Ana Paula Tanaka Hayashi

Efeitos do treinamento de força associado à suplementação de leucina sobre adaptações musculares e funcionais de idosos com pré fragilidade e fragilidade: um subestudo do
“Pro-Elderly Study”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

SÃO PAULO

2019

Ana Paula Tanaka Hayashi

Efeitos do treinamento de força associado à suplementação de leucina sobre adaptações musculares e funcionais de idosos com pré fragilidade e fragilidade: um subestudo do
“Pro-Elderly Study”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Bruno Gualano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hayashi, Ana Paula Tanaka

Efeitos do treinamento de força associado à
suplementação de leucina sobre adaptações musculares
e funcionais de idosos com pré fragilidade e
fragilidade : um subestudo do "Pro-Elderly Study" /
Ana Paula Tanaka Hayashi. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientador: Bruno Gualano.

Descritores: 1.Suplementação nutricional
2.Síndrome da fragilidade 3.Sarcopenia 4.Força
muscular 5.Qualidade de vida 6.Envelhecimento
7.Efeitos terapêuticos

USP/FM/DBD-265/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais e ao meu filho Lucas Shigueru,
pelo amor e carinho dedicados todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Gualano que se fez presente em cada momento da minha formação acadêmica, desde o mestrado, e a quem tenho como exemplo devido à sua competência e integridade profissional. Muito obrigada pela oportunidade e dedicação direcionados ao meu ensino durante esses anos.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Hamilton Roschel por todo o conhecimento que adquiri durante as nossas discussões científicas. Muito obrigada por toda a paciência e tempo dedicado ao meu ensino, principalmente durante esse período final do meu doutorado.

Aos colegas e amigos do Grupo de Pesquisa em Fisiologia Aplicada & Nutrição e do Laboratório de Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força pela amizade, discussões científicas e risadas durante esta etapa da minha vida.

À minha família por sempre me apoiar e incentivar. Obrigada por todo carinho, amor, compreensão e suporte dado para que eu conseguisse trilhar o meu caminho.

Ao meu marido, amigo e companheiro, Felipe, que sempre me deu todo o apoio necessário para que eu conseguisse realizar os meus sonhos. Meus sinceros agradecimentos por todo carinho e amor dedicados ao longo desses anos, mesmo nos meus dias mais difíceis.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Programa de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) pelo enorme aprendizado e pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1 Alterações musculares decorrentes do processo de envelhecimento	5
3.2 Resistência anabólica e fragilidade	7
3.3 Estratégias para atenuar/combater os efeitos da resistência anabólica	9
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
4.1 Protocolo experimental	16
4.2 Seleção e recrutamento de voluntários.....	18
4.3 Avaliações iniciais para a inclusão no protocolo	22
4.3.1 Critérios de fragilidade.....	22
4.3.2 Teste ergométrico.....	24
4.4 Avaliações dos desfechos primários	24
4.4.1 Composição corporal	24
4.4.2 Área de secção transversa muscular.....	25
4.4.3 Força muscular dinâmica máxima	26
4.4.4 Força isométrica balística máxima.....	27
4.4.5 Avaliações da funcionalidade	28
4.5 Avaliações dos desfechos secundários	30
4.5.1 Densidade mineral óssea.....	30
4.5.2 Avaliações Sanguíneas.....	30
4.5.2.1. Dosagem glicêmica e insulinêmica.....	30
4.5.2.2 Perfil lipídico.....	31
4.5.3 Outras análises bioquímicas	31
4.5.4 Avaliação do consumo alimentar e avaliação do estado nutricional	33
4.5.5 Avaliação da qualidade de vida	33
4.6 Suplementação e vendamento	34
4.7 Protocolo de treinamento	34
4.8 Cálculo do tamanho da amostra	35
4.9. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO.....	56
8. ANEXOS.....	57
9. REFERÊNCIAS.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

