



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**LORAINE GOLLINO**

**“Efeito da Suplementação da Proteína do Soro do Leite na Saúde Óssea de Mulheres na Pós-Menopausa em Programa de Modificação do Estilo de Vida com Exercícios Físicos e Adequação Alimentar”**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahás

Co-orientadora: Prof. Assist. Adriana Lucia Mendes

Tutor do projeto: Prof. Titular Roberto Carlos Burini

**Botucatu  
2019**

**“Efeito da Suplementação da Proteína do Soro do Leite na Saúde Óssea de Mulheres na Pós-Menopausa em Programa de Modificação do Estilo de Vida com Exercícios Físicos e Adequação Alimentar”**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia**

**Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahás**

**Co-orientadora: Profa. Assit Adriana Lucia Mendes**

**Tutor do projeto: Prof Titular Roberto Carlos Burini**

**Botucatu**

**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Gollino, Loraine.

Efeito da suplementação da proteína do soro do leite na saúde óssea de mulheres na menopausa em programa de modificação do estilo de vida com exercícios físicos e adequação alimentar / Loraine Gollino. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliana Petri Nahás

Coorientador: Adriana Lucia Mendes

Coorientador: Roberto Carlos Burini

Capes: 40101150

1. Alimentos - Consumo. 2. Densidade óssea. 3. Exercícios físicos. 4. Menopausa. 5. Suplementos dietéticos.

Palavras-chave: Consumo alimentar; Densidade óssea; Exercício; Menopausa; Suplementação nutricional.

## *Dedicatória*

### *Deus*

*Com as graças divinas de Deus e do meu anjo da guarda, tive proteção e forças para realizar este sonho.*

### *Meus pais*

*Janice e Glaucio, excepcionais por sempre confiarem em mim, me dando muito amor, apoio e carinho para continuar.*

### *Meu noivo*

*Carlos Eduardo, grande companheiro que me motiva a cada instante, me apoia e me faz acreditar que é possível.*

### *Minhas sobrinhas*

*Elisa e Isabela, com tão pouca idade conseguem transferir amor puro e, mesmo com poucas horas, bons e eternos momentos de brincadeiras.*

## *Agradecimentos especiais*

*Às mulheres que participaram deste trabalho que com todo carinho e bom humor fizeram tudo possível.*

*Aos meus irmãos, Yuri, Israel e Sara, aqueles que estão sempre na primeira fileira para me aplaudir, dar conselhos e me motivar.*

*Às minhas avós, Anna e Myrthes, que foram morar no céu no decorrer do doutorado, mas que sempre estiveram em oração por mim.*

*À minha orientadora Profa. Livre-Docente Eliana Aguiar Petri Nahás que, com carinho, me assumiu como orientanda e contribuiu muito na lapidação deste trabalho.*

*À minha co-orientadora Profa. Adriana Lucia Mendes, pela amizade, apoio, companheirismo e incontáveis auxílios científicos, profissionais e pessoais.*

*Ao querido Prof. Titular Roberto Carlos Burini, que tive a honra de partilhar bons anos e aproveitar um pouco de sua incontável expertise.*

## *Agradecimentos*

*À toda equipe do CeMENutri, aprimorandos e pós-graduandos, que, no decorrer do projeto, ajudaram de forma singular e com muito profissionalismo.*

*Às minhas queridas amigas, Fernanda Ramos, Carolina Saullo, Raíssa Leite, Tayeme Piva, Vanessa Santiloni, Lívia Bertazzo, Carolina Schaffer e Luíza Graner, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas as fases e decisões.*

*À UNIPEX e a UPECLIN, em especial a Daniela, Ana Paola e Regina Moretto que, com muito carinho e experiência, me ajudaram em diversos momentos para que tudo fosse possível.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da FMB/Unesp, em especial à Solange Sako Cagliari, pela competência e que, com muito amor e dedicação, sempre me auxiliou em todos os momentos, como aluna e amiga.*

*Ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB/Unesp, em especial ao José Eduardo Corrente, pela assessoria*

*estatística e análise dos resultados do estudo.*

*Às bibliotecárias da Biblioteca Central do Campus de Botucatu/Unesp pela elaboração da ficha catalográfica.*

*À Profa. Sílvia Justina Papini que, no decorrer da pós-graduação, me acolheu com muito amor nos diversos estágios em docência, tornando-se uma amizade muito especial.*

*À Profa. Titular Glaúcia Maria F da S Mazeto que, com muito carinho, sempre me apoiou, com palavras doces e motivadoras, e será sempre minha orientadora do coração.*

*A todos os professores que recorri para a discussão do projeto, em especial, aos Prof. Erick Prado de Oliveira e Profa. Débora Damasceno, que contribuíram de forma singular para este estudo.*

*Não encontro palavras suficientes para descrever minha gratidão à todas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor!*

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*  
**Cora Coralina**

## **Lista de Tabelas e Figuras**

## **Lista de Anexos**

## **Lista de Abreviaturas**

## SUMÁRIO

---

RESUMO.....	14
<i>ABSTRACT</i> .....	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVO.....	31
3. MÉTODOS .....	32
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Artigo Original .....	42
5. CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS .....	76
ANEXOS.....	88

## Lista de Figuras, Quadro e Tabelas

<b>Figura 1</b>	Fluxograma das participantes incluídas no estudo.....	34
<b>Figura 2</b>	Recipientes e porções diárias em sachês da suplementação da proteína do soro do leite, com orientações da ingestão diária e datas de avaliações, oferecidos às mulheres.....	36
<b>Figura 3</b>	Comparação dos valores séricos do marcador de reabsorção óssea <i>serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen (s-CTX)</i> entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14) nos momentos basal (M1) e após 20 semanas de intervenção (M2).....	59
<b>Tabela 1</b>	Comparação das características clínicas, antropométricas e laboratoriais iniciais entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14).....	56
<b>Tabela 2</b>	Comparação dos parâmetros antropométricos e laboratoriais entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14) nos momentos basal (M1) e após 20 semanas de intervenção (M2).....	57
<b>Tabela 3</b>	Comparação dos nutrientes avaliados pelo consumo alimentar entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14) nos momentos basal (M1) e após 20 semanas de intervenção (M2).....	58

## Lista de Anexos

<b>Anexo I</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	88
<b>Anexo II</b>	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	90
<b>Anexo III</b>	Laudo da suplementação da proteína do soro do leite.....	93
<b>Anexo IV</b>	Tabela nutricional da suplementação da proteína do soro do leite comercialmente divulgada.....	94

## Lista de Abreviaturas

$\beta$ -CTX	<i>Beta-serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen</i>
CeMENutri	Centro de Metabolismo, Exercício e Nutrição
CC	Circunferência da cintura
CTX	<i>Cross Linked C-telopeptide of Type I Collagen</i>
CONSORT	<i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>
DAS	Diâmetro abdominal sagital
DMO	Densitometria mineral óssea
DP	Desvio Padrão
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
DXA	<i>Dual energy x-ray absorptiometry</i>
EAP	Escritório de Apoio à Pesquisa
ESCEO	<i>European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Fosfatase alcalina
FSH	Hormônio folículo estimulante
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corporal
IMM	Índice de massa muscular
Mg	Magnésio
MG	Massa gorda
MLG	Massa livre de gordura
MM	Massa magra
NTX	<i>cross-linked N-telopeptides of type-I collagen</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSL	Proteína do soro do leite
PTH	Paratormônio
PTNtotais	Proteínas totais

P1NP	<i>Procollagen type 1 amino-terminal propeptide</i>
s-CTX	<i>serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen</i>
SAS	<i>Statistical Analyses System</i>
SWAN	<i>Women's Health Across the Nation</i>
REBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TSH	Hormônio tireoestimulante
TMB	Taxa metabólica basal
WP	<i>Whey protein</i>

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar se a suplementação da proteína do soro do leite (PSL) melhora a reabsorção óssea, em mulheres na pós-menopausa praticantes de exercício físico.

**Métodos:** Estudo prospectivo de intervenção controlado, com 38 mulheres na pós-menopausa, com idade entre 50 a 70 anos, randomizadas em dois grupos: intervenção com PSL (n=19) ou controle (n=19). Foram incluídas mulheres com amenorreia acima de 12 meses, densitometria óssea normal dos últimos doze meses e praticantes do protocolo de exercícios físicos (especificar mais). O treinamento foi realizado três vezes por semana, composto de exercícios aeróbio e resistido. No grupo suplementado foi fornecido PSL, para ingestão diária, contendo 25g de proteína. O tempo de seguimento foi de 20 semanas, com avaliações nos momentos (inicial e final). As participantes foram avaliadas quanto à antropometria, ao consumo alimentar por meio do recordatório de 24 horas, variável laboratorial (bioquímicos e hormonais) e pelo marcador de reabsorção óssea, o s-CTX (*serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen*). A análise estatística foi *per protocol*, empregando-se delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento ou por distribuição Gama (variáveis assimétricas).

**Resultados:** O estudo foi finalizado com 18 mulheres no grupo suplementado e 14 no grupo controle, com média de idade de  $59 \pm 6$  anos. Quanto aos parâmetros antropométricos e laboratoriais, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Em relação ao consumo alimentar, no momento inicial foi observado que o grupo controle apresentava maior consumo de proteínas totais, fósforo, magnésio e

aminoácidos (isoleucina, leucina, valina e glutamina). Na comparação entre os momentos, o grupo controle apresentou após 20 semanas maior consumo de energia, carboidratos, gorduras totais e fibras. No grupo suplementado foi observado maior consumo de energia, carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e aminoácidos entre os momentos. Na análise do marcador de reabsorção óssea s-CTX foi observado redução significativa entre os momentos inicial e final apenas no grupo controle ( $p=0.016$ ), diferentemente no grupo suplementado não foi observada variação significativa entre os momentos ( $p=0.311$ ).

**Conclusão:** Em mulheres na pós-menopausa praticantes de exercício físico, a associação da suplementação de proteína do soro do leite não apresentou repercussão sobre a reabsorção óssea no protocolo de 20 semanas.

**Palavras Chave:** Suplementação nutricional; Proteína do soro do leite; Marcador de reabsorção óssea; Menopausa; Exercício Físico.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect of whey protein supplementation (WPS) on bone resorption in postmenopausal women practicing physical exercise.

**Methods:** We conducted a prospective, controlled study with 38 postmenopausal women aged 50 to 70 years, randomized into two groups: with PSL intervention (n = 19) or without PSL (n = 19, control). We included women with amenorrhea above 12 months, normal bone mineral density of the last twelve months and practitioners of the physical exercise protocol. The exercises were performed three times a week with aerobic and resistance training. In the intervention group, supplementation was provided daily, containing 25g of protein. Follow-up time was 20 weeks, with assessments at the start and end times. The participants were evaluated for anthropometry, food consumption through the 24-hour recall, laboratory parameters (biochemical and hormonal) and the bone resorption marker s-CTX (serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen). Statistical analysis was per protocol, using a time-repeated measures (ANOVA) followed by the Tukey multiple comparison test adjusted for group x moment interaction, or by gamma distribution (asymmetric variables).

**Results:** We evaluated 18 women in the supplemented group and 14 in the control group, mean age  $59\pm 6$  years. Regarding the anthropometric and laboratory parameters, no significant differences were observed between groups. In relation to the food consumption, at the initial moment, it was observed that the control group presented higher consumption of total proteins, phosphorus, magnesium and amino acids (isoleucine, leucine, valine and glutamine). In the comparison between the

moments, the control group presented after 20 weeks, higher energy consumption, carbohydrates, total fats and fibers. In the supplemented group was observed greater consumption of energy, carbohydrates, proteins, fats, minerals and amino acids between moments. In the analysis of the s-CTX a significant reduction was observed between the initial and final moments only in the control group ( $p = 0.016$ ). In the supplemented group, no significant variation was observed between the moments ( $p = 0.311$ ).

**Conclusion:** In postmenopausal women practicing physical exercise, the association of whey protein supplementation did not present repercussion on bone resorption in the 20-week protocol.

**Keywords:** Nutritional supplementation; Whey protein; Bone resorption marker; Menopause; Physical exercise.

## 1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida está aumentando em todo o mundo assim como no Brasil. Dados divulgados em 2017 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam expectativa média de vida para mulheres de 79,4 anos (IBGE, 2017), sendo que um terço da vida dessas mulheres será vivenciado na pós-menopausa. A menopausa é caracterizada pela cessação permanente da menstruação após a perda da atividade ovariana, que traz como consequência a produção reduzida de estrogênio pelos ovários, diversas alterações físicas e emocionais que afetam a vida da mulher (Fritz & Speroff, 2015).

Com base em evidências, sintomas foram avaliados quanto à proximidade da menopausa, influência do processo de envelhecimento e a probabilidade de terapia com estrogênio, a qual teria eficácia no alívio dos sintomas. Quatro principais sintomas surgiram associados à menopausa: sintomas vasomotores (ondas de calor e suores noturnos), atrofia vulvovaginal (ressecamento vaginal e dispareunia), dificuldade no sono / insônia, e alterações do humor / depressão (Santoro et al. 2015). Além dos sintomas associados à menopausa, o processo do envelhecimento da mulher é acompanhado por alterações na composição corporal caracterizados pelo aumento da gordura corporal (Toth *et al.*, 2000), diminuição da massa muscular (Sirola & Rikkonen, 2005) e perda de massa óssea (Siris et al, 2001).

Nos primeiros anos de pós-menopausa, em resposta ao hipoestrogenismo, ocorre rápida perda de massa óssea demonstrada pela redução na densidade mineral óssea (DMO). O estudo *Women's Health Across the Nation* (SWAN) avaliou o início da perda da DMO em relação à data da última menstruação em 862 mulheres norte-

americanas, na pré e peri-menopausa com idade entre 42 e 52 anos. Durante período de 10 anos de seguimento, a perda cumulativa de DMO para coluna lombar foi de 10,6%, sendo que, 7,4% do total de perda ocorreram na transição menopausal, e no colo de fêmur a perda total foi 9,1% e 5,8% na transição menopausal (Greendalle et al, 2012).

O declínio na DMO e na integridade estrutural resulta em aumento do risco para osteoporose na pós-menopausa, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a osteoporose se constitui no segundo maior problema de saúde pública do mundo, seguido pela doença cardiovascular (OMS, 2000). A principal consequência clínica da osteoporose é a fratura, que ocorre principalmente em colo de fêmur, vértebras e punho (Cummings & Melton, 2002). A maioria dos casos de osteoporose ocorre em mulheres na pós-menopausa e a prevalência da doença aumenta com a idade, de 4% em mulheres entre 50 a 59 anos para 52% em mulheres com idade superior a 80 anos (NAMS, 2010). Osteoporose é responsável por cerca de 90% de todas as fraturas de quadril e coluna em mulheres com idade entre 65-84 anos (Cosman et al, 2014). O risco aumentado de fraturas, espontâneas ou traumáticas, possui relação com a diminuição da resistência do osso, devido a redução da quantidade e qualidade óssea (Migliaccio et al., 2011).

### **1.1. Menopausa e Massa óssea**

A osteoporose é definida pela redução da massa óssea associada a desarranjo da microarquitetura do esqueleto que resulta em maior fragilidade e risco aumentado de fraturas (Kanis, 1994). O osso constitui um tecido metabolicamente ativo que sofre processo contínuo de renovação e reabsorção óssea. Este processo é consequência da

atividade de dois tipos celulares principais do tecido ósseo: os osteoblastos, responsáveis pela formação e os osteoclastos, pela reabsorção. Esse processo dinâmico é chamado de remodelação óssea (Riis, 1996). Fatores genéticos e ambientais participam dos processos de aquisição do esqueleto, pelo aumento na formação do osso durante o crescimento, levando ao pico de massa óssea em adultos (Brown & Rosen, 2003; Migliaccio et al, 2004; Migliaccio et al, 2013). Qualquer desequilíbrio nesse processo que favoreça a reabsorção, com perda de massa óssea, pode fragilizar o esqueleto e torná-lo susceptível a fraturas (Giaglia *et al.*, 2007), que ocorrem com a idade avançada e na menopausa (Lupsa & Insogna, 2015).

