

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Proteína do soro do leite hidrolisado na síntese proteica muscular**

**SUELEN MAIARA MEDEIROS DA SILVA**

**Dourados - MS**

**2019**

SUELEN MAIARA MEDEIROS DA SILVA

Proteína do soro do leite hidrolisado na síntese proteica muscular

Área do CNPq: 4.05.00.00-4- Nutrição

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo

Dourados - MS

2019



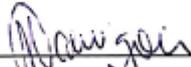
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR SUELEN MAIARA MEDEIROS DA SILVA, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 01 DE MARÇO DE 2019.

Ao primeiro dia do mês de março do ano de dois mil e dezenove (01/03/2019), às 09h, em sessão pública, realizou-se, na Sala 103/05 do Bloco C da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Proteína do soro do leite hidrolisado na síntese proteica muscular" apresentada pela mestranda SUELEN MAIARA MEDEIROS DA SILVA, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo** (Presidente/orientador), **Dr. Mario Sérgio Vaz da Silva** (membro titular), **Dr. Daniel Traina Gama** (membro titular), **Dra. Elizandra Freitas dos Santos** (membro suplente) e **Dra. Herintha Coeto Neitzke Abreu** (membro suplente). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer a candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa da candidata, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 01 de março de 2019.

Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo 

Dr. Mario Sérgio Vaz da Silva 

Dr. Daniel Traina Gama 

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_/\_\_/\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza  
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

## **AGRADECIMENTO**

À Deus por me abençoar com saúde para correr atrás dos meus objetivos. E por me dar força e perseverança para nunca desistir.

Aos meus pais por todo o carinho e amor, aos quais dedico todo o meu amor.

Aos meus irmãos (Mery, Vini e Dé) e sobrinhos (Juju e Enzo), que me motivam todos os dias.

Ao meu esposo Lennon, ao qual tenho imenso amor, que me amou e compreendeu em todas as minhas decisões.

Aos meus amigos que me ajudaram a prosseguir.

Aos meus professores da graduação e pós-graduação, em especial Prof<sup>o</sup> Dr. Pablo Lollo, que me incentivou e apoiou no caminho acadêmico. Aos professores, Prof<sup>o</sup> Dr. Mario Sérgio e Prof<sup>o</sup> Dr. Daniel Traina, que me acompanham desde a graduação e contribuem para o meu crescimento acadêmico com suas importantes correções e sugestões.

Em especial, à minha filha Cecília que me mostrou que os planos de Deus são maiores e melhores que os meus.

## **EPÍGRAFE**

Enquanto houver esperança de lutar,  
haverá esperança de vencer!  
(SANTO AGOSTINHO)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo 1

Figura 1 – Simplified (IGF)-1 signalling pathway from receptor binding to MPS	14
Figure 2. Diagram of selected studies.	16
Table 1. Comparison the effects of the intake of WP in muscle protein synthesis during exercise.	18
Figure 3. Amino acid profile of protein sources.	23

### Artigo 2

Figure 1. Amino acid profile of protein.	31
Figure 2. Distribution of groups.	32
Figura 3. Weight of animals.	34
Figure 4. 4EBP1 total expression	35
Figure 5. 4EBP1 phospholylation expression	35
Figure 6. Muscle Free Amino Acids.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAs	Amino acids
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CAS	Casein
EAA	Essential amino acids
eIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4F	Eukaryotic translation initiation factor 4F
FSR	Fractional rates of protein synthesis
FOXO	Forkhead transcription factor
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
IGF-1	Insulin Like Growth Factor 1
LEU	Leucin
MPS	Muscle protein synthesis
mTOR	Mammalian target of rapamicin
p70S6K	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PI3K	Fosfoinositol 3 kinase
PKB	Protein kinase B
p-4EBP1	Phosphorylation Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
SP	Soy protein
TSC2	tuberin
VAL	Valine
WP	Whey protein
WPI	Whey protein isolated
WPH	Whey protein hydrolyzed
WPC	Whey protein concentrated
4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