1-RM	Força dinâmica máxima
25OHD	Vitamina D
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de secção transversa
BCAAs	Aminoácidos de cadeia ramificada
CPK	Creatina fosfoquinase
CV	Coefficiente de variação
DHL	Lactato desidrogenase
DMO	Densidade mineral óssea
DXA	Densitometria de dupla emissão com fonte de raios-X
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
FC	Frequência cardíaca
FPM	Força de preensão manual
GH	Hormônio do crescimento
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HOMA-IR	<i>Homeostase model assesement of insulin resistance</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMC	Índice de massa corporal
IR	Intervalo de recuperação entre as séries
LACRE	Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
MAN	Mini Avaliação Nutricional
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NaF	Fluoreto de sódio
PSE	Percepção subjetiva ao esforço
PTH	Paratormônio
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
RNAm	RNA mensageiro
SF-36	<i>Medical Outcomes Study 36 – Iten Short Form Healthy Survey</i>
SHBG	<i>Sex hormone-binding globulin</i>
TF	Treinamento de força
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gatilho de leucina para síntese de proteínas musculares.....	12
Figura 2. Limiares de leucina para síntese de proteínas musculares em jovens e idosos..	13
Figura 3. Delineamento dos grupos experimentais do “Pro-Elderly Study”	17
Figura 4. Desenho experimental do estudo.....	18
Figura 5. Fluxograma dos voluntários.....	21
Figura 6. Gráficos de dispersão individual do consumo médio de suplemento e adesão à suplementação dos grupos Leucina e Placebo.....	48
Figura 7. Gráfico de dispersão individual da adesão ao treinamento de força (%) dos grupos Leucina e Placebo.....	49
Figura 8. Gráficos de dispersão individual de volume de treino no leg press e supino.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ponto de corte para força de preensão manual que caracteriza a fragilidade.....	22
Tabela 2. Progressão do treinamento de força durante as 16 semanas de intervenção.....	35
Tabela 3. Principais características dos participantes.....	37
Tabela 4. Consumo energético e proteico antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.....	39
Tabela 5. Força e função muscular antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.....	41
Tabela 6. Área de secção transversa muscular e DEXA antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.....	41
Tabela 7. Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36 antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.....	43
Tabela 8. Parâmetros bioquímicos antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.....	44

RESUMO

Hayashi APT. *Efeitos do treinamento de força associado à suplementação de leucina sobre adaptações musculares e funcionais de idosos com pré-fragilidade e fragilidade*: um subestudo do “*Pro-Elderly Study*” [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A síndrome da fragilidade em idosos tem sido associada com o processo sarcopênico. Estudos agudos têm indicado que o emprego de exercício de força associado à suplementação de proteínas e aminoácidos, com destaque a leucina, parece ser uma promissora estratégia para atenuar a redução da massa muscular em idosos. Entretanto, aumentos de síntese proteica muscular agudamente não necessariamente se refletem em ganhos hipertróficos em longo prazo. **Objetivo:** Investigar os possíveis efeitos crônicos do treinamento de força associado à suplementação de leucina nas adaptações musculares e funcionais de idosos com pré-fragilidade e fragilidade. **Métodos:** Quarenta e quatro idosos com pré fragilidade e fragilidade foram submetidos a um programa de treinamento de força duas vezes por semana e suplementados com 7,5g de leucina ou placebo (divididos em três doses diárias) durante 16 semanas. Foram realizadas avaliações de massa muscular, funcionalidade, exames laboratoriais, consumo alimentar e qualidade de vida antes e após a intervenção. **Resultados:** Houve efeito do treinamento nos parâmetros de força dinâmica máxima (1-RM) no *leg press* ($p<0,0001$; diferença estimada: 14,28; IC95% 11,23 a 17,33 kg), 1-RM no supino ($p<0,0001$; diferença estimada: 4,53; IC95% 3,27 a 5,78 kg), pico de torque isométrico ($p=0,0005$; diferença estimada: 61,21; IC95% 28,50 a 93,62 N·m), *timed-up-and-go test* ($p=0,0156$; diferença estimada: 0,14; IC95% 0,03 a 0,26 s), *timed-stands test* ($p<0,0001$; diferença estimada: 1,37; IC95% 1,04 a 1,70

rep), massa magra apendicular ($p=0,0078$; diferença estimada: 0,36; IC95% 0,10 a 0,63 kg) e a AST do músculo vasto lateral ($p=0,0002$; diferença estimada: 0,56; IC95% 0,29 a 0,84 cm²). Contudo, a suplementação de leucina não alterou a resposta adaptativa ao treinamento. **Conclusão:** O treinamento de força, mas não a suplementação de leucina, pode promover aumento da função e massa muscular de idosos com pré fragilidade e fragilidade.

Descritores: Suplementação nutricional; Síndrome da fragilidade; Sarcopenia; Força muscular; Qualidade de vida; Envelhecimento; Efeitos terapêuticos.

