circa un centinaio per ogni cellula), le strutture responsabili della contrazione. Le miofibrille sono costituite da sarcomeri, le unità contrattili fondamentali del muscolo, composte da filamenti di actina e miosina che si sovrappongono. Questa disposizione altamente organizzata delle miofibrille all'interno delle fibre muscolari conferisce al muscolo scheletrico la sua caratteristica striatura visibile al microscopio ottico.



Le fibre muscolari possono essere classificate in base alle loro caratteristiche funzionali e metaboliche in fibre a contrazione lenta (tipo I) e a contrazione rapida (tipo II). Presentano diverse distribuzioni di mitocondri, mioglobina e capacità ossidative, che ne determinano la resistenza e la velocità di contrazione. Le fibre di tipo I, ricche di mitocondri e mioglobina, sono altamente resistenti all'affaticamento ed utilizzano principalmente la fosforilazione ossidativa per produrre ATP, rendendole adatte a contrazioni sostenute e di lunga durata. Le fibre di tipo II, invece, sono adattate per contrazioni rapide e potenti, utilizzando prevalentemente la glicolisi anaerobica come fonte energetica (173).

4.4.1 Ipertrofia Muscolare

L'ipertrofia muscolare è principalmente indotta dall'esposizione del muscolo a carichi meccanici elevati, come l'allenamento di resistenza. Questi stimoli generano una serie di risposte molecolari che promuovono la sintesi proteica all'interno delle fibre muscolari, portando ad un aumento della loro dimensione. La via di segnalazione IGF-1/PI3K/Akt/mTOR è una delle principali responsabili della regolazione della stimolazione ipertrofica. L'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), rilasciato in risposta al carico meccanico, attiva la via PI3K/Akt, che a sua volta stimola mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), un regolatore chiave della sintesi proteica (175). L'attivazione di mTOR favorisce l'aumento della traduzione di mRNA codificanti per proteine contrattili e strutturali, essenziali per l'espansione delle miofibrille e, quindi, dell'intera fibra muscolare.

Essendo l'ipertrofia muscolare essenzialmente controllata dal tasso di sintesi proteica rispetto a quello del catabolismo, appare chiaro come essa sia strettamente dipendente da un adeguato apporto di aminoacidi, in particolare la leucina, capace di attivare direttamente mTOR e favorire quindi la sintesi delle proteine muscolari. Anche gli ormoni anabolici come il testosterone e l'ormone della crescita (GH) giocano un ruolo critico in questo processo, aumentando la sintesi proteica e la proliferazione delle cellule satelliti, contribuendo ulteriormente all'espansione muscolare.

Un altro elemento chiave nella neoformazione muscolare è rappresentato dai microRNA (miRNA), piccole molecole di RNA non codificante che regolano l'espressione genica post-trascrizionale (176). La modulazione di questi miRNA può avere un impatto significativo sulla capacità del muscolo di rigenerarsi, rendendoli potenziali target terapeutici per il trattamento di malattie muscolari.

Studi recenti hanno evidenziato come l'esercizio fisico, in particolare l'allenamento di resistenza, possa modulare l'attività di queste vie, migliorando la capacità rigenerativa

del muscolo e contrastando la sarcopenia, la perdita di massa muscolare associata all'invecchiamento (171).

4.4.2. Iperplasia Muscolare

L'iperplasia muscolare, sebbene meno documentata nell'essere umano rispetto all'ipertrofia, si verifica attraverso la formazione di nuove fibre muscolari. Questo processo è mediato principalmente dall'attivazione e dalla proliferazione delle cellule satelliti.

A livello molecolare, l'attivazione delle cellule satelliti è regolata da una serie di fattori di trascrizione specifici, tra cui MyoD, Myf5, Myogenin e MRF4, che giocano un ruolo cruciale nell'indirizzare il destino delle cellule verso la differenziazione miogenica (174). In particolare, MyoD e Myf5 sono espressi nelle prime fasi della miogenesi e sono responsabili dell'inizio del programma di differenziazione muscolare, tramite la promozione della trasformazione delle cellule satelliti verso la formazione di mioblasti, e successivamente, di miotubi. Il processo chiave di fusione dei mioblasti in miotubi è un processo essenziale per la generazione di nuove fibre muscolari ed è regolato da proteine come Myomaker e Myomerger, che facilitano l'allineamento e la fusione delle membrane cellulari. L'espressione di queste proteine è finemente controllata dai segnali extracellulari e dalle interazioni con altre cellule muscolari (e non) del microambiente tissutale.

In ogni caso, anche la proliferazione delle cellule satelliti sembra essere regolata da fattori di crescita come IGF-1 e HGF (Hepatocyte Growth Factor), oltre che dai sopracitati fattori di trascrizione miogenici come MyoD e Myf5.

Studi condotti su atleti di forza e culturisti hanno indicato che l'allenamento di resistenza intenso potrebbe indurre un aumento nel numero di fibre muscolari, suggerendo che l'iperplasia può contribuire, seppur in misura minore, all'aumento complessivo della massa muscolare (170).

Capitolo V - Meccanismi di regolazione della sintesi proteica

5.1. Meccanismi di adattamento fisiologici

Diversi studi hanno dimostrato come l'esercizio fisico sia in grado di modificare le risposte ormonali del corpo umano, dove le maggiori alterazioni in seguito allo svolgimento di esercizio fisico si manifestano come: aumento dei livelli plasmatici di cortisolo (C), diminuzione dei livelli di testosterone (T) (75), diminuzione del rapporto cortisolo/testosterone (CT) (76) ed aumento dei livelli di creatina-chinasi (CK).

Se risulta chiaro come la SPM sia regolata principalmente attraverso meccanismi di modulazione della traduzione dell'mRNA (82, 83, 84, 85), i fattori che contribuiscono a tale modulazione risultano essere numerosi, complessi e solo parzialmente chiariti.

La SPM viene infatti modulata dal bilancio energetico corporeo, da fattori di crescita quali insulina e IGF-1 e dalla disponibilità di nutrienti, soprattutto di amminoacidi (86, 87, 88, 89) ed ai relativi valori plasmatici (90-92).

Dalle evidenze emerge infatti che la supplementazione amminoacidica induca un effetto anabolico positivo sulla sintesi muscolare, sia in vitro che in vivo (91, 93-96) e che questo possa essere dovuto al conseguente aumento della concentrazione di questi sia a livello plasmatico che intramuscolare (87, 97, 99), in seguito ad integrazione.

Tutti questi meccanismi convergono sul regolatore centrale mTORC1, capace di regolare la traduzione degli mRNA attraverso due meccanismi distinti: da una parte inattiva il repressore della traduzione 4E-BP1 e dall'altra attiva la p70 S6 chinasi.

Insieme, questi cambiamenti permettono di aumentare la velocità di inizio della traduzione e di allungamento e quindi, della SPM.

Tuttavia, se è vero che questi fattori influenzano la SPM, lo fanno in modo indiretto: l'insulina, ad esempio, stimola mTOR attraverso la fosforilazione di PI3K e di PKB/Akt (99, 100, 101). Ecco che ora Akt può fosforilare il complesso TSC2 ed attivare così il Rheb, che ultimamente permette l'attivazione di mTORC1.

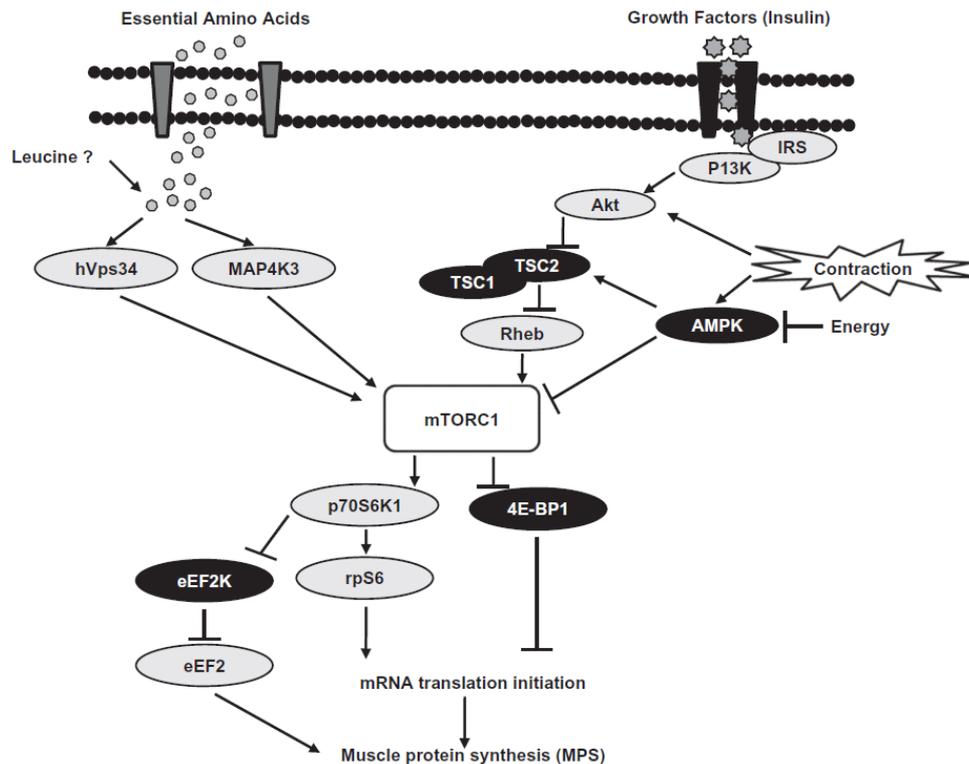


Figure 1 Essential amino acid (EAA), growth factor, and contraction-induced mTORC1 intracellular signaling. Proteins that stimulate muscle protein synthesis (MPS) are depicted in grey, whereas inhibitory proteins are depicted in black. *Abbreviations:* IRS1, insulin receptor substrate 1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, protein kinase B; TSC1/TSC2, tuberous sclerosis complex; Rheb, ras homolog enriched in brain; hVps34, vacuolar protein sorting 34; MAP4K3, mitogen-activated protein kinase; AMPK, AMP-activated protein kinase; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein; p70 S6K, 70 kDa S6 kinase; rpS6, ribosomal protein S6; eEF2K, eukaryotic elongation factor 2 kinase; eEF2, eukaryotic elongation factor 2. Figure adapted and modified from Drummond et al.⁴¹

L'attivazione di mTOR e più in generale la stimolazione di SPM rimane comunque un processo ancora poco conosciuto, nel quale si trovano coinvolti altri numerosi fattori. Praticare intenso esercizio fisico di resistenza può aumentare la SPM (46) fino a 48h (43).

Condizioni di scarsità energetica, riducono la SPM sia basale, sia post-esercizio fisico (47, 48), condizione che però viene annullata se si pratica esercizio fisico intenso (47).

Nel 2010 è stato messo in evidenza come l'espressione di microRNA in cellule muscolari umane venga profondamente alterata in seguito allo svolgimento di esercizio fisico, così come in caso di ingestione sia di EAA (49-51), sia di proteine (52), suggerendo quindi un ruolo di partecipazione da parte di queste molecole nella regolazione della SPM.

Aumentati livelli percentuali di SPM sono associati alla riduzione dell'espressione dei microRNA miR-206 e miR-499 (51). Viceversa, risultano aumentati i pattern di espressione di mRNA dell'enzima E3 ubiquitina-proteina ligasi TRIM63, conosciuto anche come MuRF1, successivamente all'allenamento fisico (26, 53-58).

La concentrazione di insulina circolante è strettamente legata alla regolazione del turnover proteico, data la sua capacità di ridurre CPM (59-61).

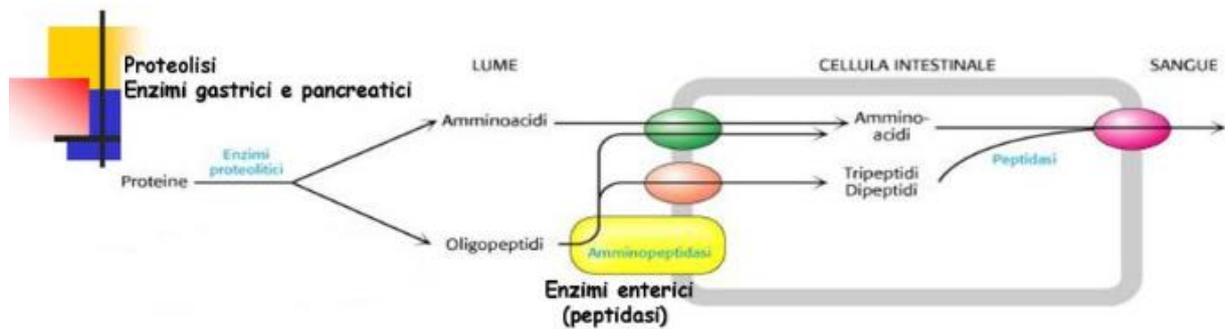
Anche il sistema ubiquitina-proteasoma, prende parte in tali processi, infatti le proteine sono marcate dall'ubiquitina per permettere il riconoscimento da parte del proteasoma, con conseguente catabolismo di queste (62, 63).

I sistemi di autofagia e lisosomi sono attivati da condizioni di disuso (64) e restrizione calorica (65), mentre fisiologicamente in seguito ad esercizio fisico (66, 67).

Le Calpaine sono delle proteasi attivate da incrementi della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , che portano alla degradazione di proteine sarcolemmiche, del citoscheletro e miofibrillari (68).

Le Caspasi sono anche esse proteasi e sembrano invece essere coinvolte nei primi step di attivazione del CPM (69).

La quantità netta di assunzione di EAA non è l'unico fattore influenzante SPM e SPCT. È stato osservato infatti come un ridotto tasso di liberazione di EAA in seguito alla digestione, si traduca in una ridotta concentrazione di questi a livello dei recettori di membrana cellulari e quindi riduca la differenza di gradiente amminoacidica tra il plasma e lo spazio intracellulare.



Ecco che anche il trasporto transmembrana degli amminoacidi è un determinante ed un fattore concorrente alla regolazione del complesso processo che è la sintesi proteica (168). Questa variabile risulta talmente influente, che massimizzando il gradiente di EAA, e quindi il trasporto transmembrana, il fattore limitante del processo di sintesi proteica divengono i macchinari deputati alla traduzione, ovvero ribosomi e tRNA (169).

5.2. Amminoacidi nella regolazione dell'espressione proteica

5.2.1. Aumento dell'anabolismo proteico

I primi studi riguardanti una possibile correlazione tra l'utilizzo dei BCAA e l'aumento di massa muscolare risalgono agli anni 70'. Questi studi, svolti in vitro su cellule muscolari di roditori (70-71), evidenziarono come la supplementazione di BCAA fosse traducibile in un aumento della sintesi proteica muscolare (SPM) ed una riduzione del catabolismo proteico muscolare (CPM).

Studi performati in vivo e nell'uomo avvalorarono quando osservato in vitro, dimostrando come gli EAA siano uno dei principali fattori capaci di indurre SPM (8-12) in modo dose-dipendente fino a 10g (13, 14) e di come questo processo sia inversamente proporzionale all'età dell'individuo (15).

Indagando i singoli contributi amminoacidici, venne messo in evidenza come fosse la leucina il principale AA attribuibile dell'effetto anabolico indotto in cellule muscolari di topo (16, 17). Il meccanismo d'azione della leucina sembra suggerire il suo coinvolgimento come regolatore del target della rapamicina mTOR (18). Ulteriori studi sull'umano hanno ulteriormente avvalorato tale ipotesi, dimostrando che anche l'esclusiva supplementazione di leucina è in grado di stimolare SPM (19, 20).