Nos primeiros anos de pós-menopausa, com a diminuição das concentrações do estrogênio, ocorre aumento na atividade osteoclástica e a reabsorção óssea, iniciando o processo de perda da massa óssea (Riggs, 1998; Maeda e Lazaretti-Castro, 2014), que começa cerca de 2 a 3 anos antes da última menstruação, e mantém-se por 3 a 4 anos após a menopausa, sendo que, neste período as mulheres perdem aproximadamente 2% de osso ao ano (NAMS, 2010). Evidência sugere que a rápida remodelação óssea - avaliada pelos marcadores bioquímicos de reabsorção e formação óssea - aumenta a perda de massa óssea e o risco de fratura osteoporótica (Cosman et al, 2014).

Frequentemente são utilizados para diagnóstico da perda óssea, técnicas de imagem, como o DXA (*dual energy x-ray absorptiometry*), empregada para medição da DMO e para diagnosticar a osteoporose, pois avalia a massa óssea nos sítios importantes de fraturas osteoporóticas (coluna e quadril) (Kanis et al, 2005). Contudo, o DXA não reflete as alterações dinâmicas que o tecido ósseo está sofrendo na ocasião do exame, sendo necessários vários meses até que alterações significativas neste

parâmetro ocorram. Para suprir esta limitação do DXA e melhorar a sensibilidade e especificidade na avaliação da massa óssea, marcadores bioquímicos de remodelação óssea vêm sendo utilizados (Saraiva & Larazetti-Castro, 2002) e por fornecerem avaliação dinâmica da atividade e saúde óssea (Ivaska et al, 2008; Bieglmayer et al, 2009). Embora não possam ser utilizados para diagnosticar a osteoporose, valores elevados desses biomarcadores são capazes de indicar taxas mais rápidas de perda de DMO, além de estarem associados com aumento do risco de fraturas osteoporóticas, de maneira independentemente da densidade, em mulheres na pós-menopausa (Garnero et al, 1996; Schousboe et al, 2007; Reginster et al, 2008; Delmas et al, 2009). Além disso, esses marcadores respondem rapidamente à intervenção terapêutica e estas mudanças têm sido associadas com a resposta óssea à terapia e, ainda, à redução do risco de fratura (Greenspan et al, 2000; Sözen et al, 2017).

Marcadores bioquímicos de remodelação óssea indicam tanto a atividade osteoclástica de reabsorção (produtos de degradação de colágeno tipo I no osso) ou osteoblástica de formação (síntese de matriz óssea) (NAMS, 2010). Em 2011, a *International Osteoporosis Foundation* (IOF) e a *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) avaliaram os vários marcadores de remodelação óssea empregados nos estudos clínicos na indicação do risco de fratura e no monitoramento do tratamento e, após estudo de revisão, recomendaram que o *procollagen type 1 amino-terminal propeptide* (P1NP), marcador de formação óssea, e o *serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen* (s-CTX), marcador de reabsorção óssea no sangue, sejam utilizados como marcadores de referência e avaliados por ensaios padronizados em estudos observacionais e de intervenção (Vasikaran et al, 2011).

As moléculas interligadoras do colágeno tipo I são atualmente os melhores marcadores bioquímicos da reabsorção óssea (Vasikaran et al, 2011). No tecido ósseo, as moléculas de colágeno estão unidas por três resíduos do aminoácido hidroxilisina, lisina ou seus derivados, de maneira que cada duas moléculas de colágeno estão unidas entre si por uma estrutura cíclica fluorescente chamada piridinolina. Os telopeptídeos (extremidades da cadeia protéica) carboxiterminal e aminoterminal do colágeno tipo I, cujas cadeias proteicas estão unidas entre si pela estrutura piridinolínica, são liberados durante a degradação do colágeno tipo I, dando origem aos telopeptídeos carboxiterminal, como o CTX, e aminoterminal, como o *cross-linked N-telopeptides of type-I collagen* (NTX), ambos do colágeno tipo I. Essas substâncias circulam no sangue e são excretadas em urina (Vargas et al, 1997). A avaliação dos telopeptídeos do colágeno tipo I parece mostrar maior correlação com a dinâmica do osso, podendo ser dosados no sangue e urina (Saraiva & Larazetti-Castro, 2002).

O CTX e o NTX são indicadores altamente sensíveis de reabsorção óssea, sendo liberados através de degradação proteolítica mediada pela catepsina K da cadeia- $\alpha 1$  durante a reabsorção óssea (Funck-Brentano et al, 2011). O s-CTX é considerado um dos marcadores de reabsorção óssea e possui associação inversamente proporcional ao exame radiológico por densitometria óssea, pois valores moderados a altos do marcador indicam baixa DMO (Silva et al., 2016) e a sua utilização poderia facilitar a investigação da saúde óssea (Maïmoun & Sultan, 2011), adiantando orientações e estratégias para a prevenção e tratamento de doenças ósseas, como osteopenia e osteoporose, e para as intervenções nutricionais somadas ao exercício físico (Tagliaferri et al., 2015).

## 1.2. Massa óssea e Exercício Físico

O treinamento resistido e exercícios aeróbicos, aumentam a massa muscular (aumento do tamanho das fibras musculares esqueléticas) (Häkkinen *et al.*, 2005; Marcora *et al.*, 2005; Lemmey *et al.*, 2009, Sharif *et al.*, 2011). Porém, em mulheres idosas, os percentuais de gordura corporal diminuem (Häkkinen *et al.*, 2003; Strasser *et al.*, 2011; Stavropoulos-Kalinoglou *et al.*, 2013).

Em relação ao metabolismo ósseo, o exercício físico deve ser capaz de produzir o efeito piezoelétrico, que é a deformação ou sobrecarga óssea causada pela força de compressão, tensão ou torção que estimula a atividade celular e promove a deposição de minerais nos pontos de estresse (Guyton & Hall, 2011). Uma meta-análise que avaliou oito estudos dos quais cinco aplicaram exercícios de impacto, três sem impacto e dois combinaram exercícios com e sem impacto, observou um efeito benéfico do exercício na DMO da coluna lombar e do fêmur em mulheres na pós-menopausa, porém, o quanto cada um destes diferentes exercícios contribuiu para este benefício não foi estudado (Kelly *et al.*, 2013). Uma pesquisa realizada com mulheres entre 20 e 35 anos de idade que avaliou os efeitos da corrida com impacto, e do treinamento de força sem impacto, sobre a DMO mostrou que a corrida levou ao aumento significativo na DMO, enquanto o treinamento de força não alterou essa variável (Liang *et al.*, 2011), porém, em mulheres idosas os exercícios sem impacto realizados na água apresentaram um efeito benéfico nos níveis dos marcadores ósseos, embora não tenham aumentado a DMO (Pernambuco *et al.*, 2013).

Em mulheres na pós-menopausa, a massa muscular e o peso corporal têm sido associados positivamente com a DMO do colo do fêmur (Gentil *et al.*, 2007; Di

Monaco *et al.*, 2010; Genaro *et al.*, 2010). Entre as hipóteses construídas para explicar a associação entre a massa muscular e a massa óssea, acredita-se que os ganhos de força muscular induziriam a deposição periosteal estimulando diretamente, via força mecânica, mecano-receptores de osteócitos (Sievanen, 2005; Karasik & Kiel, 2010). Ossos e músculos compartilham influências endócrinas e genéticas, pois músculo tem função endócrina produzindo moléculas bioativas que podem contribuir para a regulação homeostática do osso e do músculo (Sievanen, 2005; Karasik & Kiel, 2010).

Em 2011, Orsatti e cols, em estudo prospectivo controlado, avaliaram a relação entre a massa muscular e a DMO do colo do fêmur em 64 mulheres na pós-menopausa, com idade entre 45 e 70 anos. As participantes foram divididas em dois grupos: com baixa (n=32) ou normal (n=32) massa muscular apendicular. A DMO do colo do fêmur e a massa muscular foram medidas por DXA, no início e após 12 meses e, ao final do seguimento, a DMO do colo do fêmur foi significativamente menor no grupo com baixa massa muscular apendicular, não havendo diferença significativa no grupo com a massa muscular apendicular normal ( $p < 0,05$ ). Os autores concluíram que, em mulheres na pós-menopausa, a baixa massa muscular está associada negativamente à DMO do colo femoral em um curto período de tempo (Orsatti et al, 2011).

A redução da massa muscular está significativamente associada com a diminuição da atividade física, particularmente em mulheres (Gallagher *et al.*, 2000). Segundo a Sociedade Europeia de Aspectos Clínicos e Econômicos da Osteoporose e da Osteoartrite, a perda muscular anual está entre 1 e 2% após os 50 anos de vida e com aumento progressivo conforme o avanço da idade (Rizzoli *et al.*, 2014a). Em

2014, Pisciotano e cols. investigaram a massa magra e gorda, a DMO e a força muscular em 100 mulheres saudáveis ativas com idade acima de 65 anos para determinar indicadores do envelhecimento saudável. A idade e a massa muscular apendicular foram os principais determinantes da força do membro inferior, associados significativamente com o desempenho nos testes físicos. Os autores concluíram que a idade tem impacto negativo na força e no desempenho físico em mulheres na pós-menopausa (Pisciottano et al., 2014), entretanto reconhecidamente, a nutrição adequada e exercícios físicos de resistência representam efetivos caminhos para restaurar a perda da massa e força muscular, além de melhorar a qualidade de vida de mulheres na pós-menopausa (Haub et al, 2002; Burns et al, 2003; Maesta et al, 2007; Orsatti et al, 2010; Orsatti et al, 2012; Orsatti et al, 2018).

### **1.3. Massa óssea e Consumo Proteico**

Uma alimentação saudável possui efeito benéfico sobre a saúde óssea e muscular, devendo ser avaliados a ingestão calórica total e o tipo de nutrientes consumidos (Pisciottano et al., 2014). No passado, o consumo excessivo de proteínas foi considerado prejudicial à saúde óssea por induzir acidose metabólica crônica, o que poderia levar à hipercalciúria e à dissolução mineral acelerada (Barzel et al, 1998), no entanto estudos controlados em curto prazo mostraram que uma dieta rica em proteínas não tem efeitos adversos na retenção de cálcio e no metabolismo ósseo (Roughead et al, 2003; Kerstetter et al, 2005; Hunt et al 2009). Desta forma, a absorção intestinal de cálcio encontra-se aumentada com o maior consumo de proteínas, promovendo efeito positivo na mineralização óssea (Cuenca-Sánchez et al, 2015).

A proteína dietética e seus aminoácidos servem como componentes funcionais para a estrutura total do corpo, regulação e locomoção. Estruturalmente, as proteínas representam 20 a 25% da massa óssea total, das quais as fibras de colágeno tipo 1 constituem a maioria (Burn & Allen, 2013). A proteína dietética é essencial para a formação e manutenção estrutural do osso, pois o organismo é incapaz de reutilizar os aminoácidos para a síntese de colágeno após a remodelação óssea (Burn & Allen, 2013). A ingestão de proteína abaixo das recomendações nutricionais de 0,8g/kg/dia diminui massa óssea e aumentam o risco de osteoporose, particularmente em populações mais velhas (Kerstetter et al, 2003; Wright et al, 2017).

A escolha do método para a adequação proteica deve ser cautelosa e individual. Como melhor opção tem-se a utilização da proporção proteica com a necessidade energética total. Assim a relação de 1,5 g/kg de peso ao dia pode ser considerada um consumo seguro (Cuenca-Sánchez et al 2015), mas é importante avaliar a qualidade e quantidade de proteína a ser consumida para a otimização da saúde óssea e muscular, principalmente devido seu requerimento para estimulação de síntese muscular (Phillips et al, 2009; Cuenca-Sánchez et al, 2015). A qualidade da proteína é determinada pela digestibilidade proteica, do conteúdo e disponibilidade de aminoácidos para suportar a função metabólica. A proteína do soro do leite é uma das proteínas de melhor qualidade, devido ao seu elevado conteúdo em aminoácidos de teor essencial, principalmente os aminoácidos de cadeia ramificada, como por exemplo a leucina, além de possuir digestibilidade rápida (Devries & Phillips, 2015)

A suplementação proteica é eficaz para mulheres na menopausa, na prevenção da perda óssea e na melhora da DMO (Aoe et al., 2005) e, independentemente da

qualidade da proteína do leite, se hidrolisada ou concentrada, a suplementação previne a perda óssea, melhora atividade física e a densidade e conteúdo mineral ósseo (Kim et al., 2015). Uma revisão sistemática mostrou que, em estudos transversais com indivíduos idosos, a ingestão de proteína correlacionou-se positivamente com a DMO e poderia explicar 1% a 2% da variação na DMO (Darling et al, 2009). A ingestão adequada de proteínas pode beneficiar o esqueleto dos idosos, além de fornecer aminoácidos e aumentar a absorção de cálcio (Zhu et al, 2011).

*Whey protein* (WP) é um suplemento nutricional amplamente consumido, conhecido por aumentar a força e a massa muscular durante os períodos de treinamento resistido (Davies *et al*, 2018). É uma fonte de proteína de alta qualidade, rica em aminoácidos essenciais, que estimulam a síntese de proteína muscular pós-exercício (Morton *et al*, 2018). Em adultos a taxa de síntese muscular aumenta quando há a suplementação de 40g de WP, quando acompanhada do treinamento resistido, principalmente no músculo não exercitado (Yang *et al.*, 2012). Recente publicação refere que a melhor forma de adequação proteica em adultos mais velhos seria a concentração de 0.40 g/kg de peso ou 0.61g/kg de massa magra corporal por refeição, com proteínas de alta qualidade e fácil digestão, pelo fato de menor sensibilidade muscular para quantidades menores de proteína consumida nessa população (Moore *et al.*, 2015). Deve-se ter cautela com a quantidade do consumo proteico, pois o consumo máximo para a população saudável é de até 30g do macronutriente (IoM, 2005). Assim, seguindo recomendações, mulheres na pós-menopausa poderiam consumir de 20 a 25g de proteína, de alta qualidade, por refeição, além da prática regular de exercícios físicos de, pelo menos, três vezes na semana (Rizzoli, 2014b).

Recentes pesquisas avaliando o efeito da suplementação da WP sobre a massa

muscular em mulheres na pós-menopausa encontraram resultados conflitantes (Zhu et al, 2015; Weisgarber et al 2015; Mori & Tokuda, 2018; Nabuco et al, 2018). Em 2015, Zhu e cols em estudo duplo-cego controlado por placebo avaliaram a massa muscular de 196 mulheres com idade entre 70 e 80 anos randomizadas a WP contendo 30 g de proteína ou placebo contendo 2,1 g de proteína por dois anos. O estudo mostrou que, em mulheres idosas na pós-menopausa, 30g/dia de proteína suplementada não melhorou a massa muscular ou a função física (Zhu et al, 2015). No mesmo ano, Weisgarber e cols examinaram o efeito combinado da suplementação proteica de soro de leite e do treinamento resistido em 12 mulheres saudáveis na pós-menopausa. Os autores observaram que o exercício foi eficaz para melhorar índices de massa muscular e força, além disso, a ingestão proteica durante as sessões de treinamento não aumentou essa resposta (Weisgarber et al, 2015).

Por outro lado, uma pesquisa investigou o efeito da suplementação de WP consumida imediatamente antes ou após exercícios resistidos na massa muscular, na força muscular e capacidade funcional em 60 mulheres idosas pré-condicionadas. Este programa de treinamento foi realizado durante 12 semanas, três vezes por semana. Uma interação tempo versus grupo foi observada com WP apresentando maiores aumentos em massa e força muscular em comparação com grupo placebo. A suplementação com proteína de soro de leite foi eficaz na promoção de aumentos de massa e força muscular e capacidade funcional em mulheres idosas pré-condicionadas, independentemente do tempo de suplementação (Nabuco et al, 2018).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a proteína do soro do leite, especialmente sua fração proteica básica (proteína básica do leite, MBP), contém vários componentes capazes de promover a formação e inibir a reabsorção óssea

(Fried et al 2012; Nebot et al 2014; Kim et al, 2015; Ono-Ohmachi et al 2017; Douglas et al 2018). Entretanto, poucos estudos clínicos de intervenção avaliaram a saúde óssea com a suplementação da proteína do leite em mulheres na pós-menopausa (Aoe et al, 2005; Zhu et al, 2011). Aoe e cols avaliaram a suplementação da proteína do leite (40 mg por dia) sobre o metabolismo ósseo em 27 mulheres na pós-menopausa, com média de idade de 50 anos, comparado ao placebo, durante 6 meses. A taxa média de ganho de DMO lombar no grupo suplementado (1,21%) foi significativamente maior do que no grupo placebo (0,66%). Quando comparado ao grupo placebo, o NTX diminuiu no grupo de proteína do leite aos 6 meses, mas não houve diferença na osteocalcina sérica entre os dois grupos. Estes resultados sugerem que a suplementação de proteína do leite foi eficaz na prevenção da perda óssea em mulheres na menopausa e que esta melhora na DMO pode ser primariamente mediada pela inibição da reabsorção óssea (Aoe et al, 2005).

Foi realizado um estudo de dois anos de intervenção em 196 mulheres com idades entre 70 e 80 anos, randomizadas para uma bebida rica em proteínas contendo 30 g de proteína de soro de leite ou uma bebida placebo contendo 2,1 g de proteína. Ambas as bebidas forneceram 600mg de cálcio. O consumo médio de proteínas na linha de base foi de 1,1 g / kg de peso corporal por dia. Houve redução significativa na DMO lombar ao longo de 2 anos, sem diferenças entre os grupos, e a DMO de colo femoral permaneceu inalterada em ambos os grupos ao longo do tempo. Os autores concluíram que, em mulheres saudáveis, a suplementação de 30 g de proteína do leite não apresentou efeito benéfico ou deletério sobre a massa óssea (Zhu et al 2011).

#### **1.4. Justificativa**

A suplementação proteica e a prática de exercício físico são relevantes para a melhora da saúde óssea em mulheres na pós-menopausa. Nesse sentido, identificar as características nutricionais relacionados ao metabolismo ósseo, junto às modalidades de exercícios físicos efetivos para manter ou retardar a perda óssea e muscular em mulheres na pós-menopausa poderá ter implicação importante, uma vez que essas informações poderão ser utilizadas por profissionais de saúde para a melhor preservação e tratamento da saúde óssea nesta população. Entretanto poucos estudos de intervenção analisaram a reabsorção óssea em mulheres na pós-menopausa, praticantes de exercícios físicos, suplementadas com proteína do soro do leite (PSL). Diante da escassez de ensaios clínicos até o momento, os resultados do estudo proposto poderão contribuir para a construção desse conhecimento e suas possíveis implicações.

#### **1.5. Hipótese**

A associação da suplementação da proteína do soro do leite com exercício físico melhora a reabsorção óssea, prevenindo a perda óssea.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar o efeito da suplementação com proteína do soro do leite sobre a reabsorção óssea, em mulheres na pós-menopausa praticantes de exercício físico.

### **3. MÉTODO**

Estudo prospectivo de intervenção, randomizado e controlado.

#### **3.1 Tamanho amostral**

O cálculo do tamanho amostral foi embasado no estudo de Aoe e cols (2005) que demonstraram redução significativa nos valores do NTX pós-suplementação de proteína do leite em mulheres na pós-menopausa (pré  $57,5 \pm 9,9$  nmol/mmol Cr e pós  $47,3 \pm 8,3$  nmol/mmol Cr) e sem diferença no grupo placebo (pré  $59,2 \pm 9,8$  nmol/mmol Cr e pós  $58,7 \pm 8,3$  nmol/mmol Cr). Considerando a diferença entre os valores, para um coeficiente de 95% e margem de erro de 5% e poder do teste de 80%, estimou-se tamanho amostral no mínimo de 10 mulheres por grupo.

#### **3.2 Seleção da amostra**

O grupo amostral foi constituído por mulheres participantes do Programa “Alimentação Saudável e Exercício Físico na Promoção da Saúde” (Mexa-se Pró-Saúde) do Centro de Metabolismo, Exercício e Nutrição (CeMENutri). As participantes foram selecionadas respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram: idade igual ou superior a 50 anos; amenorreia maior que doze meses; densidade mineral óssea normal (T-score  $\geq -1,0$  DP) nos últimos doze meses; praticantes dos protocolos de exercícios físicos por 10 semanas e disponibilidade em participar do programa de forma voluntária. Os critérios de exclusão foram: diagnóstico de osteoporose; doenças neurológicas, osteoarticulares ou músculo esqueléticas que impedissem a realização do exercício físico; diabetes

não controlada; doenças tireoidianas e da paratireoide; insuficiência renal; uso de drogas que interferissem no metabolismo ósseo (estrogênio, testosterona, bisfosfonatos, raloxifeno, calcitonina, fluorida, corticoide, cálcio e vitamina D); antecedentes de neoplasia maligna; praticantes de exercícios físicos superior à 10 semanas e fratura óssea ocorrida nos últimos seis meses.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, as mulheres foram convidadas a participar do projeto e orientadas a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), de acordo com exigência da resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Para a execução do projeto, a pesquisadora contou com equipe que faz parte do projeto Mexa-se Pró-Saúde, do CeMENutri da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)-Unesp, com a participação de médicos, biomédicos, educadores físicos e nutricionistas, coordenado pelo Prof. Titular Roberto Carlos Burini.

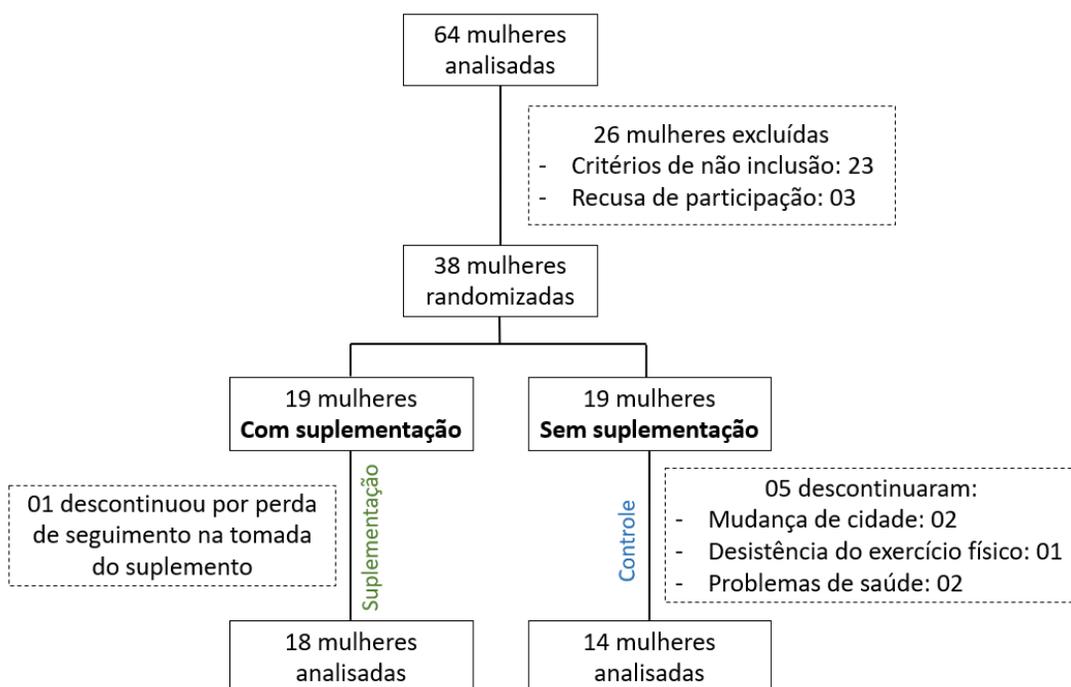
### **3.3 Aprovação ética e registro clínico**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-Unesp, Plataforma Brasil, em 18 de dezembro de 2015 sob número do parecer 1.375.145 e registro do CAAE 50835015.7.0000.5411 (Anexo II). O estudo foi registrado e aprovado pelo Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (REBEC) sob o número de registro RBR-7KKD97.

### **3.4 Delineamento do estudo**

Estudo prospectivo de intervenção, randomizado e controlado. A intervenção realizada foi a suplementação com a proteína do soro do leite (PSL). Desta forma,

após a seleção pelos critérios, as participantes de forma voluntária, praticantes de exercícios físicos regulares por protocolo de treinamento iniciados há 10 semanas, foram randomizadas em dois grupos: com suplementação da PSL (n=19,) ou sem suplementação (n=19, controle) (Figura 1). A randomização foi realizada por sorteio com envelope lacrado e aberto pela participante. As avaliações foram realizadas no início do protocolo, momento inicial (M1) e após 20 semanas, momento final (M2).



**Figura 1-** Fluxograma da randomização dos grupos do estudo.

### 3.5 Protocolos de exercício e suplementação

O protocolo de treinamento é pré-estabelecido pelo programa “Mexa-se Pró-Saúde”, realizado cinco dias na semana, no período da manhã e da tarde, com orientação por profissional Educador Físico, que acompanha e analisa a frequência de participação das participantes.

A frequência de treinamento para o protocolo do estudo foi de três vezes na

semana, em que a participante escolhia os dias da semana e o período para a realização do treinamento, desde que sejam mantidos até a finalização do projeto, contendo exercícios aeróbico e resistido. Todas as participantes foram submetidas a 10 minutos de aquecimento geral associado com alongamentos; 30 minutos de caminhada (monitorados por frequencímetro entre 60 a 80% da frequência cardíaca máxima); e 40 minutos de treinamento resistido (3 séries de 8 a 12 repetições, respeitando a repetição máxima de 60 a 70% como consta no protocolo). Os exercícios foram realizados em circuito, alternando membros inferiores e superiores, priorizando os grupamentos musculares maiores e, posteriormente, os menores. Os exercícios executados foram: *leg press*, cadeiras extensora e flexora, cadeiras adutora e abduzora, panturrilha, supino, crucifixo, remada, puxada alta, rosca direta, tríceps e abdominais (prioritariamente o reto abdominal). A finalização do treinamento consistia de 10 minutos de alongamento.

A suplementação com a PSL, no protocolo de intervenção, foi oferecida em porções diárias do produto *whey protein* concentrado da marca MaxTitanium®, (Supley Laboratório de Alimentos e Suplementos Nutricionais Ltda, São Paulo, Brasil). Em cada porção, foi separada a quantidade de 40g do produto, que corresponde a 160 kcal, 25g de proteína, 2,3g de gorduras totais, 10g de carboidrato, 1,2g de alanina, 1,0g de arginina, 1,5 g de isoleucina, 2,4g de leucina, 2,1 g de lisina, 1,6 g de prolina, 1,0 de valina, entre outros componentes, segundo laudo disponibilizado pela empresa (Anexo III) e tabela nutricional (Anexo IV).

O fracionamento da suplementação foi pesado e dividido em sachês por nutricionista responsável e, posteriormente oferecido semanalmente às mulheres participantes do estudo, com as orientações da ingestão diária: diluição em 300 mL

de água e consumo logo após o término do treino, independentemente do horário do protocolo de treinamento físico (Figura 2). Nos dias em que não houve treinamento, as participantes foram orientadas a manterem a ingestão da suplementação no mesmo horário. A adesão, tolerância e quantificação das tomadas da suplementação foram avaliadas semanalmente pela nutricionista responsável.



**Figura 2.** Recipientes e sachês de porções diárias da suplementação da proteína do soro do leite oferecidos às mulheres.

### **3.6 Protocolos Avaliados**

#### **3.6.1 Antropométrico**

Foi realizada a avaliação antropométrica no M1 e no M2, a qual foram aferidas medidas de peso corporal [P; em quilos (kg)] e estatura [E; em metros (m)], posteriormente calculado o Índice de Massa Corporal (IMC em  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), medidas de circunferência da cintura [CA; em (cm)] e aferido o diâmetro abdominal sagital [DAS (cm)]. As medidas foram realizadas por único avaliador (Gollino L), seguido

as orientações técnicas de referências, da seguinte forma:

- **Peso (Kg):** pesagem em balança antropométrica digital, do tipo plataforma com precisão de 0,01 kg. A avaliação foi realizada com a participante descalça e com mínimo de vestimentas.
- **Estatura (m):** medida por haste móvel da balança antropométrica com precisão de 0,5 cm, orientando a participante a manter-se em posição ortostática, com braços ao lado do corpo, mantendo os pés juntos e descalços, cabeça orientada no plano de Frankfurt e em inspiração profunda (Jelliffe, 1968).
- **IMC (kg/m<sup>2</sup>):** obtido por divisão do peso corporal em kg pela estatura em metros. As mulheres foram classificadas quanto ao estado nutricional pela idade (abaixo ou acima de 60 anos) preconizado pelos principais órgãos de referências (OMS, 2000 e OPAS, 2002).
- **CC (cm):** foi aferida por fita inextensível colocada ao redor da maior circunferência entre a última costela e a crista ilíaca, mantendo-a justa, sem comprimir os tecidos.
- **DAS (cm):** aferido com caliper abdominal (Holtain Kahn Abdominal Caliper®) de haste móvel e subdivisão de 0,1 cm. Foi medido com a paciente deitada em mesa examinadora de superfície firme na posição supina. A medida foi tomada no ponto umbilical (Aremellini *et al.*, 1997)

Nos momentos inicial e final, a impedância bioelétrica (BIA) foi utilizada para medir a composição corporal (Biodinâmics<sup>®</sup>, modelo 450 da TBW<sup>®</sup>, USA), com avaliação de massa livre de gordura [MLD (kg)], massa magra [MM (%)] e massa gorda [MG (%)]. Para a realização do teste, todas as mulheres foram instruídas a ingerir 2 litros de água no dia anterior a avaliação corporal, não realizar exercício

físico 24 horas antes, não ingerir cafeína e bebida alcoólica 12h antes, estar em jejum de no mínimo 4 horas e esvaziar a bexiga.

A partir dos valores fornecidos pela BIA, foram empregadas equações para o cálculo da massa livre de gordura (MLG), massa magra (MM) e porcentagem de gordura corporal (Janssen, 2002). Para o cálculo do índice de massa muscular (IMM), utilizou-se a seguinte equação:  $IMM (kg/m^2) = MM (kg)/Estatura^2(m)$ , sendo considerado normal,  $IMM \geq 6,75 kg/m^2$  (Janssen et al, 2004).

### **3.6.2 Consumo alimentar**

As participantes foram avaliadas quanto ao consumo nutricional habitual por três recordatórios de 24 horas (Fisberg *et al.*, 2009), em dias não consecutivos, sendo dois realizados durante a semana e um no final de semana, anterior a avaliação dos momentos (M1 e M2), com período de *washout* de uma semana. Os recordatórios foram coletados por entrevista com nutricionista treinada, respeitando a metodologia dos cinco passos da *Automated Multiple Pass Method* (Blanton et al, 2006). Estes foram posteriormente quantificados por meio do programa *Nutrition Data System for Research Grad-Pack Software* (desenvolvido pelo *Nutrition Coordinating (NCC), University of Minnesota, Minneapolis, EUA*) usado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos [30,31].

### **3.6.3 Laboratoriais**

Amostras sanguíneas foram colhidas nos dois momentos (M1 e M2), pela manhã, após 12 horas de jejum, no laboratório do CeMENutri por profissional biomédico. A coleta foi realizada por meio de punção venosa, em sistema fechado a

vácuo (*Vacutainer*®, *England*), sendo obtidos 20 ml de sangue, diretamente em um tubo seco (10 ml) com gel separador de soro e um tubo heparinizado com EDTA (10 ml) para obtenção de plasma. Ao final de cada coleta, foram centrifugadas por 10 min (4.000 rpm). Dois tubos com o soro obtido seguiram para dosagens bioquímicas imediatas e outro tubo com soro foi congelado a -80°C até a dosagem do marcador de reabsorção óssea, o s-CTX. Todas as avaliações bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas da FMB-Unesp.

Para avaliação do estado de saúde das mulheres foi realizada dosagem de hormônio folículo estimulante (FSH), proteínas totais (PTN totais), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), hormônio tireoestimulante (TSH), paratormônio (PTH) e cálcio total, albumina, creatinina, e glicose. Foram avaliados fosfatase alcalina (FA) e s-CTX como parâmetros relacionados a saúde óssea.

Para dosagem de cálcio, creatinina e FA foi empregado o método da química seca com equipamento de automatização, modelo Vitros 5.1/FS® (Johnson-Johnson®, Rochester, NY, USA), sendo o intervalo de referência considerado como valores normais para cálcio de 8,4-10,2mg/dL, creatinina de 0,7 a 1,2 mg/dL e FA de 36-126U/L. A dosagem de PTH e TSH foi realizada pelo método da quimioluminescência, automação em imunoensaio modelo Immullite 2000® (SPi systems, marca Siemens®, CA, USA) com o intervalo de referência considerado como valores normais de 11 a 65 pg/mL para PTH, e de 0,49 a 4,67 mIU/mL para o TSH.

O s-CTX foi empregado como marcador de reabsorção óssea e analisado por

metodologia *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay* (ELISA) da marca Elabscience® que utiliza método sanduíche e possui especificidade de reconhecer o CTX humano natural e algum recombinante. A especificidade do teste é garantida pelo uso de dois anticorpos monoclonais, que reconhecem de forma linear os octapeptídeos  $\beta$ -8AA. Portanto a metodologia empregada quantifica a forma beta do ácido aspártico do telopeptídeos C-Terminais ( $\beta$ -CTX). A sensibilidade do método é de 0,10 ng/mL, com faixa de detecção de 0,16-10 ng/mL e coeficiente de variação <10%. ~~O valor de referência do s-CTX para mulheres na pré-menopausa é de 0,11 a 0,63 ng/mL (Garnero et al, 2008).~~ As análises do marcador foi realizada no laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Unesp de Botucatu.

### **3.7 Análise estatística**

O método de análise estatística utilizado foi *per protocol*. A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas. Para comparação entre os grupos em relação às características iniciais foi empregado o Teste *t-student* (variáveis quantitativas) ou distribuição Gama (variáveis quantitativas assimétricas). Na comparação entre os momentos (inicial e final) e entre os grupos utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento. Para as variáveis assimétricas foi empregado o mesmo delineamento em medidas repetidas

através da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o P-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System* (SAS), versão 9.4, com a colaboração do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, que prestou atendimento metodológico e conduziu os procedimentos estatísticos.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Artigo Original**

**A suplementação da proteína do soro do leite não influencia em em marcador de reabsorção óssea *s*-CTX de mulheres na pós-menopausa e praticantes de exercício físico**

Effect of whey protein supplementation and resistance training on bone remodeling in postmenopausal women

**Gollino L, Mendes AL, Burini RC, Nahas EAP**

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação da proteína do soro do leite (PSL) sobre a reabsorção óssea, em mulheres na pós-menopausa praticantes de exercício físico.

**Métodos:** Estudo prospectivo de intervenção controlado, com 38 mulheres na pós-menopausa, com idade entre 50-70 anos, randomizadas em dois grupos: intervenção com PSL (25 g de proteína, n=19) ou controle (n=19). Os exercícios foram realizados três vezes por semana com treinamento aeróbico e resistido. O tempo de seguimento foi de 20 semanas, com avaliações nos momentos iniciais e finais. As participantes foram avaliadas quanto à antropometria, ao consumo alimentar por meio do recordatório de 24 horas, variáveis bioquímicas e hormonais e pelo marcador de reabsorção óssea, o *s*-CTX (*serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen*).

**Resultados:** Foram avaliadas 18 mulheres no grupo suplementado e 14 no grupo controle, com média de idade de  $59\pm 6$  anos. Quanto aos parâmetros antropométricos e laboratoriais, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. O grupo controle após 20 semanas apresentou maior consumo de energia, carboidratos, gorduras totais e fibras, e no suplementado foi observado maior consumo de energia, carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e aminoácidos entre os momentos. A média dos valores de *s*-CTX foram de  $3.3\pm 2.4$ ng/mL e  $2.8\pm 2.4$ ng/mL no suplementado ( $p=0.311$ ) e de  $2.4\pm 2.3$ ng/mL e  $1.6\pm 1.5$ ng/mL no controle ( $p=0.016$ ), nos momentos inicial e final, respectivamente.

**Conclusão:** Em mulheres na pós-menopausa praticantes de exercício físico, a associação da suplementação de proteína do soro do leite não apresentou efeito na

reabsorção óssea no protocolo de 20 semanas. Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos: RBR-7KKD97

**Palavras Chave:** Suplementação nutricional; Proteína do soro do leite; Marcador de reabsorção óssea; Menopausa; Exercício Físico.

### **Abstract**

**Objective:** To evaluate the effect of whey protein supplementation (WPS) on bone resorption in postmenopausal women practicing physical exercise.

**Methods:** We conducted a prospective, controlled study with 38 postmenopausal women aged 50 to 70 years, randomized into two groups: with PSL intervention (25g of protein, n = 19) or without PSL (n = 19, control). The exercises were performed three times a week with aerobic and resistance training. Follow-up time was 20 weeks, with assessments at the start and end times. The participants were evaluated for anthropometry, food consumption through the 24-hour recall, laboratory parameters (biochemical and hormonal) and the bone resorption marker *s*-CTX (serum C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen).

**Results:** We evaluated 18 women in the supplemented group and 14 in the control group, mean age  $59\pm 6$  years. Regarding the anthropometric and laboratory parameters, no significant differences were observed between groups. In the comparison between the moments, the control group presented after 20 weeks, higher energy consumption, carbohydrates, total fats and fibers. In the supplemented group was observed greater consumption of energy, carbohydrates, proteins, fats, minerals

and amino acids between moments. The mean values of CTX were  $3.3 \pm 2.4\text{ng/mL}$  and  $2.8 \pm 2.4\text{ng/mL}$  in the supplementation group ( $p = 0.311$ ) and  $2.4 \pm 2.3\text{ng/mL}$  and  $1.6 \pm 1.5\text{ng/mL}$  in the control ( $p = 0.016$ ), in the initial and final moments, respectively.

**Conclusion:** In postmenopausal women practicing physical exercise, the association of whey protein supplementation did not present repercussion on bone resorption in the 20-week protocol.

**Keywords:** Nutritional supplementation; Whey protein; Bone resorption marker; Menopause; Physical exercise.

## **Introdução**

Nos primeiros anos de pós-menopausa, em resposta ao hipoestrogenismo, ocorre aumento na reabsorção óssea, iniciando o processo de perda da massa óssea [1]. Esta inicia-se 2 a 3 anos antes da última menstruação, e mantém-se por 4 a 5 anos após a menopausa e com perda de aproximadamente 2% de massa óssea ao ano [2]. Evidências sugerem que a remodelação óssea acelerada - avaliada pelos marcadores bioquímicos de reabsorção e formação óssea - aumenta o risco de osteoporose em mulheres na pós-menopausa [1].

Nesse processo, a proteína dietética é essencial para a formação e manutenção estrutural do osso, pois o organismo é incapaz de reutilizar os aminoácidos para a síntese de colágeno após a remodelação óssea [3]. No passado, o consumo excessivo de proteínas foi considerado prejudicial à saúde óssea por induzir acidose metabólica crônica, o que poderia levar à hipercalcúria e a dissolução mineral acelerada [4]. No entanto, estudos controlados mostraram que uma dieta rica em proteínas não tem efeitos adversos na retenção de cálcio e no metabolismo ósseo [5,6]. Uma revisão sistemática mostrou que, em estudos transversais com indivíduos idosos, a ingestão de proteína correlacionou-se positivamente com a densidade mineral óssea (DMO) e poderia explicar 1% a 2% da variação na densidade [7].

A ingestão adequada de proteínas pode beneficiar o esqueleto dos idosos, fornecendo aminoácidos e aumentando a absorção de cálcio [8,9]. A proteína do soro do leite (PSL) é classificada como uma das proteínas de melhor qualidade, devido a digestibilidade rápida e pelo conteúdo em aminoácidos com alto teor essencial, principalmente os aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina [10].

As mulheres na pós-menopausa podem ser beneficiadas com programas de exercícios que possuem efeitos positivos na força e massa muscular e na saúde óssea [13,14,15]. O exercício físico, em relação ao metabolismo ósseo, deve ser capaz de produzir o efeito piezoelétrico, que é a deformação ou sobrecarga óssea causada pela força de compressão, tensão ou torção que estimula a atividade celular e promove a deposição de minerais nos pontos de estresse [16]. Assim, as interligações positivas entre o tecido muscular e ósseo na prática do exercício podem influenciar a remodelação óssea à partir da contração gerada pelo músculo [17,18]. O marcador sérico de remodelação óssea *C-telopeptide of Type I Collagen* (CTX) pode ser empregado na prática clínica, para monitorar o efeito do exercício físico na remodelação óssea [13,19,20].

Para mulheres na pós-menopausa a *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis* (ESCEO) recomenda a ingestão de, pelo menos, 20 a 25g de proteína de alta qualidade em cada refeição principal, combinado com a prática regular de exercícios físicos de, no mínimo, três vezes na semana [21]. Mulheres na pós-menopausa poderiam ter benefícios na prevenção da perda óssea e na melhora da DMO quando suplementada com PSL [22]. A suplementação com PSL é conhecida principalmente por aumentar a força e a massa muscular durante e após os protocolos de treinamento resistido [11,12]. Recente estudo *in vivo* demonstrou que a PSL, especialmente sua fração proteica básica, contém vários componentes capazes de promover a formação óssea e inibir a reabsorção óssea [23]. Entretanto, poucos estudos clínicos de intervenção avaliaram a saúde óssea com a suplementação proteica em mulheres na pós-menopausa [8,22,24]. Baseados nesses dados e diante da escassez de ensaios clínicos, o objetivo

do estudo foi avaliar o efeito da suplementação com a PSL na reabsorção óssea, em mulheres na pós-menopausa já praticantes de exercício físico.

## **Métodos**

### ***Desenho do estudo e seleção da amostra***

Foi realizado um estudo prospectivo, randomizado e controlado. O grupo amostral foi constituído de mulheres participantes do Programa Mexa-se Pró-Saúde do Centro de Metabolismo, Exercício e Nutrição (CeMENutri). O cálculo do tamanho amostral foi embasado no estudo de Aoe *et al.* (2005) que observaram redução significativa nos valores de *cross-linked N-telopeptides of type-I collagen* (NTX), pós-suplementação de proteína do leite em mulheres na pós-menopausa (pré  $57,5 \pm 9,9$  nmol/mmol Cr e pós  $47,3 \pm 8,3$  nmol/mmol Cr) e sem diferença no grupo placebo (pré  $59,2 \pm 9,8$  nmol/mmol Cr e pós  $58,7 \pm 8,3$  nmol/mmol Cr) [22]. Considerando a diferença entre os valores, para um coeficiente de 95% e margem de erro de 5% e poder do teste de 80%, estimou-se tamanho amostral de, no mínimo, 10 mulheres por grupo.

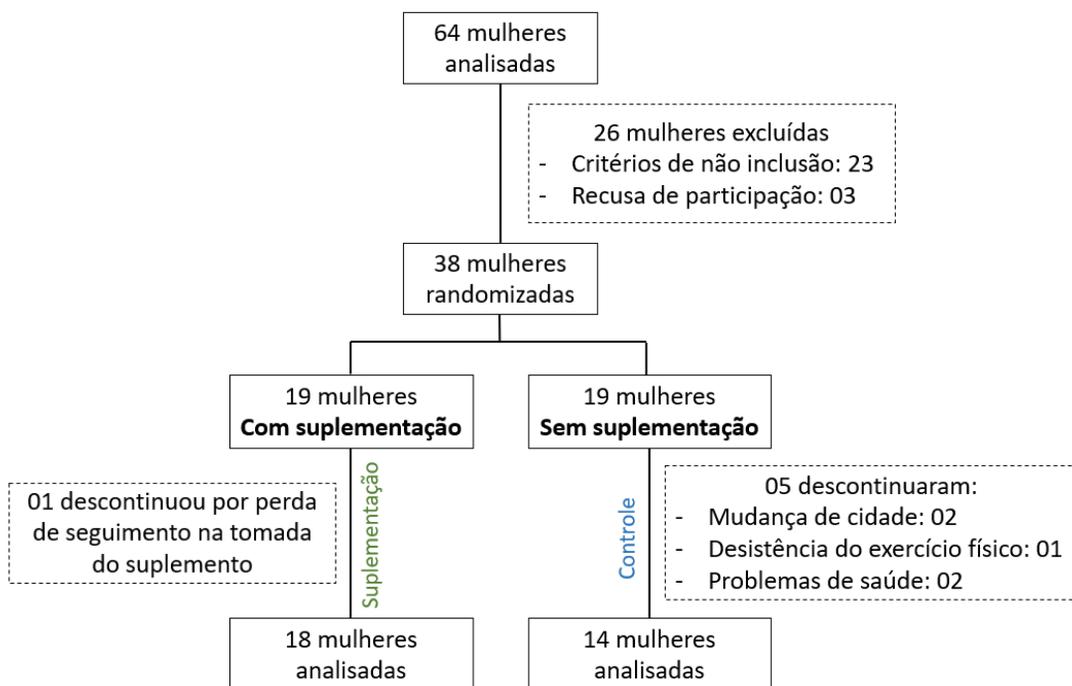
Foram incluídas mulheres com idade superior a 50 anos, amenorreia superior a um ano, densidade mineral óssea normal (T-score  $\geq -1,0$  DP) nos últimos doze meses, praticantes dos protocolos de exercícios físicos por protocolo de 10 semanas prévias e que aceitaram participar do estudo. Os critérios de exclusão foram: doenças neurológicas, osteoarticulares ou músculo esqueléticas; fratura óssea ocorrida nos últimos seis meses; câncer; diabetes não controlado; doenças tireoidianas e da paratireoide; insuficiência renal e uso de drogas que interfiram no metabolismo ósseo

(estrogênio, testosterona, bisfosfonatos, raloxifeno, calcitonina, fluorida, corticoide, cálcio e vitamina D). Todas as participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. O estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos sob o número de registro RBR-7KKD97 e desenvolvido de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) 2010.

### ***Protocolo de suplementação***

Após a seleção pelos critérios, as 38 participantes de forma voluntária, praticantes de exercícios físicos regulares por protocolo de treinamento iniciados há 10 semanas, foram randomizadas, por sorteio com envelope lacrado e aberto pela participante, em dois grupos: com suplementação da proteína do soro do leite (PSL, n=19) ou sem PSL (n=19, controle) (Figura 1). As participantes do grupo suplementado foram orientadas a ingestão de porções diárias do produto *whey protein* (WP) concentrado da marca MaxTitanium® (Supley Laboratório®, SP, Brasil). As porções foram fracionadas, por nutricionista, em sachês com 40g do produto, que correspondia a 160 kcal, 25g de proteína, 2,3g de gorduras totais, 10g de carboidrato, 1,2g de alanina, 1,0g de arginina, 1,5 g de isoleucina, 2,4g de leucina, 2,1 g de lisina, 1,6 g de prolina, 1,0 de valina, entre outros componentes, segundo a tabela nutricional disponibilizada pela empresa. As mulheres foram orientadas a diluir a porção da suplementação em 300 mL de água e ingerir diariamente, respeitando o horário após a prática de exercício físico e o consumo proteico após o treinamento [21]. Nos dias que não houve treinamento, as mulheres foram orientadas a ingestão da PSL nos

mesmos horários dos dias exercitados. A adesão da suplementação foi controlada por devolução dos sachês vazios a cada semana, assim elas retiravam novas porções para serem ingeridas nos dias subsequentes. As avaliações foram realizadas no início do protocolo (momento inicial) e após decorridas 20 semanas de acompanhamento (momento final).



**Figura 1-** Fluxograma da randomização dos grupos do estudo.

### ***Protocolo de exercício físico***

O protocolo de exercício físico com treinamento aeróbio e resistido foi realizado três vezes na semana acompanhado por profissional Educador Físico, definido por 10 minutos de aquecimento geral associado com alongamentos, 30 minutos de caminhada, 40 minutos de treinamento resistido (3 séries de 8 a 12 repetições, respeitando a carga de 60 a 70% da repetição máxima) e finalização com 10 minutos de alongamento final. O treinamento de exercícios resistidos foram

realizados em circuito, alternando membros inferiores e superiores, priorizando os grupamentos musculares maiores e, posteriormente, os menores.

### ***Avaliações das variáveis antropométricas, dietéticas e laboratoriais***

Todas as avaliações foram realizadas no momento inicial (M1) e final com 20 semanas de intervenção (M2). Foram obtidos para avaliação antropométrica: peso corporal, estatura, e posterior cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), circunferência da cintura (CC) e diâmetro abdominal sagital (DAS). A composição corporal foi analisada por meio de bioimpedância elétrica (*Biodynamics 450* da TBW®) para avaliação de massa livre de gordura (MLD), massa gorda (MG) e massa magra (MM), calculada por equação proposta por *Janssen* (2002), do cálculo da taxa metabólica basal (TMB) por fórmula de *Harris e Benedict* (1918) e do índice de massa muscular (IMM) proposto por *Janssen e cols* (2004) [25,26,27].

O consumo alimentar foi avaliado por três recordatórios de 24h [28], em dias não consecutivos, sendo dois realizados durante a semana e um no final de semana, anterior a avaliação dos dois momentos. Os recordatórios foram coletados por entrevista realizado por única nutricionista treinada, respeitando a metodologia dos cinco passos do *Automated Multiple Pass Method* [29]. Estes foram posteriormente quantificados por meio do programa *Nutrition Data System for Research Grad-Pack Software* (NCC, University of Minnesota, MN, USA), usado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos [30,31].

. As participantes foram orientadas a manter a dieta habitual.

As amostras sanguíneas foram coletadas pela manhã, após 12 horas de jejum e foram analisados os seguintes parâmetros: glicose, cálcio, proteínas totais (PTN

totais), albumina, creatinina, transaminases (TGO e TGP), hormônio tireoestimulante (TSH), hormônio folículo estimulante (FSH), paratormônio (PTH) e fosfatase alcalina (FA). Os exames laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da FMB-UNESP. As dosagens de glicose, cálcio, FA, creatinina, PTN totais e frações foram realizadas por metodologia colorimétrica de química seca com equipamento de automatização, modelo Vitros 5.1/FS<sup>®</sup> (Johnson-Johnson<sup>®</sup>, Rochester, NY, USA). O PTH e o TSH foram dosados pelo método da quimioluminescência, automação em imunoenensaio modelo Immullite 2000<sup>®</sup> (SPi systems, marca Siemens<sup>®</sup>, CA, USA).

O CTX sérico (*s*-CTX) (*Cross Linked C-telopeptide of Type I Collagen*) empregado como marcador de reabsorção óssea foi analisado por metodologia *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay* (ELISA) da marca Elabscience<sup>®</sup> que utiliza método sanduíche e possui especificidade de reconhecer o CTX humano natural e algum recombinante. A especificidade do teste é garantida pelo uso de dois anticorpos monoclonais, que reconhecem de forma linear os octapeptídeos  $\beta$ -8AA, quantificando a forma beta do ácido aspártico do telopeptídeos C-Terminais. A sensibilidade do método é de 0,10 ng/mL, com faixa de detecção de 0,16-10 ng/mL e coeficiente de variação <10%. Para as análises do marcador foi contado com o apoio do laboratório da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Unesp de Botucatu.

### ***Análise estatística***

O método de análise estatística utilizado foi *per protocol*. As variáveis foram

analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculada média e desvio-padrão para variáveis quantitativas. Para comparação entre os grupos em relação às características iniciais foi empregado o Teste *t-student* (variáveis quantitativas) ou distribuição Gama (variáveis quantitativas assimétricas). Na comparação entre os momentos (basal e 20 semanas) e entre os grupos utilizou-se o delineamento em medidas repetidas no tempo (ANOVA), seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado para interação entre grupo x momento. Para as variáveis assimétricas foi empregado o mesmo delineamento em medidas repetidas através da distribuição Gama seguido do teste de comparação múltipla de Wald. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o P-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System* (SAS), versão 9.4.

## **Resultados**

Das 38 mulheres avaliadas, 6 descontinuaram o estudo antes de 20 semanas. No grupo suplementado, uma participante descontinuou o estudo por abandono ao protocolo (falha na tomada da suplementação). No grupo controle, cinco participantes descontinuaram: duas por mudança de cidade, uma desistiu da atividade física e duas por problemas osteoarticulares com abandono ao exercício físico (Figura 1). Não foi observado evento adverso com a suplementação durante o estudo.

A comparação das características clínicas, antropométricas e laboratoriais iniciais das mulheres submetidas à suplementação com PSL (n=18) e não

suplementadas (controle, n=14) está apresentada na Tabela 1. Observa-se que os grupos foram homogêneos para as todas as variáveis avaliadas ( $p>0,05$ ). A média de idade foi de 57 anos para o grupo suplementação e de 61 anos para o grupo controle, com tempo de menopausa superior à 8 anos para ambos os grupos. A classificação do IMC, pelos valores médios, indicou sobrepeso para mulheres abaixo de 60 anos e peso normal para aquelas acima de 60 anos, em ambos os grupos, e com deposição central de gordura ( $CC > 88$  cm), para ambos os grupos.

A Tabela 2 demonstra a comparação das características antropométricas e laboratoriais entre grupos e momentos. Na avaliação final, não foram observadas variações significativas nas medidas antropométricas em ambos os grupos ( $p>0,05$ ). Não foi observado variações na porcentagem de massa gorda ou massa magra e no índice de massa muscular em ambos os grupos (Tabela 2).

A comparação entre os nutrientes analisados pelo consumo alimentar, entre os grupos e os momentos encontra-se na Tabela 3. No momento inicial foi observado que o grupo controle apresentava maior consumo de proteínas totais, fósforo, magnésio e aminoácidos (isoleucina, leucina, valina e glutamina) em comparação ao grupo suplementação. Na comparação entre os momentos (inicial em final), o grupo controle apresentou aumento no consumo de energia, carboidratos, gorduras totais e fibras. E no grupo suplementado foi observado maior consumo de energia, carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e aminoácidos no final do estudo (Tabela 3).

Na análise do marcador de reabsorção óssea *s*-CTX foi observado redução significativa entre os momentos inicial e final apenas no grupo controle, a média dos valores foi de  $2.4\pm 2.3$ ng/mL e  $1.6\pm 1.5$ ng/mL no controle ( $p=0.016$ ). No grupo

suplementado não foi observada variação significativa entre os momentos e a média foi de  $3.3 \pm 2.4 \text{ ng/mL}$  e  $2.8 \pm 2.4 \text{ ng/mL}$  ( $p=0.311$ ). Na comparação entre grupos, também não houve diferença significativa no momento final ( $p=0.113$ ) (Figura 4).

**Tabela 1.** Comparação das características clínicas, antropométricas e laboratoriais iniciais entre mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14).

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>Suplementação</b>	<b>Valor de p*</b>
Idade (anos)	61.3 ± 5.3	57.2 ± 6.4	0.057
Tempo Menopausa (anos)	10.0 ± 8.6	8.3 ± 5.5	0.498
Peso (kg)	71.2±7.87	72.8±12	0.994
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.4 ± 3.31	28.8±3.92	0.966
Circunferência da Cintura (cm)	95.9 ± 9.21	97.2 ± 10.9	0.723
DAS (cm)	21.8 ± 2.5	21.6 ± 2.4	0.786
Massa Livre de Gordura (kg)	37.4 ± 11.4	41.7 ± 4.3	0.137
Massa Magra (%)	24.6 ± 2.78	25.6 ± 3.51	0.404
Massa Gorda (%)	41.3 ± 6.2	39.9 ± 7.13	0.541
IMM (mmkg/m <sup>2</sup> )	7.3 ± 0.8	7.52 ± 0.85	0.434
TSH (µIU/mL)	2.1 ± 1.5	2.74 ± 1.2	0.454
FSH (mUI/mL)	66.9 ± 39	59.4 ± 25	0.498
Proteínas totais (g/dL)	7.2 ± 0.6	7.33 ± 0.4	0.512
Albumina (g/dL)	4.16 ± 0.2	4.2 ± 0.2	0.941
Cálcio (mg/dL)	9.43 ± 0.5	9.4 ± 0.4	0.651
Creatinina (mg/dL)	0.74 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.890
TGO (mg/dL)	31.4 ± 9.7	29.5 ± 19	0.748
TGP (mg/dL)	29.1 ± 12	43.1 ± 49	0.320
Glicose (mg/dL)	95.0 ± 8.8	94.1 ± 12	0.806
Paratormônio (pg/mL)	30.0 ± 14	32.0 ± 16	0.715
Fosfatase alcalina (U/L)	83.3 ± 17	73.8 ± 13	0.095
s-CTX (ng/mL)	2.4±2.3	3.3±2.4	0.113

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão. DAS, diâmetro abdominal sagital; FSH, hormônio folículo estimulante; IMC, índice de massa corporal; IMM, índice de massa muscular; TGO, transaminase glutâmico-oxalacética; TGP, transaminase glutâmico-pirúvica; TSH, hormônio tireoestimulante.

\*Diferença significativa se  $P < 0,05$  (Teste *t-Student* ou Teste de Distribuição Gama).

**Tabela 2.** Comparação dos parâmetros antropométricos e laboratoriais entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14), nos momentos, basal (M1) e em 20 semanas de intervenção (M2).

Parâmetros	Controle		Suplementação		Valor de <i>p</i> *
	M1	M2	M1	M2	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.4 ± 3.3	28.7 ± 3.07	28.8 ± 3.92	28.5 ± 3.52	0.812
CC (cm)	95.9 ± 9.2	96.3 ± 10.6	97.2 ± 10.9	95.3 ± 9.5	0.657
DAS (cm)	21.8 ± 2.5	21.3 ± 2.3	21.6 ± 2.45	22.4 ± 3.9	0.361
MLG (kg)	37.4 ± 11.4	36.9 ± 11.3	41.7 ± 4.3	41.3 ± 4.1	0.981
Massa Magra (%)	24.6 ± 2.8	24.4 ± 2.9	25.6 ± 3.5	25.5 ± 3.2	0.874
Massa Gorda (%)	41.3 ± 6.2	41.4 ± 6.08	39.9 ± 7.1	39.9 ± 6.8	0.987
IMM (mmkg/m <sup>2</sup> )	7.3 ± 0.8	7.1 ± 0.8	7.5 ± 0.85	7.5 ± 0.8	0.771
Proteínas totais (g/dL)	7.2 ± 0.6	7.5 ± 0.4	7.3 ± 0.4	7.4 ± 0.4	0.283
Albumina (g/dL)	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	0.814
Cálcio (mg/dL)	9.4 ± 0.5	9.3 ± 0.4	9.4 ± 0.4	9.3 ± 0.3	0.969
Magnésio (mg/dL)	1.98 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.1	0.525
Creatinina (mg/dL)	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.643
TGO (mg/dL)	31.4 ± 9.7	26.9 ± 9.3	29.5 ± 19	33.6 ± 23	0.324
TGP (mg/dL)	29.1 ± 12	35.5 ± 12	43.1 ± 49	56.3 ± 55	0.738
Glicose (mg/dL)	95.0 ± 8.8	90.4 ± 9.0	94.1 ± 12	93.4 ± 10	0.441
Paratormônio (pg/mL)	30.0 ± 14	31.1 ± 13	32.0 ± 16	37.0 ± 17	0.607
Fosfatase Alcalina (U/L)	83.3 ± 17	77.4 ± 21	73.8 ± 13	68.9 ± 12	0.896

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão. CC: circunferência da cintura; DAS: diâmetro abdominal sagital; FSH: hormônio folículo estimulante; IMC: índice de massa corporal; IMM: índice de massa muscular; MLG: massa livre de gordura; TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica; TMB: taxa metabólica basal;

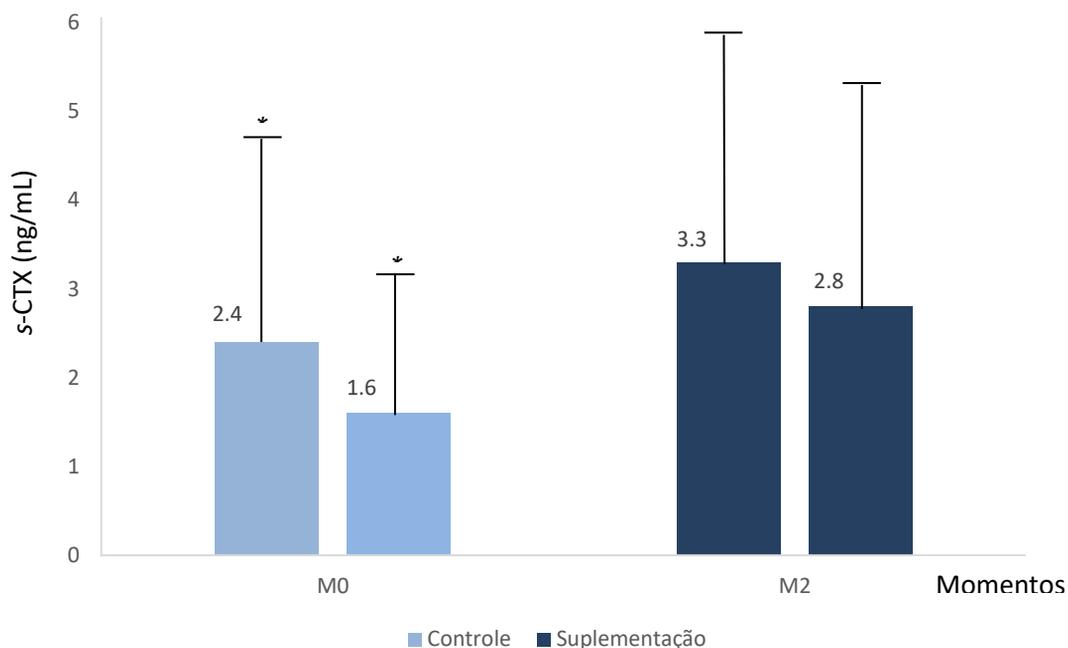
\*Diferença significativa se  $P < 0,05$  (ANOVA em medidas repetidas seguido do teste de Tukey). Letras minúsculas (a-b) indica diferença significativa entre momentos.

**Tabela 3.** Comparação dos nutrientes avaliados pelo consumo alimentar entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14), nos momentos, basal (M1) e após 20 semanas de intervenção (M2).

Parâmetros	Controle		Suplementação		Valor de <i>p</i> *
	M1	M2	M1	M2	
Energia (kcal)	1494 ± 360 <sup>a</sup>	1979 ± 781 <sup>b</sup>	1387 ± 320 <sup>a</sup>	2328 ± 1134 <sup>b</sup>	0.104
C. total (g)	192 ± 49.2 <sup>a</sup>	260 ± 118.9 <sup>b</sup>	178 ± 49.2 <sup>a</sup>	260 ± 99.6 <sup>b</sup>	0.522
P. total (g)	93.8 ± 34.6 <sup>A</sup>	80.5 ± 18.2 <sup>A</sup>	68.5 ± 22.7 <sup>Ba</sup>	122 ± 48.8 <sup>Bb</sup>	<.001
G. totais (g)	48.0 ± 17.5 <sup>a</sup>	72.2 ± 40.3 <sup>b</sup>	46.0 ± 18.1 <sup>a</sup>	88.3 ± 59.3 <sup>b</sup>	0.339
Fibras totais (g)	18.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	24.3 ± 10.2 <sup>b</sup>	16.0 ± 7.4	20.0 ± 7.4	0.934
Cálcio (mg)	638 ± 245	657 ± 265 <sup>A</sup>	508 ± 248 <sup>a</sup>	934 ± 238 <sup>bB</sup>	<b>0.009</b>
Fósforo (mg)	1347 ± 664 <sup>A</sup>	1129 ± 330	852 ± 242 <sup>aB</sup>	1216 ± 498 <sup>b</sup>	<b>0.011</b>
Magnésio (mg)	354 ± 304 <sup>A</sup>	306 ± 103	210 ± 66.3 <sup>aB</sup>	278 ± 91.3 <sup>b</sup>	0.091
Isoleucine (g)	4.0 ± 1.54 <sup>A</sup>	3.5 ± 0.9 <sup>A</sup>	3.0 ± 1.12 <sup>aB</sup>	5.8 ± 2.2 <sup>bB</sup>	<b>0.001</b>
Leucine (g)	7.0 ± 2.6 <sup>A</sup>	6.2 ± 1.5 <sup>A</sup>	5.2 ± 1.9 <sup>aB</sup>	9.8 ± 3.7 <sup>bB</sup>	<b>0.001</b>
Valine (g)	4.57±1.69 <sup>A</sup>	4.03±0.92 <sup>A</sup>	3.4 ± 1.2 <sup>aB</sup>	5.8 ± 2.3 <sup>bB</sup>	<b>0.001</b>

Valores expressos em Média ± Desvio Padrão. C: carboidrato; G: gorduras; P: proteínas; Vit: vitamina. \*Diferença significativa se  $P < 0,05$  (ANOVA em medidas repetidas seguido do teste de Tukey e distribuição GAMMA).

Letras minúsculas (a-b) indica diferença significativa entre momentos e Letras maiúsculas (A-B) diferença significativa entre os grupos.



**Figura 4:** Comparação dos valores séricos do marcador de reabsorção óssea (s-CTX) entre as mulheres na pós-menopausa submetidas à suplementação com proteína isolada do leite (n=18) e não suplementadas (controle, n=14) nos momentos, basal (M1) e após 20 semanas de intervenção (M2) (valores médios  $\pm$  desvio padrão).

\*Diferença significativa se  $P < 0,05$  (ANOVA em medidas repetidas seguido do teste de Tukey).

## Discussão

O presente estudo de intervenção com objetivo de avaliar o efeito da suplementação da PSL em mulheres na pós-menopausa submetidas a exercícios físicos não apresentou efeito na reabsorção óssea no protocolo de 20 semanas. No grupo suplementado não foi observada variação significativa entre os momentos no valor médio do marcador de reabsorção óssea. O *s*-CTX é liberado através da degradação proteolítica do colágeno tipo I mediada pela catepsina K da cadeia- $\alpha$ 1 durante a reabsorção óssea [33]. Possui associação inversamente proporcional ao exame radiológico por DMO, valores moderados a altos desse marcador representa baixa densidade óssea [19,20]. Até o momento não foi encontrado pesquisa que avaliou o efeito da suplementação da PTN sobre o *s*-CTX em população específica de mulheres na pós-menopausa que permite a comparação com os resultados deste estudo.

Na literatura existem muitos dados sobre os efeitos da suplementação da PSL na massa muscular [10,11,12], entretanto poucos estudos avaliam o impacto da suplementação proteica sobre a massa óssea em mulheres na pós-menopausa [8,22,24]. A proteína dietética e seus aminoácidos servem como componentes funcionais para a estrutura corporal total, regulação e locomoção. Estruturalmente, as proteínas representam 20 a 25% da massa óssea total das quais, as fibras de colágeno tipo 1 constituem a maioria [3]. A ingestão de proteína abaixo das recomendações nutricionais de 0,8g/kg/dia, diminui a massa óssea e aumenta o risco de osteoporose, particularmente em populações mais velhas [34,35]. Alguns estudos epidemiológicos com idosos de ambos os sexos mostraram que consumo habitual de proteína

relativamente alto estava associado à redução da perda de massa óssea [36,37] e redução do risco de fratura [38].

Estudos *in vivo* demonstraram que a PSL, especialmente sua fração proteica básica, podem promover a formação óssea e/ou inibir a reabsorção óssea resultando em aumento da massa óssea em animais [23,39,40,41], entretanto, os resultados em ensaios clínicos apresentaram resultados variáveis sobre a massa óssea. Aoe e cols (2005) avaliaram a suplementação da proteína do leite (40 mg por dia) sobre o metabolismo ósseo em 27 mulheres na pós-menopausa, 50 anos de idade em média, comparado ao placebo durante 6 meses. A taxa média de ganho de DMO lombar no grupo suplementado (1,21%) foi significativamente maior do que no grupo placebo (0,66%). Quando comparado ao grupo placebo, o NTX diminuiu no grupo de proteína do leite aos 6 meses, mas não houve diferença na osteocalcina sérica entre os dois grupos. Estes resultados sugerem que a suplementação de proteína do leite foi eficaz na prevenção da perda óssea, em mulheres na menopausa, e que esta melhora na DMO pode ser primariamente mediada pela inibição da reabsorção óssea [22].

Por outro lado, em mulheres na pós-menopausa, Zhu e cols (2011) realizaram estudo de dois anos de intervenção em 196 mulheres com idades entre 70 e 80 anos, randomizadas para uma bebida rica em proteínas contendo 30 g de PSL, ou uma bebida placebo, contendo 2,1 g de proteína, ambas forneceram 600 mg de cálcio. O consumo médio inicial de proteínas foi de 1,1 g/kg de peso corporal por dia. Houve redução significativa na DMO lombar ao longo de dois anos sem diferenças entre os grupos. A DMO de colo femoral permaneceu inalterada em ambos os grupos ao longo do tempo. Os autores concluíram que em mulheres saudáveis, a suplementação de 30 g de proteína do leite não apresentou efeitos benéficos ou deletérios sobre a massa

óssea [8].

Kerstetter e cols (2015) investigaram o impacto de dieta proteica sobre a DMO em 208 idosos (70 anos em média) randomizados a suplementação com PSL de 45 g ou grupo controle com maltodextrina isocalórica em uma dieta habitual por 18 meses. O consumo inicial de proteína referido foi entre 0,6 e 1,0 g/kg. Ao final da intervenção não houve diferença entre os grupos quanto às alterações na DMO. Foi observado aumento significativo nos valores de PINP e *s*-CTX apenas no grupo PSL. A massa magra troncular foi maior no grupo PSL aos 18 meses. Os autores concluíram que a suplementação PSL em homens e mulheres idosos com ingestão adequada de proteína dietética pode preservar a massa livre de gordura sem afetar negativamente a saúde esquelética ou a função renal em idosos saudáveis [24].

O treinamento resistido e a ingestão proteica são estratégias não farmacológicas que podem reverter ou atenuar os efeitos do envelhecimento no sistema musculoesquelético [42,43]. A PSL ou WP é um suplemento utilizado como fonte de proteína de alta qualidade, rica em aminoácidos essenciais, que estimulam a síntese de proteína muscular pós-exercício, aumentando a força e a massa muscular durante os regimes de treinamento resistido [10,11,12]. Recentes pesquisas que avaliaram o efeito da suplementação da PSL sobre a massa muscular em mulheres na pós-menopausa encontraram resultados conflitantes. Alguns estudos observaram efeito positivo adicional na resposta muscular quando associado a suplementação com a PSL concomitante ao exercício resistido [44,45]. Por outro lado, outros estudos não observaram efeitos desta suplementação sobre o ganho de massa muscular em mulheres na pós-menopausa [46,47]. Esses resultados estão em concordância com o presente estudo que não observou variações na massa muscular nas mulheres com ou

sem suplementação, submetidas protocolo de exercícios físicos. Contudo, a avaliação do IMM nas participantes do estudo demonstrou bom estado de massa muscular para cujos valores médios estavam acima do recomendando para esta população [27].

A intensidade de treinamento físico é crucial para remodelação óssea, pois quando esta é de moderada a elevada há maior alteração das concentrações dos marcadores de formação óssea, em detrimento aos de reabsorção [13]. Na presente pesquisa, o protocolo de exercício físico direcionado as mulheres na pós-menopausa foi de intensidade moderada a alta para a diminuição do *s*-CTX. A contração muscular exercida associada à força do treinamento poderia resultar em maiores estímulos para redução na reabsorção óssea, reduzindo os valores deste marcador, após a prática de exercício físico [18,20]. Gombos e cols (2016) avaliando mulheres na pós-menopausa sobrepeso submetidas a treinamentos físicos, observaram redução significativa do CTX com exercício resistido de intensidade moderada [18].

Nesta pesquisa, em resposta a suplementação, no momento final houve aumento do consumo médio de proteína no grupo PSL de 122g (21% do valor energético total de consumo) quando comparado ao grupo controle de 80g (16.2% do valor energético total consumido). Mesmo com a elevação, o macronutriente encontrava-se dentro da faixa percentual de recomendação para a população saudável (10-35%) [48]. O consumo proteico possui efeito na promoção da saúde muscular, principalmente quando combinada aos exercícios físicos resistidos [49], com aumento da massa muscular e da força [12]. A PSL, fornecida diariamente, é considerada de boa qualidade, além de possuir aminoácidos essenciais para a síntese proteica muscular [10], especialmente a leucina [50].

Em relação à ingestão proteica, existem alguns detalhes que parece ser

importante como a quantidade total diária, a qualidade e o momento da ingestão no protocolo de exercício físico [51,52,53]. Nesse estudo é possível que com maior tempo da suplementação da PSL poderíamos ter resposta sobre o ganho de massa muscular, que pode ser observado com maior tempo de intervenção [54]. Recente estudo comprovou que protocolos de treinamento podem aumentar a força e a massa muscular em mulheres na pós-menopausas, independentemente da suplementação proteica [46].

As mulheres do presente estudo apresentaram aumento no consumo calórico principalmente, por maior ingestão de carboidratos e gorduras, em ambos os grupos. Todas as participantes foram orientadas a manter a dieta habitual sem interferências dietéticas durante o seguimento. A Sociedade Norte Americana de Menopausa recomenda a redução do consumo calórico e de gorduras e estimula o consumo de frutas e vegetais, além da prática regular de exercício físico [55].

A DRI (*Dietary Reference Intakes*) preconiza princípios e diretrizes para o consumo alimentar e dispõe de quantidades adequadas de nutrientes para a população em geral [48,56]. Diferentemente dos carboidratos, os lipídios não possuem recomendações de valores em gramas ao dia e a recomendação dá-se pelo percentual do consumo diário (20-35%) em relação ao valor energético total [48]. As mulheres do presente estudo apresentaram consumo dentro do recomendado, mesmo elevando seu consumo no momento final. Além do controle do consumo de gorduras, a importância está nas escolhas do tipo de gordura consumir, pois o consumo de gorduras insaturadas relaciona-se como efeito protetor ao risco cardiovascular e na mortalidade por todas as causas [57,58], porém não houve diferença significativa na interação estatística entre grupos e momentos.

Apesar das mulheres do presente estudo tivessem aumento do consumo calórico e dos macronutrientes, não foi observado ganho de peso e alterações antropométricas no decorrer do estudo, provavelmente devido ao protocolo de treinamento. Portanto, aumento do consumo energético e o treinamento contínuo foram suficientes para manter as variáveis da composição corporal, embora não o foi suficiente para a mudança da composição corporal. Mesmo que cuidados devem ser tomados com o excesso do consumo de carboidratos, pois possui associação com o aumento do risco de mortalidade por todas as causas [57,59]

O presente estudo possui algumas limitações. O tempo de avaliação foi de 20 semanas e o controle da ingestão da suplementação foi pelo relato das participantes. Foi avaliado apenas um marcador reabsorção óssea. O ponto forte do nosso estudo inclui o delineamento controlado e randomizado em uma população de mulheres na pós-menopausa.

Em conclusão, em mulheres na pós-menopausa praticantes de exercício físico, a associação da suplementação de PSL não apresentou efeito na reabsorção óssea no protocolo de 20 semanas, diferentemente do grupo controle.

## Referências

1. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Developed by the National Osteoporosis Foundation (NOF). *Osteoporos Int.* 2014;25:2359–81.
2. NAMS- Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause.* 2010;17:25-54.
3. Burn DB, Allen MR. Basic and applied bone biology. 1st ed. San Diego (CA): Elsevier; 2013.
4. Barzel US, Massey LK. Excess dietary protein can adversely affect bone. *J Nutr.* 1998;128:1051–1053.
5. KerstetterJE, O'BrienKO, Caseria DM, Wall DE, InsognaKL. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:26–31.
6. Hunt JR, Johnson LK, Fariba Roughead ZK. Dietary protein and calcium interact to influence calcium retention: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1357–65.
7. Darling AL, Millward DJ, Torgerson DJ, Hewitt CE, Lanham- New New SA. Dietary protein and bone health: A systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:1674-92.
8. Zhu K, Meng X, Kerr DA, Devine A, Solah V, Binns CW, Prince RL. The Effects of a Two-Year Randomized, Controlled Trial of Whey Protein Supplementation on Bone Structure, IGF-1, and Urinary Calcium Excretion in older Postmenopausal Women. *J Bone Miner Res.* 2011;9:2298-306.

9. Cuenca-Sánchez M, Navas-Carrillo D, Orenes-Piñero E. controversies surrounding high-protein diet intake: satiating effect and kidney and bone health. *Adv Nutr.* 2015;6:260-6.
10. Devries MC, Phillips SM. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J Food Sci.* 2015;80 Suppl 1:A8-15. doi: 10.1111/1750-3841.12802
11. Davies RW, Carson BP, Jakeman PM. The Effect of Whey Protein Supplementation on the Temporal Recovery of Muscle Function Following Resistance Training: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2018;16;2:E221.
12. Morton RW, Murphy KT, McKellar SR, Schoenfeld BJ, Henselmans M, Helms E, et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med.* 2018;52:376-84. doi: 10.1136/bjsports-2017-097608.
13. Maïmoun L, Sultan C. Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism.* 2011;60:373-88. doi: 10.1016/j.metabol.2010.03.001.
14. Chahal J, Lee R, Luo J. Loading dose of physical activity is related to muscle strength and bone density in middle-aged women. *Bone.* 2014;67:41-5. doi: 10.1016/j.bone.2014.06.029.
15. Orsatti FL, Maesta N, de Oliveira EP, Nahas Neto J, Burini RC, Nunes PRP, et al. Adding soy protein to milk enhances the effect of resistance training on muscle strength in postmenopausal women. *J Diet Suppl.* 2018;15:140-52.

16. Guyton AC, Hall JI. Tratado de fisiologia médica. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
17. Tagliaferri C, Wittrant Y, Davicco MJ, Walrand S, Coxam V. Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Res Rev.* 2015;21:55-70. doi: 10.1016/j.arr.2015.03.002.
18. Gombos GC, Bajsz V, Pék E, Schmidt B, Sió E, Molics B, et al. Direct effects of physical training on markers of bone metabolism and serum sclerostin concentrations in older adults with low bone mass. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17:254. doi: 10.1186/s12891-016-1109-5.
19. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011;22:391-420. doi: 10.1007/s00198-010-1501-1.
20. Silva CFF, Amorim PRS, Carvalho CJ, Assis CL, Lima LM. Densitometria óssea, ctx, nível de atividade física e força na pós-menopausa. *Rev Bras Med Esporte.* 2016;22:206-10.
21. Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, van Loon LJ, Walrand S, Kanis JA, et al. The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: a consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Maturitas.* 2014b;79:122-32. doi: 10.1016/j.maturitas.2014.07.005.

22. Aoe S, Koyama T, Toba Y, Itabashi A, Takada Y. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. *Osteoporos Int.* 2005;16:2123-8.
23. Kim J, Kim HK, Kim S, Imm JY, Whang KY. Whey Protein Concentrate Hydrolysate Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *J Med Food.* 2015;18:1349-56. doi: 10.1089/jmf.2015.3441.
24. Kerstetter JE, Bihuniak JD, Brindisi J, Sullivan RR, et al. The Effect of a Whey Protein Supplement on Bone Mass in Older Caucasian Adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;6:2214-22. doi: 10.1210/jc.2014-3792.
25. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50:889-96.
26. Harris JA, Benedict FG. A biometric study of human basal metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1918;4:370-3.
27. Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH, Roubenoff R. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol.* 2004;159:413-21.
28. Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53:617-24.
29. Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ, Kretsch MJ. The USDA Automated Multiple-Pass Method Accurately Estimates Group Total Energy and Nutrient Intake. *J Nutr.* 2006;136:2594-9.

30. USDA. Food composition databases. United States Department of Agriculture. 2006.
31. USDA. Food composition databases. United States Department of Agriculture. 2007.
32. Glover SJ, Gall M, Schoenborn-Kellenberger O, Wagener M, Garner P, Boonen S, Cauley JA, Black DM, Delmas PD, Eastell R. Establishing a reference interval for bone turnover markers in 637 healthy, young, premenopausal women from the United Kingdom, France, Belgium, and the United States. *J Bone Miner Res.* 2009;24:389–97.
33. Funck-Brentano T, Biver E, Chopin F, Bouvard B, Coiffier G, Souberbielle JC, Garner P, Roux C. Clinical utility of serum bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis therapy monitoring: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2011;2:157-69.
34. Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003;133:855S–61S.
35. Wright CS, McMorrow AM, Weinheimer-Haus EM, Campbell WW. Whey protein supplementation and higher total protein intake do not influence bone quantity in overweight and obese adults following a 36-week exercise and diet intervention. *J Nutr.* 2017;2:179-86. doi: 10.3945/jn.116.240473.
36. Promislow JHE, Goodman-Gruen D, Slymen DJ, Barrett-Connor E. Protein consumption and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiol.* 2002;155:636–44.

37. Devine A, Dick IM, Islam AF, Dhaliwal SS, Prince RL. Protein consumption is an important predictor of lower limb bone mass in elderly women. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:1423–28.
38. Wengreen HJ, Munger RG, Cutler DR, Corcoran CD, Zhang J, Sassano NE. Dietary protein intake and risk of osteoporotic hip fracture in elderly residents of Utah. *J Bone Miner Res.* 2004;19:537–45.
39. Fried A, Manske SL, Eller LK, Lorincz C, Reimer RA, Zernicke RF. Skim milk powder enhances trabecular bone architecture compared with casein or whey in diet-induced obese rats. *Nutrition* 2012;3:331-5.
40. Nebot E, Erben RG, Porres JM, Femia P, Camiletti-Moirón D, Aranda P, López-Jurado M, Aparicio VA. Effects of the amount and source of dietary protein on bone status in rats. *Food Funct.* 2014;4:716-23.
41. Ono-Ohmachi A, Ishida Y, Morita Y, Kato K, Y Nara T. Milk Basic Protein Facilitates Increased Bone Mass in Growing Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2017;5:315-22.
42. 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;96:1454-64.
43. Lixandrao ME, Damas F, Chacon-Mikahil MP, Cavaglieri CR, Ugrinowitsch C, Bottaro M, et al. Time course of resistance training-induced muscle hypertrophy in the elderly. *J Strength Condit Res* 2016;30:159-63.
44. Mori H, Tokuda Y. Effect of whey protein supplementation after resistance exercise on the muscle mass and physical function of healthy older women: A randomized controlled trial. *Geriatr Gerontol Int.* 2018;9:1398-1404.

45. Nabuco HCG, Tomeleri CM, Sugihara Junior P, Fernandes RR, Cavalcante EF, Venturini D, Barbosa DS, Silva AM, Sardinha LB, Cyrino ES. Effects of Whey Protein Supplementation Pre- or Post-Resistance Training on Muscle Mass, Muscular Strength, and Functional Capacity in Pre-Conditioned Older Women: A Randomized Clinical Trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018;29. pii: S0939-4753(18)30335-1.
46. Weisgarber KD, Candow DG, Farthing JP. Whey protein and high-volume resistance training in postmenopausal women. *J Nutr Health Aging.* 2015;5:511-7.
47. Zhu K, Kerr DA, Meng X, Devine A, Solah V, Binns CW, Prince RL. Two-Year Whey Protein Supplementation Did Not Enhance Muscle Mass and Physical Function in Well-Nourished Healthy Older Postmenopausal Women. *J Nutr.* 2015;11:2520-6.
48. US. Institute of Medicine (IoM). DRI – Dietary Reference Intakes Macronutrients (e.g., protein, fat and carbohydrates). Washington: The National Academic Press; 2005.
49. Hector AJ, Phillips SM. Protein recommendations for weight loss in elite athletes: a focus on body composition and performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2018;28:170-7.
50. Mitchell WK, Wilkinson DJ, Phillips BE, Lund JN, Smith K, Atherton PJ. Human skeletal muscle protein metabolism responses to amino acid nutrition. *Adv Nutr.* 2016;7:828S-38S. doi: 10.3945/an.115.011650.
51. Phillips SM, Chevalier S, Leidy HJ. Protein "requirements" beyond the rda: implications for optimizing health. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016;41:565e72.

52. Phillips SM. The impact of protein quality on the promotion of resistance exercise-induced changes in muscle mass. *Nutr Metab (Lond)* 2016;13:64.
53. de Branco FMS, Carneiro MAS, Rossato LT., Nahas PC., Teixeira KRC., de Oliveira GN, Orsatti FL, de Oliveira EP. Protein timing has no effect on lean mass, strength and functional capacity gains induced by resistance exercise in postmenopausal women: a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*. 2019.
54. Stojkovic V, Simpson CA, Sullivan RR, Cusano AM, Kerstetter JE, Kenny AM, et al. The Effect of dietary glycemic properties on markers of inflammation, insulin resistance, and body composition in postmenopausal american women: an ancillary study from a multicenter protein supplementation trial. *Nutrients*. 2017;9:E484. doi: 10.3390/nu9050484.
55. NAMS - The 2017 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2018;11:1362-87.
56. US. Institute of Medicine (IoM). DRI – Dietary Reference Intakes for calcium and vitamin D. Washington: The National Academic Press; 2011.
57. Dehghan M, Mentz A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V, et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*. 2017;390 (10107):2050-62. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32252-3.
58. Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM, et al. Dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;136:e1-e23. doi: 10.1161/CIR.0000000000000510.

59. Seidelmann SB, Claggett B, Cheng S, Henglin M, Shah A, Steffen LM, et al. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *Lancet Public Health*. 2018;3:e419-28. doi: 10.1016/S2468-2667(18)30135-X.

## **5. CONCLUSÃO**

Em protocolo de 20 semanas de exercício físico, em mulheres na pós-menopausa, a suplementação com proteína do soro do leite não apresentou repercussão sobre a reabsorção óssea, quando comparado ao grupo controle.

## REFERÊNCIAS

Aoe S, Koyama T, Toba Y, Itabashi A, Takada Y. A controlled trial of the effect of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy menopausal women. *Osteoporos Int.* 2005;16:2123-8.

Aremellini F, Zamboni M, Harris T, Micciolo R, Bosello O. Sagittal diameter minus subcutaneous thickness An easy to obtain parameter that improves visceral fat prediction. *Obes Res.* 1997;5:315-20.

Barzel US, Massey LK. Excess dietary protein can adversely affect bone. *J Nutr.* 1998;128:1051–53.

Bieglmayer C, Kudlacek S. The bone marker plot: an innovative method to assess bone turnover in women. *Eur J Clin Invest.* 2009;39:230-8.

Blanton CA, Moshfegh AJ, Baer DJ, Kretsch MJ. The USDA Automated Multiple-Pass Method Accurately Estimates Group Total Energy and Nutrient Intake. *J Nutr.* 2006;136:2594-9.

Brown S, Rosen CJ. Osteoporosis. *Med Clin North Am.* 2003;87:1039–63.

Burn DB, Allen MR. Basic and applied bone biology. 1st ed. San Diego (CA): Elsevier; 2013.

Burns L, Ashwell M, Berry J, Bolton-Smith C, Cassidy A, Dunnigan M, et al. US Food Standard Agency Optimal Nutrition Status Workshop: environmental factor that affect bone health throughout life. *Br J Nutr.* 2003;89:835-40.

Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Developed by the National Osteoporosis Foundation (NOF). *Osteoporos Int.* 2014;25:2359-81.

Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Developed by the

National Osteoporosis Foundation (NOF). *Osteoporos Int.* 2014;25:2359-81.

Cuenca-Sánchez M, Navas-Carrillo D, Orenes-Piñero E. controversies surrounding high-protein diet intake: satiating effect and kidney and bone health. *Adv Nutr.* 2015;6:260-6.

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet.* 2002;359:1761-7.

Darling AL, Millward DJ, Torgerson DJ, Hewitt CE, Lanham-New SA. Dietary protein and bone health: A systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:1674-92.

Davies RW, Carson BP, Jakeman PM. The Effect of Whey Protein Supplementation on the Temporal Recovery of Muscle Function Following Resistance Training: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2018;16;2:E221.

Delmas P, Munoz F, Black D, Cosman F, Boonen S, Watts NB, et al. Effects of yearly zoledronic acid 5 mg on bone turnover markers and relation of PINP with fracture reduction in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1544-51.

Devries MC, Phillips SM. Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J Food Sci.* 2015;80 Suppl 1:A8-15. doi: 10.1111/1750-3841.12802

Di Monaco M, Vallero F, Di Monaco R, Tappero R. Prevalence of sarcopenia and its association with osteoporosis in 313 older women following a hip fracture. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010;52:71-4.

Douglas TEL, Vandrovcová M, Kročilová N, Keppler JK, Zárubová J, Skirtach AG, Bačáková L. Application of whey protein isolate in bone regeneration: Effects on growth and osteogenic differentiation of bone-forming cells. *J Dairy Sci.* 2018;1:28-36.

Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53:617-24.

Fried A, Manske SL, Eller LK, Lorincz C, Reimer RA, Zernicke RF. Skim milk powder enhances trabecular bone architecture compared with casein or whey in diet-induced obese rats. *Nutrition* 2012;3:331-5

Fritz MA, Speroff L. Menopausa e transição perimenopausica. In: *Endocrinologia ginecológica clinica e infertilidade.* Oitava ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2015;Cap17;689-768.

Funck-Brentano T, Biver E, Chopin F, Bouvard B, Coiffier G, Souberbielle JC, Garnero P, Roux C. Clinical utility of serum bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis therapy monitoring: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2011;2:157-69.

Gallagher D, Ruts E, Visser M, Heshka S, Baumgartner RN, Wang J, et al. Weight stability masks sarcopenia in elderly men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:366-75.

Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, et al. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1531-8.

Genaro PS, Pereira GA, Pinheiro MM, Szejnfeld VL, Martini LA. Influence of body composition on bone mass in postmenopausal osteoporotic women. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010;51:295-8

Gentil P, Lima RM, Jaco de Oliveira R, Pereira RW, Reis VM. Association between femoral neck bone mineral density and lower limb fat-free mass in postmenopausal women. *J Clin Densitom.* 2007;10:174-8.

Giaglia LR, Martin RM, Silva RAL. Terapia nutricional em doenças ósseas. alimentação, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Rocca; 2007. p. 813-28.

Glover SJ, Gall M, Schoenborn-Kellenberger O, Wagener M, Garner P, Boonen S, Cauley JA, Black DM, Delmas PD, Eastell R. Establishing a reference interval for bone turnover markers in 637 healthy, young, premenopausal women from the United Kingdom, France, Belgium, and the United States. *J Bone Miner Res* 2009;24:389–397.

Greendale GA, Sowers M, Han W, Huang MH, Finkelstein JS, Crandall CJ, et al. Bone mineral density loss in relation to the final menstrual period in a multiethnic cohort: results from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *J Bone Miner Res*. 2012;27:111-8.

Greenspan SL, Rosen HN, Parker RA. Early changes in serum N-telopeptide and C-telopeptide cross-linked collagen type 1 predict long-term response to alendronate therapy in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3537-40.

Guyton AC, Hall JI. *Tratado de fisiología médica*. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Häkkinen A, Hannonen P, Nyman K, Lyyski T, Häkkinen K. Effects of concurrent strength and endurance training in women with early or longstanding rheumatoid arthritis: comparison with healthy subjects. *Arthritis Rheum*. 2003;49:789-97.

Häkkinen A, Pakarinen A, Hannonen P, Kautiainen H, Nyman K, Kraemer WJ, et al. Effects of prolonged combined strength and endurance training on physical fitness, body composition and serum hormones in women with rheumatoid arthritis and in healthy controls. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23:505-12.

Harris JA, Benedict FG. A biometric study of human basal metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1918;4:370-3.

Haub MD, Wells AM, Tarnopolsky MA, Campbell WW. Effect of protein source in resistive-training-induced changes in body composition and muscle size in older men. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:511-7.

Hunt JR, Johnson LK, Fariba Roughead ZK. Dietary protein and calcium interact to

influence calcium retention: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1357–65.

IBGE - Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2017. Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9126-tabuas-completas-de-mortalidade>

Ivaska KK, Lenora J, Gerdhem P, Akesson K, Väänänen HK, Obrant KJ. Serial assessment of serum bone metabolism markers identifies women with highest rate of bone loss and osteoporosis risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2622-32.

Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50:889-96.

Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH, Roubenoff R. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol.* 2004;159:413-21.

Jelliffe DB. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1968.

Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, et al. Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 2005;16:581-9.

Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 1994;4:368-81.

Karasik D, Kiel DP. Evidence for pleiotropic factors in genetics of the musculoskeletal system. *Bone.* 2010;46:1226-37.

Kelly KS, Kohrt WM. Exercise and bone mineral density in premenopausal women: a meta-analysis of randomized controlled trial. *J Endocrinol.* 2013;74:1639. doi: 10.1155/2013/741639.

Kerstetter JE, OBrien KO, Insogna KL. Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* 2003;133:855S–61S.

KerstetterJE, O'BrienKO, Caseria DM,Wall DE, InsognaKL. The impact of dietary protein on calcium absorption and kinetic measures of bone turnover in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:26–31.

Kim J, Kim HK, Kim S, Imm JY, Whang KY. Whey Protein Concentrate Hydrolysate Prevents Bone Loss in Ovariectomized Rats. *J Med Food.* 2015;18:1349-56. doi: 10.1089/jmf.2015.3441.

Lemmey AB, Marcora SM, Chester K, Wilson S, Casanova F, Maddison PJ. Effects of high-intensity resistance training in patients with rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1726-34.

Liang MTB, Bassin SL, Dutto D, Pontello A, Wong ND, Spalding TW, et al. Effects of high-impact aerobics and strength training on BMD in young women aged 20-35 years. *Int J Sports Med.* 2011;32:100-8.

Lupsa BC, Insogna K. Bone health and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2015;44:517-30.

Maeda SS, Lazaretti-Castro M. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58:162-71.

Maesta M, Nahas EAP, Nahas-Neto J, Orsatti FL, Fernandes CE, Traiman P, et al. Effects of soy protein and resistance exercise on body composition and blood lipids in postmenopausal women. *Maturitas.* 2007;56:350-8.

Maïmoun L, Sultan C. Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism.* 2011;60:373-88. doi: 10.1016/j.metabol.2010.03.001.

Marcora SM, Lemmey AB, Maddison PJ. Can progressive resistance training reverse cachexia in patients with rheumatoid arthritis? Results of a pilot study. *J Rheumatol.* 2005;32:1031-9.

Migliaccio S, Falcone S, Spera G. Bone modeling and remodeling: from biology to clinical application. *Aging Clin Exp Res* 2004;16(Suppl):20–2.

Migliaccio S, Fornari R, Greco EA, Di Luigi L, Lenzi A. New therapeutical horizons in the management of postmenopausal osteoporosis. *Aging Clin Exper Res* 2013;25 Suppl 1:S117-9.

Migliaccio S, Greco EA, Fornari R, Donini LM, Lenzi A. Is obesity in women protective against osteoporosis? *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2011;4:273-82.

Moore DR, Churchward-Venne TA, Witard O, Breen L, Burd NA, Tipton KD, et al. Protein ingestion to stimulate myofibrillar protein synthesis requires greater relative protein intakes in healthyolder versus younger men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70:57-62.

Mori H, Tokuda Y. Effect of whey protein supplementation after resistance exercise on the muscle mass and physical function of healthy older women: A randomized controlled trial. *Geriatr Gerontol Int*. 2018 Sep;9:1398-1404.

Morton RW, Murphy KT, McKellar SR, Schoenfeld BJ, Henselmans M, Helms E, et al. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the effect of protein supplementation on resistance training-induced gains in muscle mass and strength in healthy adults. *Br J Sports Med*. 2018;52:376-84. doi: 10.1136/bjsports-2017-097608.

Nabuco HCG, Tomeleri CM, Sugihara Junior P, Fernandes RR, Cavalcante EF, Venturini D, Barbosa DS, Silva AM, Sardinha LB, Cyrino ES. Effects of Whey Protein Supplementation Pre- or Post-Resistance Training on Muscle Mass, Muscular Strength, and Functional Capacity in Pre-Conditioned Older Women: A Randomized Clinical Trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;29:S0939-4753(18)30335-1.

NAMS- Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2010;17:25-54.

Nebot E, Erben RG, Porres JM, Femia P, Camiletti-Moirón D, Aranda P, López-

Jurado M, Aparicio VA. Effects of the amount and source of dietary protein on bone status in rats. *Food Funct.* 2014;4:716-23.

OMS - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization; 2000. p. 256. (WHO Obesity Technical Report Series; n. 284).

OMS - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization; 2000. p. 256. (WHO Obesity Technical Report Series; n. 284).

Ono-Ohmachi A, Ishida Y, Morita Y, Kato K, Y Nara T. Milk Basic Protein Facilitates Increased Bone Mass in Growing Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2017;5:315-322.

Organización Panamericana de la Salud. División de Promoción y Protección de la Salud (HPP). Encuesta Multicentrica salud bienestar y envejecimiento (SABE) em América Latina el Caribe: Informe Preliminar [Internet]. In: XXXVI Reunión del Comité asesor de investigaciones em Salud; 9-11 jun 2001; Kingston, Jamaica: OPAS, 2002.

Orsatti FL, Maesta N, de Oliveira EP, Nahas Neto J, Burini RC, Nunes PRP, et al. Adding soy protein to milk enhances the effect of resistance training on muscle strength in postmenopausal women. *J Diet Suppl.* 2018;15:140-52.

Orsatti FL, Nahas EA, Nahas-Neto J, Maesta N, Orsatti CL, Fernandes CE. Effects of resistance training and soy isoflavone on body composition in postmenopausal women. *Obstet Gynecol Int.* 2010. doi:10.1155/2010/156037.

Orsatti FL, Nahas EA, Nahas-Neto J, Orsatti CL, Marocolo M, Barbosa-Neto O, et al. Low appendicular muscle mass is correlated with femoral neck bone mineral density loss in postmenopausal women. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:225. doi: 10.1186/1471-2474-12-225.

Orsatti FL, Nahas EA, Orsatti CL, de Oliveira EP, Nahas-Neto J, da Mota GR, et al. Muscle mass gain after resistance training is inversely correlated with trunk adiposity gain in postmenopausal women. *J Strength Cond Res.* 2012;26:2130-9.

Phillips SM, Tang JE, Moore DR. The role of milk- and soybased protein in support of muscle protein synthesis and muscle protein accretion in young and elderly persons. *J Am Coll Nutr.* 2009;28:343-54.

Pisciottano MV, Pinto SS, Szejnfeld VL, Castro CH. The Relationship between Lean Mass, Muscle Strength and Physical Ability in Independent Healthy Elderly Women from the Community. *J Nutr Health Aging.* 2014;18(5):554-8.

Pisciottano MV, Pinto SS, Szejnfeld VL, Castro CH. The Relationship between lean mass, muscle strength and physical ability in independent healthy elderly women from the community. *J Nutr Health Aging.* 2014;18:554-8.

Reginster JY, Collette J, Neuprez A, Zegels B, Deroisy R, Bruyere O. Role of biochemical markers of bone turnover as prognostic indicator of successful osteoporosis therapy. *Bone.* 2008;42:832–6.

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type 1 e type 2 osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998;13:763-73.

Riis BJ. The role of bone turnover in the pathophysiology of osteoporosis. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103:9-15.

Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, van Loon LJC, Walrand S, Kanis JA, et al. The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in portmenopausal women: A consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Maturitas.* 2014b;79:122-32.

Rizzoli R. Nutritional aspects of bone health. *Best Pract Res Clin Endocrinol*

Metab. 2014a;28:795-808. doi: 10.1016/j.beem.2014.08.003.

Roughead ZK, Johnson LK, Lykken GI, Hunt JR. Controlled high meat diets do not affect calcium retention or indices of bone status in healthy postmenopausal women. *J Nutr.* 2003;133:1020–26.

Saraiva GL, Larazetti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica *Arq Bras Endocrinol Metabologia.* 2002;46:72-8.

Schousboe JT, Bauer DC, Nyman JA, Kane RL, Melton LJ, Ensrud KE. Potential for bone turnover markers to cost-effectively identify and select post-menopausal osteopenic women at high risk of fracture for bisphosphonate therapy. *Osteoporos Int.* 2007;18:201-10.

Sharif S, Thomas JM, Donley DA, Gilleland DL, Bonner DE, McCrory JL, et al. Resistance exercise reduces skeletal muscle cachexia and improves muscle function in rheumatoid arthritis. *Case Rep Med.* 2011:ID 205691.

Sievanen H. Hormonal influences on the muscle-bone feedback system: a perspective. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5:255-61.

Silva CFF, Amorim PRS, Carvalho CJ, Assis CL, Lima LM. Densitometria óssea, ctx, nível de atividade física e força na pós-menopausa. *Rev Bras Med Esporte.* 2016;22:206-10.

Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. *JAMA* 2001;22:2815-22.

Sirola J, Rikkinen T (2005) Muscle performance after the menopause. *J Br Menopause Soc* 11:45–50

Sözen T, Özişik L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4:46-56.

Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Veldhuijzen van Zanten JJ, Nightingale P, Kitas GD, Koutedakis Y. Individualised aerobic and resistance exercise training improves cardiorespiratory fitness and reduces cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1819-25.

Strasser B, Leeb G, Strehblow C, Schobersberger W, Haber P, Cauza E. The effects of strength and endurance training in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2011;30:623-32.

Tagliaferri C, Wittrant Y, Davicco MJ, Walrand S, Coxam V. Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Res Rev.* 2015;21:55-70. doi: 10.1016/j.arr.2015.03.002.

Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:226-31.

US. Institute of Medicine (IoM). DRI – Dietary Reference Intakes Macronutrients (e.g., protein, fat and carbohydrates). Washington: The National Academic Press; 2005.

USDA. Food composition databases. United States Department of Agriculture. 2006.

USDA. Food composition databases. United States Department of Agriculture. 2007.

Vargas DM, Audi L, Carrascosa A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores

bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev Ass Med Brasil* 1997;4:367-70.

Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garner P, Griesmacher A, et al. IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011;22:391-420. doi: 10.1007/s00198-010-1501-1.

Weisgarber KD, Candow DG, Farthing JP. Whey protein and high-

volume resistance training in postmenopausal women. *J Nutr Health Aging.* 2015;:511-7.

Wright CS, McMorrow AM, Weinheimer-Haus EM, Campbell WW. Whey protein supplementation and higher total protein intake do not influence bone quantity in overweight and obese adults following a 36-week exercise and diet intervention. *J Nutr.* 2017;147(2):179-186. doi: 10.3945/jn.116.240473.

Yang Y, Breen L, Burd NA, Hector AJ, Churchward-Venne TA, Josse AR, et al. Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intake of whey protein in older men. *Br J Nutr.* 2012;108:1780-8.

Zhu K, Kerr DA, Meng X, Devine A, Solah V, Binns CW, Prince RL. Two-Year Whey Protein Supplementation Did Not Enhance Muscle Mass and Physical Function in Well-Nourished Healthy Older Postmenopausal Women. *J Nutr* 2015;11:2520-6.

Zhu K, Meng X, Kerr DA, Devine A, Solah V, Binns CW, Prince RL. The Effects of a Two-Year Randomized, Controlled Trial of Whey Protein Supplementation on Bone Structure, IGF-1, and Urinary Calcium Excretion in older Postmenopausal Women. *J Bone Miner Res.* 2011;9:2298-306.

## **ANEXOS**

### **Anexo I**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)**

A Sra está sendo convidada a participar de uma pesquisa chamada “Efeito da Suplementação da Proteína do Soro do Leite na Saúde Óssea de Mulheres na Menopausa em Programa de Modificação do Estilo de Vida com Exercícios Físicos e Adequação Alimentar”, que pretende estudar o efeito da suplementação de uma proteína, conhecida como proteína do soro do leite, com ou sem exercícios físicos de musculação na melhora da saúde do osso.

A Sra. foi selecionada a participar dessa pesquisa por ser mulher com idade maior que 45 anos, há mais de 1 ano sem menstruar, por frequentar o programa de mudança do estilo de vida (Mexa-se Pró saúde) e pela disponibilidade em participar da pesquisa. Haverá 3 grupos na pesquisa: prática da musculação com a tomada de um suplemento de proteína (grupo A) ou a prática da musculação sem a tomada do suplemento de proteína (grupo B) ou a tomada da proteína sem a prática da musculação (grupo C). A musculação será realizada 3 vezes na semana e nos 3 grupos terá adequação do consumo de alimentos que será proposto por nutricionista.

Após a concordância deste Termo, a senhora participará de um sorteio para saber em qual grupo será incluída. Após definido o grupo a senhora será acompanhada por 20 semanas e serão realizadas 3 avaliações neste período: a primeira avaliação será no começo da pesquisa (M0), a segunda avaliação será feita depois de 10 semanas (M1) e a última avaliação será realizada após 20 semanas do início (M2).

A pesquisa consta de 3 avaliações (M0, M1 e M2) quanto ao consumo alimentar pelo registro de 3 dias (onde a senhora anotará o que comerá e beberá por 3 dias), a composição corporal (peso, altura, circunferências), a bioimpedância (aparelho que mede a quantidade e o percentual de gordura e músculo do corpo pela passagem de uma corrente elétrica muito leve e assintomática) e a coleta de pequena quantidade de sangue para avaliar os exames de sangue. O procedimento de retirada de sangue tem como possíveis complicações: dor, infecção, sangramento e hematoma. O procedimento tem por finalidade o acompanhamento para a comparação das

avaliações nos 3 momentos de avaliação.

O conhecimento dessas características permite avaliar qual melhor benefício para a saúde do osso e se as intervenções propostas podem retardar a perda óssea nas mulheres na menopausada, contribuindo para a ciência e para a sociedade, apresentando um novo modelo de pesquisa e melhorando a qualidade de vida e a saúde óssea dessas mulheres.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito em desistir, pois a participação da pesquisa é voluntária e isso não irá afetar em nada. A recusa não implicará em nenhum prejuízo a senhora e você poderá retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido total sigilo do seu nome, doenças, resultados das avaliações e dos exames em todos os momentos, em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por 5 anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608/1609.

### **CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA**

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Pesquisadora: LoraineGollino      Data:      \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

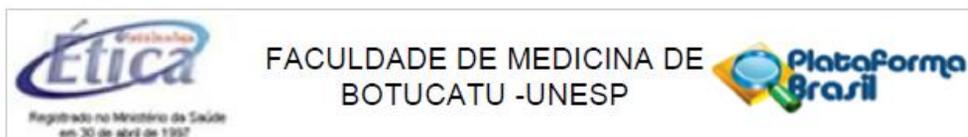
Assinatura: \_\_\_\_\_

Orientador: Roberto Carlos Burini, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Botucatu – SP, CEP 18.618-970. Fone: (14) 38801355. E-mail: [burini@fmb.unesp.br](mailto:burini@fmb.unesp.br).

Pesquisadora Loraine Gollino, Rua Vicente da Rocha Torres, 646, Vila São Lúcio. Cep: 18603-192 Fone: (16) 981104477 E-mail: [lo\\_gollino@hotmail.com](mailto:lo_gollino@hotmail.com)

## ANEXO II

### Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito da Suplementação da Proteína do Soro do Leite na Saúde Óssea de Mulheres na Pós-menopausa em Programa de Modificação do Estilo de Vida com Exercícios Físicos e Adequação Alimentar

**Pesquisador:** Loraine Gollino

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 50835015.7.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.375.145

##### Apresentação do Projeto:

Ver parecer substanciado de 07/12/2015, número 1.354.295.

##### Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer substanciado de 07/12/2015, número 1.354.295.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer substanciado de 07/12/2015, número 1.354.295.

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer substanciado de 07/12/2015, número 1.354.295.

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No parecer substanciado de 07/12/2015,, número 1.354.295, foi solicitado nova redação do TCLE com linguagem mais informal e explicativa - modificações realizadas

##### Recomendações:

##### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram acatadas, sugiro aprovação, sem necessidade de envio a CONEP.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.818-970

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1808

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 1.375.145

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião extraordinária do CEP de 18/12/2015, sem necessidade de envio à CONEP.

Lembramos que ao final da execução do projeto, é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades". Essa documentação deve ser enviada via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO"

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_602317.pdf	11/12/2015 10:23:45		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEnovoCorrigido.pdf	11/12/2015 10:22:02	Loraine Gollino	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutorado_LoraineGollino.pdf	07/11/2015 13:54:37	Loraine Gollino	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_ASSINADA.pdf	07/11/2015 13:51:19	Loraine Gollino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termos_de_Anuencia.pdf	05/11/2015 14:27:11	Loraine Gollino	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 18 de Dezembro de 2015

---

Assinado por:  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.818-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1808

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

## ANEXO III

### Laudo da suplementação da proteína do soro do leite



#### CETAL S/C LTDA. - Centro Tecnológico de Análise de Alimentos

Rua Versalúcio César, Rodoviária de Araraquã, n.º 210 - Vila Indus-trial - CEP 13700-010 - Araraquã, SP - Brasil  
Telefone: 55 (11) 4699-2001 - Fax: 55 (11) 4699-3804 - <http://www.cetal.com.br> - e-mail: [info@cetal.com.br](mailto:info@cetal.com.br)

www.cetal.com.br

#### RELATÓRIO DE ENSAIO 0013789.1

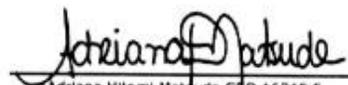
Solicitante: Supley Lab. de Alim. e Suplem. Nutric. Ltda. Orçamento: 4924,1  
Endereço: Via Augusto Bambozzi - 1890 Bairro: Setor Industrial Amostra: 015781/2015  
Município/UF: Matão / SP CEP: 15993-200  
Tel.: (16) 3384-9897 Fax: (16) 3384-9897  
Produto/Amostra: 100% Whey Chocolate - Marca: Max Titanium  
Lote: 01667701001 Fabricação: 02/06/2015  
Coleta: - Resp. Coleta: - Validade: 12/2016  
Recebimento: 22/06/2015 13:45:00 Início Ensaio: 25/06/2015 Fim do Ensaio: 30/06/2015 Remessa: 30/06/2015  
Obs.:

#### RESULTADOS FÍSICO QUÍMICOS

Ensaio	Resultado	Metodologia
Proteínas	59,13 g/100g	FQ-033 rev.06 - MAPA, Instrução Normativa nº68 12/12/2006. Método V-41. MAPA, Instrução Normativa Nº20 de 21/07/1999. Método MQT-021.
Amido	0,10 g/100g	FQ-071 rev.03 - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº108: Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal. Método nº 34.
Glicídeos Totais	15,29 g/100g	FQ-071 rev.03 - MAPA - Portaria Nº108 04/09/1991. Método 34.
Glicídios redutores em glicose	13,12 g/100g	FQ-071 rev.03 - MAPA - Portaria Nº108 04/09/1991. Método 34.
Sacarose	2,06 g/100g	FQ-071 rev.03 - MAPA - Portaria Nº108 04/09/1991. Método 34.
Carboidratos	15,39 g/100g	FQ-124 rev.00 - Resolução RDC 360, de 23 de dezembro de 2003. Manual de orient. para as indústrias de alimentos, 2ª versão atualizada. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Gerência Geral de Alimentos - Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

#### Considerações Finais:

- Este resultado é restrito para a amostra ensaiada.
- Amostra enviada pelo cliente.

  
Adriana Hilomy Matsuda CRO 16219 F  
Gerente Técnico

## ANEXO IV

### Tabela nutricional da suplementação da proteína do soro do leite comercialmente divulgada

<b>100% WHEY</b>		
<b>Porção de 40 g (2 dosadores)</b>		
	<b>Quantidade por porção</b>	<b>%VD*</b>
Valor energético	160 kcal = 672 kJ	8
Carboidratos	10 g	3
Proteínas	25 g	33
Gorduras totais	2,3 g	4
Gorduras saturadas	1,1 g	5
Gorduras <i>trans</i>	0 g	-
Fibra alimentar	0 g	0
Sódio	157 mg	7
Cálcio	284 mg	26
<b>AMINOGRAMA</b>		
Alanina	1,2 g	-
Arginina	1,0 g	-
Ácido aspártico	2,5 g	-
Cisteína	0,6 g	-
Ácido glutâmico	3,9 g	-
Glicina	0,5 g	-
Histidina	0,9 g	-
Isoleucina	1,5 g	-
Leucina	2,4 g	-
Lisina	2,1 g	-
Metionina	0,4 g	-
Fenilalanina	0,7 g	-
Prolina	1,6 g	-
Serina	1,5 g	-
Treonina	1,6 g	-
Triptofano	0,7 g	-
Tirosina	0,9 g	-
Valina	1,0 g	-

\* % Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.  
- Valor Diário não estabelecido.

**Disponível em: Pote de 900 g / Refil de 2 kg**

**Sabor Chocolate**

**INGREDIENTES:** Proteína do soro de leite concentrada [WPC], cacau em pó, aromatizantes e edulcorante sucralose. **NÃO CONTÉM GLÚTEN.**