## **Proteína do soro do leite hidrolisado na síntese proteica muscular**

### **RESUMO**

Suplementação com proteína do soro do leite hidrolisado (WPH) é utilizado para estimular a síntese proteica muscular (MPS) via fosforilação da 4EBP1 e consequentemente, o ganho de massa muscular. Contudo, precisa ser esclarecido se o consumo de WPH é superior no estímulo da MPS após o exercício físico, comparada a outras proteínas. **Objetivo:** Verificar a ativação da 4EBP1 em ratos Wistar alimentados com dieta AIN93-G modificada, tendo proteína do soro do leite hidrolisado (WPH), proteína do soro do leite concentrado (WPC) e Caseína (CAS) como fonte proteica. **Métodos:** Oitenta e quatro ratos Wistar foram divididos em três grupos: WPH, WPC e CAS; e subdivididos em: sedentários, treinados, sedentários exaustos e treinados exaustos. Técnica de Western Blot (WB) foi utilizada para quantificar a ativação da 4EBP1 no músculo gastrocnêmico e foi determinada a concentração de aminoácidos livres no músculo por métodos padrões. Para o tratamento estatístico ANOVA com post-hoc de Duncan foi utilizado. **Resultados:** A fosforilação da 4EBP1 foi superior para grupo alimentado com WPH nos grupos levados até a exaustão, quando comparado ao consumo de WPC e CAS. O consumo de WPH e WPC apresentou fosforilação significativamente superior da 4EBP1, quando comparado ao consumo de CAS, no grupo sedentário. Os animais dos grupos treinados não apresentaram diferença significativa na fosforilação da 4EBP1, nos grupos alimentados com WPH, WPC e CAS. O BCAA, especialmente a leucina (LEU), apresentou maiores concentrações livre no músculo após o consumo de WPH, nos ratos sedentários, treinados e exaustos, quando comparado aos grupos alimentados com WPC e CAS. **Conclusão:** A fosforilação da 4EBP1 foi significativamente superior, no músculo gastrocnêmio, em ratos levados até a exaustão e alimentados com WPH, sem diferença significativa nos ratos do grupo treinado. Os dados em conjunto apontam que a regeneração muscular depende do estímulo adequado durante o exercício, como o aumento no volume e intensidade e o consumo de WPH com fonte proteica apresenta resultados superiores na MPS.

**Palavras-chave:** Proteína do soro do leite; suplementação; caseína; exercício físico.

## ***ABSTRACT***

Supplementation with WPH is used to activate muscle protein synthesis by p-4EBP1 thus increasing body growth. However, it is not clear if WPH is higher in regulation mechanism of protein synthesis. **Objective:** The purpose of this study was to assess gastrocnemius 4EBP1 activation in Wistar rats fed standard AIN93-G diet supplemented with WPH, WPC and CAS. **Methods:** Eighty-four Wistar rats were divided into twelve groups and fed one of the following diets for three weeks: a) CAS; b) WPC; c) WPH; Modified AIN93-G diets containing casein, whey protein hydrolyzed and whey protein concentrate as a protein source. The diets were subdivided into 4 groups: sedentary; exercised; sedentary-exhausted and exercised-exhausted. P-4EBP1 phosphorylation was quantified by Western Blot analysis. Free amino acid concentration in muscle was determined by standard methods. ANOVA and post-hoc Duncan were applied to compare the means (significance  $p < 0.05$ ). **Results:** Phosphorylated 4EBP1 of Wistar rats were increased by feeding the AIN93-G diet with WPH compared to WPC and CAS to sedentary-exhaustive and exercise-exhaustive groups. Feeding WPC and WPH showing increase phosphorylation of 4EBP1 when compared to CAS in the sedentary condition. P-4EBP1 showed no difference between any three groups to trained group. BCAA (specifically, Leucine) were significant increase to WPH group in free amino acid concentration in muscle, compared to WPC and CAS groups. **Conclusion:** The phosphorylation of 4EBP1 was significantly higher in the gastrocnemius muscle in rats fed to exhaustion and fed WPH, with no significant difference in the rats of the trained group. The data together show that muscle regeneration depends on the appropriate stimulus during exercise, such as the increase in volume and intensity and the consumption of WPH with protein source presents superior results in MPS.

**Keywords:** whey protein; supplementation; casein; exercise.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Artigo 1: <b>Whey protein hydrolyzed supplementation in muscle protein synthesis during exercise: a systematic review</b>	12
3 OBJETIVOS	24
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5 APÊNDICES	28
5.1 Artigo 2: <b>Whey protein hydrolyzed intake activates 4EBP1 signaling in rats after exercise- exhaustive.</b>	29
6 ANEXOS	42
6.1 Parecer de aprovação do comitê de ética	43

## 1. INTRODUÇÃO

O exercício exaustivo gera micro-lesões nas células musculares. As micro-lesões musculares ocorrem em resposta à sobrecarga mecânica e metabólica ao treinamento (SOUSA et al., 2014). Após o período de adaptação ao treinamento o organismo produz uma assimilação compensatória na musculatura esquelética exercitada, tornando o músculo apto a repetir contrações sucessivas. Para o aumento da resistência e performance muscular, após o período de adaptação, o estímulo devem apresentar uma sobrecarga mecânica (aumento de intensidade e volume) para continuar estimulando as vias de tradução de sinais e estimular a recuperação muscular (SCHOENFELD, 2010).