ABSTRACT

Hayashi APT. *Effects of resistance training associated with leucine supplementation on muscle and functional adaptations in pre frail and frail elderly: a sub study of “Pro-Elderly Study”* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: The frailty syndrome is associated with the sarcopenic process. Acute studies showed that resistance exercise associated with protein and amino acid supplementation, especially leucine, have been shown effective to mitigate the effects of muscle decreasing in elderly. However, studies showing acute benefits do not necessarily reflect similar long-term responses. **Aim:** to investigate the effects of resistance training associated with leucine supplementation on muscle and functional adaptations in pre frail and frail elderly. **Methods:** Forty-four pre frail and frail elderly were engaged in a twice-a-week resistance training program and supplemented either 7.5g/d of leucine or placebo (divided into three daily doses) for 16 weeks. Muscular and functional evaluations, blood laboratory tests, food consumption and quality of life assessments were performed before and after the protocol. **Results:** There was main effect of time on maximum dynamic strength (1-RM) leg press ($p<0.0001$, estimated difference: 14.28, CI95% 11.23 a 17.33 kg), 1-RM bench press ($p<0.0001$, estimated difference: 4.53, CI95% 3.27 a 5.78 kg), peak torque peak ($p=0.0005$, estimated difference: 61.21, CI95% 28.50 a 93.62N·m), timed-up-and-go test ($p=0.0156$, estimated difference: 0.14, CI95% 0.03 a 0.26 s), timed-stands test ($p<0.0001$, estimated difference: 1.37, CI95% 1.04 a 1.70 rep), appendicular lean mass appendicular ($p=0.0078$, estimated difference: 0.36, CI95% 0.10 a 0.63 kg) and vastus lateralis CSA ($p=0.0002$, estimated difference: 0.56, CI95% 0.29 a 0.84 cm²), with

no influence of leucine supplementation. **Conclusion:** Resistance training, but not leucine supplementation, increased muscle mass and functionality in pre frail and frail elderly.

Descriptors: Nutritional supplementation; Fragility syndrome; Sarcopenia; Muscle strength; Quality of life; Aging; Therapeutic effects.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, o elevado número de pessoas idosas na população tem se tornado um fenômeno global. Projeções da Organização Mundial da Saúde estimam que em 2050 haverá 1,5 bilhão de pessoas com idade acima de 65 anos, fato este que tem motivado a busca por estratégias para melhorar a qualidade de vida desta população, caracterizada pelo decréscimo das suas funções orgânicas e capacidades funcionais (1, 2).

Em idosos, a presença de incapacidades encontra-se diretamente relacionada ao seu estado de saúde. A fadiga e a incapacidade de realizar atividades como subir um lance de escadas ou andar um quarteirão, são algumas das características que envolvem a síndrome da fragilidade (3), a qual é caracterizada pelo declínio progressivo da reserva funcional biológica e diminuição da resistência ao estresse. A fragilidade pode ocasionar aumento da vulnerabilidade e eventos adversos, incluindo: risco de quedas, fraturas, comprometimento cognitivos, institucionalizações, hospitalizações e morte (4-7). A definição mais utilizada para identificar esta síndrome inclui vários critérios, os quais se baseiam na perda de peso não intencional, fraqueza, exaustão auto referida, baixo nível de atividade física e velocidade de caminhada reduzida (6).

Apesar da fragilidade não apresentar etiologia bem estabelecida e estar atrelada a inúmeros processos fisiopatológicos (e.g., alterações hormonais, oxidativas e inflamatórias), alguns autores têm destacado uma importante associação desta síndrome com o processo sarcopênico (8-10) que, por sua vez, pode ser identificado pela redução progressiva de força e massa muscular, maior infiltração de gordura intramuscular e aumento do tecido conectivo (3). Estas modificações podem trazer implicações negativas

na capacidade funcional, atividades da vida diária, qualidade de vida e independência de idosos, bem como uma alta associação com o risco de morte (2, 11-14).

Nos últimos anos, pesquisadores que estudam o envelhecimento têm mudado o foco de avaliar determinantes de mortalidade e doenças para o desenvolvimento de estratégias que visem à longevidade com saúde, independência e bem-estar pessoal (15). Além disso, a necessidade de cuidados especiais para idosos com fragilidade gera um importante custo financeiro para o sistema de saúde pública (16), o que tem ocasionado um aumento no interesse de estudos com intervenções efetivas para atenuar ou até mesmo reverter esse quadro.

Inúmeros mecanismos estão associados à sarcopenia como, por exemplo, modificações nas fibras musculares, no número e função de células satélites, alterações no metabolismo das proteínas musculares, redução da quantidade de proteínas ingeridas e atividade física realizada (17-19). Evidências recentes têm indicado que, em idosos, a elevação da síntese de proteínas musculares após estímulos anabólicos isolados, como o exercício de força ou a suplementação de proteínas, é menor quando comparada a adultos jovens, sugerindo o desenvolvimento de uma resistência anabólica inerente ao processo de envelhecimento (19-24). Estudos agudos* também têm indicado que o emprego do exercício de força associado à suplementação de proteínas e/ou aminoácidos essenciais parece ser uma excelente estratégia para atenuar esses efeitos em idosos (25-28). Em contrapartida, estudos mostrando benefícios agudos não necessariamente refletem respostas similares à longo prazo. Investigações crônicas que avaliaram os efeitos do treinamento de força (TF) associado à suplementação em idosos com fragilidade têm apresentado resultados controversos sobre os aumentos na massa muscular (29-33). No que tange à suplementação, a leucina tem emergido como uma potencial estratégia