Un'ulteriore conferma proviene dal fatto che somministrando rapamicina, inibitore di mTORC1, l'effetto di SPM indotto dalla supplementazione di EAA viene meno (21).

I due complessi multiproteici mTORC1 ed mTORC2 sono accomunati da quella che ne è la subunità catalitica, costituita da mTOR.

mTORC1 ha la funzione di integrare i diversi segnali che regolano la SPM: la quantità di nutrienti, l'attività contrattile muscolare e la presenza di fattori di crescita (22).

mTORC2 attiva invece diversi pathways cellulari e controlla l'evoluzione del citoscheletro cellulare (23).

Nonostante il meccanismo attraverso cui gli AA siano capaci di attivare il complesso mTORC1 risultano solo in parte compresi, le evidenze sembrano suggerire che la traslocazione di questo nella zona periferica della cellula, in vicinanza del sarcolemma, sembri essere un evento necessario al suo funzionamento (24, 25).

A supporto di ciò, un altro studio ha dimostrato come in seguito ad ingestione di carboidrati e proteine, fattori che come visto risultano fondamentali nella stimolazione della SPM, avviene traslocazione di mTOR nella zona sarcolemmica (22). Lo stesso vale per ingestione di sola leucina (22).

Altri studi hanno poi dimostrato come i BCAA aumentino l'attivazione e fosforilazione di alcune proteine segnale nella via di segnalazione di mTORC1 in seguito ad esercizio fisico (26-31).

Proprio per via del ruolo centrale che presentano nell'anabolismo muscolare, i BCAA sono i primi AA verso cui atleti maschi riscontrano carenza (6). Questo effetto si

manifesta anche perché sono i BCAA ad essere maggiormente sottoposti ad ossidazione durante l'esercizio fisico (7).

Recenti studi, hanno ulteriormente indagato l'effetto anabolico indotto dalla leucina (102, 89) (Si rimanda allo schema del capitolo 5.1). Questi sembrano suggerire che la leucina sia in grado di attivare in maniera diretta mTORC1, senza passare per tutti i messaggeri precedentemente menzionati. Infatti, sebbene i meccanismi molecolari con cui avviene questo processo siano ancora da definire, la leucina risulta capace di attivare la via di segnalazione di mTOR attraverso due meccanismi diretti:

- Attraverso una nuova classe di PI3K, denominata hVps34 (vacuolar protein sorting 34) (103, 104).
- Tramite attivazione di MAP4K3 (mitogen-activated protein kinase) (105).

Questa ipotesi risulta ulteriormente avvalorata dal fatto che Drummond e colleghi, abbiano rilevato elevate concentrazioni di mRNA codificante per hVps34 in adulti anziani. Questo potrebbe infatti spiegare uno dei meccanismi attraverso cui le cellule muscolari di soggetti anziani, possano compensare un ridotto tenore di disponibilità amminoacidica (106, 107, 108, 109), e quindi spiegare la variabilità anabolica di SPM indotta dalla leucina quando somministrata a soggetti di diverse età.

Se ormai è un fatto assodato che la quantità di proteine (e quindi di amminoacidi) introdotti con la dieta, sia correlata in modo direttamente proporzionale con la sintesi proteica muscolare (SPM) ed indirettamente proporzionale con il catabolismo proteico muscolare (CPM); sono molti i fattori di confondimento presenti nei diversi studi che hanno contribuito a dare voce a questa affermazione.

Le proteine possono infatti essere assunte per mezzo di diverse vie e di diverse fonti: possono derivare dalla normale dieta alimentare ed essere quindi introdotte per via orale sotto forma di alimenti di uso comune; oppure possono essere introdotte sotto forma di integratori alimentari. In questo ultimo caso sono numerose le

alternative presenti sul commercio e si differenziano marcatamente per apporto proteico totale e per le differenti composizioni amminoacidiche.

Ma la via orale non è l'unica possibile: gli amminoacidi possono essere introdotti anche attraverso infusione endovenosa come amminoacidi liberi; infatti, diversi studi in materia hanno adottato proprio questa via di somministrazione.

Ragion per cui, nel 2020, David D. Church e colleghi realizzarono uno studio che andò a considerare diverse prove sperimentali effettuate in precedenza in diversi laboratori, in cui la supplementazione amminoacidica venne realizzata attraverso l'ingestione di diverse fonti proteiche, da cibi di uso comune ad integratori a base di EAA liberi.

Più nel dettaglio, il gruppo di ricercatori ha analizzato quattro studi, due riguardanti delle popolazioni over 60, due riguardanti popolazioni al di sotto dei 27 anni.

Il totale delle popolazioni dei quattro studi supera i cento partecipanti ed il grande gap presente tra le età medie permette di studiare gli effetti indotti dagli amminoacidi sul metabolismo muscolare in tutte le categorie di età.

Table 1. Participant demographics from compiled studies ¹.

Study	Group	N (M/F)	Age (y)	BM (kg)	BMI (kg/m ²)	LBM (kg)	BF (%)
Park 2020 European Journal of Nutrition [25]	3.5 oz Ground Beef and 2 green kiwis	11 (5/5)	72.5 ± 1.9	82.5 ± 2.2	28.7 ± 0.8	48.5 ± 2.5	36.4 ± 2.1
	3.5 oz Ground Beef and 2 gold kiwis						
Park 2020 Journal of International Society of Sports Nutrition [23]	2.4 g Whey + 3.2 g Free Form EAA	8 (3/5)	21.4 ± 0.5	73.8 ± 4.8	24.6 ± 0.8	51.6 ± 4.9	21.1 ± 2.2
	4.8 g Whey + 6.4 g Free Form EAA						
	12.6 g Whey	8 (4/4)	26.9 ± 2.0	76.2 ± 3.1	25.7 ± 1.6	49.5 ± 2.6	24.8 ± 4.1
Park 2020 Journal of Nutrition [26]	2 oz Ground Beef	8 (4/4)	21.8 ± 2.2	76.3 ± 4.6	24.9 ± 1.0	49.2 ± 4.1	30.1 ± 3.1
	2 oz Beef Sirloin	8 (4/4)	23.9 ± 1.6	68.0 ± 4.0	23.5 ± 1.0	43.5 ± 3.3	31.0 ± 2.4
	2 Cooked Eggs	8 (4/4)	23.9 ± 1.9	74.2 ± 5.4	24.4 ± 1.3	49.1 ± 3.4	27.5 ± 2.5
	2 oz Pork Loin	8 (4/4)	22.1 ± 1.0	74.3 ± 3.5	24.5 ± 0.9	51.8 ± 4.6	29.9 ± 3.9
	1/2C Kidney Beans	8 (4/4)	23.8 ± 1.9	69.8 ± 5.7	24.1 ± 1.7	44.8 ± 3.1	30.1 ± 2.5
	2T Peanut Butter	8 (4/4)	20.3 ± 1.5	70.4 ± 3.8	24.1 ± 1.1	48.1 ± 3.8	27.1 ± 2.3
	4 oz Tofu	8 (4/4)	25.9 ± 2.2	75.9 ± 2.2	25.9 ± 1.0	49.7 ± 4.2	33.0 ± 3.0
	1 oz Mixed Nuts	8 (4/4)	24.3 ± 2.1	74.3 ± 5.3	24.9 ± 1.2	49.3 ± 3.9	32.2 ± 2.2
Church 2020 Journal of International Society of Sports Nutrition [24]	3.6 g Free Form EAA	11 (5/6)	68.8 ± 1.8	81.4 ± 5.69	31.8 ± 5.7	49.7 ± 3.6	35.7 ± 2.2
	10.8 g Free Form EAA	12 (8/4)	67.4 ± 1.5	83.4 ± 5.5	27.5 ± 1.3	53.1 ± 3.9	35.4 ± 3.2
Sample Means		-	39.9 ± 2.0	76.1 ± 1.2	26.1 ± 0.6	49.5 ± 0.9	32.2 ± 0.8

¹ Data reported as mean ± SEM. BM = body mass; BMI= body mass index; LBM = lean body mass; BF = body fat; y = years; kg = kilograms; m = meters; oz. = ounces; g = grams; EAA = essential amino acids; C = cup; T = tablespoon. Data are means ± SEM.

Gli studi hanno avuto inizio con il prelievo di sangue di ciascun campione, in modo da stabilirne i valori di "baseline".

Tutti gli studi sono stati condotti dopo uno stato di digiuno notturno ed il calcolo dei valori della sintesi proteica muscolare SPM, della sintesi proteica corporea totale (SPCT) e del rateo sintetico frazionale (FSR) è stato effettuato per mezzo di infusioni di isotopi marcati di L-fenilalanina ed L-tirosina. L'utilizzo di tali isotopi permette infatti una facile rilevazione di questi attraverso tecniche di gas-cromatografia e spettrometria di massa. Nel dettaglio, i tassi della SPCT sono stati calcolati tramite la determinazione dei tassi plasmatici di fenilalanina e tirosina nel plasma (Ra): l'aumento di concentrazione medio di fenilalanina e tirosina nel plasma e l'AUC sono stati calcolati sia per il periodo postprandiale che di digiuno. Nel dettaglio, le equazioni che sono state utilizzate per calcolare la SPCT, SPM e la FSR: (127, 128, 129, 130).

I risultati ottenuti mostrano chiaramente come l'aumento della concentrazione di EAA circolanti, sia in termini di C max che di gradiente (Δ EAA), sia direttamente correlabile con la stimolazione della FSR postprandiale, della Δ FSR e della SPCT, in misura dipendente fino al 50% (210).

È stato infatti osservato come la sussistenza di un più elevato gradiente di concentrazione tra EAA intra- ed extra-cellulari, comporti un maggiore trasporto di questi verso l'interno delle cellule corporee, permettendo quindi una maggiore sintesi proteica (131, 128, 132).

Nel seguente grafico si trovano illustrate le correlazioni tra la EAACmax, Δ EAA e la FSR postprandiale.

Ciò che è emerso dallo studio è che la somma dei valori di Cmax dei BCAA insieme a quelli dei singoli amminoacidi essenziali, sono significativamente correlati ($p \leq 0.05$) in modo direttamente proporzionale alla FSR postprandiale, alla Δ FSR ed alla SPCT rispettivamente con valori di: ($r = 0.647-0.761$), ($r = 0.545-0.621$), ($r = 0.439-0.541$), (210).

Non sono solo i valori di C_{max} ad essere correlati, bensì le stesse considerazioni possono essere fatte per l' AUC_i e per la $\Delta[EAA]$.

Tutto questo è valido, sia per i BCAA che per i diversi EAA, ad esclusione per del triptofano e dell'istidina, per cui invece non sono state osservate correlazioni significative.

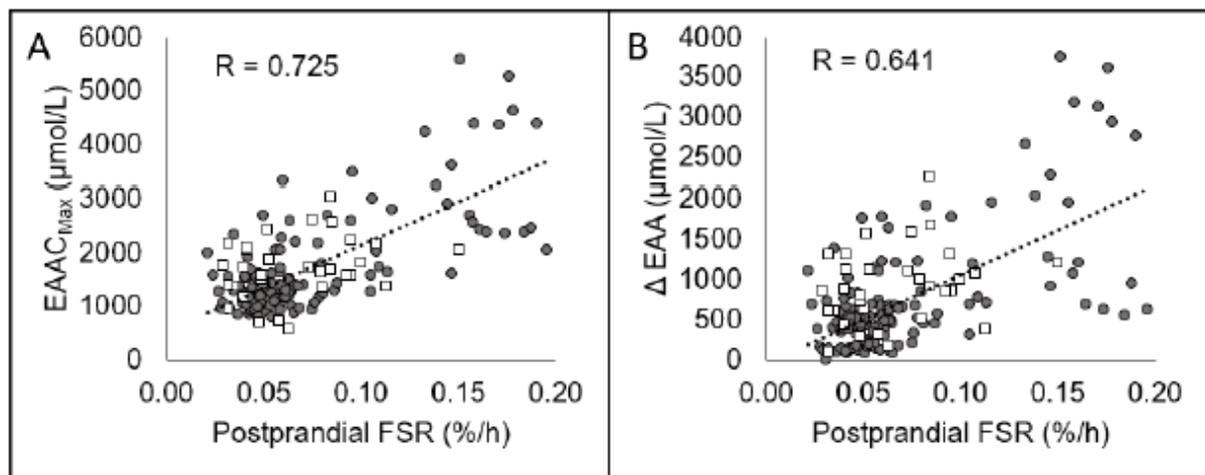


Figure 1. Relationships between postprandial fractional synthetic rate (FSR) to maximum essential amino acid (EAA) concentration ($EAAC_{max}$; Panel A) and the change in EAA concentrations from baseline to $EAAC_{max}$ (ΔEAA ; Panel B). Individual participant data from our lab in filled circles (●),

Si sottolinea comunque il fatto che questa correlazione è dose-dipendente, ovvero l'assunzione di EAA aumenta la FSR fino ad un tetto di assunzione di circa 15g, per poi tendere a plateau. Ecco che introiti eccessivi di EAA non sembrano apportare alcun beneficio al metabolismo muscolare (133, 137, 147, 152-155).

Sulla base dei dati ottenuti, è stato possibile stabilire che se si considera la concentrazione di EAA basale media dei soggetti compresi nello studio che si attesta a 961 µmol/L e la si aumenta del 100%, questa sarà correlabile con un aumento di ΔFSR del ~34%.

Questi dati risultano peraltro in linea con quelli ottenuti da Pennings e colleghi e da altri studi indipendenti effettuati in altri laboratori (133, 134, 135-145).

Dato che come anticipato, in questo tipo di studi possono essere numerosi i fattori di confondimento presenti, risulta importante considerare ed incorporare dati provenienti da studi che abbiano supplementato gli amminoacidi in vie di somministrazione ed in quantità diverse: ecco che questi effetti di correlazione tra la concentrazione plasmatica di EAA e l'aumento di FSR sono stati inoltre riscontrati anche attraverso forme diverse di assunzione degli EAA, quindi non solo per via endovenosa, bensì anche per assunzione in forma libera, sottoforma di proteine del latte, uova, soia e carne (146, 137, 147-152).

Lo studio di David Church e colleghi risulta inoltre essere il primo studio della letteratura scientifica ad aver indagato i contributi amminoacidici nei confronti della SPCT: nonostante sia la muscolatura striata la principale costituente del corpo umano, nonché quella verso cui sportivi ed atleti hanno interesse di portare all'ipertrofia; la muscolatura liscia contribuisce in maniera importante al turnover proteico corporeo e quindi alla SPCT (161-163, 164).

Per quanto concerne questo tipo di muscolatura, similmente agli studi concentrati su SPM ed SPCT, anche in questo caso si osservano incrementi della sintesi proteica totale in risposta a maggiori concentrazioni sieriche di EAA e proteine (130, 139, 152, 166, 167).

Riassumendo tali studi, possiamo quindi affermare che per incrementare il rateo sintetico frazionale (FSR) e la sintesi proteica corporea totale (SPCT), risulta particolarmente efficace l'assunzione di cibi o integratori con elevate proporzioni di EAA rispetto al totale della frazione proteica e capaci di rapido assorbimento in modo tale da indurre un forte e rapido incremento della concentrazione plasmatica di EAA.

5.2.2. Diminuzione del catabolismo proteico

Il catabolismo proteico, che permette di degradare proteine a livello muscolare con lo scopo di ricondurle ai loro elementi costituenti, è un processo multifattoriale regolato da diversi sistemi e vie di segnalazione. Nell'ambito dell'integrazione amminoacidica nello sportivo risulta un argomento fondamentale, in quanto riuscendo a decifrare i sistemi attraverso cui avviene il CPM, è possibile ridurlo, andando così ad avere una prevalenza di SPM sul CPM, che si traduce in aumento netto della massa muscolare.

Studi in vitro effettuati su cellule muscolari di topo hanno dimostrato come i BCAA siano in grado di ridurre il catabolismo proteico ed allo stesso tempo di aumentare la SPM (38). Tuttavia, ad oggi, è presente un numero molto ridotto di studi che hanno misurato gli effetti della supplementazione di BCAA sul CPM in vivo in umani e nessuno ha indagato gli effetti successivamente allo svolgimento di esercizio fisico.

Tra gli studi effettuati sull'uomo, alcuni hanno indagato il catabolismo proteico sistemico e CPM in seguito all'infusione endovenosa di 3h di amminoacidi ramificati, osservando come il flusso di fenilalanina si sia ridotto del 22%, sinonimo del fatto che sia avvenuta una riduzione del catabolismo proteico sistemico (39, 40, 41, 27)

Un effetto molto simile è stato osservato dagli stessi ricercatori in seguito ad infusione prolungata di 16h di BCAA, registrando in questo caso una riduzione del flusso di fenilalanina pari al 37% (41).

Simili riduzioni sono state osservate in seguito ad assunzione di BCAA nelle prime ore post-allenamento (28, 35).

Un altro studio ha poi dimostrato come in seguito ad ingestione di BCAA, o anche di sola leucina, si osservino ridotte concentrazioni di amminoacidi nel plasma ed intramuscolari, a supporto del fatto che i BCAA possono effettivamente avere un ruolo nel diminuire il CPM (45).

Indagando i meccanismi che regolano tale effetto, alcune evidenze suggeriscono che i BCAA riducano l'espressione dell'ubiquitina ligasi MuRF-1 e MAFbx nei muscoli scheletrici umani (26, 42), tramite riduzione dell'espressione dei relativi mRNA in seguito ad esercizio fisico in giovani atleti (42). In ogni caso, nonostante i BCAA sembrino poter ridurre sia la degradazione proteica sistemica che il CPM, i meccanismi coinvolti rimangono ancora ignoti.

Sommariamente quindi, diversi studi hanno dimostrato come i BCAA possano ridurre sia il catabolismo proteico sistemico (39, 40, 41, 27, 28, 35) sia il CPM (40, 41).

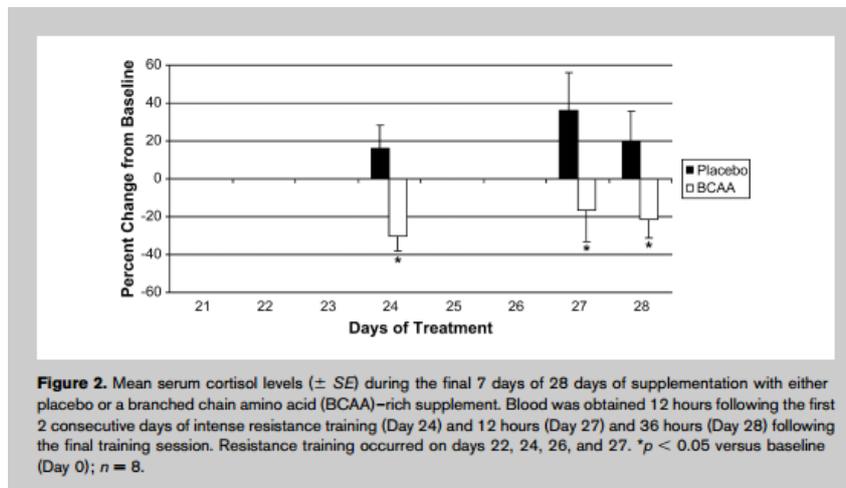
Tuttavia, nessuno studio ha dimostrato la capacità di questi di ridurre CPM che fisiologicamente avviene in seguito ad esercizio fisico (43, 44).

Carwin e Pearson con uno studio del 2010 hanno indagato come la supplementazione di BCAA, sia in grado di apportare un beneficio in giovani soggetti (22.9 ± 2 anni) che svolgono regolarmente esercizio fisico.

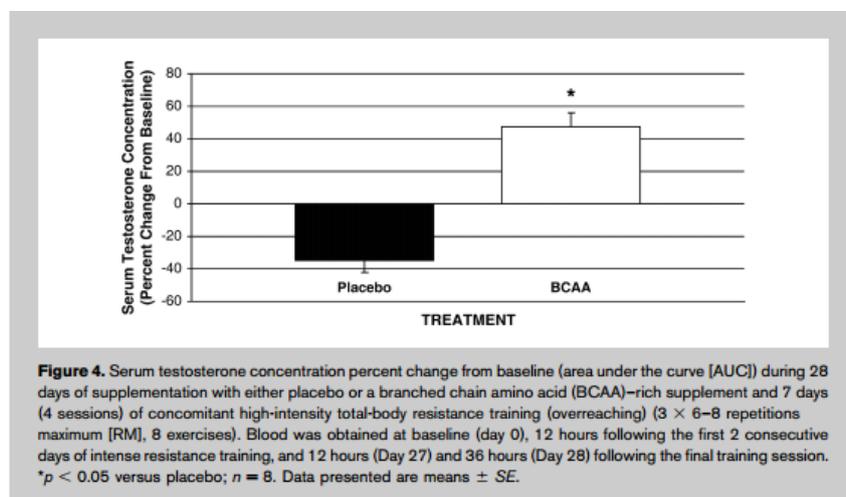
Il disegno di studi ideato è di tipo bilanciato, incrociato, controllato con placebo, in doppio cieco e con misure ripetute. Gli 8 soggetti che hanno preso parte e terminato lo studio sono stati casualmente assegnati al gruppo di assunzione di BCAA (6g/die) oppure di placebo. La somministrazione si è protratta per 4 settimane, per poi procedere ad un washout di 5 settimane ed invertire quindi i gruppi, somministrando l'alternativa per ulteriori 4 settimane.

In linea con le precedenti scoperte, lo studio ha sottolineato come le alterazioni ormonali che si verificano in seguito allo svolgimento di esercizio fisico, si sono dimostrate molto mitigate dalla concomitante assunzione di BCAA. Questo fornisce un interessante spunto di riflessione, in quanto si sottolinea come la quantità della supplementazione di BCAA sia molto inferiore rispetto alla maggioranza degli studi in questo ambito (6g/die contro studi che arrivano a somministrarne 40g/die).

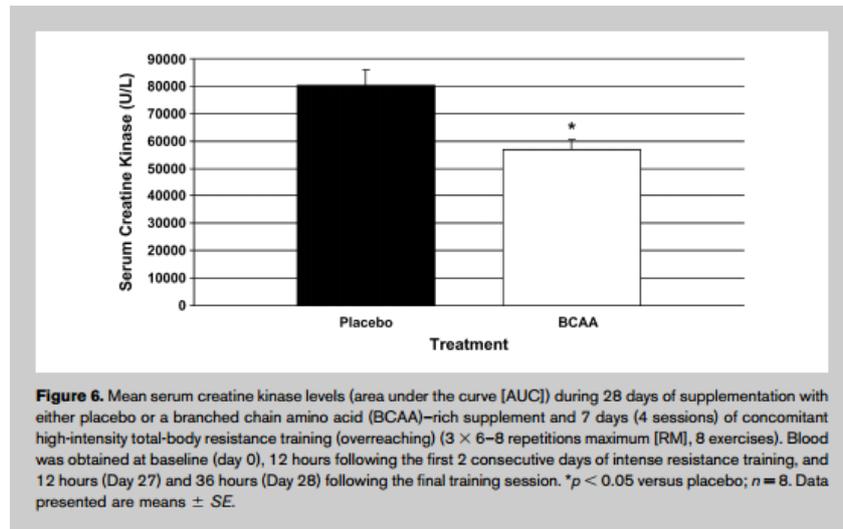
I livelli sierici di cortisolo sono stati misurati 12h dopo i primi due giorni di allenamento, oppure 12h e 36h dopo l'ultimo giorno di allenamento. Ciò che è emerso è una netta riduzione dei livelli di cortisolo nei soggetti sottoposti a supplementazione, rispetto sia ai soggetti a riposo, sia a quelli che hanno parimente svolto esercizio fisico ma a cui è stato somministrato placebo. Si sottolinea che il cambiamento percentuale in termini di cortisolo, tra soggetti che hanno svolto esercizio senza o con supplementazione, se misurato come AUC nei tre periodi, arriva a superare il 2000% (80).



Considerando la variazione dei livelli di testosterone in termini di AUC, si nota anche in questo caso come sia presente un divario importante, evidenziando differenze percentuali tra i due gruppi pari a circa ottanta punti percentuali (80).



I livelli sierici di creatina chinasi, enzima strettamente correlato al catabolismo muscolare, si mostrano (seppur sempre maggiori rispetto al non esercizio) ridotti all'interno del gruppo di assunzione dei BCAA rispetto al placebo (80).



Con tale studio viene quindi ribadito come i marker sierici caratteristici di un danno muscolare (CK e cortisolo) possano essere notevolmente ridotti con la concomitante somministrazione di BCAA, che risultano quindi capaci di indurre un effetto ormonale di tipo anti-catabolico.

L'effetto di riduzione del cortisolo è ulteriormente supportato da Bird e colleghi, che studiando soggetti maschi e non allenati, hanno riportato come l'ingestione di BCAA concomitante allo svolgimento di un elevato carico di esercizio di resistenza ha permesso di non innalzare i livelli di cortisolo al di sopra di quelli misurati a riposo in soggetti senza integrazione (77).

La riduzione del catabolismo, misurabile come abbassamento dei livelli di CK, è invece stata confermata anche da Coombes e colleghi, attraverso somministrazione di 12g/die di BCAA (78), nonché da un differente studio con somministrazione di 40g/die (79).

5.2.3. Amminoacidi vs proteine

Un recente studio del 2019 (32) ha voluto indagare come varia la sintesi proteica a livello miofibrillare (MyoPS) in seguito ad esercizio fisico dopo l'assunzione di 6g di BCAA, 6g di chetoacidi ramificati, oppure 30g di proteine del latte. Lo studio ha misurato la percentuale oraria del rateo di sintesi proteica miofibrillare FSR in uomini di ~71 anni a riposo, durante il periodo notturno ed a digiuno.

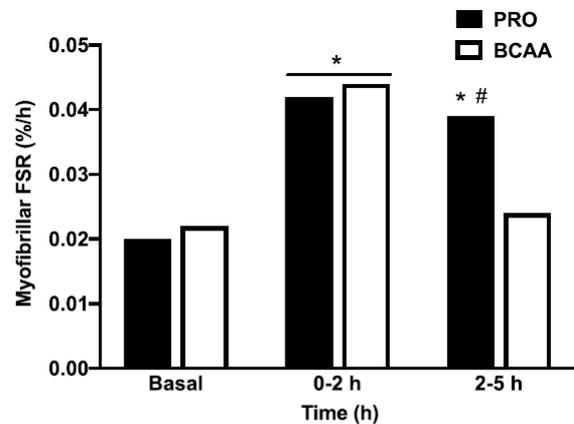


Fig. 1. Myofibrillar protein fractional synthesis rate (FSR; %/h) during the fasted (basal) state and over the early (0–2 h), and late (2–5 h) postprandial period following the ingestion of 30 g milk protein (PRO; complete source of protein containing ~6 g BCAA, of which 2.64 g was leucine) or 6 g branched-chain amino acids (BCAA; 3 g leucine, 1.5 g isoleucine, 1.5 g valine) in healthy older males. Values represent means. *Significantly different from basal; #significantly different from BCAA at the same timepoint. Adapted from Fuchs CJ, *et al.* (2019)⁽¹³⁷⁾.

Ciò che è emerso è che l'assunzione di BCAA ha stimolato in maniera comparabile a quella delle proteine del latte la MyoPS nel periodo post esercizio di 0-2h (da $0,022 \pm 0,002$ %/h a $0,044 \pm 0,004$ %/h i BCAA, da $0,020 \pm 0,002$ %/h a $0,042 \pm 0,004$ %/h le proteine). Tuttavia, l'ingestione di proteine si è dimostrata significativamente migliore nello stimolare MyoPS nel periodo 2-5h post-allenamento rispetto ai BCAA ($0,024 \pm 0,005$ %/h contro $0,039 \pm 0,004$ %/h) (32). In entrambi i periodi, i chetoacidi ramificati, hanno mostrato capacità di indurre MyoPS comparabili a quella dei BCAA.

Un altro studio, che ha indagato il grado di fosforilazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale mediata da mTOR, ha riscontrato una maggiore attivazione di queste in caso di assunzione di EAA, rispetto a BCAA (31).

Questi risultati suggeriscono come sia necessario un più ampio corredo amminoacidico per indurre MyoPS a livelli ottimali, probabilmente per via del fatto che altri AA fungono da substrati enzimatici durante tale processo.

Nel 2017, Jackman e colleghi hanno voluto indagare il contributo indotto dai BCAA nella stimolazione di MyoPS, successivamente allo svolgimento di esercizio fisico di resistenza in giovani maschi. I soggetti hanno assunto una colazione standardizzata e dopo 3h è stato svolto un intenso allenamento di resistenza. Successivamente a questo, ad un gruppo è stata assegnata la

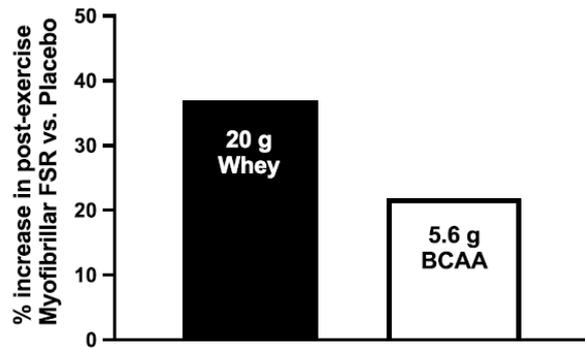


Fig. 2. Per cent increase in post-exercise myofibrillar protein fractional synthesis rate (FSR) versus placebo after ingestion of 20 g whey protein isolate (containing 10 g of EAA and 4.8 g of BCAA) or 5.6 g BCAA (containing 2.6 g leucine, 1.4 g isoleucine, 1.6 g valine). Post-exercise ingestion of 20 g whey protein isolate yields a 37% greater post-exercise myofibrillar protein FSR compared with 0 g whey protein isolate ingestion (placebo). Post-exercise ingestion of 5.6 g BCAA yields a 22% greater post-exercise myofibrillar protein FSR compared with 0 g BCAA ingestion (placebo). Adapted from Jackman *et al.* (2017)⁽¹³⁸⁾ and Witard *et al.* (2014)⁽⁴⁶⁾.

supplementazione di 5,6g di BCAA, ad uno l'assunzione di una dose parimente ricca di amminoacidi ramificati (pari a 20g di proteine whey) ed al terzo gruppo è stata assegnata un'assunzione di carboidrati isocalorica. La misurazione di MyoPS è stata effettuata sui tre gruppi, 4h dopo l'assunzione dei supplementi (28).

Ciò che è emerso è che l'ingestione di BCAA ha stimolato del 22% in più la MyoPS rispetto al placebo. Tuttavia, la stimolazione indotta dai BCAA è stata minore del ~50% rispetto all'ingestione di proteine del latte contenenti pari quantità di BCAA (33, 34). Ancora una volta, l'evidenza sembra suggerire che sia necessario il completo corredo amminoacidico per favorire massimamente la sintesi proteica.

Il medesimo gruppo di studio ha proseguito le ricerche, valutando nel 2023 la capacità di indurre MyoPS da parte di BCAA, in concomitanza all'assunzione di carboidrati. Il disegno di studi è stato il medesimo di quello precedente, così come i tempi di somministrazione dei pasti. È stato riscontrato che la co-assunzione di BCAA e carboidrati ha aumentato MyoPS del 15% rispetto ad un pasto isocalorico di soli carboidrati (35).

La stimolazione di MyoPS da parte di BCAA e proteine sembra inoltre aumentare in maniera dose-dipendente: somministrando una dose ridotta di 6,25g di proteine

implementate con BCAA, si osserva una stimolazione minore di MyoPS, sia in condizioni di riposo che dopo esercizio fisico, rispetto all'ingestione di 25g di proteine (36).

Questa ipotesi risulta ulteriormente avvalorata da uno studio svolto da Monteny e colleghi, che ha dimostrato come l'ingestione di 18,7g di proteine stimoli minormente MyoPS rispetto all'ingestione di una dose maggiore di 35,1g (37).

In contrasto a quanto osservato, uno studio capitanato da Moberg, non ha rilevato alcuna differenza in termini di MyoPS dopo l'assunzione di 50mg/kg di leucina, 110mg/kg di BCAA, 290mg/kg di EAA o placebo, successivamente allo svolgimento di esercizio fisico (31).

Per soggetti sani, giovani e fisicamente attivi, infatti, se è vero che l'assunzione di leucina stimola la SPM (108, 117-119), è altrettanto consolidato che tale stimolazione non è differente a quella indotta dal consumo di 20g di proteine del latte non addizionate di tale aa (119, 120). Si può quindi sostenere che la supplementazione di leucina risulta inutile in giovani soggetti atletici, quando questi assumono una corretta quantità di proteine di alta qualità (121).

In un recente studio, è stata indagata la variazione della SPM in adulti sani, in seguito allo svolgimento di un intenso esercizio di resistenza, in presenza di concomitante assunzione di EAA in diversi dosaggi. Gli EAA sono stati somministrati sottoforma di 0, 5, 10, 20 o 40g di proteine dell'uovo. Ciò che è emerso è che la SPM è guidata in modo dose-dipendente dall'assunzione di EAA e che in particolare, la dose maggiormente efficace risultano essere 10g di EAA (corrispondenti a 20g di proteine dell'uovo). Al superamento di tale quantità si è invece riscontrato un aumento dell'ossidazione della leucina (122).

Sono state poi svolte ulteriori ricerche, concludendo che la stessa quantità di EAA (10g) è quella maggiormente capace di stimolare SPM anche in soggetti a riposo (123).

5.3. Evidenze della supplementazione

5.3.1. Leucina e contributi amminoacidici

Per diversi decenni la leucina è stata considerata come un potente ed indipendente stimolatore della SPM, sia in vitro (91, 94, 102, 110, 111), che in vivo (99, 112-116). Nel secondo caso, la leucina ha dimostrato aumentati ratei di SPM del 65% in cellule muscolari di topo perfuse con una soluzione a base di tale amminoacido, rispetto al confronto costituito da una soluzione salina, oppure contenente valina o isoleucina (113).

Diversi studi hanno quindi proseguito questa ricerca, focalizzandosi sulla supplementazione nell'essere umano. Katsanos e colleghi hanno analizzato i diversi effetti indotti dalla supplementazione di due soluzioni di EAA con identici contenuti azotati, ma differenti per il contenuto in leucina, in due gruppi a diverse età. Nel gruppo maggiormente giovane è emersa capacità di stimolazione della SPM in entrambi i casi; tuttavia nel gruppo di anziani questa è risultata evidente solo quando è stata somministrata la formulazione arricchita con leucina (106).

Questa scoperta è confermata anche da Rieu e colleghi, che con il loro studio (107) hanno anch'essi sottolineato come il beneficio indotto dalla leucina sia dipendente dall'età.

Glynn e colleghi hanno proseguito le ricerche, osservando le differenze metaboliche indotte dalla somministrazione di 10g di EAA contenenti tenori diversi di leucina, ed allo stesso tempo non contenenti alcun altro nutriente (eliminando quindi molti fattori di confondimento presenti in altri studi in materia).

Ciò che hanno concluso è che la supplementazione di EAA arricchiti di leucina non ha apportato alcun beneficio aggiunto al rateo di SPM, rispetto alla normale

supplementazione di EAA. In entrambi i casi, comunque, SPM risulta aumentata rispetto a soggetti non sottoposti ad integrazione (124).

Questo fenomeno risulta piuttosto controverso, perché da una parte la leucina è stimolatore diretto della traduzione ed allungamento per via dei suoi effetti su mTORC1, ma dall'altra quando viene introdotta nella dieta non sembra aver alcun beneficio rispetto ad altri EAA. Tali evidenze sono spiegabili per via del fatto che il trasporto amminoacidico intra-muscolare è un processo limitato dalla quantità e quindi saturabile (90, 97, 123, 125, 126).

Ecco che si ribadisce ancora una volta come la SPM non venga influenzata dall'integrazione di leucina, una volta che un soggetto assuma già una corretta quantità di EAA.

Anche osservando i singoli contributi delle concentrazioni amminoacidiche nello stimolare la FSR, si può notare come sussista una relazione direttamente proporzionale tra queste, tranne che per gli amminoacidi triptofano e istidina, che infatti non compaiono tra i grafici.

Tuttavia, studi condotti in altri laboratori hanno riscontrato che la sola supplementazione cronica di parte degli EAA (ad esempio soltanto leucina o BCAA) risulta non sufficiente a stimolare la FSR o comunque ad indurre ipertrofia muscolare (156-160). Questo perché, se si verifica disponibilità di solo una parte del corredo di EAA, sarà necessario per il corpo indurre un aumento di CPM, in modo da compensare la mancanza di precursori.

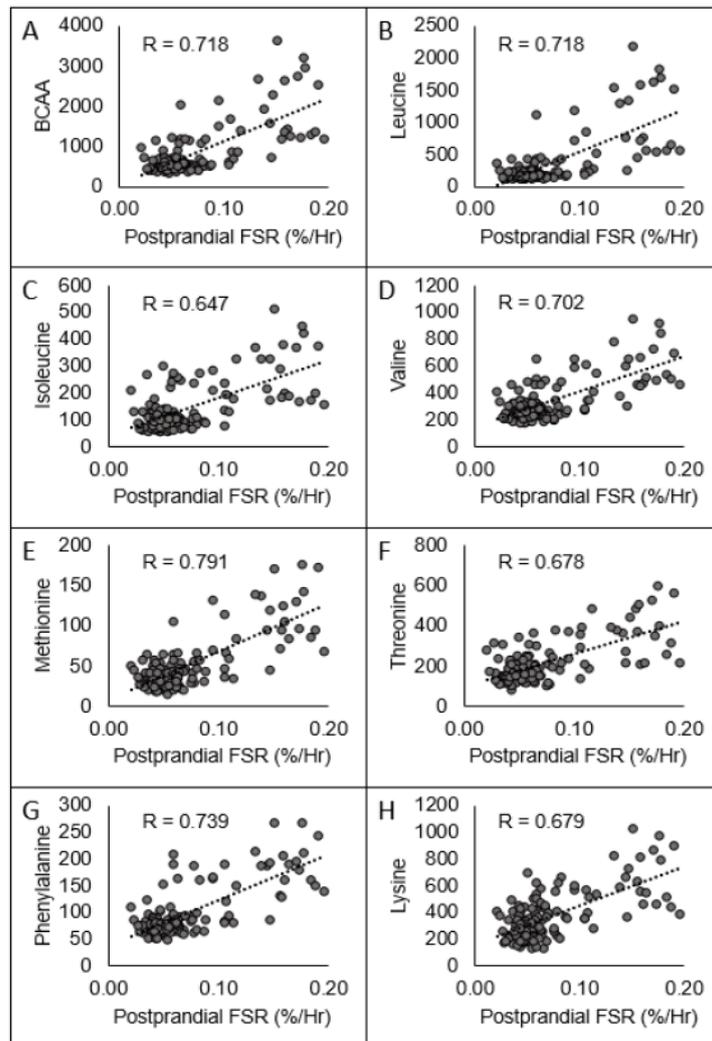


Figure 2. Relationships between C_{Max} (umol/L) of the sum of the branched chain amino acids (A; BCAAs) and individual amino acids (B–H) to postprandial FSR. Not pictured: non-significant relationships between tryptophan and histidine.

Rimangono comunque da chiarire eventuali ruoli benefici dati dall'integrazione di leucina in individui affetti da perdita muscolare, condizioni di proteolisi, età avanzata, deprivazione calorica e prolungati esercizi di endurance.

5.3.2 Suddivisioni temporali delle assunzioni

Il timing dell'assunzione dei pasti e dei supplementi proteici è una strategia dietetica molto praticata, con lo scopo di ottimizzare quella che è la risposta anabolica che si verifica in seguito allo svolgimento dell'esercizio fisico. Molti individui, infatti, tendono a concentrare le assunzioni durante o in prossimità dei momenti di attività fisica, con

lo scopo di facilitare il rimodellamento muscolare e l'ipertrofia (179). In particolar modo ciò che risulta fondamentale per ottenere tali risultati, è la presenza degli amminoacidi essenziali, sono invece minimi se non assenti i contributi dati da altri amminoacidi (180,181). Diversi studi hanno dimostrato che il consumo di proteine nel periodo peri-allenamento sia correlato ad un aumento della forza muscolare e dell'ipertrofia (182-185); tesi che viene invece smentita da altri ricercatori (186-188).

Tutti gli studi in materia considerati fino ad ora sono però accomunati dal fatto di includere campioni di pazienti molto ridotti, il che avrebbe potuto fare registrare dei risultati non significativi, per via della presenza di errori di tipo II.

Sono stati quindi presi in considerazione numerosi studi sull'argomento, ed è stata effettuata una meta-regressione multilivello, al fine di poter determinare se effettivamente lo schema temporale delle assunzioni possa avere effetti benefici sull'incremento delle prestazioni fisiche e dell'accrescimento muscolare.

Per ogni valore di 1-RM, è stato calcolato un effect size (ES) in termini di variazione pre- e post-test. È stato poi diviso dalla deviazione standard pre-test (189). È poi stata calcolata la varianza campionaria di ogni ES con il principio di Morris e DeShon (189). In assenza controlli sulle covariabili, è emerso un aumento significativo dell'ipertrofia muscolare in seguito al controllo del timing delle assunzioni ($ES = 0,24 \pm 0,10$).

Si ricorda che generalmente vengono considerati valori di ES di 0,2 come piccoli, 0,5 moderati, 0,8 o superiori grandi.

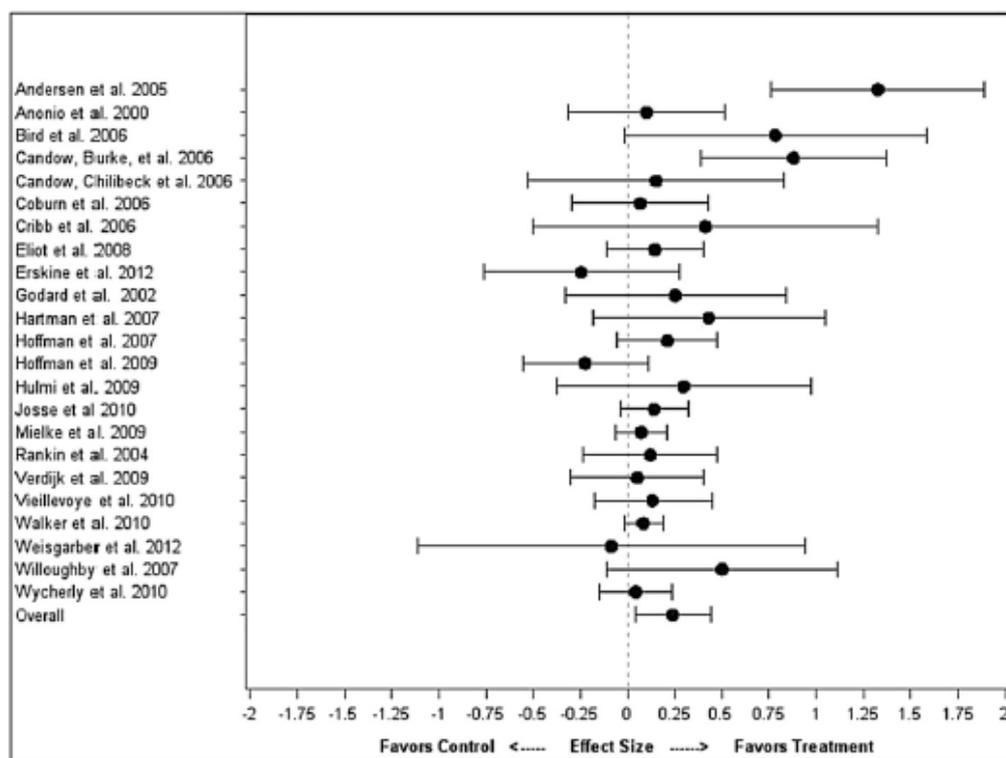


Figure 2 Impact of protein timing on hypertrophy by study.

Si ricorda che questo è vero quando non si considerano le covariabili, infatti, effettuando una regressione che tenga conto di queste, gli effetti benefici sopra citati, risultano del tutto assenti (178).

Per quanto riguarda l'incremento della forza muscolare, non sono stati riscontrati incrementi significativi.

Dopo ulteriori analisi, è emerso come l'assunzione totale di proteine sia di gran lunga il più importante predittore di ipertrofia muscolare, correlabile ad un incremento di ~0,2 punti di ES ogni 0,5g/kg di proteine ingerite (178). Questa ipotesi risulta infatti anche in linea con quella di Cermak e colleghi (190), i quali non hanno indagato alcun timing nell'assunzione proteica, ma hanno dimostrato come la quantità totale di proteine assunta in termini di g/kg/die sia il principale fattore modulante la sintesi proteica. Ecco che emerge come tale correlazione sia spiegabile quasi esclusivamente per via dei differenti dosaggi di proteine somministrati nei vari studi.

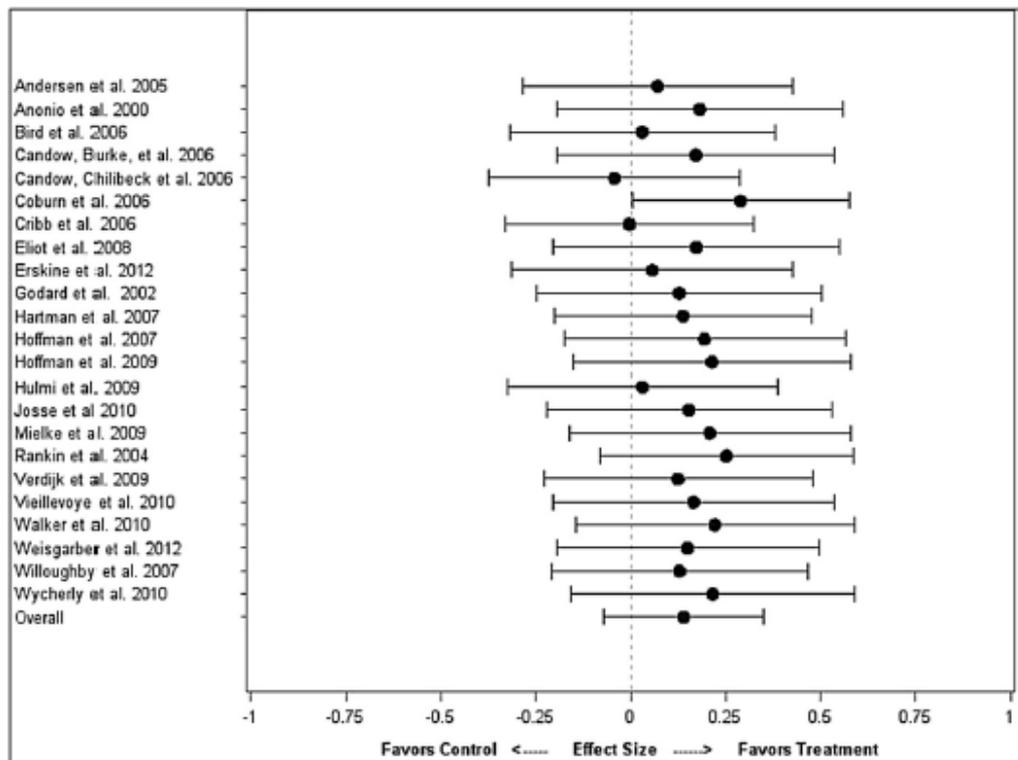


Figure 3 Impact of protein timing on hypertrophy by study, adjusted for total protein intake.

Si ricorda comunque come la grande maggioranza degli studi, tengano conto di soggetti non praticanti regolarmente esercizio fisico di resistenza. Questo risulta infatti un fattore molto importante nel determinare la risposta in seguito allo svolgimento di attività fisica (191). Inoltre, solamente 4 studi sono stati considerati idonei ai criteri di inclusione (178). Appare quindi evidente come, in data odierna, non siano presenti evidenze verificate che il tempo di assunzione di un pasto proteico risulti correlato in alcun modo ad un incremento delle prestazioni fisiche o dell'ipertrofia.

Per quanto riguarda invece le quantità delle assunzioni giornaliere, è stato evidenziato come livelli superiori di intake proteici siano di fondamentale importanza soprattutto durante le prime fasi dell'esercizio intenso di resistenza. Questa affermazione è supportata da Lemon e colleghi, i quali hanno dimostrato come bodybuilder principianti, richiedano un intake proteico giornaliero di 1,6-1,7 g/kg affinché il loro organismo non ricada in un bilancio di azoto negativo (188).

Questa aumentata richiesta proteica è attribuibile ai repentini cambiamenti che si verificano nel rateo di SPM ed al bisogno di sostenere complessivamente, un maggiore tasso di massa magra, piuttosto che all'aumento del catabolismo delle proteine stesse (189).

Sono infatti presenti evidenze, che suggeriscono come il fabbisogno proteico giornaliero in realtà diminuisca leggermente fino a 1,4 g/kg/die in individui altamente allenati, in quanto questi presentano una maggiore efficienza metabolica nell'utilizzo dell'azoto introdotto con la dieta (190). Rimangono comunque necessari ulteriori studi in materia.

Se è vero che al momento non esistano prove concrete a supporto di quale sia il momento "migliore" durante la giornata in cui concentrare l'assunzione di proteine, l'assunzione di queste prima di coricarsi, risulta essere un argomento di crescente interesse nella ricerca scientifica, poiché questa strategia nutrizionale sembra offrire benefici significativi per la sintesi proteica muscolare (MPS) e il recupero durante il sonno.

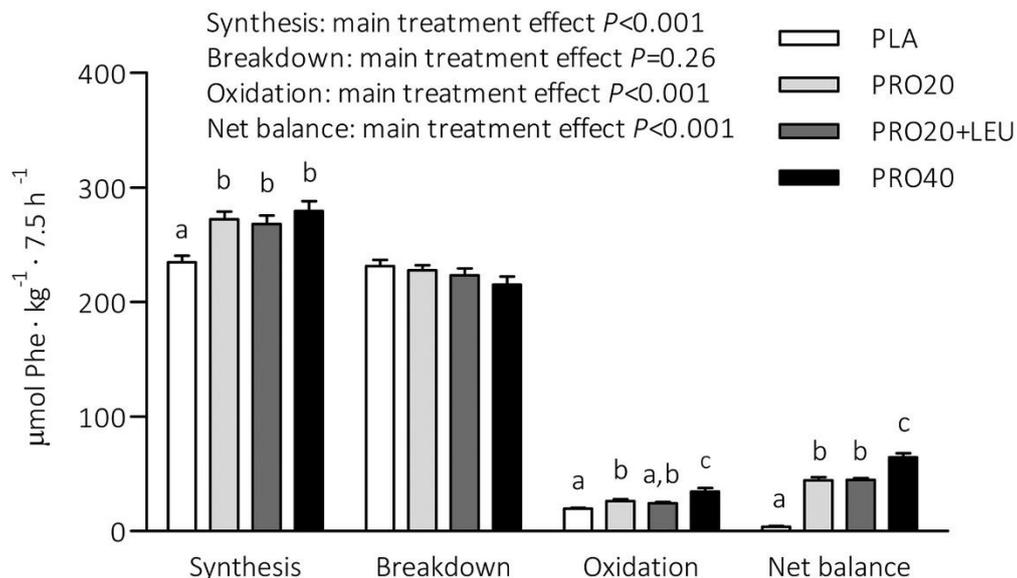
Durante la notte, il corpo entra in una fase prolungata di digiuno di 6-8h. In questo lasso temporale, la concentrazione plasmatica degli amminoacidi vede un calo importante, durante il quale la disponibilità di questi per la SPM risulta limitata. Consumare proteine prima di dormire aiuta a mantenere un apporto costante di amminoacidi nel sangue, prevenendo il catabolismo muscolare e promuovendo una maggiore SPM notturna (195).

Uno studio di Snijders e colleghi, ha dimostrato che l'ingestione di circa 40 grammi di caseina prima di coricarsi, può migliorare significativamente la sintesi proteica muscolare e favorire l'adattamento muscolare dopo un allenamento di resistenza (196). Questo si verifica in quanto la caseina è una proteina a lento rilascio: a differenza dei classici supplementi a base di proteine del latte, questa viene rilasciata lentamente all'interno del flusso sanguigno. Oltre al miglioramento della SPM notturna,

l'assunzione di proteine prima del sonno è stata correlata anche a incrementi nella forza e nella massa muscolare. Lo stesso gruppo di ricerca ha osservato come soggetti che assumono proteine prima di dormire, durante un programma di allenamento di resistenza, riportano maggiori aumenti in termini di massa e forza muscolare rispetto a coloro che non le assumevano (196).

Ecco, quindi, che tale supplementazione contribuisce al mantenimento di un bilancio proteico positivo durante la notte, il che è cruciale per la crescita e il mantenimento della massa muscolare (197).

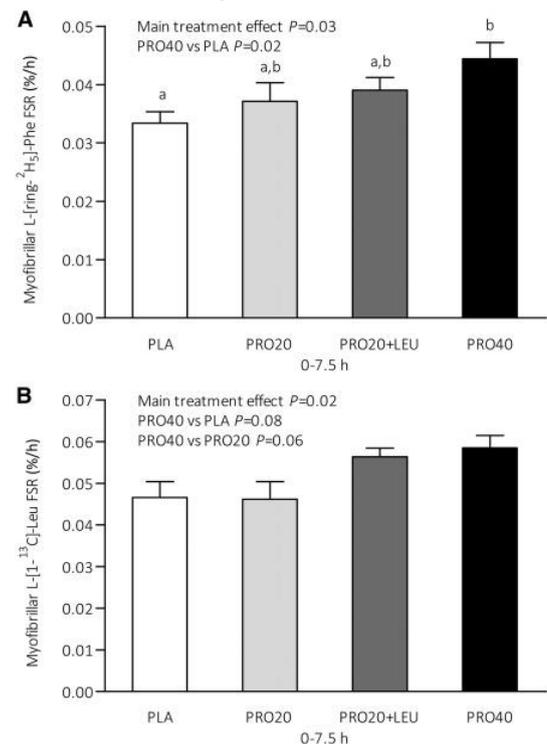
Altri studi hanno voluto focalizzarsi sull'assunzione di casine prima del sonno, come quello condotto nel 2017 da Kouw e colleghi. In questo studio, condotto su 48 anziani maschi, si sono voluti indagare gli effetti mediati dall'ingestione di 40g di caseina (PRO40), 20g (PRO20), 20g + 1,5g di leucina (PRO20+LEU) oppure placebo (PLA) prima di dormire. Lo studio, randomizzato ed a doppio cieco, ha rilevato i valori corporei totali di: sintesi proteica, catabolismo proteico, ossidazione e bilancio netto durante un periodo notturno di 7,5h (200).



Ciò che è emerso è che la SPCT risulta maggiore in tutti i gruppi di assunzione rispetto al placebo ($P < 0,05$). Non risultano significative differenze per quanto riguarda il

catabolismo proteico corporeo totale ($P = 0,26$). Risultano invece maggiori tassi di ossidazione per il gruppo di assunzione PRO40 e PRO20 rispetto al placebo ($P < 0,05$). Complessivamente, comunque, il bilancio proteico netto risulta di gran lunga maggiore in tutti i gruppi di assunzione proteica rispetto al placebo ($P < 0,001$), con PRO40 che registra il valore maggiore anche rispetto a PRO20 e PRO20+LEU ($P < 0,001$).

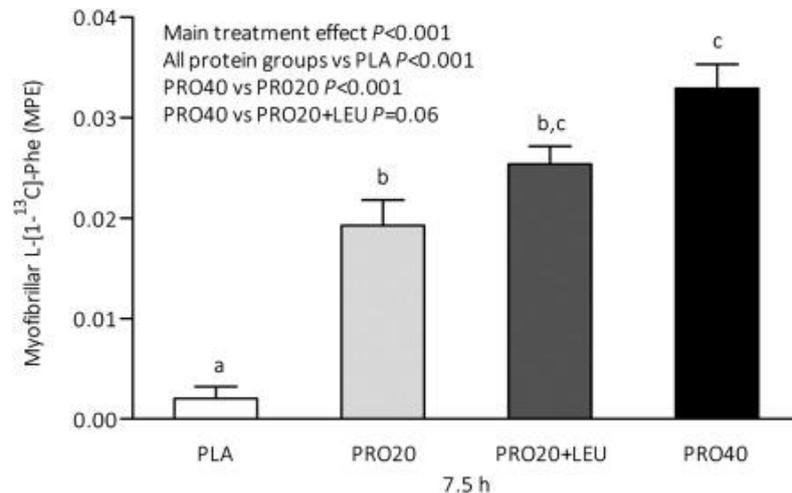
L'ingestione di 40 g di proteine prima del sonno si è dimostrata capace di aumentare i tassi di SPM durante la notte di circa il 33% rispetto ai valori osservati nel gruppo placebo (valori misurati con tracciante di fenilalanina, $P = 0,02$). Similmente, è stato osservato un tasso di sintesi proteica frazionata (FSR) superiore di circa il 25% nel gruppo PRO40 rispetto al placebo, sebbene questa differenza non abbia raggiunto la significatività statistica ($P = 0,08$). I valori di FSR risultano in media di $0,033\% \pm 0,002\%/h$ nel placebo, $0,037\% \pm 0,003\%/h$ in PRO20, $0,039\% \pm 0,002\%/h$ in PRO20+LEU e $0,044\% \pm 0,003\%/h$ in PRO40, che dimostra quindi il contributo maggiore ($P = 0,03$).



Sono state svolte anche delle analisi a posteriori, che hanno riconfermato i dati osservati: i valori di FSR miofibrillari erano più elevati nel gruppo PRO40 rispetto al placebo ($P = 0,02$). Non sono state osservate differenze nei valori di FSR per PRO20 ($P = 0,73$) e PRO20+LEU ($P = 0,42$).

Le stesse analisi sono state ripetute utilizzando come tracciante la leucina: in questo caso i valori di FSR sono risultati $0,047\% \pm 0,004\%/h$ nel placebo, $0,046\% \pm 0,004\%/h$ in PRO20, $0,056\% \pm 0,002\%/h$ in PRO20+LEU e $0,058\% \pm 0,003\%/h$ in PRO40, che

anche in questo caso ha fatto registrare l'effetto principale ($P = 0,02$). Le analisi post hoc hanno mostrato valori di FSR maggiori nel gruppo PRO40 rispetto al placebo ($P = 0,08$). PRO20 ($P = 0,99$) e PRO20+LEU ($P = 0,19$) non differivano rispetto al placebo.



L'ingestione di proteine prima di dormire aumenta i tassi di sintesi proteica muscolare durante la notte, anche in un contesto in cui quantità sostanziali ($1,1 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) di proteine sono già consumate con una normale cena ricca di proteine ($29 \pm 2 \text{ g}$ di proteine) consumata 5 ore prima del sonno.

Come si può osservare dal grafico, l'ingestione precedente al sonno ha registrato un sostanziale aumento nell'incorporamento miofibrillare della fenilalanina marcata, ovvero un maggiore utilizzo degli aminoacidi introdotti con la dieta. Questo vale maggiormente per il gruppo PRO40 rispetto a tutti gli altri ($P < 0,001$).

Kouw e colleghi hanno poi dimostrato che l'assunzione giornaliera di proteine prima di dormire aumenta i guadagni in massa muscolare e forza dopo 3 mesi di allenamento di resistenza in giovani uomini che già consumano quantità abbondanti di proteine nella loro dieta ($1,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (201). Circa 40 g di proteine di alta qualità sembrano invece essere necessari per massimizzare i tassi di sintesi proteica muscolare post-prandiale negli individui anziani (202).

Oltre a ottimizzare il contenuto proteico di ogni pasto, è stato recentemente dimostrato che l'attività fisica svolta in serata possa ulteriormente migliorare la SPM notturna, seguente l'ingestione di proteine prima del periodo di riposo notturno (203).

Un altro aspetto da considerare è l'impatto dell'assunzione di proteine prima di dormire sulla qualità del sonno. Trommelen e colleghi hanno riportato che l'ingestione di proteine prima di dormire non interferisce con il ciclo del sonno, né con la qualità del riposo e può anzi supportare il recupero muscolare (198).

Lo stesso gruppo di ricerca ha inoltre evidenziato come, a favore dei loro studi, l'attività della sintesi proteica muscolare durante la notte sembra essere sensibile all'assunzione dei relativi elementi anabolici necessari (199).

In conclusione, possiamo affermare che una distribuzione adeguata dell'assunzione proteica tra i pasti principali possa aumentare i tassi di sintesi proteica muscolare durante la giornata (204-206) e sia associata a una maggiore massa magra negli adulti anziani (207). Questa distribuzione dovrebbe includere un'assunzione di proteine a lento rilascio (caseine) prima del sonno in modo da massimizzare le concentrazioni amminoacidiche e quindi la sintesi proteica anche durante il periodo di digiuno notturno (178).

Capitolo VI - Conclusioni

L'integrazione alimentare a base di amminoacidi e proteine risulta un elemento cardine in quella che è la sfera alimentare di qualsiasi sportivo.

Soggetti altamente allenati richiedono quantitativi di assunzione proteica ed amminoacidica molto maggiori rispetto ad individui ordinari, che si attestano intorno ai 1,4g/kg/die. Questo fabbisogno è riconducibile al fatto che i BCAA sono i primi AA verso cui gli atleti vanno incontro a carenza (6), in quanto l'esercizio fisico di resistenza induce non solo un aumento del catabolismo, e quindi dell'ossidazione proteica (7);

ma anche alterazioni ormonali importanti che in ultima analisi si ripercuotono sulla regolazione del bilancio anabolico e catabolico corporeo.