O exercício físico aumenta a necessidade de proteína para a reposição de proteínas perdidas e reconstrução da musculatura lesionada. A reorganização da estrutura celular depende do balanço positivo entre a taxa de síntese e a taxa de degradação proteica, portanto, o treino ativa vias de tradução de sinais gerando um aumento da síntese proteica muscular (MPS) (KIMBALL et al., 2006). A regulação das vias de tradução proteica aliada a uma dieta que contenha os aminoácidos essenciais (EAA), gera um balanço nitrogenado positivo (SANDRI, 2008). Para que o balanço nitrogenado seja positivo é necessária a biodisponibilidade de aminoácidos na circulação sanguínea favorecendo a regeneração muscular. Assim, para que ocorra uma melhora nas respostas agudas e adaptações crônicas do músculo esquelético, o exercício físico deve apresentar o estímulo adequado que desencadeia a ativação ou repressão superior de vias moleculares de sinalização de MPS, necessitando de uma proteína de boa digestão e absorção, que resultariam no aumento da transcrição e a tradução de proteínas (SOUSA et al., 2014).

O reparo do tecido muscular depende do consumo de proteínas de alto valor biológico. Para a recuperação muscular a proteína ingerida deve conter os EAA, responsáveis pela regeneração tecidual, como a proteína do soro do leite (WP), proteína do ovo, caseína (CAS) e proteína da soja (SP) (GORISSEN et al., 2015). Os suplementos a base de proteínas tem ação rápida aumentando os aminoácidos disponíveis na circulação sistêmica facilitando o anabolismo de proteína no músculo (KERKSICK et al., 2006). Portanto, a ingestão de proteínas é essencial para a recuperação muscular. Porém o consumo de suplementação proteica acima da necessidade diária, não gera aumento de desempenho e recuperação muscular, pelo contrario, essa proteína adicional é armazenado na forma de gordura corporal.

O aumento no consumo de suplementos proteicos por praticantes de atividade física gerou a necessidade e o interesse, por meio dos pesquisadores, de estudos sobre o efeito e a utilização desses suplementos na recuperação muscular após o exercício. Dentre os suplementos a base de proteína, um suplemento muito utilizado por praticantes de atividade física é WP. O WP é utilizado por atletas para recuperação muscular e/ou hipertrofia (TIPTON et al., 2007). Visto que, WP são proteínas de rápida digestão e absorção, que elevam os níveis de aminoácidos plasmáticos e musculares após sua ingestão, auxiliando na recuperação do músculo esquelético. A ingestão de WP após o exercício induziu a hiperaminoacidemia, sinalização de mTOR e MPS (BURKE et al., 2001), Yang et al. (2012) suplementou 30 idosos com 20 e 40g de WP e SP, logo após o exercício de resistido. A população idosa são menos sensíveis aos efeitos anabólicos da dieta e exercício, contudo, foram observados aumentos significativos na capacidade de estimular a MPS em idosos suplementados com WP, do que com SP, 1h após o exercício, nas doses de 20g e 40g.

O estudo com hidrolisados proteicos surge a partir da descoberta de transportadores para di e tri peptídeos intestinais. As proteínas hidrolisadas são fabricadas a partir da proteína intacta, por processo de hidrólise (ácida ou enzimática), são fontes de peptídeos de diversos tamanhos e apresentam rápida taxa de absorção no trato gastrointestinal em comparação às proteínas intactas (MEREDITH et al., 1990). Abecia-Soria et al. (2003) verificou que ratos alimentados com WPH e submetidos a exercício físico até a exaustão em esteira, atingiram a exaustão em maior tempo, quando comparada ao WPI. Entretanto, Ramos (2001) alimentou ratos com WPH submetidos à natação, os resultados não apresentaram diferença significativa na glicose sérica, insulina plasmática, proteínas totais, albumina, triacilgliceróis plasmáticos e colesterol total, quando comparados aos ratos alimentados com WPI ou CAS. Em hipótese, a utilização de WPH apresentaria uma disponibilidade de aminoácidos facilitada na circulação sanguínea, o que resultaria na recuperação muscular melhorada, quando comparada a proteínas intactas, após o exercício.

No desenvolvimento deste trabalho foi realizada uma revisão sistemática na literatura científica com a finalidade de verificar a utilização do WPH na MPS. Posteriormente, foi realizado um estudo experimental que mostrou o efeito do consumo do WPH na MPS. Assim, no presente estudo procurou-se de analisar se o consumo de hidrolisados proteicos (WPH) apresenta efeito superior na MPS após o exercício. Além de investigar as proteínas do leite, CAS e WPC, e comparar o efeito dessas proteínas na MPS.



A pedido da autora a Revisão de Literatura e o Apêndice foram retirados do pdf.

**6 ANEXOS**

## 6.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 28 de novembro de 2017.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "***Efeitos do consumo de proteína de soja e probiótico nas lesões musculares***", registrada sob o protocolo de nº 25/2017, sob a responsabilidade de *Pablo Christiano Barboza Lollo e Suelen Maiara Medeiros da Silva* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 18/08/2017.

<i>Finalidade</i>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	15/01/2018 a 01/05/2019
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus - Wistar</i>
<i>Nº de animais</i>	56
<i>Peso/idade</i>	21 dias
<i>Sexo</i>	machos
<i>Origem</i>	Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD

*Melissa Negrão Sepulveda*

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA