MARCELO GOMES PEREIRA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA
NO PROCESSO DE REGENERAÇÃO MUSCULAR
ESQUELÉTICA**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

MARCELO GOMES PEREIRA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA NO PROCESSO
DE REGENERAÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Saldanha Aoki

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pereira, Marcelo Gomes.

Efeito da suplementação com leucina no processo de regeneração muscular esquelética / Marcelo Gomes Pereira. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Plasticidade músculo-esquelética.

Versão do título para o inglês: Effect of leucine supplementation on skeletal muscle regenerative process.

1. Regeneração (fenômenos biológicos) 2. Músculo esquelético 3. Suplementação alimentar 4. Aminoácidos 5. Proteínas musculares 6. Proteínas do tecido conjuntivo I. Miyabara, Profa. Dra. Elen Haruka II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB021/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcelo Gomes Pereira.

Título da Tese: Efeito da suplementação com leucina no processo de
regeneração muscular esquelética.

Orientador(a): Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **87** nas fls. **105** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Elen Haruka Miyabara**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Efeito da suplementação com leucina sobre o processo de regeneração muscular esquelética"* do qual participam o(s) Marcelo Gomes Pereira, Eduardo de Oliveira Cruz Carlassara e os pesquisadores Anselmo Sigari Moriscot, Marcelo Saldanha Aoki, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **03.07.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 12 de julho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 036.14

São Paulo, 11 de junho de 2014.

REF.: Protocolo nº 087/11.

"Efeito da suplementação com leucina sobre o processo de regeneração muscular esquelética"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 03.07.2017.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Aos imortais, Wagner Gonçalves (in memorian) e Guilherme Gomes (in
memorian)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Obrigado por me abençoar diariamente, dando-me forças e sabedoria para percorrer meu caminho.

À minha orientadora Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara, profissional incansável, por dar oportunidade ao meu doutorado. Obrigado pela atenção dispensada, pela transmissão de conhecimentos, pelo esforço e pela singular orientação com profissionalismo e dedicação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Saldanha Aoki, pela ajuda na idealização do projeto e inúmeras contribuições.

Aos meus pais, Luiz Pereira e Rita Gomes Pereira, pela competente educação e valores transmitidos. Obrigado por sempre me darem liberdade para escolher meu caminho, permitindo que eu evolua. Obrigado por reconhecerem as minhas conquistas. Obrigado por estarem ao meu lado em todos os momentos. Sem o apoio de vocês esse dia não chegaria.

À minha querida companheira Fernanda Cunha, que entrou em minha vida durante a execução deste trabalho e com muita paciência ajudou-me a suportar os “altos e baixos” da carreira científica. Obrigado pelo apoio aos meus objetivos profissionais.

Agradeço de coração ao ex-aluno do laboratório Eduardo Carlassara, que de aprendiz durante sua Iniciação Científica tornou-se um bom amigo. Obrigado pela valiosa ajuda em grande parte deste trabalho.

Agradeço à Meiri Tomaz, Tabata Leal e Lucila Hernandez, minhas colegas de laboratório. Obrigado por toda a ajuda e pelo companheirismo durante os momentos alegres e as angústias da Pós-Graduação. Torço para que todas tenham sucesso em suas carreiras!

Ao Prof. Dr. Anselmo S. Moriscot, profissional a quem tenho grande admiração, e seus alunos (em especial Igor L. Baptista). Ao permitirem que as portas do laboratório ficassem sempre abertas foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

Ao experiente Prof. Dr. Paulo A. Abrahamsohn, pela colaboração e valiosa ajuda para que parte deste trabalho fosse realizado.

À Profa. Dra. Isis C. Kettelhut, seus alunos (em especial Dawit A. Gonçalves) e técnicos, por não hesitarem em abrir as portas do laboratório para nos auxiliar. Agradeço não apenas pela ajuda, mas também pelo exemplo de profissionalismo.

Ao meu velho amigo Flávio J. Roccato. Obrigado pelas agradáveis conversas intermináveis, risadas e palavras de apoio. A amizade que iniciou no primeiro dia de aula na Graduação prosseguirá por muito tempo.

Ao meu novo amigo Jairo Jacintho, que com seu admirável trabalho devolveu-me a qualidade de vida e com seu Aikido vem ensinando-me a “pensar em círculos”. Sempre irei lhe agradecer. Muito obrigado!

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da secretaria do Departamento de Anatomia do ICB, Patrícia, Cristiane, Lucianna, Celso. Obrigado pela ajuda e atenção.

Aos demais professores, alunos e funcionários do ICB. Obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À empresa Ajinomoto Co. Inc., pela doação da leucina utilizada neste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Muito obrigado!

MARATHON

(Rush, Power Windows, 1985)

It's not how fast you can go
The force goes into the flow
If you pick up the beat
You can forget about the heat

More than just survival
More than just a flash
More than just a dotted line
More than just a dash

It's a test of ultimate will
The heartbreak climb uphill
Got to pick up the pace
If you want to stay in the race

More than just blind ambition
More than just simple greed
More than just a finish line
Must feed this burning need -
In the long run...

From first to last
The peak is never passed
Something always fires the light
That gets in your eyes
One moment's high
And glory rolls on by
Like a streak of lightening
That flashes and fades
In the summer sky

Your meters may overload
You can rest at the side of the road
You can miss a stride
But nobody gets a free ride

More than high performance
More than just a spark
More than just the bottom line
Or a lucky shot in the dark -
In the long run...

You can do a lot in a lifetime
If you don't burn out too fast
You can make the most of the distance
First you need endurance -
First you've got to last...

“O importante não é aquilo que fazem de nós, mas o que nós mesmos fazemos do que os outros
fizeram de nós...
...cada homem deve inventar o seu caminho.”

Jean-Paul Sartre

RESUMO

PEREIRA MG. Efeito da suplementação com leucina no processo de regeneração muscular esquelética. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O tecido muscular esquelético de mamíferos possui notável capacidade de se regenerar após um estímulo lesivo. Considerando-se que possíveis agentes terapêuticos capazes de melhorar a resposta regenerativa permanecem em investigação, a utilização de estratégias nutricionais, como, por exemplo, agentes anabólicos, podem ser úteis na busca pela melhora do processo de regeneração do músculo esquelético devido à possível maximização da recuperação da massa muscular após lesão. Nesse sentido, aminoácidos essenciais parecem ser potenciais candidatos para promover a recuperação do trofismo muscular durante a regeneração, uma vez que alguns destes, especialmente a leucina, modulam vias intracelulares reguladoras da massa muscular. O objetivo do presente estudo, portanto, foi investigar os efeitos da suplementação com leucina durante o processo de regeneração do músculo esquelético. Para isso, ratos *Wistar* jovens (dois meses) tiveram os músculos *soleus* e TA da pata esquerda submetidos à criolesão, enquanto que os da pata direita foram utilizados como controle. Os animais foram divididos em dois grupos, os quais receberam ou não a suplementação com leucina (1,35 g/kg por dia), a qual teve início três dias antes da criolesão e prosseguiu por um, três, 10 e 21 dias ao longo do processo de regeneração. Os resultados mostram que a leucina induziu aumento na área de secção transversal das fibras musculares em regeneração apenas no músculo *soleus* no período de 10 dias após lesão ($p \leq 0,05$); reduziu a área de infiltrado inflamatório, a densidade da área de tecido conjuntivo e a ativação de elementos da via TGF- β /Smad em ambos os músculos no período de 10 dias ($p \leq 0,05$). A leucina também aumentou o número de células satélites em proliferação no músculo *soleus* no período de três dias e acelerou a conversão da isoforma de MyHC-neonatal em MyHC adulta em ambos os músculos aos 10 dias após lesão, tendo, inclusive, aumentado a taxa de síntese proteica neste mesmo período ($p \leq 0,05$). Tais efeitos, entretanto, não foram acompanhados por aumento na expressão dos elementos da via PI3K/Akt/mTOR. Por outro lado, foram observadas redução da ativação de FoxO3a e do acúmulo de proteínas ubiquitinadas no músculo *soleus* aos três e 10 dias após lesão, além de aumento na atividade do proteassomo 26S ($p \leq 0,05$). Finalmente, a suplementação com leucina atenuou o prejuízo funcional induzido pela lesão em ambos os músculos, porém a fadiga muscular foi prevenida apenas no músculo *soleus* avaliado aos 10 dias após lesão ($p \leq 0,05$). Nossos resultados sugerem que a suplementação com leucina acelera a recuperação estrutural e funcional do tecido muscular lesado. Mais especificamente, os possíveis efeitos da leucina em melhorar a recuperação do tamanho das fibras musculares em regeneração do *soleus* e do tecido conjuntivo dos músculos *soleus* e TA após lesão, parecem envolver a modulação de elementos do sistema ubiquitina-proteassomo e a atenuação da ativação de elementos da via TGF- β /Smad, respectivamente.

Palavras-chave: Lesão muscular esquelética. Regeneração. Suplementação com leucina.

ABSTRACT

PEREIRA MG. Effect of leucine supplementation on skeletal muscle regenerative process. PhD. Thesis (Morphofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Mammalian skeletal muscle has the ability to adapt to environmental conditions, including a remarkable capacity to regenerate after damage. Considering that the investigation of therapeutic agents capable to improve the muscle regenerative process is still ongoing, nutritional strategies, such as, anabolic agents could be useful to improve skeletal muscle regenerative process due to a possible maximization of muscle mass recovery after damage. Accordingly, essential amino acids seems to be potential candidates to improve the recovery of muscle trophism, and some of them, such as leucine, appear to modulate the intracellular pathways that control muscle mass. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of leucine supplementation on the skeletal muscle regenerative process. Young *Wistar* rats (two months-old) had their soleus and TA muscles from left hind limb submitted to cryolesion, while the same muscles from right hind limb were used as intact control. The animals were divided into two groups, which were supplemented or not with leucine (1.35 g/kg per day). Leucine supplementation started three days before cryolesion and continued for 1, 3, 10 and 21 days after damage. The results show that leucine induced an increase in cross-sectional area of myofibers from regenerating soleus muscle at day 10 post-damage ($p \leq 0.05$); reduced the area of inflammatory infiltration, the area density of connective tissue, and the activation of elements from the TGF- β /Smad signaling pathway in both muscles at day 10 post-damage ($p \leq 0.05$). Leucine also increased the number of proliferating satellite cells in soleus muscles at day 3 post-damage, accelerated the shift from neonatal MyHC to adult MyHC in both muscles at day 10 post-damage; and increased the rate of protein synthesis in the same period ($p \leq 0.05$). However, these effects were not accompanied by increased expression of elements from the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. On the other hand, there were a reduction of FoXO3a activation and accumulation of ubiquitinated proteins in soleus muscle at days 3 and 10 post-damage, and an increase in the 26S proteasome activity ($p \leq 0.05$). Finally, leucine supplementation attenuated the functional impairment of damaged soleus and TA muscles, however it did not prevent skeletal muscle fatigue in TA muscles evaluated at day 10 post-damage ($p \leq 0.05$). Our results suggest that leucine accelerates the structural and functional recovery of damaged skeletal muscle tissue. The possible effects of leucine in improving recovery of myofiber size in soleus muscle and remodeling of connective tissue in soleus and TA damaged muscles, seems to be involved with modulation of the ubiquitin-proteasome system and attenuation of TGF- β /Smad signaling pathway activation, respectively.

Keywords: Skeletal muscle damage. Regeneration. Leucine supplementation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	28
Figura 2 – Representação do sistema ubiquitina-proteassomo.....	30
Figura 3 – Diagrama representativo do protocolo para análise da função contrátil muscular <i>in vivo</i>	49
Figura 4 – Massa corporal dos animais obtida realizando-se duas pesagens semanais durante o período de 21 dias após lesão.....	51
Figura 5 – Fotomicrografias representativas de secções transversais do músculo <i>soleus</i> em um e três dias após lesão.....	54
Figura 6 – Fotomicrografias representativas de secções transversais dos músculos <i>soleus</i> (em 10 e 21 dias após lesão) e TA (em 10 dias após lesão).....	56
Figura 7 – Área de secção transversal (AST) das fibras dos músculos <i>soleus</i> (em 10 e 21 dias após lesão) e TA (em 10 dias após lesão).....	58
Figura 8 – Área do infiltrado inflamatório dos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	59
Figura 9 – Incidência de macrófagos no músculo <i>soleus</i> em três dias após lesão.....	59
Figura 10 – Densidade da área do tecido conjuntivo dos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	61
Figura 11 – Densidade da área do colágeno tipo III no músculo <i>soleus</i> em 10 dias após lesão.....	62
Figura 12 – Conteúdo de hidroxiprolina no músculo TA no período de 10 dias após lesão.....	63
Figura 13 – Expressão de TβRI fosforilado nos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	64
Figura 14 – Expressão de Smad2/3 ativado nos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	66
Figura 15 – Células satélites em proliferação no músculo <i>soleus</i> em três dias após lesão.....	68
Figura 16 – Expressão das isoformas de MyHC nos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	70

Figura 17 – Taxa de síntese proteica no músculo EDL em 10 dias após lesão.....	71
Figura 18 – Expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR no músculo <i>soleus</i> em três dias após lesão.....	72
Figura 19 – Expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR nos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	74
Figura 20 – Núcleos positivos para FoXO3a no músculo <i>soleus</i> em três dias após lesão.....	76
Figura 21 – Núcleos positivos para FoXO3a no músculo <i>soleus</i> em 10 dias após lesão.....	78
Figura 22 – Expressão de MAFbx/atrogin-1 e MuRF1 no músculo <i>soleus</i> em três dias após lesão.....	79
Figura 23 – Expressão de proteínas ubiquitinadas nos músculos <i>soleus</i> e TA em três e 10 dias após lesão.....	80
Figura 24 – Atividade do proteassomo 26S no músculo <i>soleus</i> em três dias após lesão.....	81
Figura 25 – Análise da função contrátil dos músculos <i>soleus</i> e TA em 10 dias após lesão.....	84
Figura 26 – Análise da função contrátil do músculo <i>soleus</i> em 21 dias após lesão.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para a análise da função contrátil muscular <i>in vivo</i>	49
Tabela 2 – Massa do músculo soleus (g) dos animais avaliados nos períodos de um, três, 10 e 21 dias após lesão.....	52
Tabela 3 – Massa do músculo TA (g) dos animais avaliados no período de 10 dias após lesão.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt – *protein kinase B*

ALK – *activating-receptor like kinases*

AST – área de secção transversal

ATP – adenosina trifosfato

BCAA – aminoácidos de cadeia ramificada (*Branched-chain amino acids*)

BMP – *bone morphogenic protein*

C – grupo controle

Ca²⁺ – cálcio

Crio – grupo submetido à criolesão

Crio+Leu – grupo submetido à criolesão e suplementado com leucina

Deptor – *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*

DP – desvio padrão

E1 – enzimas ativadoras de ubiquitina

E2 – enzimas conjugadoras de ubiquitina

E3-ligases – enzimas ubiquitina-ligases

EDL – músculo extensor longo dos dedos (*extensor digitorum longus*)

eIF-4E – *euchariotic initiation factor-4E*

FoXO – *Forkhead Box O transcription factors*

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GβL – *G protein β-subunit-like protein*

GDF – fatores de crescimento e diferenciação (*Growth Differentiation Factor*)

GLM – *General Linear Model*

HMB – *β-hydroxy β-methylbutyrate*

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin Like Growth Factor*)

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico-sintase induzível (*inducible nitric oxide synthase*)

IR-1 – receptor de insulina do tipo 1

Leu – grupo suplementado com leucina

LC3-II – *protein ligth chain 3*

MAPK – *mitogen-activated protein kinase phosphatase*

MAFbx/atrogin-1 – *muscle atrophy F-box/atrogin-1*

MRF – fator regulatório miogênico

mTOR – *mammalian/mechanistic target of rapamycin*
MM – massa molecular em kDa
mN – miliNewton
MuRF1 – *muscle-specific RING finger-1*
Myf – fator miogênico (*myogenic fator*)
MyHC – miosina de cadeia pesada
MyoD – *myoblast determination protein*
Pax7 – *paired box transcription factor 7*
PB – *phosphate buffer*
PBS – *phosphate buffer saline*
PDK – proteína dependente de fosfoinosítídeos
PI3K – *phosphoinositide-3-kinase*
PFA – paraformaldeído
PRAS40 – *proline-rich Akt substrate 40 kDa*
p70^{S6K} – proteína ribossomal p70^{S6K} (*protein S6 kinase – S6K1*)
Raptor – *regulatory associated protein of mTOR*
Rictor – *rapamycin-insensitive companion of mTOR*
Ser – serina
SIN-1 – *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein*
TA – músculo tibial anterior (*tibialis anterior*)
TGF-β – fator de crescimento e transformação β (*transforming growth fator β*)
TNF – fator de necrose tumoral (*tumor necrosis fator*)
Thr – treonina
TβRI – receptores do tipo I de TGF-β
U. A. – unidade arbitrária
4E-BP1 – *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético.....	20
1.2 Regeneração muscular esquelética.....	23
1.3 Participação da via PI3K/Akt/mTOR e do sistema ubiquitina- proteassomo no controle da massa muscular.....	26
1.4 Efeito de estratégias nutricionais sobre as adaptações musculares.....	30
1.5 Efeitos da leucina sobre as vias de síntese e degradação proteica no tecido muscular esquelético.....	32
1.6 Justificativa e relevância do estudo.....	34
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Geral.....	36
2.2 Específicos.....	36
<i>2.2.1 Avaliação dos efeitos da suplementação com leucina nos seguintes aspectos do processo de regeneração do músculo soleus de ratos jovens.....</i>	<i>36</i>
<i>2.2.2 Avaliação dos efeitos da suplementação com leucina nos seguintes aspectos do processo de regeneração do músculo tibialis anterior (TA) de ratos jovens.....</i>	<i>36</i>
3 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS.....	37
3.1 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo específico 2.2.1.....	37
3.2 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo específico 2.2.2.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Amostra.....	39
4.2 Grupos experimentais.....	39
4.3 Suplementação com leucina.....	40
4.4 Criolesão.....	41
4.5 Coleta das amostras.....	41
4.6 Análises histológicas.....	41
<i>4.6.1 Análises morfométricas.....</i>	<i>42</i>
<i>4.6.2 Imunofluorescência.....</i>	<i>43</i>
<i>4.6.3 Imunohistoquímica.....</i>	<i>44</i>

4.7 Western blotting.....	44
4.8 Análise da taxa de síntese proteica muscular <i>ex vivo</i>	46
4.9 Dosagem de hidroxiprolina.....	47
4.10 Atividade do proteassomo 26S.....	47
4.11 Análise da função contrátil muscular <i>in vivo</i>	47
4.12 Análise estatística.....	50
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Massa corporal, massa muscular e aspectos histológicos.....	51
5.2 Incidência de macrófagos.....	59
5.3 Densidade da área de tecido conjuntivo e de colágeno tipo III, conteúdo de colágeno e perfil de ativação de elementos da via TGF- β /Smad.....	60
5.4 Células satélites em proliferação.....	67
5.5 Expressão de MyHC-neonatal, MyHC-I e MyHC-II.....	69
5.6 Taxa de síntese proteica e perfil de ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	70
5.7 Perfil de ativação do sistema ubiquitina-proteassomo.....	74
5.8 Avaliação da função contrátil muscular.....	81
6 DISCUSSÃO.....	86
6.1 Efeito da suplementação com leucina sobre a massa corporal e o comportamento alimentar dos animais.....	86
6.2 Efeito da suplementação com leucina sobre as alterações morfológicas do músculo esquelético em regeneração.....	87
6.3 Efeito da suplementação com leucina nas células satélites em proliferação e nas células musculares em diferenciação durante a regeneração do músculo esquelético.....	90
6.4 Efeito da suplementação com leucina sobre vias reguladoras da massa muscular durante o processo de regeneração do músculo esquelético.....	91
6.5 Efeito da suplementação com leucina sobre a função contrátil muscular durante o processo de regeneração do músculo esquelético.....	96

6.6 Comparação do efeito da suplementação com leucina nos músculos <i>soleus</i> e TA durante o processo de regeneração muscular.....	98
7 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético

O corpo humano possui cerca de seiscentos e quarenta músculos esqueléticos, os quais representam, aproximadamente, 40% e 50% da massa corporal de um indivíduo adulto do sexo feminino e masculino, respectivamente. O músculo esquelético desempenha diversas funções, dentre elas a produção de força contrátil para a locomoção, manutenção da postura e respiração, além de auxiliar na produção de calor e de constituir a principal reserva energética de aminoácidos (1-3).

As fibras musculares são células constituídas por vários núcleos, possuem formato poligonal e alongado e são circundadas pela membrana plasmática, a qual recebe a denominação de sarcolema (1, 2, 4). Os núcleos posicionam-se periféricamente na fibra muscular e são responsáveis pela manutenção de pequenas regiões da mesma, que são denominadas de domínios mionucleares. Sabe-se também que o posicionamento periférico dos núcleos é essencial para a adequada transmissão sináptica (5). Além disso, as fibras musculares são formadas durante o desenvolvimento por meio da fusão de células progenitoras miogênicas mononucleadas, algumas das quais permanecem indiferenciadas e associadas às fibras musculares adultas, sendo denominadas células satélites (6-9).

As fibras musculares adultas também são constituídas de filamentos denominados miofibrilas, e estas constituídas por proteínas contráteis, sendo as principais, miosina, actina, tropomiosina e troponina, a qual possui três subunidades, a troponina I, T e C (10-12). As miofibrilas ainda podem ser divididas em segmentos individuais denominados sarcômeros, as unidades funcionais contráteis do músculo esquelético. As diferenças entre os índices de refração das várias partes da fibra muscular definem seu padrão estriado, representado pela alternância entre bandas claras e escuras dos sarcômeros (1, 4). A região clara do sarcômero (banda I) é dividida por uma fina camada de proteínas estruturais denominada linha Z (escura) e a região escura (banda A) possui uma banda H mais clara em seu centro. Cada sarcômero é delimitado por duas linhas Z consecutivas, sendo que os filamentos espessos de miosina apresentam-se alinhados para formar a banda A, enquanto que os filamentos finos de actina formam a região menos densa do sarcômero

(banda I). As linhas Z atravessam as miofibrilas e unem-se aos filamentos finos por meio de uma proteína estrutural, a actinina. Além disso, a titina, outra proteína estrutural, conecta as linhas Z às linhas M, as quais correspondem a ligações laterais entre filamentos grossos adjacentes, fornecendo estrutura para a formação dos sarcômeros (1, 13).

A contração muscular ocorre após a despolarização do sarcolema da fibra muscular em um processo conhecido como acoplamento excitação-contração (14, 15). O potencial de ação, ao ser transmitido às fibras musculares, provoca liberação de cálcio (Ca^{2+}) pelo retículo sarcoplasmático. A contração muscular ocorre, basicamente, pelo encurtamento do sarcômero devido ao deslizamento dos filamentos finos sobre os espessos. Durante o repouso, a troponina I está ligada firmemente à actina, enquanto a tropomiosina cobre os locais onde as cabeças de miosina ligam-se à actina; assim, o complexo troponina-tropomiosina inibe a interação entre a actina e a miosina. Quando o Ca^{2+} liga-se à troponina C, o acoplamento entre troponina I e actina enfraquece, permitindo a movimentação da molécula de tropomiosina. Essa movimentação faz com que os locais de fixação das cabeças de miosina fiquem descobertos; e, em seguida, moléculas de adenosina trifosfato (ATP) são hidrolisadas e tem início a contração (11). Dessa maneira, o ciclo no qual as cabeças de miosina, ligadas firmemente à actina, curvam-se sobre o restante da molécula de miosina, desprendendo-se em seguida, repete-se várias vezes durante a contração. Para que o músculo relaxe após a contração há a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, acarretando na redução da concentração intracelular de Ca^{2+} , com subsequente término da interação química entre actina e miosina (2, 16, 17). O ATP fornece energia tanto para a contração quanto para o relaxamento, uma vez que a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático é feita por transporte ativo (2, 16).

Além das fibras musculares, o músculo esquelético também é constituído de tecido conjuntivo altamente organizado. A camada mais externa do tecido conjuntivo que envolve todo o músculo é denominada epimísio. Uma segunda camada de tecido conjuntivo, denominada perimísio, envolve feixes, ou fascículos, de fibras musculares. Além disso, cada fibra muscular é revestida por uma camada de tecido conjuntivo denominado endomísio (1, 4). Em relação à predominância das fibras colágenas, o epimísio apresenta grande quantidade de colágeno tipo I, já o perimísio

os do tipo I e III, enquanto o endomísio os do tipo I, III e V (4). O colágeno tipo I origina fibras paralelas e rígidas, conferindo força de tração, já o colágeno tipo III dá origem a fibras flácidas, conferindo distensibilidade ao tecido (18). O colágeno tipo IV, por sua vez, é responsável pela estabilidade mecânica da fibra muscular, sendo localizado exclusivamente da membrana basal (19).

O tecido conjuntivo serve ainda como trajeto para que vasos sanguíneos e nervos relacionem-se com as fibras musculares (1). Além disso, desempenha importante função na transmissão de força (20) e na formação da matriz extracelular (21). O tecido conjuntivo também está envolvido com a formação do reservatório biológico (nicho) das células satélites, uma vez que este se localiza anatomicamente entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular (22, 23). No entanto, alterações no tecido conjuntivo podem resultar em fibrose, a qual pode ser causada pela ação de fatores de crescimento, como a observada, por exemplo, em situações de distrofia muscular (24, 25). Nesse caso, o fator de crescimento e transformação (*transforming growth factor; TGF*) β tem sido descrito como um dos principais indutores de fibrose em diferentes tecidos (24, 26).

Além de possuírem as características previamente relatadas, os músculos esqueléticos são compostos por diferentes tipos de fibras musculares (27). De maneira geral, as fibras musculares do tipo I (oxidativas ou de contração lenta), são aquelas nas quais a alta concentração de mioglobina, a rica capilarização e a alta atividade mitocondrial conferem predomínio do metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, alta resistência à fadiga. As fibras musculares do tipo II (glicolíticas ou de contração rápida) são divididas em dois subtipos, IIa e IIb. Nesse caso, as últimas apresentam menor concentração de mioglobinas, menor capilarização e menor quantidade de mitocôndrias, predominando, então, o metabolismo glicolítico, com conseqüente baixa resistência à fadiga. Já as primeiras apresentam características intermediárias entre as fibras musculares do tipo I e IIb, possuindo, portanto, moderada resistência à fadiga (28, 29).

O tecido muscular esquelético possui alta capacidade de se adaptar em resposta a diversas alterações orgânicas e ambientais. A adaptação do músculo esquelético em resposta ao treinamento físico de força ou à ablação de músculos sinergistas, por exemplo, ocorre pelo aumento do diâmetro das fibras musculares com conseqüente ganho de força, fenômeno conhecido por hipertrofia muscular (30-

32). Por outro lado, o músculo esquelético também se adapta à ausência de estímulos, como em situações de imobilização de membros ou após longos períodos de repouso pós-cirúrgico, por exemplo, condições onde ocorre atrofia muscular caracterizada por redução tanto da área de secção transversal (AST) das fibras quanto da produção de força muscular (33, 34). Sabe-se também que alterações hormonais como, por exemplo, o hipertireoidismo, acarreta outra adaptação da musculatura esquelética, a conversão gradual dos tipos de fibras musculares, que neste exemplo seria a conversão progressiva das fibras do tipo I em fibras do tipo II (35). Outra importante característica do tecido muscular esquelético é sua notável capacidade de se adaptar após lesão. Este processo adaptativo é denominado regeneração muscular e será abordado em detalhes a seguir.

1.2 Regeneração muscular esquelética

O processo de regeneração do músculo esquelético ocorre após uma lesão do tecido que pode ser de origem mecânica, como, por exemplo, laceração, contusão e distensão (36); de origem química, como lesões causadas por metais pesados ou toxinas oriundas de venenos de serpentes (37, 38); e de origem térmica, como aquelas causadas por congelamento ou queimadura (39). Esse processo foi inicialmente descrito na segunda metade do século XIX; porém, somente após cerca de 100 anos os primeiros mecanismos celulares começaram a ser investigados (40).

A lesão muscular caracteriza-se pelo rompimento do sarcolema, causando aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular e desencadeando a ativação de proteases dependentes de Ca^{2+} , como as calpaínas, responsáveis pela degradação de componentes celulares (41). Com a ruptura do sarcolema, as células inflamatórias invadem o tecido e contribuem para o processo de regeneração muscular. As primeiras células inflamatórias a ocuparem o local da lesão são os neutrófilos (42), e já foi demonstrado que seu número aumenta expressivamente em cerca de seis horas após lesão (43, 44). Os neutrófilos são responsáveis por secretar radicais livres e citocinas pró-inflamatórias, as quais auxiliam na degradação dos debris celulares (45). Em 24 horas após lesão, o número de neutrófilos declina concomitantemente ao aumento da incidência de macrófagos (42, 46).

As populações de macrófagos apresentam atividades opostas, pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em diferentes estágios do processo de regeneração (47). Os macrófagos são comumente classificados como M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios), nomenclatura referente à ativação clássica e alternativa, respectivamente (48). Os macrófagos M1 estão presentes em estágios precoces da regeneração e atuam na fagocitose dos debris celulares. Além disso, secretam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) 1 β e óxido nítrico-sintase induzível (*inducible nitric oxide synthase; iNOS*), o qual, por meio da metabolização de L-arginase, é capaz de produzir grandes quantidades de óxido nítrico e eliminar patógenos intracelulares (47, 49). Os macrófagos M1 também promovem a proliferação e reprimem a diferenciação de mioblastos, além de induzir redução na síntese de colágeno em meio de cultura celular (50-52).

Em estágios avançados do processo de regeneração muscular ocorre alteração no fenótipo dos macrófagos de M1 para M2 (47, 53, 54). Essa transição de fenótipos é crucial para a regeneração muscular sendo parcialmente regulada por *mitogen-activated protein kinase phosphatase* (MAPK) 1 (55). Estudos mostram que essa transição ocorre somente após a instalação da fase pró-inflamatória e que a ativação exacerbada da sinalização M1 resulta em prejuízos no processo de regeneração muscular (56, 57). Além disso, as células inflamatórias presentes no tecido muscular lesado também são responsáveis pela secreção de citocinas, tais como, o fator de necrose tumoral (*tumor necrosis fator; TNF*) α , TGF- β , e IL-6, as quais são capazes, entre outros efeitos, de ativar as células satélites (58-60).

As células satélites são mononucleadas e indiferenciadas localizadas em um nicho específico na superfície da fibra muscular, entre a lâmina basal e o sarcolema (7, 23). Em condições normais, as células satélites permanecem quiescentes; entretanto, quando o músculo esquelético sofre uma lesão as mesmas são ativadas e recebem a denominação de células precursoras miogênicas, as quais proliferam apresentando alta expressão de fatores regulatórios miogênicos, como o fator miogênico (*myogenic fator; Myf*) 5 e *myoblast determination protein* (MyoD), por exemplo (41, 42). Para que a ativação das células satélites ocorra é necessário que tanto a quantidade como suas propriedades miogênicas sejam mantidas; pois, enquanto parte das células participam da regeneração das fibras musculares, outra parte passa pelo processo de auto-renovação, retornando ao estado de quiescência

(61). Nesse sentido, as células satélites em estado de quiescência apresentam alta expressão de *paired box transcription factor 7* (Pax7), o qual também garante a especificidade da linhagem miogênica (61).

Após a proliferação ocorre a diferenciação das células precursoras miogênicas em mioblastos, fase esta marcada pela redução da expressão de Pax7 concomitantemente ao aumento da expressão de miogenina e do fator regulatório miogênico (MRF) 4 (62). O processo de diferenciação terminal, por sua vez, é caracterizado pela fusão dos mioblastos para a formação de miotubos (63), os quais passam a expressar a miosina de cadeia pesada (MyHC) neonatal a qual, posteriormente, é substituída pelas isoformas adultas de MyHC (41, 42, 62). Sabe-se ainda que a expressão de vários genes, como Notch e Wnt é modulada durante a ativação e proliferação das células satélites e em fibras musculares em diferenciação durante a regeneração (64, 65).

Devido à fusão das células precursoras miogênicas à fibra muscular lesada, um novo núcleo celular é incorporado localizando-se, inicialmente, no centro da fibra muscular sendo, posteriormente, movido para a periferia da mesma. A fibra muscular com núcleo centralizado é comumente utilizada como um marcador histológico de regeneração muscular, e em situações de doenças musculares crônicas, como distrofias, há a permanente presença dessas fibras no tecido muscular, indicando ciclos constantes de degeneração e regeneração (66). O correto posicionamento do núcleo é essencial para a adequada função muscular, uma vez que sua localização central atua como barreira física para a contração e consequente produção de força, pois dificulta a formação de pontes cruzadas e o deslizamento das moléculas de actina e miosina (5).

Dessa maneira, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de regeneração muscular têm sido amplamente investigados e fatores de crescimento, como, o fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin Like Growth Factor; IGF*) I, TGF- β , membros da família IL-6 e fatores regulatórios miogênicos (MRFs: MyoD, Myf-5, miogenina e MRF-4) são conhecidos como facilitadores e reguladores da resposta regenerativa muscular (41, 67). Dentre esses, MyoD destaca-se como um importante fator de transcrição miogênico, uma vez que possui a capacidade de reprogramar geneticamente células não musculares em uma linhagem miogênica (68).

Além disso, para que ocorra a recuperação estrutural e funcional da fibra muscular previamente lesada, vias de sinalização intracelular reguladoras do trofismo muscular exercem função importante no curso da resposta regenerativa. Nesse sentido, as vias que controlam a síntese e a degradação de proteínas mostram-se essenciais para o processo de regeneração muscular. De fato, a ativação de elementos da via *phosphoinositide-3-kinase* (PI3K)/*protein kinase B* (Akt)/*mammalian/mechanistic target of rapamycin* (mTOR) (PI3K/Akt/mTOR), responsável pela ativação da síntese proteica, favorecendo assim o aumento da massa muscular (69, 70), foi recentemente demonstrada como uma reguladora da resposta regenerativa, sendo importante para a etapa de diferenciação muscular (66, 71). Por outro lado, vias que controlam a degradação proteica também participam do processo regenerativo do músculo esquelético, como é o caso do sistema ubiquitina-proteassomo (72-74).

Sendo a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e o sistema ubiquitina-proteassomo importantes reguladores da massa muscular, cabe a seguir uma abordagem sobre suas respectivas atuações no tecido muscular esquelético.

1.3 Participação da via PI3K/Akt/mTOR e do sistema ubiquitina-proteassomo no controle da massa muscular

A ativação da via PI3K/Akt/mTOR é regulada por fatores de crescimento como o IGF-I e pelos níveis plasmáticos de insulina (75). Estímulos importantes para a musculatura esquelética, como exercício físico e nutrição adequada, levam ao aumento dos níveis de IGF-I, iniciando a cascata de sinalização com o recrutamento da PI3K, da proteína dependente de fosfoinosítídeos (PDK) e, finalmente, da Akt (76). A ativação da PI3K pelo IGF-I desloca a Akt para a membrana celular fosforilando-a no resíduo serina 473 (Ser⁴⁷³). Uma vez fosforilada, a Akt possui diversos alvos e pode influenciar a sobrevivência celular e a síntese de proteínas (70).

Um dos principais alvos da Akt é a mTOR, uma serina/treonina quinase, que uma vez associada a *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor), *G protein β -subunit-like protein* (G β L), *proline-rich Akt substrate 40 kDa* (PRAS40) e *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor) dá origem ao complexo mTORC1 (77). Quando, ao invés de associar-se a raptor e PRAS40, mTOR associa-

se à *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor) e *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein* (SIN-1), origina o complexo mTORC2 (69). No entanto, o complexo mTORC1 é o principal regulador do crescimento e do metabolismo celular (77).

Uma vez ativada a mTOR fosforila a proteína ligadora *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) prevenindo sua interação com o *euchariotic initiation factor-4E* (eIF-4E) e, conseqüentemente, permitindo o acoplamento do eIF-4E ao eIF-4G para a formação do complexo eIF-4F (78). Esses fatores de iniciação eucarióticos são responsáveis pela ligação do ribossomo na extremidade 5' *cap* do RNAm, onde a tradução dos códons ocorrerá (79). Como essa região ribossomal é reconhecida pelo eIF-4E, a interação da 4E-BP1 com essa extremidade inibe o processo de tradução (80, 81). Por outro lado, a mTOR também fosforila a proteína ribossomal p70^{S6K} (*protein S6 kinase; S6K1*), a qual atua na fosforilação do polipeptídeo ribossomal S6 na subunidade ribossomal 40S (82). O adequado funcionamento desse mecanismo possibilita a síntese de proteínas (Figura 1).

Figura 1 – Representação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.

Fatores tróficos, estímulos hormonais e/ou nutricionais ativam a proteína PI3K e, consequentemente, a proteína Akt. A ativação da Akt, por sua vez, fosforila a proteína mTOR, a qual unindo-se a Raptor forma o complexo mTORC1, o principal regulador do crescimento e do metabolismo celular, pois este é capaz de fosforilar a proteína p70^{S6k}, a qual fosforila o polipeptídeo ribossomal S6, resultando, assim, em aumento na biogênese ribossomal. Além disso, mTORC1 pode fosforilar a proteína ligadora 4E-BP1 e assim prevenir sua interação com o fator de iniciação eucariótico eIF-4E, permitindo, consequentemente, a formação do complexo eIF-4F. Por outro lado, a união de mTOR a Rictor origina o complexo mTORC2. Setas verdes representam ativação e, quando indicadas, ativação via fosforilação. Setas vermelhas representam inibição e, quando indicadas, inibição via fosforilação.

FONTE: adaptado de Sussman et al. (2011) (83).

O sistema ubiquitina-proteassomo dependente de ATP é o principal modulador da proteólise muscular esquelética (84). A ativação desse sistema é desencadeada por diversas condições indutoras de atrofia muscular como, sepse, caquexia (perda excessiva de massa muscular) provocada, por exemplo, por câncer ou infecção pelo HIV; hipocinesia, hipogravidade, imobilização e envelhecimento (72-74). Nessa via, as proteínas-alvo do tecido muscular são ligadas covalentemente à ubiquitina e degradadas por um complexo multicatalítico denominado proteassomo 26S. A marcação das proteínas-alvo ocorre quando as enzimas ativadoras de

ubiquitina (E1) ativam as moléculas de ubiquitina hidrolisando ATP, a seguir as enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) unem as moléculas de ubiquitina formando um complexo de poliubiquitinas e, finalmente, as enzimas ubiquitina-ligases (E3-ligases), ligam esse complexo à proteína-alvo a qual, por sua vez, será reconhecida e degradada pelo proteassomo 26S (85) (Figura 2). Os genes das ubiquitina-ligases *muscle-specific RING finger-1* (MuRF1) e *muscle atrophy F-box/atrogin-1* (MAFbx/atrogin-1) apresentam regiões promotoras controladas por fatores de transcrição da família *Forkhead Box O transcription factors* (FoXO), os quais podem ser fosforilados pela Akt sendo impedidos de se translocar para o núcleo (34). Tais enzimas também parecem estar envolvidas em diversos processos celulares, como o crescimento e a diferenciação (33, 86). Além disso, a ligação do complexo de poliubiquitinas a uma proteína específica é um processo passível de reversão, uma vez que as enzimas desubiquitinases, como UBP45, UBP69 e USP28 podem reverter o complexo com a proteína-alvo, evitando sua degradação.

Figura 2 – Representação do sistema ubiquitina-proteassomo.

Inicialmente, as moléculas de ubiquitina são ativadas pela ação das enzimas E1 em uma reação que envolve gasto energético (ATP). Em seguida, pela ação das enzimas E2, essas moléculas são conjugadas em um complexo de poliubiquitinas. Posteriormente, por intermédio das E3-ligases, esse complexo é ligado à proteína-alvo e conduzido ao proteassomo 26S para degradação em pequenos peptídeos. As moléculas de ubiquitina são, subsequentemente, recicladas e podem participar de uma nova etapa do processo.

FONTE: adaptado de Murton et al. (2008) (87).

Dessa maneira, para o sucesso do processo de regeneração muscular é necessária a modulação de vias de sinalização intracelular (como PI3K/Akt/mTOR e o sistema ubiquitina-proteassomo) que favoreçam a recuperação da fibra muscular lesada. Possíveis alvos terapêuticos capazes de melhorar ou mesmo acelerar a resposta regenerativa permanecem em investigação. Nesse sentido, a utilização de agentes anabólicos parece ser uma possível estratégia para melhorar o processo regenerativo muscular.

1.4 Efeito de estratégias nutricionais sobre as adaptações musculares

Considerando-se a inexistência de estudos sistemáticos sobre os efeitos celulares e moleculares de diferentes estratégias nutricionais durante o processo de regeneração muscular após lesão, optou-se por realizar uma breve exposição acerca de tais efeitos sobre o processo de adaptação muscular induzida pelo

treinamento físico de força, uma vez que o mesmo é capaz de induzir lesão muscular.

A suplementação com aminoácidos pode ser um método eficaz para minimizar os efeitos da lesão muscular. O estudo de Nosaka et al. (2006) (88) comparou dois protocolos de suplementação em indivíduos submetidos a uma única sessão de treinamento de força (flexão de cotovelos durante 30 minutos a 9% da contração isométrica máxima). O primeiro grupo, suplementado com um complexo de diversos aminoácidos essenciais e não essenciais, dentre eles leucina, isoleucina e valina, os quais formam o grupo dos aminoácidos de cadeia ramificada (*Branched-chain amino acids*; BCAA's), ingeriu a primeira dose 30 minutos antes do início da sessão e a segunda dose imediatamente após a mesma. O segundo grupo seguiu a mesma orientação, porém continuou sendo suplementado ao longo de quatro dias após a sessão. Os resultados mostraram que os níveis plasmáticos de creatina quinase e mioglobina foram menores no segundo grupo; além disso, os indivíduos relataram menores índices de dor muscular tardia, avaliada por meio de uma escala visual. Outro estudo, utilizando um suplemento alimentar contendo arginina e glutamina, verificou o efeito de duas doses suplementares diárias em indivíduos submetidos a duas sessões semanais de treinamento de força para grandes grupos musculares ao longo de 12 semanas. Os resultados mostraram que o grupo suplementado apresentou menores níveis de creatina quinase e cortisol, assim como de dor muscular tardia, quando comparados ao grupo placebo (89).

Com relação à suplementação específica com aminoácidos de cadeia ramificada, o estudo de Greer et al. (2007) (90) comparou dois grupos de indivíduos, o primeiro suplementado com 2,5 g de BCAA e o segundo com a mesma quantidade de placebo. Ambos foram submetidos a um protocolo de treinamento de resistência aeróbia composto por três séries de 90 minutos em cicloergômetro (55% VO_2). Foram fornecidas duas doses da suplementação aos indivíduos, a primeira antes do início da sessão e a segunda em 60 minutos após o início da mesma. O grupo suplementado com BCAA apresentou menores níveis de creatina quinase e de dor muscular tardia, ao mesmo tempo em que obteve maior torque flexor do joelho (medida de força muscular) em relação ao grupo placebo.

No que diz respeito à suplementação com BCAA e lesão muscular induzida pelo treinamento de força, o estudo de Jackman et al. (2010) (91) comparou

indivíduos suplementados com 7,3 g de BCAA e outros com a mesma quantidade de placebo, submetidos a uma única sessão de treinamento composta por 12 séries de 10 repetições (120% da contração voluntária máxima), de contrações excêntricas do quadríceps. As suplementações foram fracionadas em quatro momentos: a) 30 minutos antes da sessão, b) uma hora e 30 minutos após, c) quatro horas após e d) oito horas após, perdurando pelos três dias subsequentes. Os resultados indicaram que os índices de dor muscular tardia, avaliados por escala visual, foram menores nos indivíduos do grupo suplementado com BCAA, enquanto a força muscular, avaliada em dinamômetro isocinético, atingiu valores maiores em relação ao grupo placebo. O estudo de Shimonura et al, (2010) (92) comparou indivíduos suplementados com 5,5 g de BCAA ou de placebo submetidos a uma única sessão de treinamento de força, composta por sete séries de 20 repetições de agachamentos sem sobrecarga. A suplementação foi fornecida em dose única, imediatamente antes do início da sessão e os indivíduos foram acompanhados pelos três dias subsequentes. O grupo suplementado com BCAA apresentou menores índices de dor muscular tardia, menores níveis plasmáticos de mioglobina e atingiu valores maiores de força muscular máxima, avaliada em dinamômetro isocinético, quando comparado ao grupo placebo em todo o período de estudo.

Sendo assim, as manipulações nutricionais, como a suplementação com aminoácidos essenciais, são potenciais estratégias para se conseguir uma melhor resposta regenerativa. Tal hipótese baseia-se no fato de que alguns desses aminoácidos, como, por exemplo, a leucina, podem atuar no controle da massa muscular e, conseqüentemente, na recuperação funcional por meio de uma possível modulação de vias reguladoras de síntese e degradação proteica no tecido muscular esquelético (93-96).

1.5 Efeitos da leucina sobre as vias de síntese e degradação proteica no tecido muscular esquelético

Desde a década de 1970, a função dos aminoácidos essenciais, isto é, aqueles que necessitam ser consumidos diariamente, pois o organismo não possui capacidade para sintetizá-los, é alvo de pesquisas onde o metabolismo de proteínas musculares é explorado (97). Dentre os principais, a leucina é um aminoácido altamente seletivo e capaz de desempenhar funções importantes como “regulador-

chave” da síntese proteica no músculo esquelético. Este aminoácido é capaz de iniciar a ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, pela fosforilação da mTOR nos resíduos Ser²⁴⁴⁸ e Ser²⁴⁸¹ (96, 98-101).

Estudos *in vivo* sugerem que os efeitos da suplementação com leucina estão relacionados à montagem do fator de iniciação eucariótico eIF-4F, componente importante para a tradução do RNAm (93, 95, 96, 101-106). Em estudo recente, onde foram analisados os efeitos da leucina na musculatura esquelética de animais submetidos a dietas com baixas concentrações de proteínas, os resultados indicaram aumentos dose dependentes na fosforilação da proteína p70^{S6K} e da dissociação da proteína ligadora 4E-BP1 com o fator de iniciação eucariótico eIF-4E, contribuindo para o início da síntese proteica (107). Adicionalmente, estudos com animais suplementados com leucina, porém mantidos em jejum e tratados com somatostatina, no intuito de gerar baixas concentrações de insulina plasmática, mostraram uma atenuação da fosforilação da p70^{S6K} sem alterações na formação do complexo eIF-4F (98-100, 108). Tais resultados reforçam o fato de que a leucina desencadeia a ativação da via PI3K/Akt/mTOR por um mecanismo independente da ação da insulina (109).

Com relação às pesquisas *in vitro*, estudos em culturas celulares de mioblastos (L6) mostram que há redução da formação do complexo eIF-4F e aumento da associação entre a 4E-BP1 e o eIF-4E em meio de cultura com ausência de leucina (110). Por outro lado, um estudo com cultura de células satélites tratadas com leucina mostrou aumentos na fosforilação de mTOR e p70^{S6K}, além de aumentos consideráveis na taxa de síntese proteica e na proliferação de tais células (111).

A suplementação com leucina também tem sido estudada em diversas situações catabólicas, entre elas: a) perda de massa muscular em resposta a atrofia provocada, por exemplo, pelo desuso em condições de imobilização e pelos efeitos colaterais da utilização de glicocorticóides (112, 113); b) situações patológicas, como caquexia associada a sepse, câncer ou contaminação pelo HIV (105); e c) adaptações fisiológicas, como a perda de massa muscular durante o envelhecimento (114).

Tais estudos, em geral, mostram resultados relevantes, pois sugerem que a leucina pode agir diretamente na fibra muscular esquelética minimizando a

degradação proteica e aumentando a capacidade de síntese de proteínas musculares. Um deles reportou que a suplementação com leucina atenuou a perda de massa muscular induzida pela imobilização (112). Os autores observaram redução na expressão de componentes do sistema ubiquitina-proteassomo no músculo esquelético; mais especificamente, houve menor acúmulo de proteínas ubiquitinadas e menor expressão de E3-ligases (E3- α , MAFbx/atrogin-1 e MuRF1), sugerindo que a suplementação com leucina reduz a atividade proteolítica. Outro estudo observou que a suplementação com leucina em animais que consumiam dieta com baixo teor de proteínas, não atenuou a expressão de MAFbx/atrogin-1 e MuRF1 (115). Porém, uma diminuição na expressão do marcador de autofagia *protein ligth chain 3* (LC3-II) foi reportada, sugerindo que a leucina minimiza a degradação proteica do tecido muscular esquelético, uma vez que LC3-II é a isoforma ativa da proteína necessária para a produção de autofagossomos.

Embora os mecanismos moleculares pelos quais a leucina age sobre a facilitação do processo de tradução do RNAm ainda não tenham sido completamente elucidados, sugere-se que seu principal efeito esteja relacionado ao aumento tanto do número de ribossomos por célula muscular, quanto da eficácia dos mesmos em conduzir a síntese protéica (98, 100, 116, 117).

1.6 Justificativa e relevância do estudo

Estudos sistemáticos dos efeitos da leucina no processo de regeneração muscular ainda não haviam sido conduzidos. Apenas um estudo, datado de 1975, mostrou que a suplementação com leucina melhora a estrutura do músculo esquelético após lesão por esmagamento em animais (118). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na regeneração do músculo esquelético permanecem desconhecidos. Sendo assim, este estudo propôs-se a contribuir para o melhor entendimento dos efeitos da suplementação com leucina durante o processo de regeneração muscular. As análises foram conduzidas por meio da abordagem de diferentes fases da regeneração; como, instalação do processo inflamatório, ativação e proliferação de células satélites, diferenciação/maturação das fibras musculares em regeneração, recuperação da massa muscular após lesão, além da recuperação da função contrátil. A compreensão dos efeitos da leucina durante o processo de regeneração muscular

poderá servir de base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas não farmacológicas, visando o tratamento de lesões ou mesmo disfunções músculo-esqueléticas de diversas etiologias.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito da suplementação com leucina durante o processo de regeneração do músculo esquelético.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar os efeitos da suplementação com leucina nos seguintes aspectos do processo de regeneração do músculo soleus de ratos jovens:

- ✓ Aspectos macroscópicos e histológicos;
- ✓ Reestruturação de componentes da matriz extracelular;
- ✓ Incidência de macrófagos;
- ✓ Incidência de células satélites em proliferação;
- ✓ Incidência de células musculares em diferenciação;
- ✓ Perfil de ativação de elementos da via PI3K/Akt/mTOR;
- ✓ Perfil de ativação de elementos do sistema ubiquitina-proteassomo;
- ✓ Recuperação da função contrátil muscular.

2.2.2 Avaliar os efeitos da suplementação com leucina nos seguintes aspectos do processo de regeneração do músculo tibialis anterior (TA) de ratos jovens:

- ✓ Aspectos macroscópicos e histológicos;
- ✓ Reestruturação de componentes da matriz extracelular;
- ✓ Incidência de células musculares em diferenciação;
- ✓ Perfil de ativação de elementos da via PI3K/Akt/mTOR;
- ✓ Acúmulo de proteínas ubiquitinadas;
- ✓ Recuperação da função contrátil muscular.

3 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

Os efeitos da suplementação com leucina durante o processo de regeneração muscular foram avaliados nos períodos de um, três, 10 e 21 dias após lesão induzida por criolesão em músculos esqueléticos de ratos jovens. Optamos por estudar, principalmente, o músculo *soleus*, pois existem indícios de que aminoácidos de cadeia ramificada podem ser captados e metabolizados de maneira mais eficiente em músculos com predomínio de fibras do tipo I (119). Porém, também investigamos os efeitos da suplementação com leucina no músculo TA, um músculo com predomínio de fibras musculares do tipo IIb, no período de 10 dias após lesão no intuito de comparar a resposta regenerativa de músculos fenotipicamente distintos.

Os períodos de um, três, 10 e 21 dias após lesão foram abordados, pois representam “períodos-chave” para o estudo da necrose e do processo inflamatório, proliferação de células satélites, franca regeneração com intensa síntese proteica e restauração da estrutura muscular com recuperação funcional, respectivamente (41). Assim, as seguintes estratégias experimentais foram utilizadas:

3.1 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo específico 2.2.1

- ✓ *Análise macroscópica e histológica:* avaliação da massa muscular, da morfologia do tecido muscular, mensuração da área de secção transversal (AST) das fibras musculares e da área do infiltrado inflamatório;
- ✓ *Análise da reestruturação de componentes da matriz extracelular:* determinação da densidade do tecido conjuntivo e do colágeno tipo III, do conteúdo de colágeno e do perfil de ativação de elementos da via TGF- β /Smad;
- ✓ *Análise da incidência de macrófagos:* determinação da incidência de células marcadas com MAC387 (marcador de macrófagos);
- ✓ *Análise da incidência de células satélites em proliferação:* determinação da incidência de células co-marcadas com Pax7 (marcador de células

satélites quiescentes e ativadas) e MyoD (marcador de células satélites ativadas e em proliferação);

- ✓ *Análise da incidência de células musculares em diferenciação:* determinação da incidência de células marcadas com miosina de cadeia pesada neonatal (MyHC-neonatal) e miosina de cadeia pesada do tipo I ou II (MyHC-I ou II; isoformas adultas);
- ✓ *Análise do perfil de ativação de elementos da via PI3K/Akt/mTOR:* avaliação da expressão de elementos da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR;
- ✓ *Análise do perfil de ativação de elementos do sistema ubiquitina-proteassomo:* análise da expressão de proteínas ubiquitinadas e de E3-ligases (MAFbx/atrogin-1 e MuRF1), ativação de FoXO3a e atividade do proteassomo 26S;
- ✓ *Análise da função contrátil:* avaliação da contração muscular tetânica máxima e do desenvolvimento de fadiga muscular.

3.2 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo específico 2.2.2

A comparação dos efeitos da suplementação com leucina nos músculos *soleus* e TA foi realizada utilizando-se a maioria das estratégias supracitadas. Para as análises em que houve tal comparação, os dados referentes a ambos os músculos avaliados foram inseridos em uma mesma figura na seção Resultados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA – ICB/USP; # 87/2011).

4.1 Amostra

Foram utilizados ratos *Wistar* jovens (dois meses de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas (BEIRA MAR Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e acondicionados no biotério do Departamento de Anatomia (ICB/USP) com temperatura controlada entre 22 e 25 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

4.2 Grupos experimentais

Os efeitos da suplementação com leucina no músculo esquelético foram avaliados em diferentes períodos do processo de regeneração. Para isso, os músculos *soleus* e TA da pata esquerda foram submetidos à criolesão e os da pata direita foram utilizados como controle. Os animais foram divididos aleatoriamente da seguinte maneira:

a) Grupo criolesado – *um dia*; (n=5): O músculo *soleus* da pata esquerda dos animais foi submetido à criolesão (grupo Crio) e analisado após um dia. O músculo da pata contralateral (grupo C) foi utilizado como controle;

b) Grupo criolesado – *três dias*; (n=5): O músculo *soleus* da pata esquerda dos animais foi submetido à criolesão (grupo Crio) e analisado após três dias. O músculo da pata contralateral (grupo C) foi utilizado como controle;

c) Grupo criolesado – *10 dias*; (n=10): Os músculos *soleus* e TA da pata esquerda dos animais foram submetidos à criolesão (grupo Crio) e analisados após 10 dias. Os músculos da pata contralateral (grupo C) foram utilizados como controle;

d) Grupo criolesado – 21 dias; (n=5): O músculo *soleus* da pata esquerda dos animais foi submetido à criolesão (grupo Crio) e analisado após 21 dias. O músculo da pata contralateral (grupo C) foi utilizado como controle;

e) Grupo criolesado + leucina – um dia; (n=5): Os animais foram suplementados com leucina por três dias antes da criolesão e continuaram sendo suplementados até o final do período experimental (um dia após criolesão, grupo Crio+Leu). O músculo *soleus* da pata contralateral foi utilizado como controle apenas suplementado com leucina (grupo Leu);

f) Grupo criolesado + leucina – três dias; (n=5): Os animais foram suplementados com leucina por três dias antes da criolesão e continuaram sendo suplementados até o final do período experimental (três dias após criolesão, grupo Crio+Leu). O músculo *soleus* da pata contralateral foi utilizado como controle apenas suplementado com leucina (grupo Leu);

g) Grupo criolesado + leucina – 10 dias; (n=10): Os animais foram suplementados com leucina por três dias antes da criolesão e continuaram sendo suplementados até o final do período experimental (10 dias após criolesão, grupo Crio+Leu). Os músculos *soleus* e TA da pata contralateral foram utilizados como controle apenas suplementados com leucina (grupo Leu);

h) Grupo criolesado + leucina – 21 dias; (n=5): Os animais foram suplementados com leucina por três dias antes da criolesão e continuaram sendo suplementados até o final do período experimental (21 dias após criolesão, grupo Crio+Leu). O músculo *soleus* da pata contralateral foi utilizado como controle apenas suplementado com leucina (grupo Leu).

4.3 Suplementação com leucina

A leucina (L-leucine; gentilmente cedida pela empresa Ajinomoto Co., Inc, Tokyo, Japão) foi administrada oralmente (via gavagem, em 5 mL de água destilada), uma vez ao dia a uma dose correspondente a 1,35 g/kg de massa corporal, a qual corresponde a 100% da quantidade diária de leucina consumida por roedores em dieta padrão (120). Estudos mostraram que essa dose além de contribuir para o aumento da taxa de síntese proteica, apresenta também efeitos terapêuticos (95, 105, 121). A suplementação teve início três dias antes da criolesão

e prosseguiu até o final do protocolo experimental de acordo com os diferentes períodos estudados. Dessa maneira, os grupos de animais suplementados com leucina e avaliados nos períodos de um, três, 10 e 21 dias após lesão foram suplementados por quatro, seis, 13 e 24 dias, respectivamente. Os animais dos grupos controle receberam a mesma quantidade de solução salina (NaCl, 0,9%).

4.4 Criolesão

Para o procedimento de criolesão os animais foram anestesiados com coquetel de ketamina e xilazina (95 e 12 mg/kg de massa corporal, via intraperitoneal); e, em seguida, os músculos *soleus* e TA foram cirurgicamente expostos. A criolesão consiste de um ciclo de congelamento e descongelamento muscular; e, dessa forma, o procedimento foi realizado aplicando-se uma barra de ferro (0,4 x 0,4 cm para o músculo *soleus* e 0,4 x 1,0 cm para o músculo TA), previamente imersa em nitrogênio líquido, sobre a superfície dos músculos, durante 10 segundos. Após o descongelamento dos músculos, a pele dos animais foi suturada e os mesmos mantidos por alguns minutos sobre placa aquecida (37 °C) para evitar hipotermia (66, 122).

4.5 Coleta das amostras

Uma hora após a última dose suplementar de leucina os animais foram anestesiados (tiopental sódico, 5 mg/100g, via intraperitoneal) e sacrificados por deslocamento cervical, de acordo com normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)¹. Em seguida, os músculos foram removidos, pesados e separados para as análises histológicas e moleculares.

4.6 Análises histológicas

Os músculos destinados às análises histológicas foram previamente congelados em isopetano, posteriormente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Para que as lâminas histológicas fossem geradas com secções transversais de 10 µm de espessura, os músculos foram cortados em criostato

¹ www.cobea.org.br

(CM3050, Leica Biosystems, Nusloch, Alemanha). As figuras provenientes das análises foram montadas no programa Adobe PhotoShop (v7.0, San Jose, CA, EUA) e apenas ajustes referentes ao brilho e contraste foram realizados.

4.6.1 Análises morfométricas

Secções histológicas não fixadas foram coradas com azul de toluidina (Merck, Darmstadt, Alemanha) para a análise da morfologia geral, mensuração da AST das fibras musculares e quantificação da área do infiltrado inflamatório. As fotomicrografias foram capturadas em microscópio óptico (PCM 2000; Nikon, Chiyoda, Tokyo, Japão) e analisadas com o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para a análise da AST (μm^2) nos músculos controle foram mensuradas, aproximadamente, 500 fibras musculares. Nos grupos criolesados, a AST foi obtida apenas das fibras musculares em processo de regeneração identificadas pela presença do núcleo centralizado (123). Para a quantificação da área do infiltrado inflamatório toda a região do músculo não composta por fibras musculares foi considerada, indicando a extensão do processo inflamatório muscular. Essa análise foi expressa como porcentagem relativa à área total do músculo.

Para a quantificação da densidade do tecido conjuntivo muscular as lâminas foram coradas com *picrossirius red* (coloração em vermelho) e analisadas em microscopia ótica e também de luz polarizada (PCM 2000, Nikon). O sistema de planimetria por contagem de pontos (Image-Pro Plus) foi utilizado para a determinação da densidade de tecido conjuntivo pela marcação de 500 intersecções das linhas por campo. As intersecções que coincidiam com o tecido conjuntivo nas quatro áreas por secção selecionadas aleatoriamente de cinco secções histológicas por animal foram marcadas, correspondendo a um total de 10.000 intersecções por animal. A área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada pela divisão da soma do número de pontos coincidentes nas intersecções (tecido conjuntivo) pelo total de pontos e expressa como porcentagem relativa à área total do músculo (124).

4.6.2 Imunofluorescência

As secções transversais dos músculos destinadas à reação de imunofluorescência foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) em 0,2 M de *phosphate buffer* (PB) por 10 minutos a temperatura ambiente, bloqueadas com 0,1M de glicina em *phosphate buffer saline* (PBS) por cinco minutos e permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100/PBS por 10 minutos. As lâminas foram incubadas com uma solução contendo o anticorpo primário, 3% de *normal goat serum* e 0,3% de Triton X-100/0,1 M PB, *overnight* à 4 °C. Após a lavagem com 0,1M PB (três vezes de 10 minutos), uma solução contendo o anticorpo secundário e 0,3% de Triton X-100/0,1 M PB foi adicionada às lâminas e as mesmas permaneceram por duas horas em ambiente escuro. Após cinco minutos de lavagem em PBS as lâminas foram cobertas com as lamínulas utilizando-se a resina *Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI* (H-1200, Vector Labs, CA, EUA). As fotomicrografias foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Observer D1, Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com filtros FITC, rodamina e DAPI e utilizando-se objetiva de 20X.

Os anticorpos primários utilizados foram: mouse monoclonal anti-macrófagos MAC387 (1:200; AbCam; Cambridge, MA, EUA); Pax7 (1:500; Development Studies Hybridoma Bank, Tokyo, Japão); MyoD (1:500; AbCam); mouse monoclonal anti-colágeno III (1:250; AbCam); rabbit monoclonal anti-Smad2/3 (1:200; Cell Signaling, Massachusetts, MA, EUA); rabbit polyclonal anti-phosphorylated TGF beta receptor I (1:250; AbCam) e, rabbit polyclonal anti-FoXO3a (1:300; AbCam). Os anticorpos secundários utilizados foram os seguintes: FITC-conjugado goat anti-mouse (1:200; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, EUA); Rhodamine anti-rabbit (1:200; AbCam); CY3 donkey anti-mouse (1:200; Jackson ImmunoResearch); e, CY2 goat anti-rabbit (1:200; Jackson ImmunoResearch).

A determinação da área do colágeno do tipo III foi realizada pela técnica de planimetria por contagem de pontos, conforme descrito anteriormente (124). Para a análise da ativação e proliferação das células satélites foi considerada toda a área lesada dos músculos avaliados; o resultado foi obtido pela co-localização entre Pax7, MyoD e DAPI, sendo apresentado como resultado a porcentagem de células MyoD positivas (MyoD⁺) em relação à população total de células Pax7 positivas (Pax7⁺). A quantificação de macrófagos, núcleos positivos para FoXO3a, Smad2/3, e

os receptores de TGF- β (T β RI) fosforilados (marcação ao redor de núcleos celulares) foram obtidas em cinco campos aleatórios fotografados na área lesada dos músculos. As áreas desses campos foram também quantificadas (Image Pro-Plus) e somadas. Dessa maneira, o resultado foi expresso por meio da razão entre o número total e o volume (mm³) de tecido muscular lesado; sendo que o volume foi calculado pelo produto entre a AST (mm²) dos campos e a espessura da secção do tecido muscular (10 μ m) (125).

4.6.3 Imunohistoquímica

Secções transversais não fixadas foram submetidas à reação de imunohistoquímica para a detecção de fibras musculares em processo de diferenciação. Para isso, utilizado o kit comercial *Vectastain Elite ABC* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. As lâminas foram incubadas com o substrato de 3,3'-diaminobenzidina para peroxidase (Vector Laboratories) e contra coradas com hematoxilina para a identificação dos núcleos celulares. O anticorpo primário utilizado foi mouse monoclonal anti-neonatal myosin heavy chain (MyHC-neonatal; 1:20; Novocastra, Newcastle, RU). O anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse IgG conjugated horseradish peroxidase (1:20; Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories). Para a contagem das células positivas para MyHC-neonatal foi considerada a área do músculo esquelético em regeneração, sendo que a AST total também foi quantificada, uma vez que os dados foram expressos como porcentagem relativa à área total do músculo (Image Pro-Plus).

4.7 Western blotting

Para a extração das proteínas, as amostras foram homogeneizadas (Polytron PTA 20S; Brinkmann Instruments, Brinkmann, Canada) em tampão apropriado composto de 90 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 3 mM de MgCl²⁺, 5 mM de EDTA, 1% de glicerol, 1 mM de DTT, 0,04% de SDS, e coquetel de inibidores de protease (1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e inibidores de fosfatase, *PhosStop* (10%, Roche, Mannheim, Alemanha), pH 7,4. Já para a extração das proteínas para a análise da expressão de proteínas ubiquitinadas as amostras foram

homogeneizadas em tampão contendo 1 mM de EDTA, 6,25 mM de fosfato de sódio monobásico (pH 7,2), 0,625% de ácido deoxicólico de sódio e 0,625% de Nonidet P-40. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e a concentração total de proteínas foi determinada pelo método Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) (126). A seguir, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli (240 mM de Tris-HCl, 0,8% de SDS, 200 mM de beta-mercaptoetanol, 40% de glicerol e 0,02% de azul de bromofenol) na proporção de 1:1 (127). Quantidades iguais de proteínas (50 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) no aparelho para minigel (Mini-protean; Bio-Rad). A densidade do gel utilizado para as análises das proteínas ubiquitinadas foi padronizada em 8%; para as demais análises, essa densidade variou entre 6% e 15%, sendo determinada de acordo com a massa molecular de cada proteína. Em cada gel foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita por eletroforese a uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). As membranas foram coradas com Ponceau S para a confirmação da transferência de quantidades iguais de proteínas e em seguida lavadas com solução basal (0,5 M de NaCl; 50 mM de Tris-HCl em pH 7,4 e 0,1% de *Tween* 20). A seguir, as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários específicos, diluídos em solução bloqueadora (3% de albumina bovina, 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, e 0,02% de *Tween* 20). Após serem lavadas por três vezes (10 minutos cada) com solução basal, as membranas foram incubadas durante uma hora, em temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (diluído em solução basal) capaz de produzir uma reação de quimiluminescência. Após a incubação das membranas com anticorpo secundário, estas foram novamente lavadas com solução basal (três vezes de 10 minutos) e incubadas com os reagentes do kit ECL (ECL; Amersham, RU) por dois minutos.

Anticorpos primários utilizados:

- 1) Para análise do perfil de ativação da via PI3K/Akt/mTOR: a) rabbit monoclonal anti-mTOR total e fosforilada na serina 2448; b) rabbit

monoclonal anti-p70^{S6K} total, e fosforilada na serina 371 e na treonina 389; c) rabbit monoclonal anti-4E-BP1 total e fosforilada na treonina 70 e treonina 37/46; e d) rabbit monoclonal anti-eIF-4E (1:1000; Cell Signalling).

- 2) Para a determinação da expressão de proteínas ubiquitinadas e de E3-ligases: anti-ubiquitin (1:1500, Boston Biochem, Cambridge, Massachusetts, EUA), anti-MAFbx/atrogin-1 (1:1000; AbCam) e anti-MuRF1 (1:1000; Cell Signalling).
- 3) Para a quantificação de MyHC-I e MyHC-II: mouse polyclonal anti-slow myosin heavy chain (MyHC-I) e mouse polyclonal anti-fast myosin heavy chain (MyHC-II) (1:500, AbCam).

Como anticorpos secundários foram utilizados *horseradish* peroxidase (*goat anti-rabbit* e *anti-mouse*; Peroxidase-conjugated; 1:5000, Jackson ImmunoResearch Laboratorie), os mesmos são capazes de produzir uma reação de quimiluminescência, a qual foi capturada em filme fotográfico. Os filmes foram digitalizados em scanner e a densitometria das revelações foi realizada com o programa ImageJ (Scion Corp., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Como proteína normalizadora foi utilizada gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 1:1000, Cell Signalling).

4.8 Análise da taxa de síntese proteica muscular *ex vivo*

De acordo com Gonçalves et al. (2012) (128), as amostras foram rapidamente dissecadas, pesadas e mantidas em seu comprimento de repouso por meio de fixação dos tendões em suportes plásticos inertes. As amostras foram incubadas a 37 °C em tampão bicarbonato *Krebs-Ringer* (pH 7,4) tamponado com 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono, contendo glicose (5 mmol / L) e outros aminoácidos em concentrações semelhantes às do plasma de roedores (129). Após o período de 1 h (período de equilíbrio), foi adicionada L- [U-14C] tirosina (0,05 µCi/mL) ao meio de incubação, onde as amostras permaneceram durante 2 h. Subsequentemente, a estimativa da atividade específica de tirosina solúvel em ácido em cada amostra foi realizada medindo-se a radioatividade e a respectiva concentração de tirosina, a qual foi determinada pelo método de Waalkes e Udenfriend (130). Após a medição da radioatividade incorporada, a taxa de síntese

foi calculada usando-se a atividade específica de tirosina em cada amostra (131, 132). Este experimento exige a utilização de um músculo delgado o suficiente para garantir que a tirosina seja incorporada a todas as fibras musculares. Assim, foi utilizado o músculo *Extensor Digitorum Longus* (EDL) de ratos *Wistar* com 30 dias de idade, pois o mesmo atende as condições do experimento além de possuir as mesmas características fenotípicas do músculo TA. O procedimento de criação do músculo EDL foi o mesmo descrito no item 4.4.

4.9 Dosagem de hidroxiprolina

O conteúdo de hidroxiprolina muscular foi dosado por meio de ensaio colorimétrico utilizando-se kit comercial (Hydroxyproline Assay Kit; BioVision Inc., Milpitas, CA, EUA). O protocolo foi conduzido de acordo com as recomendações do fabricante.

4.10 Atividade do proteassomo 26S

Para avaliação da atividade catalítica do proteassomo 26S, extratos proteicos foram obtidos em tampão apropriado contendo 50 mM de Tris, pH 7,5, acrescido de 1 mM de ATP. A quantidade de proteína das amostras foi determinada pelo método Bradford (126) e 25 µg de proteína foram incubadas com substratos peptídicos fluorogênicos LLVY-AMC (para a atividade do tipo quimiotripsina) ou ARR-AMC (para a atividade do tipo tripsina) (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) em tampão contendo 20 mM de Tris, pH 7,5, 2,5 mM de $MgCl_2$ acrescido de 1 mM de ATP. A geração de fluorescência pela quebra dos substratos pelo proteassomo foi monitorada em espectrômetro fluorimétrico (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA) a 37 °C por 45 min nos comprimentos de onda de 365 e 440 nm para excitação e emissão, respectivamente.

4.11 Análise da função contrátil muscular *in vivo*

De acordo com estudos prévios do nosso grupo (66, 122) e no intuito de evitar possíveis efeitos da eletroestimulação em parâmetros celulares (133), dois outros grupos de animais (C e Leu; n=10) foram utilizados especificamente para esse

experimento. Os animais foram anestesiados com 1ml / 100g de Tribromoetanol (2,2,2-Tribromoethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e uma incisão foi feita no tornozelo dos mesmos para a exposição dos tendões dos músculos *soleus* e TA. Os animais foram posicionados sobre uma plataforma acrílica, a pata foi estabilizada e o tendão intacto dos músculos a serem analisados foi amarrado com uma linha (4-0) ao braço de alavanca de um servomotor (BIOPAC Systems, CA, EUA), o qual controla o comprimento muscular e faz a aferição da força produzida pelo músculo. O servomotor é controlado pelo computador que move o braço de alavanca a uma distância previamente estabelecida e com velocidade constante. Para a análise do músculo *soleus*, os animais foram posicionados em decúbito ventral e a pata foi fixada sobre a plataforma acrílica com o joelho totalmente estendido. Para a análise do músculo TA, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a pata foi fixada com a planta do pé totalmente em contato com a plataforma acrílica. O comprimento dos músculos foi ajustado com incrementos de 0,125 mm para a tensão isolada máxima (134).

Os músculos foram ativados via nervo isquiático, o qual foi cuidadosamente isolado de outros músculos e conectado a um eletro-estimulador (BIOPAC Systems). Uma duração de pulso de 0,2 ms foi utilizada durante as contrações. Durações de trem de pulso de 500 ms e 10 ms foram utilizadas para as contrações isoladas e tetânicas, respectivamente. A voltagem inicial foi fixada em 2 V e ajustada com incrementos de 2 V até que a tensão isolada máxima fosse atingida. A frequência de estimulação para determinação da contração tetânica máxima foi padronizada em 350 Hz para o músculo *soleus* e 200 Hz para o músculo TA. Para a avaliação da fadiga muscular, a mesma foi padronizada em 200 Hz (Tabela 1) (135, 136).

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para a análise da função contrátil muscular *in vivo*.

	Isolada	Tetânica (pré-fadiga)	Fadiga	Tetânica (pós-fadiga)
Duração	2 min	2 s	2 s / 4 s (10 estímulos)	2 s
Voltagem	2 V + 2 V	máxima	máxima	máxima
Frequência	0,2 Hz	<i>soleus</i> : 350 Hz TA: 200 Hz	<i>soleus</i> e TA: 200 Hz	<i>soleus</i> : 350 Hz TA: 200 Hz

2 V + 2 V: voltagem inicial de 2 V, a qual foi subsequentemente ajustada com incrementos de 2 V.

O protocolo, demonstrado esquematicamente na Figura 3, contém as seguintes etapas: a) 2 minutos de contrações isoladas, b) análise da primeira contração tetânica máxima (pré-fadiga), c) 2 minutos de contrações isoladas, d) análise da fadiga muscular por meio de 10 estimulações intermitentes de duração de 2 segundos, com intervalo de 4 segundos entre cada uma delas, e) 2 minutos de contrações isoladas, e f) análise da segunda contração tetânica máxima (pós-fadiga). Dessa maneira, foi possível avaliar o desenvolvimento de fadiga muscular, bem como comparar a capacidade de produção de força tetânica máxima antes e depois da mesma (pré e pós-fadiga, respectivamente). O computador coleta e analisa os dados de força, os quais são obtidos em gramas (g) e, posteriormente, convertidos para miliNewtons (mN). Durante o experimento, a região de exposição do tendão foi mantida hidratada com solução salina (NaCl, 0,9%).

Figura 3 – Diagrama representativo do protocolo para análise da função contrátil muscular *in vivo*.

Isoladas: 2 minutos de contrações isoladas; pré-fadiga: primeira contração tetânica máxima (2 s); fadiga: 10 contrações tetânicas submáximas subsequentes (2 s / 4 s); pós-fadiga: segunda contração tetânica máxima (2 s).

4.12 Análise estatística

Os dados estão expressos no formato de média e desvio padrão (DP). O teste *t*-Student foi realizado para analisar a quantificação da área do infiltrado inflamatório, a proliferação das células satélites e a quantificação de MyHC-neonatal, uma vez que para tais análises apenas os grupos Crio e Crio+Leu foram comparados entre si. A análise de variância (*General Linear Model – GLM*) foi realizada para a comparação múltipla entre mais de dois grupos dos feitos da lesão e da suplementação com leucina sobre a massa muscular, a AST das fibras musculares, a quantificação de macrófagos, a densidade da área de tecido conjuntivo e colágeno do tipo III, a quantidade de colágeno, a quantificação de receptores T β RI, Smad2/3, a marcação de núcleos positivos para FoXO3a, a atividade do proteassomo, a taxa de síntese proteica e a análise da expressão de proteínas (acúmulo de proteínas ubiquitinadas, E3-ligases, elementos da via PI3K/Akt/mTOR e isoformas de MyHC-I e II). Já os dados referentes à massa corporal e função muscular foram analisados pelo teste de modelos mistos para medidas repetidas (*Mixed Models to repeated measures*). Quando um valor significativo de *F* foi obtido, o *post-hoc* de Tukey foi conduzido para as múltiplas comparações propostas. Para as análises foi utilizado o programa SAS, versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), e as mesmas foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal, massa muscular e aspectos histológicos

O comportamento da massa corporal dos animais foi acompanhado durante o período mais longo do protocolo experimental (21 dias após lesão), onde foram realizadas duas pesagens semanais totalizando, portanto, seis medidas. A Figura 4 mostra que a massa corporal dos animais de ambos os grupos, controle não suplementado com leucina (C) e suplementado com leucina (Leu), não apresentou diferença significativa no período. Além disso, a avaliação da quantidade de ração e do volume de água consumidos, ambos avaliados no mesmo período, também não apresentou diferenças entre os grupos (Consumo de ração, C: 334,5 (60,9) g vs. Leu: 287,8 (49,1) g. Consumo de água, C: 550,8 (65,6) ml vs. Leu: 495,0 (53,1) ml).

Figura 4 – Massa corporal dos animais obtida realizando-se duas pesagens semanais durante o período de 21 dias após lesão.

Grupo de animais controle, não suplementados com leucina (C); grupo de animais suplementados com leucina (Leu).

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de modelos mistos para medidas repetidas (*Mixed Models*) com *post-hoc* de Tukey.

No período de um dia após lesão houve aumento na massa do músculo *soleus* (30%) em ambos os grupos (Crio e Crio+Leu), quando comparados àqueles não lesados (C e Leu) ($p \leq 0,05$; Tabela 2). No período de três dias após lesão, a massa muscular em ambos os grupos (Crio e Crio+Leu) foi menor (31%) em relação à observada nos mesmos grupos no período de um dia após lesão ($p \leq 0,05$; Tabela

2). A massa do músculo *soleus* do grupo suplementado com leucina (Leu) no período de 10 dias foi maior (33%) em relação àquela observada no mesmo grupo no período de um dia ($p \leq 0,05$; Tabela 2). Ainda no período de 10 dias, a massa do músculo *soleus* foi menor (31%) no grupo lesado não suplementado (Crio), em relação ao mesmo grupo do período de um dia após lesão ($p \leq 0,05$; Tabela 2); entretanto, nenhuma diferença foi observada no grupo lesado suplementado (Crio+Leu) em relação a ambos os grupos lesados (Crio e Crio+Leu) do período de um dia após lesão. Nos grupos avaliados no período de 21 dias, nenhuma diferença foi observada (Tabela 2).

Tabela 2 – Massa do músculo *soleus* (g) dos animais avaliados nos períodos de um, três, 10 e 21 dias após lesão.

Massa do músculo <i>soleus</i> (g)				
Períodos experimentais/Grupos	C	Crio	Leu	Crio+Leu
1 dia	0,10 (0,01)	0,13 (0,02) ^a	0,09 (0,03)	0,13 (0,02) ^a
3 dias	0,10 (0,01)	0,09 (0,02) ^b	0,09 (0,06)	0,09 (0,01) ^b
10 dias	0,11 (0,03)	0,09 (0,01) ^b	0,12 (0,06) ^b	0,11 (0,02)
21 dias	0,11 (0,01)	0,11 (0,01)	0,10 (0,01)	0,10 (0,01)

Soleus controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu).

^a diferença significativa vs. respectivos grupos C e Leu;

^b diferença significativa vs. respectivos grupos do período de um dia.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135)

Em relação à massa do músculo TA, a qual foi avaliada no período de 10 dias após lesão, observou-se redução (25%) no grupo submetido à criolesão (Crio) em relação àqueles não lesados (C e Leu) ($p \leq 0,05$; Tabela 3). O grupo lesado e suplementado (Crio+Leu) apresentou massa muscular menor (30%, $p \leq 0,05$) em

relação ao controle e não houve diferença quando o grupo apenas suplementado (Leu) foi comparado ao grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa do músculo TA (g) dos animais avaliados no período de 10 dias após lesão.

Massa do músculo TA (g)				
Período experimental/Grupos	C	Crio	Leu	Crio+Leu
10 dias	0,56 (0,03)	0,43 (0,04) ^a	0,59 (0,07)	0,41 (0,03) ^a

TA controle (C); TA submetido à criolesão (Crio); TA controle suplementado com leucina (Leu) e TA submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu).

^a diferença significativa vs. respectivos grupos C e Leu;

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

Secções histológicas do músculo *soleus* foram coradas com azul de toluidina e analisadas em cada um dos quatro períodos após lesão. Os músculos do grupo controle (C) e suplementados com leucina (Leu) apresentaram, nos períodos de um e três dias, fibras musculares com formato poligonal e núcleos periféricos, evidenciando a estrutura normal do tecido (Figura 5A, B, E e F, respectivamente). No período de um dia após lesão os músculos de ambos os grupos (Crio e Crio+Leu) apresentaram sinais significativos de danos, como evidenciados pelas fibras hipercontraídas, espaços vazios entre as fibras musculares e presença de infiltrado inflamatório; sinais característicos de necrose, rompimento do sarcolema e edema (Figura 5C e D, respectivamente). No período de três dias, os músculos dos grupos Crio e Crio+Leu ainda apresentavam sinais característicos de lesão, evidenciada por áreas claras entre as fibras musculares e infiltrado inflamatório (Figura 5G e H, respectivamente).

Figura 5 – Fotomicrografias representativas de secções transversais do músculo *soleus* em um e três dias após lesão.

A e E: *soleus* controle (C). B e F: *soleus* de animal suplementado com leucina (Leu) durante quatro e seis dias, respectivamente. C e G: *soleus* um e três dias após lesão (Crio), respectivamente. D e H: *soleus* de animal submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu) analisado após um e três dias, respectivamente. Setas indicam fibras musculares hipercontraídas. Asteriscos indicam processo inflamatório. Coloração com azul de toluidina. Barra: 50 μ m.

FONTE: Pereira et al. (2014) (135)

Os músculos *soleus* não lesados dos animais do grupo controle (C) e suplementado com leucina (Leu) nos períodos de 10 e 21 dias também apresentaram fibras musculares com formato poligonal e núcleos periféricos, evidenciando a estrutura tecidual normal (Figura 6A, B, E e F, respectivamente). Os músculos submetidos à criolesão (Crio e Crio+Leu) e analisados em ambos os períodos apresentaram fibras musculares em processo de regeneração com núcleos centralizados, característica que não foi observada nos músculos não lesados (C e Leu) (Figura 6C, D, G e H, respectivamente). Além disso, houve aparente redução no processo inflamatório em ambos os grupos submetidos à criolesão (Crio e Crio+Leu) nos períodos de 10 e 21 dias, quando comparados àqueles avaliados nos períodos de um e três dias (Figura 6C, D, G e H, respectivamente).

As secções histológicas do músculo TA, analisadas no período de 10 dias após lesão, mostraram que os grupos controle (C) e suplementado com leucina (Leu) apresentaram estrutura tecidual normal (Figura 6A e B, respectivamente); enquanto os submetidos à criolesão (Crio e Crio+Leu) apresentaram fibras com núcleos centralizados, caracterizando o processo de regeneração, além da presença de infiltrado inflamatório (Figura 6C e D, respectivamente).

Figura 6 – Fotomicrografias representativas de secções transversais dos músculos *soleus* (em 10 e 21 dias após lesão) e TA (em 10 dias após lesão).

soleus

TA

À esquerda, músculo *soleus* nos períodos de 10 e 21 dias após lesão. A e E: *soleus* controle (C). B e F: *soleus* de animal suplementado com leucina (Leu) durante 13 e 24 dias, respectivamente. C e G: *soleus* aos 10 e 21 dias após lesão (Crio), respectivamente. D e H: *soleus* de animal submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu) analisado aos 10 e 21 dias após lesão, respectivamente. À direita, músculo TA no período de 10 dias após lesão. A: TA controle (C). B: TA de animal suplementado com leucina (Leu) durante 13 dias. C: TA aos 10 dias após lesão (Crio). D: TA de animal submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu) analisado aos 10 dias após lesão. Setas indicam fibras musculares em regeneração com núcleo centralizado. Asteriscos indicam processo inflamatório. Coloração com azul de toluidina. Barra: 50 µm.

FONTE: Pereira et al. (2014) (135, 136)

Ainda nos períodos de 10 e 21 dias após lesão foi observado no músculo *soleus* que o grupo Crio apresentou menor AST das fibras musculares (53% e 26% de redução, respectivamente), quando comparados aos grupos C ($p \leq 0,05$; Figura 7A e B). No período de 10 dias, o grupo Crio+Leu apresentou fibras musculares com AST maior (40%) em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 7A); entretanto, nenhuma diferença foi observada nas análises realizadas aos 21 dias do protocolo experimental (Figura 7B). No que diz respeito aos grupos que não foram submetidos à criolesão foi observado aumento na AST das fibras musculares do grupo Leu em relação às do grupo C (45%) apenas no período de 10 dias, ou seja, após 13 dias de suplementação ($p \leq 0,05$; Figura 7A). Já no período de 21 dias, o grupo Leu, que neste caso foi suplementado durante 24 dias, não apresentou alteração em relação ao grupo C (Figura 7B).

No músculo TA observou-se menor AST (53%) das fibras de ambos os grupos submetidos à criolesão (Crio e Crio+Leu) quando comparados aos grupos não lesados ($p \leq 0,05$; Figura 7C). Entretanto, a suplementação com leucina não induziu alterações na AST das fibras musculares (Figura 7C).

Figura 7 – Área de secção transversal (AST) das fibras dos músculos *soleus* (em 10 e 21 dias após lesão) e TA (em 10 dias após lesão).

A e B: mensuração da AST das fibras do músculo *soleus* nos períodos de 10 e 21 dias após lesão, respectivamente. C: mensuração da AST das fibras do músculo TA no período de 10 dias após lesão. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu).

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135, 136)

No período de 10 dias após lesão, observou-se no grupo Crio+Leu do músculo *soleus* redução da área do infiltrado inflamatório em relação ao grupo Crio (70%, $p \leq 0,05$; Figura 8A). Tal redução também foi observada no músculo TA (48%, $p \leq 0,05$; Figura 8B).

Figura 8 – Área do infiltrado inflamatório dos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e B: área do infiltrado inflamatório dos músculos *soleus* e TA, respectivamente. *Soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu).

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pelo teste *t*-Student ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

5.2 Incidência de macrófagos

A incidência de macrófagos foi avaliada no músculo *soleus* no período de três dias após lesão. A Figura 9 mostra que o grupo Crio+Leu apresentou menor incidência dessas células (60%) em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$).

Figura 9 – Incidência de macrófagos no músculo *soleus* em três dias após lesão.

Soleus controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu).

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135)

5.3 Densidade da área de tecido conjuntivo e de colágeno tipo III, conteúdo de colágeno e perfil de ativação de elementos da via TGF- β /Smad

Os efeitos da leucina na reestruturação de componentes da matriz extracelular durante o processo de regeneração foram avaliados aos 10 dias após lesão. Em ambos os músculos *soleus* e TA, observou-se que a lesão provocou aumento na densidade da área de tecido conjuntivo do grupo Crio (*soleus*: 58%, TA: 84%) em relação ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 10A e B). O grupo Crio+Leu, por sua vez, mostrou redução na densidade da área de tecido conjuntivo (*soleus*: 60%, TA: 52%) em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 10A e B). Também foi observada redução significativa na densidade da área do tecido conjuntivo no grupo Leu em relação ao grupo C (*soleus*: 46%, TA: 66%, $p \leq 0,05$; Figura 10A e B).

A organização das fibras de colágeno foi analisada em microscopia de luz polarizada. Na Figura 10 observa-se que o grupo Crio de ambos os músculos apresentou área do tecido conjuntivo de coloração amarela e verde, o que indica fibras colágenas recém-formadas, e distribuídas pelo perímio e endomíio, principalmente. Já no grupo Crio+Leu observou-se fibras de coloração laranja e vermelha, principalmente no perímio. Fibras laranjas e vermelhas também foram observadas no grupo controle (C).

Figura 10 – Densidade da área do tecido conjuntivo dos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e B: fotomicrografias representativas de secções transversais e densidade da área do tecido conjuntivo dos músculos *soleus* e TA, respectivamente. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu). Coloração com *picrossirius red* e análise em microscopia óptica e de luz polarizada. Barra: 50 μ m.

^a diferença significativa vs. C;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

Secções histológicas do músculo *soleus* foram submetidas à reação de imunofluorescência para a análise da densidade da área de colágeno tipo III. O grupo Crio apresentou maior densidade da área de colágeno tipo III (180%) quando comparado aos grupos não submetidos à lesão (C e Leu) ($p \leq 0,05$; Figura 11A e B). A suplementação com leucina acarretou em significativa redução na densidade da área de colágeno tipo III no grupo Crio+Leu (60%) quando comparado ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 11A e B). Por outro lado, diferente das análises apresentadas anteriormente (densidade da área de tecido conjuntivo), não foi observada redução na densidade da área de colágeno tipo III no grupo apenas suplementado com leucina (Leu) em relação ao grupo controle (C).

Figura 11 – Densidade da área do colágeno tipo III no músculo *soleus* em 10 dias após lesão.

A: fotomicrografias representativas de secções transversais do músculo *soleus*. B: densidade da área de colágeno tipo III do músculo *soleus*. *Soleus* controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). Reação de imunodeteção de colágeno tipo III. Barra: 50 µm.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135)

O conteúdo de hidroxiprolina foi quantificado no intuito de avaliar a quantidade de colágeno no músculo TA no período de 10 dias após lesão. Observou-se aumento no conteúdo de hidroxiprolina (35%) no grupo Crio quando comparado ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 12). A suplementação com leucina foi capaz de reduzir o conteúdo de hidroxiprolina (39%) no músculo lesado (grupo Crio+Leu) em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 12). Por outro lado, os músculos não lesados e suplementados (grupo Leu) apresentaram valores semelhantes ao grupo C (Figura 12).

Figura 12 – Conteúdo de hidroxiprolina no músculo TA em 10 dias após lesão.

TA controle (C); TA submetido à criolesão (Crio); TA controle suplementado com leucina (Leu) e TA submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu).

^a diferença significativa vs. C;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

Secções transversais dos músculos *soleus* e TA foram submetidas à imunodeteccção de T β RI, receptor de TGF- β fosforilado, e de núcleos positivos para Smad2/3. As análises mostraram que a suplementação com leucina reduziu a expressão do receptor T β RI nos grupos submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu) de ambos os músculos (*soleus*: 62%, TA: 43%) quando comparados aos respectivos grupos Crio ($p \leq 0,05$; Figura 13A e B, músculo *soleus*. Figura 13C e D, músculo TA).

Figura 13 – Expressão de T β RI fosforilado nos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e C: fotomicrografias representativas de secções transversais dos músculos *soleus* e TA, respectivamente. B e D: quantificação de receptores TβRI por mm³ nos músculos *soleus* e TA, respectivamente. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu). Reação de imunofluorescência para identificação de TβRI (marcação em vermelho; painéis A e C). DAPI: marcação nuclear em azul, MERGE: co-marcação de TβRI e DAPI, indicados pelas setas. Barra: 50 μm.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

Em relação ao número de núcleos marcados com Smad2/3, a leucina também provocou significativa redução no grupo Crio+Leu de ambos os músculos (*soleus*: 69%, TA: 42%) em relação aos respectivos grupos Crio ($p \leq 0,05$; Figura 14A e B, músculo *soleus*. Figura 14C e D, músculo TA).

Figura 14 – Expressão de Smad2/3 ativado nos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e C: fotomicrografias representativas de secções transversais dos músculos *soleus* e TA, respectivamente. B e D: quantificação de Smad2/3 por mm³ nos músculos *soleus* e TA, respectivamente. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu). Reação de imunofluorescência para identificação de Smad2/3 (marcação em vermelho; painéis A e C). DAPI: marcação nuclear em azul, MERGE: co-marcação de Smad2/3 e DAPI, indicados pelas setas. Barra: 50 µm.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

5.4 Células satélites em proliferação

As células satélites em proliferação foram detectadas por meio da co-marcação de Pax7 e MyoD no músculo *soleus* no período de três dias após lesão. A quantificação foi realizada pelo número de células MyoD positivas (MyoD⁺) presentes na população total de células Pax7 positivas (Pax7⁺). Na Figura 15

observa-se que houve aumento do número de células satélites em proliferação no grupo Crio+Leu (49%) em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$).

Figura 15 – Células satélites em proliferação no músculo *soleus* em três dias após lesão.

A: fotomicrografias representativas de secções transversais do músculo *soleus*. B: quantificação de células satélites em proliferação (Pax7⁺/MyoD⁺). *Soleus* submetido à criolesão (Crio) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). Reação de imunofluorescência para identificação de células satélites em proliferação. Pax7: marcação em verde, MyoD: marcação em vermelho, DAPI: marcação nuclear em azul, MERGE: co-marcação de Pax7, MyoD e DAPI, indicados pelas setas. Barra: 50 μ m.

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pelo teste *t*-Student ($p \leq 0,05$).

5.5 Expressão de MyHC-neonatal, MyHC-I e MyHC-II

A análise da expressão de MyHC-neonatal foi realizada no intuito de detectar a presença de fibras musculares em diferenciação nos músculos *soleus* e TA no período de 10 dias após lesão. Na Figura 16 observa-se menor número de fibras em regeneração marcadas com MyHC-neonatal no grupo Crio+Leu de ambos os músculos (*soleus*: 64%, TA: 46%) em relação aos respectivos grupos Crio ($p \leq 0,05$; Figura 16A e B).

As expressões das isoformas adultas de MyHC nos músculos *soleus* e TA (MyHC-I e II, respectivamente) também foram analisadas nesse período. Inicialmente, observou-se que o grupo Leu apresentou aumento na expressão de MyHC-I no músculo *soleus* (190%) e que não houve alteração na expressão de MyHC-II nesse mesmo grupo no músculo TA, quando comparados aos respectivos grupos controle (C) ($p \leq 0,05$; Figura 16C). No grupo submetido à criolesão (Crio), houve aumento na expressão de MyHC-I no músculo *soleus* (70%) e redução na expressão de MyHC-II no músculo TA (87%) em relação aos respectivos grupos C ($p \leq 0,05$; Figura 16C). A expressão de ambas as isoformas aumentou no grupo Crio+Leu em relação aos respectivos grupos Crio (*soleus*: 40%, TA: 1900%, $p \leq 0,05$; Figura 16C).

Figura 16 – Expressão das isoformas de MyHC nos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e B: expressão de MyHC-neonatal nos músculos *soleus* e TA, respectivamente. C: expressão e análise densitométrica das isoformas adultas de MyHC (MyHC-I e II). *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). MM: massa molecular em kDa. U. A.: unidade arbitrária. Como proteína normalizadora foi utilizada GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Para a expressão de MHC-n os dados foram comparados entre os grupos pelo teste *t*-Student ($p \leq 0,05$). Para a expressão de MHC-I e II os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

5.6 Taxa de síntese proteica e perfil de ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR

A taxa de síntese proteica foi avaliada no músculo EDL no período de 10 dias após lesão. Como pode ser observado na Figura 17, o grupo não lesado e suplementado com leucina (Leu) não apresentou alteração na taxa de síntese proteica em relação ao grupo controle (C). Já o músculo submetido à criolesão

(grupo Crio) apresentou aumento (290%) em relação ao grupo C e, nesse caso, a suplementação com leucina foi capaz de potencializar a síntese proteica, pois o grupo Crio+Leu apresentou aumento (25%) quando comparado ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 17).

Figura 17 – Taxa de síntese proteica no músculo EDL em 10 dias após lesão.

EDL controle (C); EDL submetido à criolesão (Crio); EDL controle suplementado com leucina (Leu) e EDL submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). nmol Tirosoina.mg⁻¹.2h⁻¹: nmol de tirosina incorporada por mg de tecido ao longo de duas horas.

^a diferença significativa vs. C;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (136)

A análise da expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR foi realizada nos períodos de três e 10 dias após lesão; neste último, por ser considerado um período de franca regeneração com intensa síntese proteica, a análise foi mais detalhada.

As análises realizadas no músculo *soleus* no período de três dias após lesão (grupo Crio) mostraram aumento na expressão de p70^{S6K} fosforilada nos resíduos Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹ (89% e 79%, respectivamente) em relação ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 18A e B). Por outro lado, o aumento induzido pela lesão na fosforilação da p70^{S6K} não foi afetado pela leucina, pois a expressão desta no grupo Crio+Leu foi semelhante à do grupo Crio (Figura 18A e B). Além disso, o grupo Crio apresentou menor expressão de 4E-BP1 (80%) e eIF-4E (45%) quando comparado ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 18A e B). Por outro lado, no que diz respeito aos efeitos da leucina, foi observado aumento da ordem de quatro vezes na expressão de 4E-BP1 no grupo Crio+Leu em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 18A e B). Nos demais grupos, nenhuma alteração foi observada (Figura 18A e B).

Figura 18 – Expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR no músculo *soleus* em três dias após lesão.

A: expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR, p70^{S6K} fosforilada nos resíduos Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹, 4E-BP1 e eIF-4E. B: análise densitométrica da expressão dos referidos elementos da via PI3K/Akt/mTOR. *Soleus* controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). MM: massa molecular em kDa. U. A.: unidade arbitrária. Como proteína normalizadora foi utilizada GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

^a diferença significativa vs. C;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

As análises realizadas no músculo *soleus* no período de 10 dias após lesão mostraram que os músculos submetidos à criolesão (grupo Crio) apresentaram maior expressão de mTOR, mTOR fosforilada no resíduo Ser²⁴⁴⁸ e p70^{S6K} fosforilada nos resíduos Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹ em relação ao grupo C (90%, 30%, 100% e 80%, respectivamente) ($p \leq 0,05$; Figura 19A e B). A suplementação com leucina no músculo lesado (Crio+Leu) reduziu a expressão de mTOR e mTOR fosforilada no resíduo Ser²⁴⁴⁸ (42% e 45%, respectivamente) em relação ao grupo Crio ($p \leq 0,05$; Figura 19A e B). Por outro lado, o aumento na fosforilação da p70^{S6K} induzido pela lesão não foi afetado pela leucina, pois a expressão dessa proteína (em ambos os resíduos avaliados) no grupo Crio+Leu foi similar à do grupo Crio. Além disso, o grupo suplementado com leucina (Leu) apresentou diminuição (25%) na fosforilação da mTOR (Ser²⁴⁴⁸) em relação ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 19A e B). Nenhuma

alteração foi observada na expressão dos outros elementos avaliados, 4E-BP1, 4E-BP1 fosforilada nos resíduos Thr⁷⁰ e Thr^{37/46} e eIF-4E.

No músculo TA, as análises realizadas no período de 10 dias após lesão mostraram aumentos na fosforilação da p70^{S6K} em ambos os resíduos Ser³⁷¹ (140%) e Thr³⁸⁹ (190%), quando os grupos submetidos à criolesão (Crio e Crio+Leu) foram comparados ao grupo controle (C) ($p \leq 0,05$; Figura 19C e D). Por outro lado, não foram observadas alterações nas expressões de 4E-BP1 e eIF-4E (Figura 19C e D).

Figura 19 – Expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR nos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e C: expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR no período de 10 dias após lesão nos músculos *soleus* e TA, respectivamente. mTOR total e fosforilada no resíduo Ser²⁴⁴⁸, p70^{S6K} fosforilada nos resíduos Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹, 4E-BP1 total e fosforilada nos resíduos Thr⁷⁰ e Thr^{37/46} e eIF-4E. B e D: análise densitométrica da expressão dos referidos elementos da via PI3K/Akt/mTOR nos músculos *soleus* e TA, respectivamente. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu). MM: massa molecular em kDa. U. A.: unidade arbitrária. Como proteína normalizadora foi utilizada GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (General Linear Model – GLM) com post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135, 136)

5.7 Perfil de ativação do sistema ubiquitina-proteassomo

Iniciamos o estudo do principal sistema proteolítico muscular por meio da imunodeteção do factor de transcrição FoXO3a ativado. No período de três dias após lesão o músculo *soleus* apresentou aumento da ordem de 13 vezes no número

de núcleos positivos para FoXO3a em relação ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 20A e B) e a suplementação com leucina (grupo Crio+Leu) atenuou esse aumento (58% em relação ao grupo Crio, $p \leq 0,05$; Figura 20A e B).

Figura 20 – Núcleos positivos para FoXO3a no músculo *soleus* em três dias após lesão.

A: fotomicrografias representativas de seções transversais dos músculos *soleus*. B: quantificação de núcleos positivos para FoXO3a. *Soleus* controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). Reação de imunofluorescência para identificação de núcleos positivos para FoXO3a. FoXO3a: marcação em verde, DAPI: marcação nuclear em azul, MERGE: co-marcação de FoXO3a e DAPI, indicados pelas cabeças de setas. Barra: 50 µm.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135)

Resultados similares foram observados quando o músculo *soleus* foi analisado no período de 10 dias após lesão. O grupo Crio apresentou maior número de núcleos positivos para FoXO3a em relação ao grupo C (5,6 vezes, $p \leq 0,05$; Figura 21A e B) e a leucina atenuou esse aumento no grupo Crio+Leu (55% em relação ao grupo Crio, $p \leq 0,05$; Figura 21A e B).

Figura 21 – Núcleos positivos para FoXO3a no músculo *soleus* em 10 dias após lesão.

A: fotomicrografias representativas de secções transversais dos músculos *soleus*. B: quantificação de núcleos positivos para FoXO3a. *Soleus* controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). Reação de imunofluorescência para identificação de núcleos positivos para FoXO3a. FoXO3a: marcação em verde, DAPI: marcação nuclear em azul, MERGE: co-marcação de FoXO3a e DAPI, indicados pelas cabeças de setas. Barra: 50 µm.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135)

Sendo FoXO um regulador transcricional de duas importantes E3-ligases atuantes no músculo esquelético, MAFbx/atrogin-1 e MuRF1, a expressão de ambas também foi analisada no músculo *soleus* no período de três dias após lesão. Entretanto, não foram observadas alterações nos grupos avaliados (Figura 22A e B).

Figura 22 – Expressão de MAFbx/atrogin-1 e MuRF1 no músculo *soleus* em três dias após lesão.

A: expressão das E3-ligases, MAFbx/atrogin-1 e MuRF1, no músculo *soleus*. B: análise densitométrica da expressão das referidas E3-ligases. *Soleus* controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). MM: massa molecular em kDa. U. A.: unidade arbitrária. Como proteína normalizadora foi utilizada GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (General Linear Model – GLM) com post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Em prosseguimento às análises, o acúmulo de proteínas ubiquitinadas foi mensurado nos períodos de três dias (músculo *soleus*) e 10 dias (músculos *soleus* e TA) após lesão. Houve aumento no acúmulo de proteínas ubiquitinadas no grupo Crio em relação ao grupo C do músculo *soleus* em ambos os períodos avaliados (70% e 65%, $p \leq 0,05$; Figura 23A e B, respectivamente). A suplementação com leucina reduziu tal acúmulo gerado em decorrência da lesão (30% e 25%, $p \leq 0,05$; Figura 23A e B, respectivamente). No músculo TA, por sua vez, não houve alteração no acúmulo de proteínas ubiquitinadas aos 10 dias após lesão (Figura 23C).

Figura 23 – Expressão de proteínas ubiquitinadas nos músculos *soleus* e TA em três e 10 dias após lesão.

A e B: expressão de proteínas ubiquitinadas e análises densitométricas no músculo *soleus* nos períodos de três e 10 dias após lesão, respectivamente. C: expressão de proteínas ubiquitinadas e análise densitométrica no músculo TA no período de 10 dias após lesão. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu). MM: massa molecular em kDa. U. A.: unidade arbitrária.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135, 136)

Finalmente, a atividade do proteassomo 26S foi avaliada no músculo *soleus* no período de três dias após lesão. Houve aumento da atividade do tipo quimiotripsina apenas no grupo Crio+Leu quando comparado ao grupo Crio (100%, $p \leq 0,05$; Figura 24A). Em relação à atividade do proteassomo 26S do tipo tripsina, observou-se aumento somente nos grupos Crio e Crio+Leu em relação ao grupo C (100% e 133%, respectivamente, $p \leq 0,05$; Figura 24B).

Figura 24 – Atividade do proteassomo 26S no músculo *soleus* em três dias após lesão.

A: atividade do proteassomo 26S do tipo quimiotripsina. B: atividade do proteassomo 26S do tipo tripsina. *Soleus* controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). U. A. F./min: unidade arbitrária de fluorescência por minuto.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. Crio.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de variância de duas vias (*General Linear Model – GLM*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.8 Avaliação da função contrátil muscular

No intuito de investigar os efeitos da suplementação com leucina na recuperação funcional dos músculos *soleus* e TA, foram avaliadas a força tetânica máxima e a capacidade do músculo em resistir à fadiga.

Nos músculos *soleus* e TA avaliados no período de 10 dias, não foram observadas diferenças na força tetânica máxima mensurada antes do protocolo de fadiga muscular (pré-fadiga) entre os grupos não lesados (C e Leu) (Figura 25A e C, respectivamente). No músculo *soleus* avaliado após lesão (grupos Crio e Crio+Leu) a força tetânica máxima na condição pré-fadiga foi menor (50%) em relação àqueles não lesados (C e Leu) ($p \leq 0,05$; Figura 25A). No músculo TA avaliado após lesão, a força tetânica máxima na condição pré-fadiga foi menor (50%) apenas no grupo não suplementado com leucina (Crio) em relação ao grupo controle ($p \leq 0,05$; Figura 25C); e nenhuma alteração foi observada na força tetânica máxima quando o grupo lesado

e suplementado com leucina (Crio+Leu) foi comparado àqueles não lesados (C e Leu) (Figura 25C).

Após o primeiro estímulo tetânico para analisar a produção de força máxima (pré-fadiga), foi realizado o protocolo para indução de fadiga nos músculos *soleus* e TA e quatro valores, em um total de 10 estímulos coletados, foram analisados (1º, 4º, 7º e 10º estímulos, respectivamente). No grupo controle (C) do músculo *soleus* observou-se significativa perda de força, indicando fadiga, a partir do 4º estímulo (26% em relação ao 1º estímulo) e essa diferença permaneceu até o final do protocolo (7º e 10º estímulos – 31% e 27%, respectivamente, $p \leq 0,05$; Figura 25B). Porém, a suplementação com leucina (grupo Leu), fez com que o *soleus* não apresentasse sinais de fadiga, pois não foram observadas diferenças entre os quatro estímulos analisados (Figura 25B). O grupo submetido à criolesão (Crio) apresentou prejuízos funcionais ao longo dos quatro estímulos analisados (56%, 46%, 57% e 63% de queda, respectivamente) em relação ao grupo C ($p \leq 0,05$; Figura 25B). Além disso, quando os quatro estímulos foram comparados entre si, foi comprovado o desenvolvimento de fadiga, pois houve significativa queda na produção de força nos 7º e 10º estímulos analisados (37% em ambos quando comparados ao 1º estímulo, $p \leq 0,05$; Figura 25B). No grupo submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu), também foram observados prejuízos na produção de força (62%, 52%, 50% e 57% de queda, respectivamente) em relação aos grupos não lesados ($p \leq 0,05$; Figura 25B). No entanto, neste grupo não foram observadas alterações quando o 4º, 7º e 10º estímulos foram comparados ao 1º, sugerindo que a leucina preveniu o desenvolvimento de fadiga muscular mesmo durante o processo de regeneração (Figura 25B).

Na análise da fadiga do músculo TA, o grupo controle (C) apresentou indícios de fadiga a partir do 4º estímulo (30% em relação ao 1º estímulo) e essa diferença foi mantida até o final do protocolo (50% em relação ao 1º estímulo, $p \leq 0,05$; Figura 25D). A suplementação com leucina no grupo não submetido à criolesão (grupo Leu) não impediu o desenvolvimento de fadiga, pois houve queda na produção de força ao longo das 10 contrações (atingindo 30% em relação ao 1º estímulo, $p \leq 0,05$; Figura 25D). O grupo Crio não apresentou prejuízos funcionais significantes quando o 1º estímulo foi comparado àquele do grupo C (20%); no entanto, a produção de força diminuiu ao longo dos demais estímulos (atingindo 35% em relação ao 1º

estímulo, $p \leq 0,05$; Figura 25D). No grupo submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu), nenhuma diferença foi observada no 1º estímulo quando comparado ao grupo C; porém, a produção de força diminuiu 35% nos demais estímulos em relação ao 1º ($p \leq 0,05$; Figura 25D).

Finalmente, após o protocolo de indução de fadiga, aplicou-se a segunda estimulação tetânica máxima (pós-fadiga). No músculo *soleus*, os grupos não submetidos à lesão (C e Leu) não apresentaram diferenças em relação à estimulação pré-fadiga (Figura 25A). No grupo Crio observou-se queda na produção de força (42%) quando a estimulação pós-fadiga foi comparada à pré-fadiga ($p \leq 0,05$; Figura 25A). No grupo submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu) não houve prejuízo funcional na condição pós-fadiga (Figura 25A). No músculo TA todos os grupos apresentaram queda na produção de força tetânica máxima quando a condição pós-fadiga foi comparada à pré-fadiga (43%, 24%, 25% e 25% nos grupos C, Crio, Leu e Crio+Leu, respectivamente, $p \leq 0,05$; Figura 25D).

Figura 25 – Análise da função contrátil dos músculos *soleus* e TA em 10 dias após lesão.

A e C: força tetânica máxima dos músculos *soleus* e TA, respectivamente. B e D: desenvolvimento de fadiga muscular dos músculos *soleus* e TA, respectivamente. *Soleus* e TA controle (C); *soleus* e TA submetidos à criolesão (Crio); *soleus* e TA controle suplementados com leucina (Leu) e *soleus* e TA submetidos à criolesão e suplementados com leucina (Crio+Leu). Pré-fadiga e pós-fadiga, estimulações tetânicas máximas realizadas antes e depois do protocolo de indução de fadiga, respectivamente. 1^o, 4^o, 7^o e 10^o, estimulações avaliadas em um total de 10 coletadas. mN: miliNewton.

^a diferença significativa vs. C e Leu;

^b diferença significativa vs. pré-fadiga;

^c diferença significativa vs. 1^a estimulação.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de modelos mistos para medidas repetidas (*Mixed Models*) com *post-hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$).

FONTE: Pereira et al. (2014) (135, 136)

Quando a análise funcional nos animais do grupo de 21 dias após lesão foi realizada, não houve alteração na força tetânica máxima do músculo *soleus* nos quatro grupos avaliados (Figura 26).

Figura 26 – Análise da função contrátil do músculo *soleus* em 21 dias após lesão.

Soleus controle (C); *soleus* submetido à criolesão (Crio); *soleus* controle suplementado com leucina (Leu) e *soleus* submetido à criolesão e suplementado com leucina (Crio+Leu). Pré-fadiga e pós-fadiga, estimulações tetânicas máximas realizadas antes e depois do protocolo de indução de fadiga, respectivamente. mN: miliNewton.

Os dados foram comparados entre os grupos pela análise de modelos mistos para medidas repetidas (*Mixed Models*) com *post-hoc* de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Para que a função muscular seja preservada ao longo da vida é fundamental que o processo de regeneração do tecido muscular esquelético seja bem sucedido. Mecanismos reguladores da massa e da função muscular participam ativamente do processo de regeneração e, nesse aspecto, a suplementação com o aminoácido leucina pode representar uma boa estratégia terapêutica para maximizar a recuperação do músculo esquelético. Os resultados do presente estudo sugerem que a suplementação com leucina melhora a recuperação estrutural e funcional do músculo esquelético após lesão, pois minimiza a incidência de macrófagos, aumenta o número de células satélites em proliferação, acelera a reparação do tecido conjuntivo, além de contribuir para o controle da massa muscular.

6.1 Efeito da suplementação com leucina sobre a massa corporal e o comportamento alimentar dos animais

No presente estudo, foi avaliado se a massa corporal dos animais sofreria alterações devido à suplementação com leucina e se esse fato estaria relacionado a mudanças no comportamento alimentar. A suplementação com leucina via dieta, como a ração enriquecida com leucina, por exemplo, pode induzir alterações no paladar em roedores, o que causaria possíveis modificações no comportamento alimentar dos mesmos (137). Assim, no intuito de evitar possíveis interferências da leucina sobre o comportamento alimentar dos animais, utilizamos a suplementação via gavagem, pois evidências sugerem que esta não provoca alterações na ingestão alimentar (138). Os animais suplementados consumiram quantidades similares de ração e água quando comparados aos do grupo controle, apesar da alta dose suplementar de leucina utilizada (1,35 g/kg; equivalente a 100% das necessidades diárias do animal). Tal fato contribuiu para que a massa corporal fosse semelhante entre os grupos quando avaliados durante o período mais longo do protocolo experimental (21 dias). Estudos prévios nos quais a intolerância alimentar provocada pela leucina não foi observada, corroboram tais resultados (139, 140).

6.2 Efeito da suplementação com leucina sobre as alterações morfológicas do músculo esquelético em regeneração

Como esperado, o aumento na massa do músculo *soleus* foi observado apenas no grupo avaliado no período de um dia após lesão, uma vez que o intenso edema muscular é característico dessa fase (41, 141). Além disso, nenhuma alteração na massa muscular em resposta apenas à leucina foi observada quando os grupos suplementados foram comparados aos respectivos controles do mesmo período. Estudos que também utilizaram a suplementação com leucina por longos períodos (10 dias até oito semanas) corroboram, pelo menos em parte, esses resultados, uma vez que os mesmos não relataram alterações na massa muscular em seus grupos experimentais (142, 143). Observou-se aumento na massa do músculo *soleus* causado pela suplementação com leucina quando o grupo suplementado (Leu) do período de 10 dias foi comparado ao mesmo grupo do período de um dia. Por outro lado, a leucina não provocou alterações na massa do músculo TA.

Aumentos significantes na AST das fibras musculares do *soleus*, em ambos os grupos suplementados com leucina (Leu e Crio+Leu), foram observados no período de 10 dias; entretanto, nenhuma alteração foi observada na AST do *soleus* aos 21 dias e do TA aos 10 dias. Esse resultado corrobora, pelo menos em parte, o estudo de Baptista et al. (2010) (112), onde os autores observaram que a suplementação com leucina por um período próximo ao abordado neste estudo (sete dias), aumentou a AST das fibras do músculo *soleus* durante recuperação de atrofia induzida por imobilização.

As diferenças observadas nos efeitos da leucina sobre a AST das fibras musculares do *soleus* e do TA em regeneração, sem ter provocado aumento na massa muscular, levantou a hipótese de um possível efeito desse aminoácido sobre o remodelamento da matriz extracelular. O tecido conjuntivo garante a estrutura do músculo esquelético além de transferir a força, gerada pelas fibras, aos tendões através da fáscia muscular (20). Nesse contexto, Kaasik et al. (2011) (144) mostraram que alterações na estrutura da matriz extracelular estão relacionadas a prejuízos funcionais. Além disso, alterações na matriz extracelular podem afetar a plasticidade do músculo esquelético, uma vez que o reservatório biológico (nicho) das células satélites depende de sua adequada estrutura (145). Dessa forma,

analisamos a densidade da área do tecido conjuntivo e sua organização, o conteúdo de colágeno e a densidade da área de colágeno tipo III nos músculos em regeneração suplementados com leucina.

Observou-se a presença de fibras colágenas de coloração amarela e verde no perimísio e no endomísio dos músculos *soleus* e TA analisados aos 10 dias após lesão. Considerando-se que procolágenos e fibras colágenas finas e recém-formadas apresentam coloração entre amarela e verde, e fibras colágenas espessas apresentam coloração entre laranja e vermelha (146, 147), houve aumento da incidência de novas fibras colágenas (amarelas/verdes) em ambos os músculos, o que pode ser corroborado pelo aumento na densidade da área do tecido conjuntivo e no conteúdo de colágeno observado. Houve redução na incidência de fibras colágenas laranjas/vermelhas no grupo suplementado, porém não lesado. No entanto, o conteúdo de colágeno não foi alterado nesse grupo, sugerindo que a leucina não representa riscos ao funcionamento do músculo esquelético e de outros órgãos. A suplementação com leucina no músculo lesado provocou redução na incidência de fibras colágenas finas (amarelas/verdes), diminuição da densidade da área do tecido conjuntivo e diminuição do conteúdo de colágeno, fatores que possivelmente contribuíram para a melhora da função contrátil muscular no período de 10 dias após lesão.

Além disso, no músculo *soleus* também foi avaliada a expressão de colágeno tipo III, uma das mais abundantes proteínas da matriz extracelular e presente, predominantemente, no perimísio e endomísio (148). Nesse caso, a suplementação com leucina no músculo não lesado também não alterou a expressão do colágeno tipo III, o que não exclui a possibilidade de outras proteínas da matriz extracelular serem mais responsivas à leucina. Aos 10 dias após lesão, a leucina foi eficaz em reduzir a expressão de colágeno tipo III mostrando, portanto, que esse aminoácido pode contribuir para uma efetiva reparação do nicho das células satélites e de suas conexões vascular e neural.

No intuito de melhor compreender o possível efeito da leucina sobre o remodelamento da matriz extracelular durante o processo de regeneração muscular, a ativação de elementos da via indutora de fibrose TGF- β /Smad, o receptor de TGF- β (T β RI) e Smad2/3, foram avaliados; uma vez que estes elementos estão envolvidos na indução de fibrose em vários tecidos, incluindo o muscular esquelético

(26, 149). As análises indicaram que, no período de 10 dias após lesão, a leucina reduziu a expressão de T β RI e Smad2/3 em ambos os músculos estudados, o que corrobora a hipótese de que a suplementação com leucina minimiza o acúmulo de componentes da matriz extracelular por meio da atenuação da sinalização da via TGF- β . Estes dados estão de acordo com o achado de que a decorina, um proteoglicano que possui uma região interna rica em leucina, é capaz de modular a sinalização dependente de TGF- β por meio de sua interação com *low-density lipoprotein receptor-related protein-1* e, consequentemente, inibir o processo de fibrose muscular dependente de TGF- β (150).

A superfamília do TGF- β é composta de TGF- β 's (TGF- β 1, β 2 e β 3), as *bone morphogenic proteins* (BMP's), os fatores de crescimento e diferenciação (*Growth Differentiation Factor* – GDF's) e as activinas (149). A cascata de sinalização dessa superfamília ocorre por meio dos receptores transmembrânicos serina/treonina quinase dos tipos I e II (T β RI e T β RII), os quais também são denominados de *activin-receptor like kinases* (ALK) (151). Co-receptores auxiliares também foram identificados como reguladores do acesso dos membros da superfamília do TGF- β aos seus receptores. No caso do TGF- β , dois co-receptores são bem conhecidos, a betaglicana (receptor III do TGF- β) e a endoglicana (149, 151). As betaglicanas interagem com todas as três isoformas de TGF- β , embora com menos afinidade do que dos receptores do tipo I e II. O TGF- β liga-se primeiramente a betaglicana e então ao receptor II (T β RII), com o qual forma um complexo heteromérico. Subsequentemente, T β RI é recrutado, ocorre a dissociação da β glicana e o mesmo é fosforilado por T β RII, iniciando a sinalização intracelular com a fosforilação da proteína Smad2/3 (149, 151). Estas, quando ativadas, formam complexos heteroméricos com uma co-smad (Smad 4), a qual tem a função de conduzi-las ao núcleo da célula. Esses complexos Smad interagem com outros fatores de transcrição em regiões promotoras de genes alvo (como colágeno e fibronectina, por exemplo), regulando a transcrição dos mesmos (149, 151).

Esses resultados sugerem um impacto relevante da leucina na regeneração muscular, pois o remodelamento da matriz extracelular, por meio da atenuação da ativação de elementos da via indutora de fibrose TGF- β /Smad, pode contribuir para a reparação do nicho das células satélites. De fato, evidências sugerem que fatores extracelulares em contato com as células satélites, incluindo proteínas da matriz

extracelular, atuam no controle de suas funções (152). Além disso, o recente estudo de Urciolo et al. (2013) (153) mostrou que o colágeno tipo VI, outra proteína constituinte da matriz extracelular, é de fundamental importância para a manutenção do nicho das células satélites durante a regeneração muscular.

Outro evento importante que ocorre durante a regeneração muscular diz respeito ao processo inflamatório. A partir da ruptura do sarcolema das fibras musculares e o consequente aumento do conteúdo de Ca^{2+} citoplasmático, ocorre a ativação de proteases dependentes de Ca^{2+} e o início do processo inflamatório com a migração de, principalmente, neutrófilos e macrófagos para o local da lesão (59). Estudos mostraram que essas células inflamatórias possuem como função inicial a remoção de debris celulares; entretanto, recentemente, tais células têm sido associadas como promotoras do processo regenerativo, pois secretam citocinas capazes de ativar as células satélites (41, 47). Assim, em associação aos efeitos benéficos da leucina sobre o remodelamento da matriz extracelular de músculos em processo de regeneração, observou-se que este aminoácido também foi capaz de reduzir a incidência de macrófagos no tecido muscular no período de três dias, bem como a área do infiltrado inflamatório aos 10 dias após lesão. Sabe-se que, os aminoácidos de cadeia ramificada, dos quais a leucina faz parte, podem influenciar o processo inflamatório muscular, pois podem ser transaminados em glutamato para aumentar a síntese de glutamina, o qual, por sua vez, é um aminoácido altamente consumido por células inflamatórias em condições patológicas (154). Outro ponto a ser ressaltado é que os BCAA's poderiam atuar como doadores de nitrogênio para a síntese de glutamina no músculo esquelético (155). Dessa maneira, é possível lançar a hipótese de que a instalação do processo inflamatório tenha sido acelerada e tais células atuado de forma mais efetiva estimuladas pelo aumento do substrato energético derivado da suplementação com leucina aos três e 10 dias do processo de regeneração.

6.3 Efeito da suplementação com leucina nas células satélites em proliferação e nas células musculares em diferenciação durante a regeneração do músculo esquelético

Nossos resultados mostraram que a suplementação com leucina proporcionou aumento no número de células satélites em proliferação quando o músculo *soleus* foi avaliado aos três dias após lesão. Esses dados estão de acordo

com o estudo de Alway et al. (2013) (156), o qual reportou que a suplementação com β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB), um metabólito da leucina, aumenta a proliferação das células satélites no músculo esquelético de animais idosos durante recuperação após atrofia induzida por desuso. Hao et al. (2011) (157) também mostraram que a suplementação com HMB auxilia na recuperação muscular de animais idosos por meio do aumento na proliferação das células satélites e redução da apoptose. Além disso, tem sido demonstrado que o IGF-1 e a leucina podem ativar mioblastos *in vitro* por meio da ativação de mTOR (111).

Aos 10 dias após lesão houve redução do número de fibras musculares em diferenciação marcadas com MyHC-neonatal no grupo suplementado com leucina e, concomitantemente, aumento na expressão das isoformas adultas de MyHC-I e MyHC-II nos músculos *soleus* e TA, respectivamente; sugerindo que a leucina tenha acelerado a conversão da isoforma neonatal em isoformas adultas. Considerando-se que Haegens et al. (2012) (158) mostraram que a leucina induz acréscimo de proteínas miofibrilares em meio de cultura de células musculares, o aumento na AST das fibras do músculo *soleus*, assim como o aumento na taxa de síntese proteica no músculo EDL causados pela suplementação com leucina aos 10 dias após lesão, podem ter sido reflexo da conversão acelerada entre as isoformas de MyHC.

6.4 Efeito da suplementação com leucina sobre vias reguladoras da massa muscular durante o processo de regeneração do músculo esquelético

O aumento da AST das fibras do músculo *soleus* e da taxa de síntese proteica no músculo TA dos grupos suplementados com leucina aos 10 dias após lesão, nos levaram a investigar os mecanismos celulares responsáveis por controlar a síntese e a degradação de proteínas musculares. As vias de sinalização intracelular que controlam a síntese e a degradação proteica atuam de maneira coordenada e podem ser moduladas de acordo com a biodisponibilidade de aminoácidos (109, 159).

No período de três dias após lesão houve maior expressão da proteína p70^{S6K} fosforilada (Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹) no músculo *soleus*, sugerindo que nessa fase aguda após lesão há ativação do complexo mTORC1 o que está de acordo com o estudo de Miyabara et al. (2010) (66), onde foi reportado aumento na expressão dessa proteína também em período agudo após criolesão (um dia) do músculo *soleus*.

Entretanto, não foram observados efeitos da suplementação com leucina sobre a fosforilação de p70^{S6K}. Além disso, a lesão muscular acarretou em redução na expressão de 4E-BP1 e eIF-4E, possivelmente como consequência da proteólise característica dessa fase (41). Além disso, o intenso processo inflamatório muscular observado aos três dias após lesão pode ter sido a causa da menor expressão daquelas proteínas, pois estudos sugerem que a liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio podem inibir a formação do complexo mTORC1 e reduzir a fosforilação de 4E-BP1 (160, 161). Porém, a suplementação com leucina ocasionou a recuperação da expressão de 4E-BP1 e eIF-4E provavelmente via mecanismos independentes da ativação de p70^{S6K}. Uma possibilidade seria que a leucina ao reduzir o processo inflamatório muscular teria contribuído para a restauração da expressão dessas proteínas.

Aos 10 dias após lesão, fase caracterizada por franca regeneração com recuperação do tamanho das fibras musculares, observou-se maior expressão de mTOR, mTOR fosforilada (Ser²⁴⁴⁸) e p70^{S6K} fosforilada (Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹) no músculo *soleus*; e aumento na expressão de p70^{S6K} fosforilada (Ser³⁷¹ e Thr³⁸⁹) e na taxa de síntese proteica no músculo TA. De fato, estudos prévios do nosso grupo mostraram que nessa etapa do processo de regeneração, há aumento na expressão de mTOR e mTOR fosforilada, bem como na taxa de síntese proteica (66, 122), eventos importantes para a recuperação da AST das fibras musculares lesadas. No mesmo período, entretanto, não foram observadas quaisquer alterações nos demais elementos analisados, 4E-BP1, 4E-BP1 fosforilada (Thr⁷⁰ e Thr^{37/46}) e eIF-4E.

Estudos têm demonstrado que uma única dose de leucina é capaz de desencadear a síntese de proteínas musculares, por meio da ativação de elementos da via PI3K/Akt/mTOR (95, 108, 121, 162). No entanto, os resultados do presente estudo mostraram que a suplementação com leucina, aos três e 10 dias do processo de regeneração do músculo sóleo não potencializou a ativação dessa via. No músculo TA avaliado aos 10 dias após lesão, observou-se que a leucina não alterou a expressão de elementos da via PI3K/Akt/mTOR; porém, aumentou a taxa de síntese proteica no músculo submetido à criolesão. Esse resultado sugere que a ativação aguda da via PI3K/Akt/mTOR pela leucina tenha estimulado o aumento da síntese proteica e mantido-a elevada ao longo do período de 10 dias após lesão, pois tal condição requer a síntese de proteínas miofibrilares previamente

danificadas. Além disso, não se pode descartar o possível efeito da leucina em outras vias de sinalização intracelular envolvidas no controle da massa muscular, como as vias β -adrenérgica e *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (163, 164).

A menor expressão de mTOR e mTOR fosforilada no músculo *soleus* dos grupos suplementados com leucina (Leu e Crio+Leu) aos 10 dias do período experimental pode ser interpretada como um mecanismo protetor desencadeado pelo tecido muscular. Tal hipótese baseia-se em um recente estudo, no qual os autores reportaram que a hiperativação do complexo mTORC1 promove inibição do processo de autofagia, o que, em longo prazo, resulta em miopatia vacuolar no músculo esquelético (165). Outros estudos reportaram que a suplementação com leucina em longo prazo (cinco até oito semanas) não provocou estimulação de etapas essenciais da via de síntese proteica, sugerindo que a suplementação crônica não induz a fosforilação sustentada de mTOR, p70^{S6K} e 4E-BP1 (142, 143). Além disso, Newgard et al. (2009) (166) mostraram que a suplementação com BCAA por períodos variando entre 12 e 16 semanas foi responsável por elevar a fosforilação de mTOR e p70^{S6K} apenas em animais alimentados com ração rica em ácidos graxos. Esses dados ajudam a explicar os resultados do presente estudo, pois os autores não observaram alterações quando os animais foram alimentados com ração padrão.

Apesar dessa aparente discrepância envolvendo os efeitos agudos e crônicos da suplementação com leucina sobre a ativação da via PI3K/Akt/mTOR, alguns estudos sugerem possíveis mecanismos. Uma das possibilidades é que a própria ativação da p70^{S6K}, que ocorre em resposta à leucina (95), poderia induzir um possível mecanismo de feedback negativo, diminuindo a ativação da sinalização intracelular por meio da inibição do receptor de insulina do tipo 1 (IR-1) (167). Outra hipótese é em relação à diminuição da biodisponibilidade de outros aminoácidos essenciais, especialmente isoleucina e valina. A maior disponibilidade de leucina ativaria complexos enzimáticos responsáveis pela degradação dos BCAA's, resultando na redução da biodisponibilidade de isoleucina e valina, o que poderia acarretar em prejuízos na ativação da via de síntese proteica (168). Além disso, um fenômeno conhecido por "resistência anabólica aos aminoácidos", ou seja, a perda da capacidade do músculo esquelético em responder aos estímulos desse nutriente,

poderia ocorrer, uma vez que a síntese proteica é refratária às altas concentrações de aminoácidos (169).

Esses resultados reforçam a hipótese de que o controle da massa muscular durante o processo de regeneração, mesmo sob os efeitos da leucina, não depende unicamente da modulação da via PI3K/Akt/mTOR e do consequente aumento da síntese proteica, mas também de vias que controlam a proteólise muscular. Dessa maneira, no presente estudo, optou-se pela análise do sistema ubiquitina-proteassomo por ser o principal sistema proteolítico muscular (84).

A família de fatores de transcrição FoXO é responsável por integrar diferentes programações gênicas a fim de manter o controle de qualidade celular. Dentre os membros dessa família, FoXO3a é o mais expresso no tecido muscular além de ser regulador transcricional de duas importantes E3-ligases, MAFbx/atrogin-1 e MuRF1 (170). Nossos resultados indicaram aumento na ativação de FoXO3a e no acúmulo de proteínas ubiquitinadas aos três e 10 dias após lesão do músculo *soleus*; e os grupos submetidos à criolesão e suplementados com leucina, apresentaram atenuação da ativação de FoXO3a e do acúmulo de proteínas ubiquitinadas. Esses efeitos, no entanto, não foram acompanhados por alterações na expressão de MAFbx/atrogin-1 e MuRF1. Tais resultados estão de acordo com estudo prévio de nosso grupo, no qual foi reportado acúmulo de proteínas ubiquitinadas nos períodos de um e 10 dias após criolesão (66). Além disso, o estudo de Baptista et al. (2010) (112), conduzido em modelo de atrofia muscular induzida por imobilização, também mostrou que a leucina atenuou o acúmulo de proteínas ubiquitinadas e, nesse caso, reduziu a expressão de E3-ligases. Os efeitos da leucina no acúmulo de proteínas ubiquitinadas também foram previamente observados no tecido muscular de animais idosos. Após serem submetidos a oito dias de imobilização, tais animais foram acompanhados ao longo de 10, 20, 30 e 40 dias de recuperação e suplementação com leucina, e em todos os períodos houve redução do acúmulo de proteínas ubiquitinadas (171).

A suplementação com leucina tem sido utilizada como forma de terapia frente a diversos estímulos catabólicos. O estudo de Ventrucchi et al. (2004) (172), por exemplo, investigou os efeitos da leucina sobre o sistema ubiquitina-proteassomo em ratas com tumor de *Walker* durante o período gestacional. Os resultados mostraram que o músculo gastrocnêmio dos animais que receberam a dieta

enriquecida com leucina apresentou menor atividade do proteassomo em relação ao grupo controle em resposta ao desenvolvimento das células tumorais. Além disso, de acordo com Siu et al. (2011) (173), a redução da atividade do sistema ubiquitina-proteassomo foi responsável por minimizar os sinais patológicos observados após lesão muscular. Neste estudo, utilizando um inibidor específico da atividade do sistema ubiquitina-proteassomo (MG132), os autores reportaram melhoras estruturais no músculo esquelético de animais submetidos à lesão por compressão. Recentemente, Rom et al. (2013) (174) avaliaram os efeitos do MG132 e também da leucina sobre o catabolismo induzido pela toxicidade da fumaça do cigarro em cultura celular de miotubos. Os autores observaram que o tratamento com leucina preveniu a redução no diâmetro dos miotubos e a degradação de proteínas por meio da inibição das E3-ligases.

Esses estudos, portanto, sugerem que a inibição da atividade do sistema ubiquitina-proteassomo pode ser um mecanismo benéfico para a adaptação do tecido muscular frente aos mais diferentes estímulos. Uma possível explicação é que com a inibição da atividade do proteassomo pode ocorrer maior ativação do processo de autofagia (175); não significando, portanto, inibição da atividade proteolítica muscular, pois já é conhecido que para o adequado controle da massa muscular é necessária a ativação de tal processo (176).

Nossos resultados mostraram que a suplementação com leucina aumentou a atividade do proteassomo 26S no músculo *soleus* aos três dias após lesão. Este dado sugere que a leucina tenha contribuído para uma reciclagem mais eficiente das proteínas musculares danificadas o que, conseqüentemente, acarretou em redução no acúmulo de proteínas ubiquitinadas como mecanismo compensatório, o qual se estendeu até o período de 10 dias após lesão. Este resultado corrobora, pelo menos em parte, o estudo de Baehr et al. (2014) (177), no qual os autores reportaram maior atividade do proteassomo 26S em modelo de hipertrofia induzida por sobrecarga funcional, sugerindo que a ativação do sistema ubiquitina-proteassomo é parte essencial do processo de plasticidade do tecido muscular. O sistema ubiquitina-proteassomo também se mostra importante para o crescimento e desenvolvimento muscular, pois Kitajima et al. (2014) (178) avaliando a relação entre a atividade do proteassomo e o crescimento muscular em animais nocaute músculo-específico para Rpt3, um gene proteassomal, reportaram graves deficiências no desenvolvimento

muscular dos mesmos, uma vez que a atividade do proteassomo estava reduzida. Nesse estudo, os autores atribuíram tais resultados à menor taxa de reciclagem de proteínas musculares.

Além disso, o aumento da atividade do proteassomo não foi acompanhado de alterações na expressão das E3-ligases MAFbx/atrogin-1 e MuRF1. De fato, estudos apontam para uma aparente desconexão entre a expressão dessas E3-ligases e a atividade proteolítica muscular, fortalecendo a hipótese de que a análise isolada de ambas nem sempre pode ser considerada como reflexo da atividade proteolítica (177, 179, 180). No entanto, não se pode descartar o envolvimento de outras E3-ligases associadas à regulação da proteólise muscular (181).

Portanto, nossos resultados sugerem que a leucina auxilia na regeneração do tecido muscular após lesão por meio da modulação dos mecanismos celulares envolvidos na síntese e degradação de proteínas. Porém, tal interpretação ainda requer abordagens mais específicas; além disso, as relações entre a via PI3K/Akt/mTOR e o sistema ubiquitina-proteassomo ainda não foram completamente elucidadas (182, 183).

6.5 Efeito da suplementação com leucina sobre a função contrátil muscular durante o processo de regeneração do músculo esquelético

No intuito de investigar se as alterações estruturais moleculares induzidas pela suplementação com leucina durante o processo de regeneração muscular teriam impacto sobre a função contrátil muscular, análises funcionais foram realizadas nos períodos de 10 dias após lesão nos músculos *soleus* e TA e aos 21 dias apenas no músculo *soleus*.

Em 10 dias após lesão, os músculos *soleus* e TA apresentaram menor capacidade de produção de força máxima (contração tetânica máxima), bem como menor resistência à fadiga. Esses resultados corroboram estudos prévios do nosso grupo, os quais também indicaram prejuízos funcionais nessa etapa do processo de regeneração (66, 122). Entretanto, no músculo *soleus*, o grupo Crio+Leu não apresentou desenvolvimento de fadiga e manteve os níveis de força tetânica máxima entre as condições pré e pós-fadiga. Essa melhora funcional pode ser resultante da atenuação da ativação de elementos da via TGF- β /Smad, aumento do número de células satélites em proliferação, aceleração da conversão da isoforma

de MyHC-neonatal em MyHC adulta e modulação dos mecanismos reguladores da massa muscular, os quais contribuíram para a recuperação estrutural do tecido muscular.

A suplementação com leucina no músculo TA em regeneração teve um efeito estimulador sobre a função contrátil, pois não houve queda na produção de força tetânica máxima na condição pré-fadiga em relação ao grupo controle. Entretanto, tal efeito não foi suficiente para evitar o desenvolvimento de fadiga. Esse resultado pode estar relacionado à conversão acelerada da isoforma de MyHC-neonatal em MyHC adulta, que pode ter sido consequência do aumento da taxa de síntese proteica (66, 67, 123). Por outro lado, nos músculos TA não lesados e suplementados com leucina (grupo Leu), a força tetânica máxima pré-fadiga não foi diferente em relação ao controle, possivelmente porque nesse grupo a leucina não foi capaz de aumentar a síntese proteica. Além disso, nossos resultados estão de acordo com o estudo de van Norren et al. (2009) (184), o qual mostrou que após 20 dias de suplementação com leucina combinada a outros nutrientes, animais com caquexia induzida por câncer apresentaram melhora na função contrátil muscular. Nossos achados também podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo estudo de Pinheiro et al. (2012) (185), em que animais suplementados por quatro semanas com HMB apresentaram maior capacidade de produção de força máxima (força tetânica) e maior resistência à fadiga, benefícios funcionais atribuídos ao aumento nos conteúdos de ATP e glicogênio muscular.

Os estudos envolvendo estratégias nutricionais e desempenho físico em seres humanos também são escassos no que diz respeito à suplementação com leucina. Entretanto, os benefícios parecem ser evidentes tanto em relação ao desenvolvimento de força máxima quanto no que diz respeito à resistência a fadiga muscular. Walker et al. (2011) (186), por exemplo, mostraram que após oito semanas de suplementação com leucina e *Whey-Protein* os indivíduos apresentaram maior desenvolvimento de força nos membros superiores, fato atribuído ao aumento na quantidade de massa magra. Além disso, existem evidências de que a suplementação com leucina associada à manutenção de outros nutrientes fundamentais, como carboidratos e ácidos graxos, resulta em maior desenvolvimento de potência muscular e menor percepção de fadiga; o que pode

estar associado à atenuação da lesão muscular também em atletas de alto rendimento (187).

No período de 21 dias após lesão do músculo *soleus* nenhuma alteração funcional foi observada tanto no grupo controle quanto no grupo suplementado, indicando que a capacidade funcional, nessa fase do processo de regeneração, foi reestabelecida e não é influenciada pela suplementação com leucina.

6.6 Comparação do efeito da suplementação com leucina nos músculos *soleus* e TA durante o processo de regeneração muscular

Diante do exposto, observou-se que a suplementação com leucina induziu aumento na AST das fibras do músculo *soleus* em 10 dias após lesão, mas não na AST das fibras do músculo TA, embora a taxa de síntese proteica tenha aumentado no EDL, um músculo fenotipicamente similar ao TA. Além disso, houve atenuação da expressão de proteínas ubiquitinadas em 10 dias após lesão apenas no músculo *soleus* suplementado com leucina. Estes resultados sugerem que os mecanismos indutores do aumento na AST das fibras do músculo TA em resposta à leucina tenham ocorrido em período mais tardio após lesão (após 10 dias) e podem estar relacionados ao fato de que aminoácidos são captados e metabolizados de maneira menos eficiente em músculos com predomínio de fibras do tipo II (119). Tais eventos tiveram consequências funcionais, pois a leucina preveniu o desenvolvimento de fadiga no músculo *soleus* lesado enquanto no músculo TA lesado houve prevenção da queda da força tetânica máxima pré-fadiga. Por outro lado, em ambos os músculos, a leucina minimizou a área de infiltrado inflamatório, acelerou a restauração do tecido conjuntivo atenuando a ativação de elementos da via TGF- β /Smad e também estimulou a conversão entre as isoformas neonatal e adulta de MyHC.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a suplementação com leucina melhora a recuperação estrutural e funcional dos músculos *soleus* e TA após lesão. Mais especificamente, os efeitos da leucina em melhorar a recuperação do tamanho das fibras musculares em regeneração do *soleus* e do tecido conjuntivo dos músculos *soleus* e TA após lesão, parecem envolver a modulação de elementos do sistema ubiquitina-proteassomo e a atenuação da ativação de elementos da via TGF- β /Smad, respectivamente. Esses dados poderão servir de base para o desenvolvimento de futuras abordagens terapêuticas para a recuperação muscular após diversas situações de lesão ou mesmo em condições patológicas.

REFERÊNCIAS*

1. Gray H. Gray's Anatomia. 40 ed. Standring. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 1549 p.
2. Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. xii, 369 p.
3. Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. J Cell Physiol. 2010 Jul;224(1):7-16.
4. Junqueira LCC, J. Histologia básica: texto e atlas. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. 538 p.
5. Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. Front Physiol. 2013;4:363.
6. Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. Mol Cell Biol Hum Dis Ser. 1993;3:210-56.
7. Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. J Anat. 1965 Jul;99(Pt 3):435-44.
8. Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. Development. 2012 Aug;139(16):2845-56.
9. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1994;123:213-57.
10. Makovicky P, Jilek F. Short review of some properties of muscular proteins. Cesk Fysiol. 2008;57(1):10-4.
11. Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. Science. 1993 Jul 2;261(5117):58-65.
12. Vale RD. Getting a grip on myosin. Cell. 1994 Sep 9;78(5):733-7.
13. Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Sep;4(9):679-89.
14. Ebashi S. Excitation-contraction coupling. Annu Rev Physiol. 1976;38:293-313.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

15. Sandow A. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Pharmacol Rev.* 1965 Sep;17(3):265-320.
16. MacIntosh BRG, P. F.; McComas, A. J. *Skeletal muscle: form and function.* Champaign: Human Kinetics; 2006. viii, 423 p.
17. Tesi C, Piroddi N, Colomo F, Poggese C. Relaxation kinetics following sudden Ca(2+) reduction in single myofibrils from skeletal muscle. *Biophys J.* 2002 Oct;83(4):2142-51.
18. Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev.* 2002 Jan;30(1):20-5.
19. Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):649-98.
20. Turrina A, Martinez-Gonzalez MA, Stecco C. The muscular force transmission system: role of the intramuscular connective tissue. *J Bodyw Mov Ther.* 2013 Jan;17(1):95-102.
21. Gillies AR, Lieber RL. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve.* 2011 Sep;44(3):318-31.
22. Cosgrove BD, Sacco A, Gilbert PM, Blau HM. A home away from home: challenges and opportunities in engineering in vitro muscle satellite cell niches. *Differentiation.* 2009 Sep-Oct;78(2-3):185-94.
23. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961 Feb;9:493-5.
24. MacDonald EM, Cohn RD. TGFbeta signaling: its role in fibrosis formation and myopathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2012 Nov;24(6):628-34.
25. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):199-210.
26. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011 Oct;29(5):196-202.
27. Pette D, Staron RS. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1990;116:1-76.
28. Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf).* 2010 Aug;199(4):451-63.
29. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1447-531.