Come dimostrato da Carwyn P.M. Sharp (80), la concentrazione plasmatica di cortisolo in seguito allo svolgimento di esercizio fisico può registrare aumenti fino a +40% rispetto ad individui a riposo. Questo aumento può però essere diminuito in maniera massiccia, attraverso un'adeguata integrazione di BCAA.

L'effetto di riduzione del cortisolo è confermato anche da Bird e colleghi (77).

La creatina chinasi è un enzima la cui concentrazione plasmatica (espressa in U/L) risulta aumentata in seguito allo svolgimento di esercizio fisico. Anche questo effetto può essere mitigato dall'assunzione concomitante di BCAA (80) in maniera dose-dipendente.

La capacità dei BCAA di mitigare tali effetti è confermata anche dal Dott. Coombes (78), nonché da un altro gruppo di ricerca indipendente (79).

L'esercizio fisico non è correlato soltanto a cambiamenti di natura sanguigna, è infatti stato dimostrato come i sistemi di autofagia e lisosomiali, siano attivati sia da condizioni di disuso (64) e restrizione calorica (65), ma soprattutto in seguito all'esercizio fisico (66, 67). Ancora, lo svolgimento di esercizio fisico è indissolubilmente associato ad un aumento di quello che è il CPM (43, 44).

David Church e colleghi hanno dimostrato come un aumento sia della concentrazione plasmatica degli EAA circolanti, dei BCAA, ma anche dei singoli amminoacidi, è direttamente correlabile con la stimolazione della FSR postprandiale, della Δ FSR e della SPCT, in modo dipendente fino al 50%. Le sole eccezioni sono triptofano ed istidina. È stato concluso che aumentando del 100% quella che è la concentrazione amminoacidica plasmatica media di soggetti che non svolgono supplementazione alimentare, si registrano aumenti di Δ FSR del ~34%.

Tali dati sono peraltro in linea con quelli ottenuti da Pennings e colleghi e da altri studi effettuati in altri laboratori indipendenti (133, 134, 135-152).

La supplementazione di EAA risulta capace di stimolare la FSR e la SPM (8-12) fino ad un plateau che si aggira a dosaggi di 15g per assunzione. Ecco che introiti eccessivi di EAA non sembrano apportare alcun beneficio al metabolismo muscolare (13, 14, 133, 137, 147, 152-155), anzi sembrano essere meno efficaci rispetto all'assunzione di 10g, che permette la maggiore stimolazione anabolica in assoluto (122, 123).

Per quanto riguarda la supplementazione di BCAA, le considerazioni sono simili a quelle ottenute con la supplementazione di EAA, ma solo nel breve periodo.

Recenti studi hanno infatti dimostrato come la sintesi proteica miofibrillare (MyoPS) nel periodo post-esercizio 0-2h venga stimolata in modo comparabile dall'assunzione di 6g di BCAA o 30g di proteine del latte (32), tuttavia si viene a creare un importante gap in periodi di digiuno più prolungati (32).

Simili considerazioni sono supportate da diversi studi (31, 28), tanto che alcuni asseriscono ad una capacità di 20g di proteine, di stimolare la MyoPS ~50% più efficacemente rispetto a 5,6g di BCAA. (33, 34). Gli stessi concetti sono in linea con quanto osservato da V. Churchward (36).

Per diversi anni, la leucina è stata studiata in maniera approfondita, in quanto attivatore indipendente della SPM (99, 108-112-119) tramite stimolazione diretta di mTOR (18-20) ed in particolare del complesso mTORC1 (89, 102-105).

Tuttavia, la stimolazione indotta dalla leucina non è differente a quella indotta dal consumo di 20g di proteine del latte non addizionate di tale aa (119, 120).

Lo stesso risultato è stato poi confermato da Glynn e colleghi (124).

Si può quindi sostenere che la supplementazione di sola leucina non risulta apportare alcun beneficio aggiuntivo ad individui atletici, quando questi assumono una corretta quantità di proteine di alta qualità (121).

Risulta invece importante il timing delle assunzioni proteiche durante la giornata, in modo da mantenere costantemente elevate le concentrazioni plasmatiche amminoacidiche. Questo è vero soprattutto durante la notte, in cui il corpo entra in un periodo di digiuno prolungato. L'ingestione di 40g di caseina prima del sonno, si è dimostrata efficace nell' aumentare la sintesi proteica inibendo i processi dediti all'anabolismo muscolare (196, 197, 200). Anche durante il digiuno notturno, la supplementazione di leucina non sembra apportare alcun beneficio aggiunto in termini di FSR (200).

Complessivamente, possiamo quindi concludere che l'esercizio fisico implica cambiamenti fisiologici importanti a livello corporeo, caratterizzati da un aumento di quelle che sono le attività sia anaboliche che cataboliche. Questi ultimi cambiamenti possono però essere ridotti e mitigati da una corretta dieta proteica, che risulta fondamentale in organismi altamente allenati come gli atleti professionisti. A data odierna, non sono presenti prove sostanziali che assumere un determinato tipo di amminoacido sia maggiormente efficace rispetto ad altri in termini di ipertrofia ed iperplasia muscolare. Risulta invece assodato che fonti proteiche più complete, distribuite lungo tutto l'arco della giornata (e della notte), siano maggiormente efficaci nello stimolare la sintesi proteica rispetto ai soli EAA, BCAA o soprattutto dei singoli amminoacidi.

Capitolo VII – Bibliografia

1. Malowany JM, West DWD, Williamson E, et al. (2019) Protein to maximize whole-body anabolism in resistance trained females after exercise. *Med Sci Sports Exerc* 51, 798–804.
2. Mazzulla M, Abou Sawan S, Williamson E, et al. (2020) Protein intake to maximize whole-body anabolism during postexercise recovery in resistance-trained men with high habitual intakes is severalfold greater than the current recommended dietary allowance. *J Nutr* 150, 505–511.
3. Wooding DJ, Packer JE, Kato H, et al. (2017) Increased protein requirements in female athletes after variable-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc* 49, 2297–2304.
4. Weijzen MEG, van Gassel RJJ, Kouw IWK, et al. (2022) Ingestion of free amino acids compared with an equivalent amount of intact protein results in more rapid amino acid absorption and greater postprandial plasma amino acid availability without affecting muscle protein synthesis rates in young adults in a double-blind randomized trial. *J Nutr* 152, 59–67.
5. Trommelen J & van Loon LJC (2021) Assessing the wholebody protein synthetic response to feeding in vivo in human subjects. *Proc Nutr Soc* 80, 139–147.
6. Kato H, Suzuki K, Bannai M, et al. (2018) Branched-chain amino acids are the primary limiting amino acids in the diets of endurance trained men after a bout of prolonged exercise. *J Nutr* 148, 925–931.
7. Tarnopolsky M (2004) Protein requirements for endurance athletes. *Nutrition* 20, 662–668.
8. Børsheim E, Tipton KD, Wolf SE, et al. (2002) Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E648–657.
9. Rasmussen BB, Tipton KD, Miller SL, et al. (2000) An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. *J Appl Physiol* (1985) 88, 386–392.
10. Smith K, Reynolds N, Downie S, et al. (1998) Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein. *Am J Physiol* 275, E73–E78.
11. Tipton KD, Gurkin BE, Matin S, et al. (1999) Nonessential amino acids are not necessary to stimulate net muscle protein synthesis in healthy volunteers. *J Nutr Biochem* 10, 89–95.
12. Volpi E, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, et al. (2003) Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am J Clin Nutr* 78, 250–258.

13. Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, et al. (2009) Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr* 89, 161–168.
14. Witard OC, Jackman SR, Breen L, et al. (2014) Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *Am J Clin Nutr* 99, 86–95.
15. Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, et al. (2005) Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* 19, 422–424.
16. Buse MG & Reid SS (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest* 56, 1250–1261.
17. Buse MG & Weigand DA (1977) Studies concerning the specificity of the effect of leucine on the turnover of proteins in muscles of control and diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 475, 81–89.
18. Atherton PJ, Smith K, Etheridge T, et al. (2010) Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids* 38, 1533–1539.
19. Smith K, Barua JM, Watt PW, et al. (1992) Flooding with L-[1-13C]leucine stimulates human muscle protein incorporation of continuously infused L-[1-13C]valine. *Am J Physiol* 262, E372–E376.
20. Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, et al. (2013) Effects of leucine and its metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *J Physiol* 591, 2911–2923.
21. Dickinson JM, Fry CS, Drummond MJ, et al. (2011) Mammalian target of rapamycin complex activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids. *J Nutr* 141, 856–862.
22. Liu GY & Sabatini DM (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21,183–203.
23. Betz C & Hall MN (2013) Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol* 203, 563–574.
24. Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, et al. (2011) Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol* 13, 453–460.
25. Hannaian SJ, Hodson N, Abou Sawan S, et al. (2020) Leucine-enriched amino acids maintain peripheral mTOR-Rheb localization independent of myofibrillar protein synthesis and mTORC1 signaling postexercise. *J Appl Physiol* (1985) 129, 133–143.

26. Borgenvik M, Apró W & Blomstrand E (2012) Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E510–E521.
27. Liu Z, Jahn LA, Long W, et al. (2001) Branched chain amino acids activate messenger ribonucleic acid translation regulatory proteins in human skeletal muscle, and glucocorticoids blunt this action. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2136–2143.
28. Jackman SR, Witard OC, Philp A, et al. (2017) Branched-chain amino acid ingestion stimulates muscle myofibrillar protein synthesis following resistance exercise in humans. *Front Physiol* 8, 390.
29. Apró W & Blomstrand E (2010) Influence of supplementation with branched-chain amino acids in combination with resistance exercise on p70S6 kinase phosphorylation in resting and exercising human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 200, 237–248.
30. Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, et al. (2004) Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E1–E7.
31. Moberg M, Apró W, Ekblom B, et al. (2016) Activation of mTORC1 by leucine is potentiated by branched-chain amino acids and even more so by essential amino acids following resistance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 310, C874–C884.
32. Fuchs CJ, Hermans WJH, Holwerda AM, et al. (2019) Branched-chain amino acid and branched-chain ketoacid ingestion increases muscle protein synthesis rates in vivo in older adults: a double-blind, randomized trial. *Am J Clin Nutr* 110, 862–872.
33. Witard OC, Jackman SR, Breen L, et al. (2014) Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *Am J Clin Nutr* 99, 86–95.
34. Churchward-Venne TA, Burd NA, Mitchell CJ, et al. (2012) 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* 590, 2751–2765.
35. Jackman SR, Wallis GA, Yu J, et al. (2023) Co-ingestion of branched-chain amino acids and carbohydrate stimulates myofibrillar protein synthesis following resistance exercise in trained young men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 33, 1–9.

36. Churchward-Venne TA, Breen L, Di Donato DM, et al. (2014) 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* 99, 276–286.
37. Monteyne AJ, Coelho MOC, Porter C, et al. (2020) Branched-chain amino acid fortification does not restore muscle protein synthesis rates following ingestion of lower- compared with higher-dose mycoprotein. *J Nutr* 150, 2931–2941.
38. May ME & Buse MG (1989) Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. *Diabetes Metab Rev* 5, 227–245.
39. Ferrando AA, Williams BD, Stuart CA, et al. (1995) Oral branched-chain amino acids decrease whole-body proteolysis. *JPEN* 19, 47–54.
40. Louard RJ, Barrett EJ & Gelfand RA (1990) Effect of infused branched-chain amino acids on muscle and whole-body amino acid metabolism in man. *Clin Sci (Lond)* 79, 457–466.
41. Louard RJ, Barrett EJ & Gelfand RA (1995) Overnight branched-chain amino acid infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. *Metabolism* 44, 424–429.138. Jackman SR, Witard OC, Philp A, et al. (2017) Branched-chain amino acid ingestion stimulates muscle myofibrillar protein synthesis following resistance exercise in humans. *Front Physiol* 8, 390.
42. Lysenko EA, Vepkhvadze TF, Lednev EM, et al. (2018) Branched-chain amino acids administration suppresses endurance exercise-related activation of ubiquitin proteasome signaling in trained human skeletal muscle. *J Physiol Sci* 68, 43–53.
43. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, et al. (1997) Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 273, E99–E107.
44. Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, et al. (1999) Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol* 276, E118–E124.
45. Nair KS & Short KR (2005) Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J Nutr* 135, 1547s–1552s.
46. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, et al. (1995) Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 268, E514–E520.
47. Areta JL, Burke LM, Camera DM, et al. (2014) Reduced resting skeletal muscle protein synthesis is rescued by resistance exercise and protein ingestion following short-term energy deficit. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306, E989–E997.

48. Hector AJ, Marcotte GR, Churchward-Venne TA, et al. (2015) Whey protein supplementation preserves postprandial myofibrillar protein synthesis during short-term energy restriction in overweight and obese adults. *J Nutr* 145, 246–252.
49. Drummond MJ, Glynn EL, Fry CS, et al. (2009) Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle. *J Nutr* 139, 2279–2284.
50. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, et al. (2008) Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1333–E1340.
51. Margolis LM, McClung HL, Murphy NE, et al. (2017) Skeletal muscle myomiR are differentially expressed by endurance exercise mode and combined essential amino acid and carbohydrate supplementation. *Front Physiol* 8, 182.
52. Camera DM, Ong JN, Coffey VG, et al. (2016) Selective modulation of MicroRNA expression with protein ingestion following concurrent resistance and endurance exercise in human skeletal muscle. *Front Physiol* 7, 87.
53. Louis E, Raue U, Yang Y, et al. (2007) Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 103, 1744–1751.
54. Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, et al. (2008) Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E43–E51.
55. Nedergaard A, Vissing K, Overgaard K, et al. (2007) Expression patterns of atrogenic and ubiquitin proteasome component genes with exercise: effect of different loading patterns and repeated exercise bouts. *J Appl Physiol* (1985) 103, 1513–1522.
56. Reitelseder S, Agergaard J, Doessing S, et al. (2014) Positive muscle protein net balance and differential regulation of atrogenic expression after resistance exercise and milk protein supplementation. *Eur J Nutr* 53, 321–333.
57. Stefanetti RJ, Lamon S, Rahbek SK, et al. (2014) Influence of divergent exercise contraction mode and whey protein supplementation on atrogenic-1, MuRF1, and FOXO1/3A in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 116, 1491–1502.
58. Yang Y, Jemiolo B & Trappe S (2006) Proteolytic mRNA expression in response to acute resistance exercise in human single skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* (1985) 101, 1442–1450.

59. Abdulla H, Smith K, Atherton PJ, et al. (2016) Role of insulin in the regulation of human skeletal muscle protein synthesis and breakdown: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 59, 44–55.
60. Greenhaff PL, Karagounis LG, Peirce N, et al. (2008) Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E595–E604.
61. Wilkes EA, Selby AL, Atherton PJ, et al. (2009) Blunting of insulin inhibition of proteolysis in legs of older subjects may contribute to age-related sarcopenia. *Am J Clin Nutr* 90, 1343–1350.
62. Lecker SH, Goldberg AL & Mitch WE (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17, 1807–1819.
63. Sandri M (2013) Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2121–2129.
64. Brocca L, Cannavino J, Coletto L, et al. (2012) The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol* 590, 5211–5230.
65. Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, et al. (2010) Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Exp Gerontol* 45, 138–148.
66. Jamart C, Benoit N, Raymackers JM, et al. (2012) Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 112, 3173–3177.
67. Luo L, Lu AM, Wang Y, et al. (2013) Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Exp Gerontol* 48, 427–436.
68. Tipton KD, Hamilton DL & Gallagher JJ (2018) Assessing the role of muscle protein breakdown in response to nutrition and exercise in humans. *Sports Med* 48, 53–64.
69. Du J, Wang X, Miereles C, et al. (2004) Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 113, 115–123.
70. 7. Buse MG & Reid SS (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest* 56, 1250–1261.
71. 8. Fulks RM, Li JB & Goldberg AL (1975) Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem* 250, 290–298.
72. Il Sole 24 Ore, "Cresce il mercato degli integratori", Monica Melotti
73. Federfarma "Integratori: +60% delle vendite in farmacia rispetto a 10 anni fa"

74. Credenceresearch, report 23668, Nov 15, 2023
75. Kraemer, WJ. Endocrine responses to resistance exercise. *Med SciSports Exerc* 20: S152–S157, 1988.
76. Banfi, G and Dolci, A. Free testosterone/cortisol ratio in soccer: Usefulness of a categorization of values. *J Sports Med Phys Fitness* 46: 611–616, 2006.
77. Bird, SP, Tarpenning, KM, and Marino, FE. Effects of liquid carbohydrate/essential amino acid ingestion on acute hormonal response during a single bout of resistance exercise in untrained men. *Nutrition* 22: 367–375, 2006.
78. Coombes, JS and McNaughton, LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 40: 240–246, 2000.
79. Sheffield, M. Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis. *Ann Med* 32: 181–186, 2000.
80. Carwyn P.M. Sharp and David R. Pearson. Amino acid supplements and recovery from high-intensity resistance training. *Journal of Strength and Conditioning Research - 2010 National Strength and Conditioning Association.*
81. Matthew S. Kaspary, Sarkis J. Hannaian, Zachary W. Bell and Tyler A. Churchward-Venne. The effects of branched-chain amino acids on muscle protein synthesis, muscle protein breakdown and associated molecular signalling responses in humans: an update. Cambridge University Press on behalf of The Nutrition Society.
82. Proud CG. Cell signaling. mTOR, unleashed. *Science*. 2007; 318:926–927.
83. Proud CG. Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1187–1190.
84. Stipanuk MH. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr Rev*. 2007;65:122–129.
85. Drummond MJ, Dreyer HC, Fry CS, Glynn EL, Rasmussen BB. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol*. 2009;106:1374–1384.
86. Wolfe RR, Miller SL. Amino acid availability controls muscle protein metabolism. *Diabetes Nutr Metab*. 1999;12:322–328.
87. Wolfe RR. Regulation of muscle protein by amino acids. *J Nutr*. 2002;132(Suppl):S3219–S3224.

88. Pasiakos SM, Vislocky LM, Carbone JW, et al. Acute energy deprivation affects skeletal muscle protein synthesis and associated intracellular signaling proteins in physically active adults. *J Nutr.* 2010;140:745–751.
89. Drummond MJ, Rasmussen BB. Leucine-enriched nutrients and the regulation of mammalian target of rapamycin signaling and human skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11:222–226.
90. Atherton PJ, Etheridge T, Watt PW, et al. Muscle full effect after oral protein: time-dependent concordance and discordance between human muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1080–1088.
91. Li JB, Jefferson LS. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1978;544:351–359.
92. Rennie MJ. Control of muscle protein synthesis as a result of contractile activity and amino acid availability: implications for protein requirements. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2001;11(Suppl):S170–S176.
93. Garlick PJ, Grant I. Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. *Biochem J.* 1988;254:579–584.
94. Hong SO, Layman DK. Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *J Nutr.* 1984;114:1204–1212.
95. 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;10:89–95
96. 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;78:250–258.
97. Bohe J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *J Physiol.* 2003;552(Pt 1):315–324.
98. Drummond MJ, Glynn EL, Fry CS, Timmerman KL, Volpi E, Rasmussen BB. An increase in essential amino acid availability upregulates amino acid transporter expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298: E1011–E1018.
99. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J Nutr.* 2000;130:139–145.

100. Anthony JC, Lang CH, Crozier SJ, et al. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am J Physiol.* 2002;82:E1092–E110.
101. Anthony JC, Reiter AK, Anthony TG, et al. Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. *Diabetes.* 2002;51:928–936.
102. Buse MG, Reid SS. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest.* 1975;56:1250–1261.
103. Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005;280:33076–33082.
104. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:14238–14243.
105. Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J* 2007;403:1320.
106. 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.* 2006;291:E381–E387.
107. Rieu I, Balage M, Sornet C, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol.* 2006;575(Pt 1): 305–315.
108. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295:E1333–E1340.
109. Drummond MJ, Miyazaki M, Dreyer HC, et al. Expression of growth-related genes in young and older human skeletal muscle following an acute stimulation of protein synthesis. *J Appl Physiol.* 2009;106:1403–1411
110. Buse MG, Weigand DA. Studies concerning the specificity of the effect of leucine on the turnover of proteins in muscles of control and diabetic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 475:81–89.
111. Fulks RM, Li JB, Goldberg AL. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem.* 1975;250:290–298.

112. Anthony JC, Anthony TG, Layman DK. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *J Nutr.* 1999;129:1102–1106.
113. 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;130:2413–2419.
114. Bolster DR, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *J Nutr.* 2004;134:1704–1710.
115. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2005;135:376–382.
116. Vary TC. Acute oral leucine administration stimulates protein synthesis during chronic sepsis through enhanced association of eukaryotic initiation factor 4G with eukaryotic initiation factor 4E in rats. *J Nutr.* 2007;137:2074–2079.
117. Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, et al. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol.* 2008;104:1452–1461.
118. Dreyer HC, Drummond MJ, Pennings B, et al. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294:E392–E400.
119. Tipton KD, Elliott TA, Ferrando AA, Aarsland AA, Wolfe RR. Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009;34:151–161.
120. Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Aarsland AA, Sanford AP, Wolfe RR. Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *Am J Physiol.* 2007;292:E71–E76.
121. Koopman R, Verdijk LB, Beelen M, et al. Co-ingestion of leucine with protein does not further augment post-exercise muscle protein synthesis rates in elderly men. *Br J Nutr.* 2008;99:571–580.
122. Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, et al. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:161–168.
123. Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, et al. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J.* 2005;19:422–424.

124. Glynn EL, Fry CS, Drummond MJ, et al. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J Nutr.* 2010;140:1970–1976.
125. Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol.* 1995;268(3 Pt 1):E514–E520.
126. Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transporters: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E603–E613.
127. Park, S.; Church, D.D.; Azhar, G.; Schutzler, S.E.; Ferrando, A.A.; Wolfe, R.R. Anabolic response to essential amino acid plus whey protein composition is greater than whey protein alone in young healthy adults. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2020, 17, 9.
128. Park, S.; Church, D.D.; Starck, C.; Schutzler, S.E.; Azhar, G.; Kim, I.-Y.; Ferrando, A.A.; Moughan, P.J.; Wolfe, R.R. The impact of Hayward green kiwifruit on dietary protein digestion and protein metabolism. *Eur. J. Nutr.* 2020.
129. Baumann, P.Q.; Stirewalt, W.S.; O'Rourke, B.D.; Howard, D.; Nair, K.S. Precursor pools of protein synthesis: A stable isotope study in a swine model. *Am. J. Physiol.* 1994, 267, E203–E209.
130. Gwin, J.A.; Church, D.D.; Hatch-McChesney, A.; Howard, E.E.; Carrigan, C.T.; Murphy, N.E.; Wilson, M.A.; Margolis, L.M.; Carbone, J.W.; Wolfe, R.R.; et al. Effects of high versus standard essential amino acid intakes on whole-body protein turnover and mixed muscle protein synthesis during energy deficit: A randomized, crossover study. *Clin. Nutr.* 2020.
131. Biolo, G.; Fleming, R.Y.; Maggi, S.P.; Wolfe, R.R. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Metab.* 1995, 268, E75–E84.
132. Shefeld-Moore, M.; Wolfe, R.R.; Gore, D.C.; Wolf, S.E.; Ferrer, D.M.; Ferrando, A.A. Combined effects of hyperaminoacidemia and oxandrolone on skeletal muscle protein synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000, 278, E273–E279.
133. Volpi, E.; Kobayashi, H.; Shefeld-Moore, M.; Mittendorfer, B.; Wolfe, R.R. 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, 250–258.
134. Pennings, B.; Boirie, Y.; Senden, J.M.G.; Gijzen, A.P.; Kuipers, H.; Van Loon, L.J.C. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011, 93, 997–1005.

135. Volpi, E.; Mittendorfer, B.; Wolf, S.E.; Wolfe, R.R. Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am. J. Physiol.* 1999, 277, E513–E520.
136. Mitchell, W.K.; Phillips, B.E.; Williams, J.P.; Rankin, D.; Lund, J.N.; Wilkinson, D.J.; Smith, K.; Atherton, P.J. The impact of delivery profile of essential amino acids upon skeletal muscle protein synthesis in older men: Clinical efficacy of pulse vs. bolus supply. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2015, 309, E450–E457.
137. Pennings, B.; Groen, B.; de Lange, A.; Gijsen, A.P.; Zorenc, A.H.; Senden, J.M.G.; Van Loon, L.J.C. Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012, 302, E992–E999.
138. Kramer, I.F.; Verdijk, L.B.; Hamer, H.M.; Verlaan, S.; Luiking, Y.C.; Kouw, I.W.K.; Senden, J.M.; Van Kranenburg, J.; Gijsen, A.P.; Bierau, J.; et al. Both basal and post-prandial muscle protein synthesis rates, following the ingestion of a leucine-enriched whey protein supplement, are not impaired in sarcopenic older males. *Clin. Nutr.* 2017, 36, 1440–1449.
139. Gorissen, S.H.; Horstman, A.M.; Franssen, R.; Crombag, J.J.; Langer, H.; Bierau, J.; Respondek, F.; Van Loon, L.J. Ingestion of Wheat Protein Increases In Vivo Muscle Protein Synthesis Rates in Healthy Older Men in a Randomized Trial. *J. Nutr.* 2016, 146, 1651–1659.
140. Symons, T.B.; Schutzler, S.E.; Cocke, T.L.; Chinkes, D.L.; Wolfe, R.R.; Paddon-Jones, D. Aging does not impair the anabolic response to a protein-rich meal. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 86, 451–456.
141. Fuchs, C.J.; Hermans, W.J.H.; Holwerda, A.M.; Smeets, J.S.J.; Senden, J.M.; Van Kranenburg, J.; Gijsen, A.P.; Wodzig, W.K.H.W.; Schierbeek, H.; Verdijk, L.B.; et al. Branched-chain amino acid and branched-chain ketoacid ingestion increases muscle protein synthesis rates in vivo in older adults: A double-blind, randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2019, 110, 862–872.
142. Bendtsen, L.Q.; Thorning, T.K.; Reitelseder, S.; Ritz, C.; Hansen, E.T.; Van Hall, G.; Astrup, A.; Sjödin, A.; Holm, L. Human Muscle Protein Synthesis Rates after Intake of Hydrolyzed Porcine-Derived and Cows' Milk Whey Proteins—A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 2019, 11, 989.
143. Glynn, E.L.; Fry, C.S.; Drummond, M.J.; Timmerman, K.L.; Dhanani, S.; Volpi, E.; Rasmussen, B.B. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J. Nutr.* 2010, 140, 1970–1976.

144. Wall, B.T.; Hamer, H.M.; de Lange, A.; Kiskini, A.; Groen, B.B.L.; Senden, J.M.G.; Gijsen, A.P.; Verdijk, L.B.; Van Loon, L.J.C. Leucine co-ingestion improves post-prandial muscle protein accretion in elderly men. *Clin. Nutr.* 2013, 32, 412–419.
145. Chanet, A.; Verlaan, S.; Salles, J.; Giraudet, C.; Patrac, V.; Pidou, V.; Pouyet, C.; Hafnaoui, N.; Blot, A.; Cano, N.; et al. Supplementing Breakfast with a Vitamin D and Leucine-Enriched Whey Protein Medical Nutrition Drink Enhances Postprandial Muscle Protein Synthesis and Muscle Mass in Healthy Older Men. *J. Nutr.* 2017, 147, 2262–2271.
146. Witard, O.C.; Jackman, S.R.; Breen, L.; Smith, K.; Selby, A.; Tipton, K.D. Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, 99, 86–95.
147. Cuthbertson, D.; Smith, K.; Babraj, J.; Leese, G.; Waddell, T.; Atherton, P.; Wackerhage, H.; Taylor, P.M.; Rennie, M.J. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J.* 2005, 19, 422–424.
148. Moore, D.R.; Robinson, M.J.; Fry, J.L.; Tang, J.E.; Glover, E.I.; Wilkinson, S.B.; Prior, T.; Tarnopolsky, M.A.; Phillips, S.M. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, 89, 161–168.
149. Yang, Y.; Breen, L.; Burd, N.A.; Hector, A.J.; Churchward-Venne, T.A.; Josse, A.R.; Tarnopolsky, M.A.; Phillips, S.M. Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intakes of whey protein in older men. *Br. J. Nutr.* 2012, 108, 1780–1788.
150. Yang, Y.; Churchward-Venne, T.A.; Burd, N.A.; Breen, L.; Tarnopolsky, M.A.; Phillips, S.M. Myofibrillar protein synthesis following ingestion of soy protein isolate at rest and after resistance exercise in elderly men. *Nutr. Metab.* 2012, 9, 57.
151. Robinson, M.J.; Burd, N.A.; Breen, L.; Rerечich, T.; Yang, Y.; Hector, A.J.; Baker, S.K.; Phillips, S.M. Dose-dependent responses of myofibrillar protein synthesis with beef ingestion are enhanced with resistance exercise in middle-aged men. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2013, 38, 120–125.
152. Holwerda, A.M.; Paulussen, K.J.M.; Overkamp, M.; Goessens, J.P.B.; Kramer, I.F.; Wodzig, W.K.W.H.; Verdijk, L.B.; Van Loon, L.J.C. Dose-Dependent Increases in Whole-Body Net Protein Balance and Dietary Protein-Derived Amino Acid Incorporation into Myofibrillar Protein During Recovery from Resistance Exercise in Older Men. *J. Nutr.* 2019, 149, 221–230.

153. Tipton, K.D.; Ferrando, A.A.; Phillips, S.M.; Doyle, D.; Wolfe, R.R. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am. J. Physiol. Metab.* 1999, 276, E628–E634
154. Katsanos, C.S.; Kobayashi, H.; She_eld-Moore, M.; Aarsland, A.; Wolfe, R.R. Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 82, 1065–1073.
155. Miller, S.L.; Tipton, K.D.; Chinkes, D.L.; Wolf, S.E.; Wolfe, R.R. Independent and combined effects of amino acids and glucose after resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2003, 35, 449–455.
156. Verhoeven, S.; Vanschoonbeek, K.; Verdijk, L.B.; Koopman, R.; Wodzig, W.K.W.H.; Dendale, P.; Van Loon, L.J.C. Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, 89, 1468–1475.
157. Church, D.D.; Schwarz, N.A.; Spillane, M.B.; McKinley-Barnard, S.K.; Andre, T.L.; Ramirez, A.J.; Willoughby, D.S. l-Leucine Increases Skeletal Muscle IGF-1 but Does Not Differentially Increase Akt/mTORC1 Signaling and Serum IGF-1 Compared to Ursolic Acid in Response to Resistance Exercise in Resistance-Trained Men. *J. Am. Coll. Nutr.* 2016, 35, 627–638.
158. DE Andrade, I.T.; Gualano, B.; Hevia-Larraín, V.; Neves-Junior, J.; Cajueiro, M.; Jardim, F.; Gomes, R.L.; Artioli, G.G.; Phillips, S.M.; Campos-Ferraz, P.; et al. Leucine Supplementation Has No Further Effect on Training-induced Muscle Adaptations. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2020, 52, 1809–1814.
159. Backx, E.M.P.; Horstman, A.M.H.; Marzuca-Nassr, G.N.; Van Kranenburg, J.; Smeets, J.S.; Fuchs, C.J.; Janssen, A.A.W.; de Groot, L.C.P.G.M.; Snijders, T.; Verdijk, L.B.; et al. Leucine Supplementation Does Not Attenuate Skeletal Muscle Loss during Leg Immobilization in Healthy, Young Men. *Nutrients* 2018, 10, 635.
160. Ferrando, A.A.; Williams, B.D.; Stuart, C.A.; Lane, H.W.; Wolfe, R.R. Oral Branched-Chain Amino Acids Decrease Whole-Body Proteolysis. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 1995, 19, 47–54.
161. Smeets, J.S.J.; Horstman, A.M.H.; Vles, G.F.; Emans, P.J.; Goessens, J.P.B.; Gijsen, A.P.; Van Kranenburg, J.M.X.; Van Loon, L.J.C. Protein synthesis rates of muscle, tendon, ligament, cartilage, and bone tissue in vivo in humans. *PLoS ONE* 2019, 14, e0224745
162. Smeets, J.S.J.; Horstman, A.M.H.; Schijns, O.E.M.G.; Dings, J.T.A.; Hoogland, G.; Gijsen, A.P.; Goessens, J.P.B.; Bouwman, F.G.; Wodzig, W.K.W.H.; Mariman, E.C.; et al. Brain tissue plasticity: Protein synthesis rates of the human brain. *Brain* 2018, 141, 1122–1129.

163. Nakshabendi, I.M.; McKee, R.; Downie, S.; Russell, R.I.; Rennie, M.J. Rates of small intestinal mucosal protein synthesis in human jejunum and ileum. *Am. J. Physiol.* 1999, 277, E1028–E1031.
164. Nair, K.S.; Schwartz, R.G.; Welle, S. Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* 1992, 263, E928–E934.
165. Gwin, J.A.; Church, D.D.; Hatch-McChesney, A.; Howard, E.E.; Carrigan, C.T.; Murphy, N.E.; Wilson, M.A.; Margolis, L.M.; Carbone, J.W.; Wolfe, R.R.; et al. Effects of high versus standard essential amino acid intakes on whole-body protein turnover and mixed muscle protein synthesis during energy deficit: A randomized, crossover study. *Clin. Nutr.* 2020.
166. Kim, I.-Y.; Schutzler, S.; Schrader, A.; Spencer, H.J.; Azhar, G.; Ferrando, A.A.; Wolfe, R.R. The anabolic response to a meal containing different amounts of protein is not limited by the maximal stimulation of protein synthesis in healthy young adults. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016, 310, E73–E80.
167. Churchward-Venne, T.A.; Pinckaers, P.J.M.; Smeets, J.S.J.; Betz, M.W.; Senden, J.M.; Goessens, J.P.B.; Gijzen, A.P.; Rollo, I.; Verdijk, L.B.; Van Loon, L.J. Dose-response effects of dietary protein on muscle protein synthesis during recovery from endurance exercise in young men: A double-blind randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2020, 112, 303–317.
168. Miller, S.; Chinkes, D.; MacLean, D.A.; Gore, D.; Wolfe, R.R. In vivo muscle amino acid transport involves two distinct processes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 287, E136–E141.
169. Wolfe, R.R.; Song, J.; Sun, J.; Zhang, X. Total aminoacyl-transfer RNA pool is greater in liver than muscle in rabbits. *J. Nutr.* 2007, 137, 2333–2338.
170. Schoenfeld, B. J. (2010). The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(10), 2857-2872.
171. Adams, G. R., & Bamman, M. M. (2012). Characterization and regulation of mechanical loading-induced compensatory muscle hypertrophy. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2829-2870.
172. Kadi, F., & Ponsot, E. (2010). The biology of satellite cells and their involvement in skeletal muscle hypertrophy. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 20(2), 67-94.
173. Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447-1531.

174. Charge, S. B., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), 209-238.
175. Goldspink, G. (2005). Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiological Reviews*, 85(3), 831-851.
176. Buckingham, M., & Rigby, P. W. (2014). *Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis*. *Developmental Cell*, 28(3), 225-238.
177. Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93(1), 23-67.
178. Schoenfeld et al. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2013, 10:53
179. Lemon PW, Berardi JM, Noreen EE: The role of protein and amino acid supplements in the athlete's diet: does type or timing of ingestion matter? *Curr Sports Med Rep* 2002 Aug, 1(4):214–221.
180. Borsheim E, Tipton KD, Wolf SE, Wolfe RR: Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 Oct, 283(4):E648–E657.
181. 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 Feb, 10(2):89–95.
182. Cribb PJ, Hayes A: Effects of supplement timing and resistance exercise on skeletal muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc* 2006 Nov, 38 (11):1918–1925.
183. Willoughby DS, Stout JR, Wilborn CD: Effects of resistance training and protein plus amino acid supplementation on muscle anabolism, mass, and strength. *Amino Acids* 2007, 32(4):467–477.
184. Hulmi JJ, Kovanen V, Selanne H, Kraemer WJ, Hakkinen K, Mero AA: Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. *Amino Acids* 2009 Jul, 37(2):297–308.
185. Burk A, Timpmann S, Medijainen L, Vahi M, Oopik V: Time-divided ingestion pattern of casein-based protein supplement stimulates an increase in fat-free body mass during resistance training in young untrained men. *Nutr Res* 2009 Jun, 29(6):405–413.
186. Hoffman JR, Ratamess NA, Tranchina CP, Rashti SL, Kang J, Faigenbaum AD: Effect of protein-supplement timing on strength, power, and bodycomposition changes in resistance-trained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009 Apr, 19(2):172

187. Verdijk LB, Jonkers RA, Gleeson BG, Beelen M, Meijer K, Savelberg HH, et al: Protein supplementation before and after exercise does not further augment skeletal muscle hypertrophy after resistance training in elderly men. *Am J Clin Nutr* 2009 Feb, 89(2):608–616.
188. Wycherley TP, Noakes M, Clifton PM, Cleanthous X, Keogh JB, Brinkworth GD: Timing of protein ingestion relative to resistance exercise training does not influence body composition, energy expenditure, glycaemic control or cardiometabolic risk factors in a hypocaloric, high protein diet in patients with type 2 diabetes. *Diab Obes Metab* 2010 Dec, 12(12):1097–1105.
189. Morris SB, DeShon RP: Combining effect size estimates in meta-analysis with repeated measures and independent-groups designs. *Psychol Methods* 2002 Mar, 7(1):105–125.
190. Cermak NM, Res PT, de Groot LC, Saris WH, van Loon LJ: Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012 Dec, 96(6):1454–1464.
191. Peterson MD, Rhea MR, Alvar BA: Applications of the dose-response for muscular strength development: a review of meta-analytic efficacy and reliability for designing training prescription. *J Strength Cond Res* 2005 Nov, 19(4):950–958.
192. Lemon PW, Tarnopolsky MA, MacDougall JD, Atkinson SA: Protein requirements and muscle mass/strength changes during intensive training in novice bodybuilders. *J Appl Physiol* 1992 Aug, 73(2):767–775.
193. Lemon PW: Beyond the zone: protein needs of active individuals. *J Am Coll Nutr* 2000 Oct, 19(5 Suppl):513S–521S.
194. Moore DR, Del Bel NC, Nizi KI, Hartman JW, Tang JE, Armstrong D, et al: Resistance training reduces fasted- and fed-state leucine turnover and increases dietary nitrogen retention in previously untrained young men. *J Nutr* 2007 Apr, 137(4):985–991.
195. Trommelen, J., & van Loon, L. J. (2016). Pre-sleep protein ingestion to improve the skeletal muscle adaptive response to exercise training. *Nutrients*, 8(12), 763. doi:10.3390/nu8120763.
196. Snijders, T., Res, P. T., Smeets, J. S., van Vliet, S., van Kranenburg, J., & van Loon, L. J. (2015). Protein ingestion before sleep increases muscle mass and strength gains during prolonged resistance-type exercise training in healthy young men. *Journal of Nutrition*, 145(6), 1178–1184. doi:10.3945/jn.114.208371.

197. Res, P. T., Groen, B., Pennings, B., Beelen, M., Wallis, G. A., Gijsen, A. P., ... & van Loon, L. J. (2012). Protein ingestion before sleep improves postexercise overnight recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(8), 1560-1569. doi:10.1249/MSS.0b013e31824cc363.
198. Trommelen, J., Holwerda, A. M., Kouw, I. W., Langer, H., & van Loon, L. J. (2018). Resistance exercise augments postprandial overnight muscle protein synthesis rates. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 50(1), 192-201. doi:10.1249/MSS.0000000000001428.
199. Trommelen, J., & van Loon, L. J. (2016). Pre-sleep protein ingestion to improve the skeletal muscle adaptive response to exercise training. *Nutrients*, 8(12), 763. doi:10.3390/nu8120763.
200. Kouw, I. W. K., Groen, B. B., Smeets, J. S., Kramer, I. F., van Kranenburg, J., Nilwik, R., & van Loon, L. J. (2017). Pre-sleep protein ingestion increases overnight muscle protein synthesis rates in healthy older men: a randomized controlled trial. *Journal of Nutrition*, 147(12), 2252-2261. doi:10.3945/jn.117.255098.
201. 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*, 145 (2015) 1178-84 Google Scholar
202. Churchward-Venne TA, Holwerda AM, Phillips SM, van Loon LJ What is the optimal amount of protein to support post-exercise skeletal muscle reconditioning in the older adult? *Sports Med*, 46 (2016) 1205-12
203. Holwerda AM, Kouw IW, Trommelen J, Halson SL, Wodzig WK, Verdijk LB, van Loon LJ Physical activity performed in the evening increases the overnight muscle protein synthetic response to presleep protein ingestion in older men *J Nutr*, 146 (2016) 1307-14
204. Murphy CH, Churchward-Venne TA, Mitchell CJ, Kolar NM, Kassis A, Karagounis LG, Burke LM, Hawley JA, Phillips SM
205. Hypoenergetic diet-induced reductions in myofibrillar protein synthesis are restored with resistance training and balanced daily protein ingestion in older men *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 308 (2015) E734-43 Google Scholar
206. Areta JL, Burke LM, Ross ML, Camera DM, West DW, Broad EM, Jeacocke NA, Moore DR, Stellingwerff T, Phillips SM Timing and distribution of protein ingestion during prolonged recovery from resistance exercise alters myofibrillar protein synthesis *J Physiol*, 591 (2013) 2319-31 Google Scholar

207. Mamerow MM, Mettler JA, English KL, Casperson SL, Arentson-Lantz E, Sheffield-Moore M, Layman DK, Paddon-Jones D Dietary protein distribution positively influences 24-h muscle protein synthesis in healthy adults *J Nutr*, 144 (2014) 876-80
208. Farsijani S, Morais JA, Payette H, Gaudreau P, Shatenstein B, Gray-Donald K, Chevalier S Relation between mealtime distribution of protein intake and lean mass loss in free-living older adults of the NuAge study *Am J Clin Nutr*, 104 (2016), pp. 694-703
209. Kisselev LL, Frolova LYu. Termination of translation in eukaryotes. *Biochem Cell Biol*. 1995 Nov-Dec;73(11-12):1079-86. doi: 10.1139/o95-116. PMID: 8722024.
210. Church DD, Hirsch KR, Park S, Kim IY, Gwin JA, Pasiakos SM, Wolfe RR, Ferrando AA. Essential Amino Acids and Protein Synthesis: Insights into Maximizing the Muscle and Whole-Body Response to Feeding. *Nutrients*. 2020 Dec 2;12(12):3717. doi: 10.3390/nu12123717. PMID: 33276485; PMCID: PMC7760188.
211. <https://www.salute.gov.it/portale/alimentiParticolariIntegratori/homeAlimentiParticolariIntegratori.jsp>
212. Kaspy MS, Hannaian SJ, Bell ZW, Churchward-Venne TA. The effects of branched-chain amino acids on muscle protein synthesis, muscle protein breakdown and associated molecular signalling responses in humans: an update. *Nutrition Research Reviews*. Published online 2023:1-14. doi:10.1017/S0954422423000197
213. Humberto Nicastro, Daniela Fojo Seixas Chaves, Antonio Herbert Lancha, Chapter 37 - An Overview of Branched-Chain Amino Acids in Exercise and Sports Nutrition, Editor(s): Debasis Bagchi, Sreejayan Nair, Chandan K. Sen, *Nutrition and Enhanced Sports Performance*, Academic Press, 2013, Pages 367-375, ISBN 9780123964540, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396454-0.00037-0>.

Capitolo VIII - Ringraziamenti

Ringrazio il Dott. Nicola Sponsiello, mio relatore di tesi, per la celerità delle sue risposte e per avermi guidato al meglio nella stesura di questo elaborato, culmine dei miei studi accademici.

Ringrazio più di tutti mia mamma Katia, per esserci stata sempre, per avermi aiutato nella scelta di questo corso di studi, che sarà mio compagno per una vita intera. Ti ringrazio per avermi sostenuto nei momenti in cui volevo mollare tutto, per aver sempre cercato di farmi vedere il bello anche nei momenti più bui. Grazie a te ho imparato ad essere sempre riconoscente per ciò che ho e a crederci fino in fondo.

Ringrazio mia nonna Lina, che da una vita intera si è sempre presa cura di me, come ha sempre fatto con tutte le persone che le sono accanto. Hai un cuore d'oro nonna, non ci sono più persone come te.

Ringrazio mio papà Massimiliano, che a modo suo, mi ha aiutato a risolvere i problemi di tutti questi anni. Grazie a te ho imparato che anche gli ostacoli più grandi, se visti da un'altra prospettiva, sono nulla.

Ringrazio mio zio Simone, ho condiviso insieme a te tanti successi di questi anni e mi hai sempre motivato nel raggiungere i miei obiettivi, guardando sempre al futuro.

Ringrazio mio nonno Curzio, che avrebbe sempre voluto che mi appassionassi di elettronica. Chissà nonno, magari ancora qualche anno e ce l'avresti fatta. Mi hai sempre detto che avresti voluto essere qui oggi, ed infatti lo sei, lissù che mi guardi insieme a mia nonna Franca.

Ringrazio i miei amici più cari. Ringrazio le amicizie che durano da anni e quelle che invece sono maturate più tardi. Ringrazio Francesco e le mie due Giorgie, che sono qui oggi insieme a me. Vi ringrazio per tutti i bei momenti trascorsi insieme, perché so di poter contare in ogni momento su di voi. Avete reso questi anni più leggeri grazie a tutte le risate che abbiamo condiviso.

Ringrazio il gruppo del mercoledì, ringrazio Andrea e tutti i ragazzi e le ragazze. È grazie a voi che posso dire di avere vissuto questi anni di università a pieno, senza rinunciare a nulla. I nostri percorsi, i più vari e strampalati si sono incrociati e ci hanno portati a condividere innumerevoli momenti. Dicono che le amicizie dell'università durino una vita, spero sia così.

Ringrazio infine ogni istante di questi cinque anni, anche i peggiori. Li ringrazio perché sono stati cinque anni indimenticabili, che hanno profondamente cambiato la persona che sono, fino a rendermi quella che sono oggi: una persona più elevata, più cosciente, una persona migliore.