30. Andersen JL, Aagaard P. Effects of strength training on muscle fiber types and size; consequences for athletes training for high-intensity sport. *Scand J Med Sci Sports*. 2010 Oct;20 Suppl 2:32-8.
31. Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res*. 2010 Oct;24(10):2857-72.
32. Vandeburgh HH. Dynamic mechanical orientation of skeletal myofibers in vitro. *Dev Biol*. 1982 Oct;93(2):438-43.
33. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Oct;287(4):C834-43.
34. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2006 Feb;33(2):155-65.
35. Caiozzo VJ, Swoap S, Tao M, Menzel D, Baldwin KM. Single fiber analyses of type IIA myosin heavy chain distribution in hyper- and hypothyroid soleus. *Am J Physiol*. 1993 Sep;265(3 Pt 1):C842-50.
36. Jarvinen M, Sorvari T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1975 Mar;83(2):259-65.
37. Gutierrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 2003 Dec 15;42(8):915-31.
38. Harris JB. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon*. 2003 Dec 15;42(8):933-45.
39. Toader-Radu M. Dynamics of regeneration in skeletal muscle following localized heat injury. *Morphol Embryol (Bucur)*. 1978 Jan-Mar;24(1):69-73.
40. Scharner J, Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):28.
41. Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des*. 2010;16(8):906-14.
42. Tiidus PM. Skeletal muscle damage and repair. Champaign: IL: Human Kinetics; 2008. xii, 337 p.
43. Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1993 Jul;265(1 Pt 2):R166-72.
44. Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve*. 1991 Jun;14(6):515-20.

45. Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2011 Jan;10(1):35-42.
46. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 2008;38(11):947-69.
47. Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Munoz-Canoves P. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:491497.
48. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013 Jan;229(2):176-85.
49. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol.* 2013;120:163-84.
50. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):1057-69.
51. Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci.* 2002 Oct;23(4):189-94.
52. Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003 Dec 8;163(5):1133-43.
53. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Dec;299(6):E1016-27.
54. Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* 2008 Jul 1;22(13):1747-52.
55. Perdiguero E, Kharraz Y, Serrano AL, Munoz-Canoves P. MKP-1 coordinates ordered macrophage-phenotype transitions essential for stem cell-dependent tissue repair. *Cell Cycle.* 2012 Mar 1;11(5):877-86.
56. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, et al. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Oct 13;106(41):17475-80.

57. Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J.* 2013 Sep;280(17):4118-30.
58. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209-38.
59. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Feb;288(2):R345-53.
60. Toumi H, F'Guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat.* 2006 Apr;208(4):459-70.
61. Motohashi N, Asakura A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:1.
62. Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007 Oct;16(5):857-68.
63. Yusuf F, Brand-Saberi B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol.* 2012 Aug;138(2):187-99.
64. Miyabara EH, Baptista IL, Lomonte B, Selistre-de-Araujo HS, Gutierrez JM, Moriscot AS. Effect of calcineurin inhibitors on myotoxic activity of crotoxin and Bothrops asper phospholipase A2 myotoxins in vivo and in vitro. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006 Jul;143(3):284-94.
65. Tsivitse S. Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis. *Int J Biol Sci.* 2010;6(3):268-81.
66. Miyabara EH, Conte TC, Silva MT, Baptista IL, Bueno C, Jr., Fiamoncini J, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo. *Muscle Nerve.* 2010 Nov;42(5):778-87.
67. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol.* 2001 Aug;91(2):534-51.
68. Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, et al. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(14):5434-8.
69. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):1009-13.
70. Wu M, Falasca M, Blough ER. Akt / protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *J Cell Physiol.* 2010 Jul 29;226(1):29-36.

71. Ge Y, Wu AL, Warnes C, Liu J, Zhang C, Kawasome H, et al. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Dec;297(6):C1434-44.
72. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008 Jun;23:160-70.
73. Taillandier D, Combaret L, Pouch MN, Samuels SE, Bechet D, Attaix D. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*. 2004 May;63(2):357-61.
74. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2005 Jan 28;280(4):2847-56.
75. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 1994 Oct 27;371(6500):762-7.
76. Philippou A, Halapas A, Maridaki M, Koutsilieris M. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Jul-Sep;7(3):208-18.
77. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Oct 15;122(Pt 20):3589-94.
78. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*. 1999 Jun 1;13(11):1422-37.
79. Hornberger TA, Sukhija KB, Chien S. Regulation of mTOR by mechanically induced signaling events in skeletal muscle. *Cell Cycle*. 2006 Jul;5(13):1391-6.
80. Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N, Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*. 1998 Feb 15;12(4):502-13.
81. Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, et al. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*. 1997 Oct 17;272(42):26457-63.
82. Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E715-29.
83. Sussman MA, Volkers M, Fischer K, Bailey B, Cottage CT, Din S, et al. Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev*. 2011 Jul;91(3):1023-70.

84. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):761-71.
85. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
86. Nedergaard A, Vissing K, Overgaard K, Kjaer M, Schjerling P. Expression patterns of atrogenic and ubiquitin proteasome component genes with exercise: effect of different loading patterns and repeated exercise bouts. *J Appl Physiol*. 2007 Nov;103(5):1513-22.
87. Murton AJ, Constantin D, Greenhaff PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Dec;1782(12):730-43.
88. Nosaka K, Sacco P, Mawatari K. Effects of amino acid supplementation on muscle soreness and damage. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2006 Dec;16(6):620-35.
89. Kraemer WJ, Hatfield DL, Volek JS, Fragala MS, Vingren JL, Anderson JM, et al. Effects of amino acids supplement on physiological adaptations to resistance training. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 May;41(5):1111-21.
90. Greer BK, Woodard JL, White JP, Arguello EM, Haymes EM. Branched-chain amino acid supplementation and indicators of muscle damage after endurance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2007 Dec;17(6):595-607.
91. Jackman SR, Witard OC, Jeukendrup AE, Tipton KD. Branched-chain amino acid ingestion can ameliorate soreness from eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2010 May;42(5):962-70.
92. Shimomura Y, Inaguma A, Watanabe S, Yamamoto Y, Muramatsu Y, Bajotto G, et al. Branched-chain amino acid supplementation before squat exercise and delayed-onset muscle soreness. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010 Jun;20(3):236-44.
93. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2):139-45.
94. Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch MN, Bechet D, Taillandier D, et al. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol*. 2005 Dec 1;569(Pt 2):489-99.
95. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr*. 2005 Mar;135(3):376-82.

96. Norton LE, Layman DK, Bunpo P, Anthony TG, Brana DV, Garlick PJ. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. *J Nutr.* 2009 Jun;139(6):1103-9.
97. Buse MG, Reid SS. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest.* 1975 Nov;56(5):1250-61.
98. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J Nutr.* 2001 Mar;131(3):856S-60S.
99. Anthony JC, Lang CH, Crozier SJ, Anthony TG, MacLean DA, Kimball SR, et al. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 May;282(5):E1092-101.
100. Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR, Jefferson LS. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J Nutr.* 2001 Apr;131(4):1171-6.
101. Norton LE, Layman DK. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *J Nutr.* 2006 Feb;136(2):533S-7S.
102. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000 Oct;130(10):2413-9.
103. Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Davis TA. Amino acid availability and age affect the leucine stimulation of protein synthesis and eIF4F formation in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Dec;293(6):E1615-21.
104. Pruznak AM, Kazi AA, Frost RA, Vary TC, Lang CH. Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside prevents leucine-stimulated protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 2008 Oct;138(10):1887-94.
105. Vary TC. Acute oral leucine administration stimulates protein synthesis during chronic sepsis through enhanced association of eukaryotic initiation factor 4G with eukaryotic initiation factor 4E in rats. *J Nutr.* 2007 Sep;137(9):2074-9.
106. Vary TC, Lynch CJ. Meal feeding enhances formation of eIF4F in skeletal muscle: role of increased eIF4E availability and eIF4G phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Apr;290(4):E631-42.
107. Yin Y, Yao K, Liu Z, Gong M, Ruan Z, Deng D, et al. Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs. *Amino Acids.* 2010 May 15.
108. Vary TC, Lynch CJ. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. *J Nutr.* 2007 Aug;137(8):1835-43.

109. Stipanuk MH. Leucine and protein synthesis: mTOR and beyond. *Nutr Rev.* 2007 Mar;65(3):122-9.
110. Kimball SR, Horetsky RL, Jefferson LS. Implication of eIF2B rather than eIF4E in the regulation of global protein synthesis by amino acids in L6 myoblasts. *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):30945-53.
111. Han B, Tong J, Zhu MJ, Ma C, Du M. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and leucine activate pig myogenic satellite cells through mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Mol Reprod Dev.* 2008 May;75(5):810-7.
112. Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve.* 2010 Jun;41(6):800-8.
113. Baptista IL, Silva WJ, Artioli GG, Guilherme JP, Leal ML, Aoki MS, et al. Leucine and HMB Differentially Modulate Proteasome System in Skeletal Muscle under Different Sarcopenic Conditions. *PLoS One.* 2013;8(10):e76752.
114. Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol.* 2006 Aug 15;575(Pt 1):305-15.
115. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids.* 2009 Oct;37(4):609-16.
116. Bolster DR, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *J Nutr.* 2004 Jul;134(7):1704-10.
117. Lynch CJ, Halle B, Fujii H, Vary TC, Wallin R, Damuni Z, et al. Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Oct;285(4):E854-63.
118. Rogulska A, Kurasz S. Regeneration of crushed skeletal muscles in experimental animals and the effect of leucine on the course of this process in white rat. *Pol Med Sci Hist Bull.* 1975 Mar-Apr;15(2):245-8.
119. Buse MG. In vivo effects of branched chain amino acids on muscle protein synthesis in fasted rats. *Horm Metab Res.* 1981 Sep;13(9):502-5.
120. Nutrition SoLA. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals.* Fourth Revised Edition ed. Washington, D.C.: National Academy Press; 1995. 192 p.
121. Lang CH, Frost RA, Deshpande N, Kumar V, Vary TC, Jefferson LS, et al. Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4E-BP1, S6K1, eIF4G, and mTOR in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Dec;285(6):E1205-15.

122. Conte TC, Silva LH, Silva MT, Hirabara SM, Oliveira AC, Curi R, et al. The beta2-adrenoceptor agonist formoterol improves structural and functional regenerative capacity of skeletal muscles from aged rat at the early stages of postinjury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 May;67(5):443-55.
123. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Apr;290(4):C1128-38.
124. Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*. 1981 Jan;121(Pt 1):75-88.
125. Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ, Brooks SV. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol* (1985). 2002 May;92(5):1873-8.
126. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
127. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
128. Goncalves DA, Silveira WA, Lira EC, Graca FA, Paula-Gomes S, Zanon NM, et al. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jan 1;302(1):E123-33.
129. Scharff R, Wool IG. Effect of diabetes on the concentration of amino acids in plasma and heart muscle of rats. *Biochem J*. 1966 Apr;99(1):173-8.
130. Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med*. 1957 Nov;50(5):733-6.
131. Fulks RM, Li JB, Goldberg AL. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem*. 1975 Jan 10;250(1):290-8.
132. Tischler ME, Desautels M, Goldberg AL. Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? *J Biol Chem*. 1982 Feb 25;257(4):1613-21.
133. Burch N, Arnold AS, Item F, Summermatter S, Brochmann Santana Santos G, Christe M, et al. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle. *PLoS One*. 2010;5(6):e10970.
134. Chan S, Head SI. Age- and gender-related changes in contractile properties of non-atrophied EDL muscle. *PLoS One*. 2010;5(8):e12345.

135. Pereira MG, Baptista IL, Carlassara EO, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PLoS One*. 2014;9(1):e85283.
136. Pereira MG, Silva MT, Carlassara EO, Goncalves DA, Abrahamsohn PA, Kettelhut IC, et al. Leucine supplementation accelerates connective tissue repair of injured tibialis anterior muscle. *Nutrients*. 2014 Oct;6(10):3981-4001.
137. Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MF, Rocco SA, Marin RM, Morari J, et al. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes*. 2008 Mar;57(3):594-605.
138. Koch CE, Goddeke S, Kruger M, Tups A. Effect of central and peripheral leucine on energy metabolism in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol B*. 2013 Feb;183(2):261-8.
139. Vianna D, Resende GF, Torres-Leal FL, Pantaleao LC, Donato J, Jr., Tirapegui J. Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats. *Nutrition*. 2012 Feb;28(2):182-9.
140. Zampieri TT, Pedroso JA, Furigo IC, Tirapegui J, Donato J, Jr. Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. *PLoS One*. 2013;8(12):e84094.
141. Miyabara EH, Aoki MS, Soares AG, Moriscot AS. Expression of tropism-related genes in regenerating skeletal muscle of rats treated with cyclosporin-A. *Cell Tissue Res*. 2005 Mar;319(3):479-89.
142. Balage M, Dupont J, Mothe-Satney I, Tesseraud S, Mosoni L, Dardevet D. Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle IR/PI3K signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. *J Nutr Biochem*. 2011 Mar;22(3):219-26.
143. Zeanandin G, Balage M, Schneider SM, Dupont J, Hebuterne X, Mothe-Satney I, et al. Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *Age (Dordr)*. 2011 Apr 7;34(2):371-87.
144. Kaasik P, Riso EM, Seene T. Extracellular matrix and myofibrils during unloading and reloading of skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 2011 Apr;32(4):247-53.
145. Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep*. 2013 Nov 29;14(12):1062-72.
146. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*. 1989;93(1):27-9.

147. Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C, et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension*. 1995 Jul;26(1):101-11.
148. Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23(3):245-54.
149. Hawinkels LJ, Ten Dijke P. Exploring anti-TGF-beta therapies in cancer and fibrosis. *Growth Factors*. 2011 Aug;29(4):140-52.
150. Cabello-Verrugio C, Santander C, Cofre C, Acuna MJ, Melo F, Brandan E. The internal region leucine-rich repeat 6 of decorin interacts with low density lipoprotein receptor-related protein-1, modulates transforming growth factor (TGF)-beta-dependent signaling, and inhibits TGF-beta-dependent fibrotic response in skeletal muscles. *J Biol Chem*. 2012 Feb 24;287(9):6773-87.
151. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):205-18.
152. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):23-67.
153. Urciuolo A, Quarta M, Morbidoni V, Gattazzo F, Molon S, Grumati P, et al. Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat Commun*. 2013;4:1964.
154. Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, Bechara LR, Voltarelli VA, Rogero MM, et al. Does Branched-Chain Amino Acids Supplementation Modulate Skeletal Muscle Remodeling through Inflammation Modulation? Possible Mechanisms of Action. *J Nutr Metab*. 2012;2012:136937.
155. Holecek M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition*. 2002 Feb;18(2):130-3.
156. Alway SE, Pereira SL, Edens NK, Hao Y, Bennett BT. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) enhances the proliferation of satellite cells in fast muscles of aged rats during recovery from disuse atrophy. *Exp Gerontol*. 2013 Sep;48(9):973-84.
157. Hao Y, Jackson JR, Wang Y, Edens N, Pereira SL, Alway SE. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced muscle fiber atrophy in aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Sep;301(3):R701-15.
158. Haegens A, Schols AM, van Essen AL, van Loon LJ, Langen RC. Leucine induces myofibrillar protein accretion in cultured skeletal muscle through mTOR dependent and -independent control of myosin heavy chain mRNA levels. *Mol Nutr Food Res*. 2012 May;56(5):741-52.

159. Nicastro H, Artioli GG, Dos Santos Costa A, Solis MY, da Luz CR, Blachier F, et al. An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. *Amino Acids*. 2010 Jun 1;40(2):287-300.
160. Frost RA, Lang CH. mTor signaling in skeletal muscle during sepsis and inflammation: where does it all go wrong? *Physiology (Bethesda)*. 2011 Apr;26(2):83-96.
161. Lang CH, Frost RA. Differential effect of sepsis on ability of leucine and IGF-I to stimulate muscle translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Oct;287(4):E721-30.
162. Murgas Torrazza R, Suryawan A, Gazzaneo MC, Orellana RA, Frank JW, Nguyen HV, et al. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *J Nutr*. 2010 Dec;140(12):2145-52.
163. Minetti GC, Feige JN, Rosenstiel A, Bombard F, Meier V, Werner A, et al. Galphai2 signaling promotes skeletal muscle hypertrophy, myoblast differentiation, and muscle regeneration. *Sci Signal*. 2011 Nov 29;4(201):ra80.
164. Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, et al. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1309-18.
165. Castets P, Lin S, Rion N, Di Fulvio S, Romanino K, Guridi M, et al. Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):731-44.
166. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*. 2009 Apr;9(4):311-26.
167. Tremblay F, Brule S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, et al. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28;104(35):14056-61.
168. Paxton R, Harris RA. Regulation of branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase. *Arch Biochem Biophys*. 1984 May 15;231(1):48-57.
169. Bohe J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *J Physiol*. 2003 Oct 1;552(Pt 1):315-24.
170. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):159-69.

171. Magne H, Savary-Auzeloux I, Migne C, Peyron MA, Combaret L, Remond D, et al. Contrarily to whey and high protein diets, dietary free leucine supplementation cannot reverse the lack of recovery of muscle mass after prolonged immobilization during ageing. *J Physiol*. 2012 Apr 15;590(Pt 8):2035-49.
172. Ventrucci G, Mello MA, Gomes-Marcondes MC. Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats a leucine-rich diet. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Dec;11(4):887-95.
173. Siu PM, Teng BT, Pei XM, Tam EW. Proteasome inhibition alleviates prolonged moderate compression-induced muscle pathology. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011 Mar 7;12:58.
174. Rom O, Kaisari S, Aizenbud D, Reznick AZ. Essential Amino Acid Leucine and Proteasome Inhibitor MG132 Attenuate Cigarette Smoke Induced Catabolism in C2 Myotubes. *Adv Exp Med Biol*. 2013;788:25-33.
175. Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol*. 2007 Aug;171(2):513-24.
176. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab*. 2009 Dec;10(6):507-15.
177. Baehr LM, Tunzi M, Bodine SC. Muscle hypertrophy is associated with increases in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. *Front Physiol*. 2014 Feb 21;5:69.
178. Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, Warita H, Kato M, Tateyama M, et al. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. *J Cell Sci*. 2014 Dec 15;127(24):5204-17.
179. Baehr LM, Furlow JD, Bodine SC. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J Physiol*. 2011 Oct 1;589(Pt 19):4759-76.
180. Vary TC, Frost RA, Lang CH. Acute alcohol intoxication increases atrogen-1 and MuRF1 mRNA without increasing proteolysis in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Jun;294(6):R1777-89.
181. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Sep 15;307(6):E469-84.
182. Quy PN, Kuma A, Pierre P, Mizushima N. Proteasome-dependent activation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is essential for autophagy suppression and muscle remodeling following denervation. *J Biol Chem*. 2013 Jan 11;288(2):1125-34.

183. Tang H, Inoki K, Lee M, Wright E, Khuong A, Sugiarto S, et al. mTORC1 promotes denervation-induced muscle atrophy through a mechanism involving the activation of FoxO and E3 ubiquitin ligases. *Sci Signal*. 2014 Feb 25;7(314):ra18.
184. van Norren K, Kegler D, Argiles JM, Luiking Y, Gorselink M, Laviano A, et al. Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice. *Br J Cancer*. 2009 Mar 10;100(5):713-22.
185. Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, de Souza-Jr AL, Vitzel KF, Nachbar RT, et al. Metabolic and functional effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Jul;112(7):2531-7.
186. Walker TB, Smith J, Herrera M, Lebegue B, Pinchak A, Fischer J. The influence of 8 weeks of whey-protein and leucine supplementation on physical and cognitive performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010 Oct;20(5):409-17.
187. Thomson JS, Ali A, Rowlands DS. Leucine-protein supplemented recovery feeding enhances subsequent cycling performance in well-trained men. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2011 Apr;36(2):242-53.