* Estudos laboratoriais com infusão ou ingestão de aminoácido marcado para avaliar a síntese proteica muscular e/ou a proteólise, medidas a partir das quais se pretende inferir balanço proteico e, em última análise, remodelamento muscular (atrofia e hipertrofia) em longo prazo.

nutricional para melhorar a resposta anabólica uma vez que está envolvida na via de ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a principal reguladora da síntese proteica e da tradução de RNA mensageiro (RNAm) (34). Com isso, dentre os aminoácidos, a leucina parece ser a responsável pela elevação da síntese de proteínas musculares pós-prandial e, sua quantidade, parece ser fator limitante para a ativação da mesma (28, 35, 36). Entretanto, na literatura, poucos estudos avaliaram os efeitos crônicos da ingestão de leucina na população idosa (22, 23). Desta forma, baseado na ausência de dados na literatura avaliando a ação crônica da associação de duas potenciais estratégias contra a fragilidade em idosos, como o TF e a suplementação de leucina, faz-se importante e necessária a condução de novas pesquisas nessa área.

2. OBJETIVOS

Investigar os possíveis efeitos crônicos do TF associado à suplementação de leucina nas adaptações musculares e funcionais de idosos com pré-fragilidade e fragilidade.

Como desfechos primários, foram avaliados: composição corporal, força e função muscular. Como desfechos secundários, foram avaliados: alterações ósseas, metabólicas, nutricionais e de qualidade de vida de idosos com pré-fragilidade e fragilidade.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Alterações musculares decorrentes do processo de envelhecimento

Alterações fisiológicas, como perda de unidades motoras, alterações do tipo de fibras, atrofia das fibras musculares e redução da ativação neuromuscular, podem afetar a velocidade e força dos movimentos, levando potencialmente à incapacidade funcional de idosos. As reduções de massa e força muscular que ocorrem no processo de envelhecimento são conceitualmente bem conhecidas na literatura (37). A redução da massa muscular tem sido observada a partir dos 30 anos de idade e tem-se verificado uma redução de 40% no total da área de secção transversa (AST) muscular em indivíduos com idade entre 20 e 60 anos (38, 39). No que tange a força muscular, estudos apontam uma diminuição de 20-40% e, com o aumento da faixa etária, esta redução é ainda mais expressiva (50%, ou mais, em indivíduos acima de 90 anos) (39, 40). Adicionalmente, foi demonstrado que a perda de força ocorre duas a cinco vezes mais rapidamente quando comparada à diminuição da massa muscular em idosos e parece ser um risco mais consistente para incapacidade motora e morte (41).

Há uma clara diminuição na quantidade de neurônios motores e unidades motoras funcionais no tecido muscular esquelético, assim como, maior atrofia e redução no número fibras musculares dos tipos I e II, ocorrendo preferencialmente nas fibras do tipo II e, conseqüentemente, diminuindo a razão de fibras musculares tipo II/tipo I (42). Sabe-se que entre os 50 e 80 anos de idade há uma redução de 50% do número de fibras musculares do músculo vasto lateral de homens (600.00 fibras para 323.000) (43) e que a desnervação de fibras musculares contribui com a perda de massa muscular devido à uma inervação insuficiente que pode levar a atrofia ou apoptose de fibras musculares (44).

Outro fator que tem recebido destaque no processo de envelhecimento muscular é a função prejudicada de células satélites: elas estão envolvidas no reparo muscular, desempenhando um importante papel na sua manutenção. Entretanto, com a idade, há uma redução de 50% no seu número, levando à uma piora na capacidade regenerativa do músculo (45). Estudos *in vitro* mostram que as células satélites envelhecidas apresentam redução na ativação, proliferação, formação de colônias e diferenciação (46) e são mais propensas a apoptose (47).

Células satélites ativadas expressam fatores miogênicos regulatórios de maneira similar à células precursoras musculares durante o desenvolvimento do músculo esquelético (48). Entretanto, com o envelhecimento, as células satélites desenvolvem uma maior propensão a diferenciarem-se em tipos de células fora da linhagem miogênica, resultando em diferenciação fibroblástica e adipogênica. Assim, as mudanças na composição muscular, observadas em idosos, como o aumento de gordura e tecido conjuntivo, podem ser explicadas parcialmente por essa adoção de fenótipos (44).

A arquitetura muscular é uma característica importante para a capacidade geradora de força e, com o processo de envelhecimento, alterações significativas avaliadas por métodos de imagem, como ressonância magnética e ultrassom, têm sido observadas. Narici et al. (2003) (49) demonstraram que idosos possuem uma redução da angulação e comprimento fascicular no músculo gastrocnêmio quando comparados a indivíduos jovens. Complementando esses achados, Kubo et al. (2003) (50) demonstraram que nessa mesma população há uma diminuição na penação angular do músculo vasto lateral de homens e mulheres. Tais fatos sugerem que, com o processo de envelhecimento, há uma importante alteração da arquitetura muscular, afetando a função muscular, uma vez que, um menor ângulo de penação reduz o número de fibras sobre a área, reduzindo a

capacidade de produzir tensão na unidade músculo-tendínea, enquanto a redução do comprimento da fibra muscular reduz a velocidade de encurtamento por diminuir o número de sarcômeros que estão em série (51).

3.2. Resistência anabólica e fragilidade

Indivíduos jovens, mesmo não envolvidos em qualquer tipo de exercício, possuem a massa muscular constante com uma dieta com o consumo adequado de calorias e proteínas, ou seja, o balanço entre a síntese e degradação proteica muscular desses indivíduos se mantém estável. Entretanto, com o envelhecimento, a redução progressiva da massa muscular se torna aparente devido às alterações da flutuação de síntese e degradação proteica, resultando em um expressivo balanço proteico negativo (52). Estudos envolvendo o balanço proteico no envelhecimento mostram que a redução muscular ocorre devido à um declínio nas taxas basais de síntese de proteínas musculares (35, 53) ou à um aumento da taxa basal de degradação de proteínas musculares (54) ou, ainda, devido à uma combinação dos dois processos, resultando no balanço proteico negativo (1). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que não existe diferença na síntese proteica basal de jovens e idosos saudáveis, sugerindo que o maior impacto sobre o balanço proteico em idosos advém da atenuação da magnitude da resposta anabólica pós-prandial (55) e pós-exercício (23).

Cuthbertson et al. (2005) demonstraram que a ingestão de 40g de aminoácidos essenciais (equivalentes a aproximadamente 100g de proteína) não foram suficientes para estimular as taxas de síntese de proteínas musculares em idosos como o observado em jovens, sugerindo que a habilidade em estimular a síntese após uma alimentação rica em aminoácidos parece ser prejudicada com o passar dos anos (20). Complementarmente,

estudos têm demonstrado que idosos, quando comparado a jovens, possuem uma resposta atenuada da síntese de proteínas musculares não só com a administração de aminoácidos (20, 56, 57), mas também com o exercício físico (23), reforçando a ideia de uma resistência anabólica promovida pelo envelhecimento.

Tem sido especulado alguns fatores que poderiam contribuir para essa resistência anabólica, como deficiências na digestão de proteínas e absorção de aminoácidos (58), na perfusão de tecido muscular mediada por insulina (59), na absorção de aminoácidos no músculo (60) ou devido à uma redução na quantidade ou no processo de ativação de proteínas-chave de sinalização (20, 22, 23). Ainda, especula-se que o metabolismo esplânico seja um importante sequestrador de aminoácidos no processo de envelhecimento, especialmente a leucina, fazendo com o que o aporte de aminoácidos necessários para o anabolismo muscular não chegue ao tecido muscular esquelético (61).

A resistência anabólica é um dos principais responsáveis pela atrofia muscular no envelhecimento (62) que, por sua vez, possui alta associação com a síndrome da fragilidade (8-10). A fragilidade é um termo utilizado para denotar uma síndrome multidimensional de perda de reservas energéticas, habilidades físicas, cognição e saúde que dão origem a vulnerabilidade. Não existe uma definição clínica única aceita para fragilidade e, com isso, a criação de diversas escalas para mensurar a fragilidade reflete a dificuldade em se definir essa síndrome. Dentre as mais utilizadas, a estabelecida por Fried et al. (2001) se baseia na perda de peso não intencional, fraqueza, exaustão auto referida, baixo nível de atividade física e velocidade de caminhada reduzida (6).

O declínio progressivo da reserva funcional biológica e a diminuição da resistência ao estresse promovidos pela fragilidade podem ocasionar um aumento do risco de quedas, fraturas, declínios cognitivos, institucionalizações, hospitalizações e até

mesmo a morte (4-7), justificando, assim, a busca por estratégias para atenuar ou até mesmo reverter esse quadro.

3.3.Estratégias para atenuar/combater os efeitos da resistência anabólica

Tem sido demonstrado, através de técnicas de ressonância magnética ou tomografia computadorizada, que protocolos de TF que utilizam 70%, ou mais, da força dinâmica máxima (1-RM) e com duração de dez a 14 semanas são capazes de promover o aumento de 5 a 12% na AST muscular de idosos. Adicionalmente, através da técnica de avaliação por biópsia muscular, o TF aumenta de 20 a 40% a área de uma única fibra muscular, mesmo em indivíduos com idade acima de 80 anos (63). Apesar de o exercício não prevenir por si só a redução de fibras do tipo II em comparação à indivíduos jovens, Korhonen et al. (2006) (64) demonstraram que o tamanho das fibras do tipo II eram superiores em idosos treinados quando comparados a idosos não treinados, sugerindo que a redução do tamanho da fibra muscular promovida pelo envelhecimento pode ser atenuada pelo treinamento à longo prazo.

Recentemente, Churchward-Venne et al. (2015) (65) demonstraram que existe uma grande heterogeneidade na resposta adaptativa ao TF em idosos, referente ao ganho de massa muscular, tamanho de fibra muscular e nos aumentos de força e função muscular. Entretanto, os pesquisadores observaram que não existem não-respondedores aos benefícios do TF, sendo este indicado como excelente intervenção no envelhecimento da população.

Apesar de evidências mostrarem que a elevação da síntese de proteínas musculares após estímulos anabólicos isolados (*i.e.*; exercícios de força ou suplementação de proteínas) é menor em idosos quando comparada a adultos jovens (19-24), estudos agudos

têm indicado que o emprego do exercício de força associado à suplementação de proteínas e/ou aminoácidos essenciais parece ser uma ótima estratégia para atenuar os efeitos da resistência anabólica em idosos (25-28).

Por outro lado, investigações crônicas que avaliaram os efeitos do TF associado à suplementação de proteínas em idosos com fragilidade têm apresentado resultados controversos sobre os aumentos na massa muscular (29-33). Tieland et al. (2012) (31), por exemplo, submeteram idosos com fragilidade a um programa de TF (duas sessões por semana, durante 24 semanas) à uma suplementação (duas doses diárias de 15g) de proteína do soro do leite (*whey*) ou placebo e verificaram um aumento significativo na massa muscular do grupo que consumiu *whey*. Contrariando estes achados, Fiatarone et al. (1994) (32) observaram, na mesma população, que indivíduos que realizaram TF (três sessões por semana, durante 10 semanas) não apresentaram diferenças nas alterações da massa muscular entre o grupo que suplementou 240 ml de bebida contendo 360 kcal (60% de carboidrato, 23% de gordura e 17% de proteínas de soja) e o grupo placebo. A discrepância entre os estudos pode estar associada à diversos fatores, entre eles, o período de treinamento, a fonte e a quantidade de proteína suplementada.

No que tange à fonte de proteína, pesquisas têm demonstrado que a suplementação de *whey* promove maior elevação na síntese de proteínas musculares, em repouso e após o exercício de força, quando comparado à outras fontes de proteína (e.g., caseína e soja) (28, 35, 36). Possivelmente, os resultados podem estar atrelados à uma rápida taxa de absorção e elevada quantidade de aminoácidos, em especial, a leucina.

Luiking et al. (2014) (66) observaram em idosos saudáveis que a suplementação de *whey*, enriquecida com leucina, proporciona maior elevação na taxa de síntese de proteínas musculares pós-prandial quando comparada a um produto lácteo convencional.

Corroborando, o estudo proposto por Katsanos et al. (2006) (19) comparou os efeitos agudos de duas diferentes misturas de aminoácidos com diferentes concentrações de leucina (6,7g mix de aminoácidos, sendo 1,7g leucina [26%] vs. 2,8g leucina [41%]) presentes em 15g de *whey* no metabolismo proteico de indivíduos idosos. A pesquisa enfatizou a quantidade de leucina consumida como fator limitante, uma vez que a ingestão com maior concentração deste aminoácido foi capaz de estimular a síntese de proteínas musculares pós-prandial em idosos, enquanto o mesmo resultado não foi obtido com o consumo de menor dosagem.

Tang et al. (2009) demonstraram que diferentes fontes de proteína (*whey* vs. soja vs. caseína) possuem diferentes valores de síntese de proteínas musculares em repouso e em exercício (67), mostrando, mais uma vez, um ponto comum entre os estudos: a diferença nas concentrações de leucina, influenciando nas respostas de síntese de proteínas musculares.

Assim, o conceito da leucina como gatilho para síntese de proteínas musculares tem sido baseado nas discussões que tangem as diferentes concentrações deste aminoácido desencadeando, ou não, a síntese de proteínas musculares. A velocidade de digestão, portanto o pico de leucinemia, seria o desencadeante da síntese, como ilustrado na Figura 1. O exercício de força, complementarmente, aumentaria a sensibilidade à leucina, diminuindo o seu limiar de gatilho. O envelhecimento e a inatividade, por sua vez, aumentariam o limiar da leucina, compondo, mais uma vez, o quadro de resistência anabólica (68).

Figura 1. Gatilho de leucina para síntese de proteínas musculares.

Adaptado de Phillips (2014).

Em jovens e idosos, esse limiar de leucina parece ser diferente, como ilustrado na Figura 2. Breen e Phillips (1) defendem a ideia de que os músculos de indivíduos jovens são altamente sensíveis às ações anabolizantes da leucina, uma vez que um grama de leucina ingerida por via oral parece ser suficiente para estimular a síntese de proteínas musculares em repouso. Em contraste, os idosos obtêm esses resultados positivos somente com dois gramas de leucina, encontrada, por exemplo, em 20 g de *whey*.

Figura 2. Limiares de leucina para síntese de proteínas musculares em jovens e idosos. Adaptado de Breen e Phillips (2011).

A suplementação de leucina tem sido estudada como uma promissora intervenção nutricional para a manutenção e/ou aumento do conteúdo de proteína muscular em diversas condições ou patologias que induzem a perda de massa muscular (e.g., câncer, diabetes do tipo 2, envelhecimento) (69). Estudos *in vitro* demonstraram que os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), em especial a leucina, possuem o potencial para regular o metabolismo proteico muscular, estimulando a síntese e atenuando a degradação de proteínas musculares (70-72). Posteriormente, estudos *in vivo* constataram que a leucina é capaz de estimular a síntese de proteínas musculares semelhante a uma refeição completa (73) e de maneira dose-dependente (74), ativando a via da mTOR que, por sua vez, aciona duas proteínas-chaves envolvidas na regulação da tradução do RNAm

de proteínas: a proteína ribossomal S6 quinase (S6K1) e a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) (75).

Na literatura, poucos estudos avaliaram os efeitos crônicos da ingestão de leucina na população idosa, os quais utilizaram, em sua maioria, uma mistura de aminoácidos com elevado percentual de leucina (76-83) que refletiu em um aumento de massa magra com (79) ou sem (81) melhoras na força e função muscular. Adicionalmente, Solerte et al. (2008) (80) mostraram que um maior período de intervenção (8-16 meses) resultou em ganho de 13-17% na massa magra associada à melhora de desempenho e força muscular nesta mesma população, sugerindo que o resultado pode ser mais expressivo a partir de protocolos que utilizem a suplementação com maior tempo de duração. Além disso, pesquisas que utilizaram a suplementação dessa mistura de aminoácidos rica em leucina associada ao estímulo mecânico advindo do TF, durante três meses, também se mostraram capazes em aumentar força muscular e capacidade física de idosos saudáveis (76-78), demonstrando um possível efeito sinérgico desta combinação.

No que tange ao efeito da ingestão de leucina isolada em idosos, Verhoeven et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação de leucina sobre a massa muscular sem a associação de um protocolo de TF (83). Durante três meses, os voluntários ingeriram 7,5 g/dia de leucina ou placebo divididas em três doses diárias. Os autores não observaram diferenças significativas nos ganhos de força e massa muscular. Entretanto, o estudo foi alvo de críticas uma vez que o período de ingestão de aminoácidos foi considerado como insuficiente na promoção de um possível efeito terapêutico em idosos saudáveis. Em função disto, Leenders et al. (2011) avaliaram os efeitos da ingestão de leucina sobre a massa muscular em uma população mais vulnerável (idosos com diabetes tipo 2) durante seis meses com o mesmo protocolo de suplementação (7,5 g/dia de leucina ou placebo

divididas em três doses diárias) também sem submetê-los ao TF (82). Novamente, não foram observadas diferenças significativas na força e massa muscular dos voluntários. Possivelmente, os resultados da suplementação isolada do aminoácido podem ter sido atenuados pela ausência do estímulo mecânico advindo do TF que, por sua vez, iria favorecer o estímulo nutricional proporcionado pela ingestão de leucina.

Adicionando algumas discussões na área, o estudo proposto por Trabal et al. (2015) teve o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de leucina combinada ao TF em idosos. Durante 12 semanas os voluntários eram submetidos a um protocolo de quatro dias de TF associado à suplementação de 10g de leucina (ou placebo) dividida em duas doses diárias consumidas nas refeições almoço e jantar (84). O estudo teve como resultado que a intervenção foi capaz de melhorar a força muscular isométrica no *leg press* e os resultados do teste de mobilidade funcional. Entretanto, o estudo contou com um *dropout* de 19 indivíduos de um total de 30 voluntários. Em função disto, o número amostral do estudo foi limitado a 11 voluntários. Ainda, vale a pena destacar que no grupo suplementado com leucina sete de 15 voluntários desistiram do estudo por não tolerar o suplemento enquanto apenas 4 voluntários desistiram de participar pelo mesmo motivo no grupo placebo. Tais informações, considerando o baixo valor amostral e os efeitos adversos da dosagem utilizada na suplementação, geram dúvidas em relação a extrapolação dos resultados como uma verdade absoluta.

Desta forma, baseado na presença de dados limitados na literatura avaliando os efeitos crônicos do TF associado à suplementação de leucina em idosos, faz-se importante e necessária a condução de novos estudos visando a ação sinérgica destas duas estratégias, principalmente em uma população mais vulnerável como a de idosos com pré-fragilidade e fragilidade.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Protocolo experimental

Trata-se de um subestudo do projeto intitulado "The effects of protein intake associated with resistance training in frail elderly individuals" ("Pro-Elderly Study") que é composto por uma série de sub-investigações que tiveram como objetivo explorar o potencial papel benéfico da ingestão de proteínas, aminoácidos e derivados associados ao TF em idosos com pré-fragilidade e fragilidade na qualidade de vida, composição corporal, força, e função muscular (Figura 3). O projeto foi inscrito no banco de ensaios aleatorizados norte-americano *Clinical Trial* (www.clinicaltrial.gov), conforme solicitado pelos jornais científicos de grande impacto na área de saúde (NCT01890382) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo no dia 11 de dezembro de 2014 (número do CAAE: 37499314.0.0000.5391). O estudo foi conduzido de janeiro de 2015 a junho de 2017. Em síntese, o "Pro-Elderly Study" teve como objetivo esclarecer as seguintes questões:

1) em idosos com pré-fragilidade/fragilidade submetidos ao TF, há diferença entre a suplementação de diferentes fontes de proteína (*whey* vs. soja)?

2) em idosos com pré-fragilidade/fragilidade submetidos ao TF, a suplementação de Cr é eficaz e segura? Ainda, se associada a suplementação de *whey* ela apresenta efeitos aditivos?

3) o TF associado à suplementação de *whey* ocasiona respostas diferenciadas entre homens e mulheres idosos com pré-fragilidade/fragilidade?

Adicionalmente a estas questões, o presente projeto de doutorado tem, como parte desse estudo proposto, adicionar a seguinte pergunta:

4) em idosos com pré-fragilidade/fragilidade submetidos ao TF, a suplementação da leucina isolada é capaz de melhorar a composição corporal, força e função muscular?

♀: mulheres; ♂: homens; 1: estudo comparando diferentes fontes de proteína; 2: estudo com suplementação de creatina; 3: estudo comparando homens e mulheres; 4: estudo com suplementação de leucina isolada.

Figura 3. Delineamento dos grupos experimentais do “Pro-Elderly Study”.

O projeto apresentou delineamento longitudinal, duplo-cego, controlado por placebo e aleatorizado, estratificado por sexo e força. Por se tratar de um subestudo de um projeto maior, a randomização foi realizada em blocos. A cada randomização, sete mulheres eram divididas entre os grupos Soja, Placebo Whey, Whey, Whey+Creatina, Placebo Whey+Creatina, Leucina e Placebo Alanina e, dois homens eram divididos entre os grupos Placebo Whey e Whey. Com isso, no presente estudo, apenas mulheres foram estudadas.

Todos os voluntários foram avaliados no período basal (PRÉ) e após 16 semanas de intervenção (PÓS) como ilustrado na Figura 4.

1-RM: força dinâmica máxima; ECG: eletrocardiograma; PRÉ: avaliações iniciais; PÓS: avaliações finais; TF: treinamento de força; TRIAGEM: anamnese + critérios de fragilidade.

Figura 4. Desenho experimental do estudo.

4.2. Seleção e recrutamento de voluntários

O recrutamento dos voluntários foi iniciado em dezembro de 2014. O fluxo de entrada foi contínuo e a triagem foi realizada no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE), situado no 4º andar do prédio dos ambulatórios do Hospital das Clínicas de São Paulo, e no Laboratório de Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força, localizado no 3º andar da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo. Foram considerados elegíveis aqueles que obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

- a) faixa etária ≥ 65 anos; e
- b) pré-frágeis e frágeis [segundo critério de Fried et al. (2001) (6)].

Foram excluídos aqueles que apresentavam pelo menos um dos critérios de exclusão:

- a) usuário de insulina exógena ou medicamentos que alterem as respostas musculares;

- b) portador de doença pulmonar obstrutiva crônica ou nefropatias;
- c) usuário de suplementos alimentares de proteínas, aminoácidos ou creatina;
- d) estar em dieta restritiva;
- e) ser vegetariano;
- f) estar engajado em programa regular com exercícios de força;
- g) portador de doenças como hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemias, cardiopatias, hiper ou hipotireoidismo não controlado; e
- h) possuir qualquer acometimento que comprometa a participação no estudo, tal como distúrbios do aparelho locomotor.

Os voluntários que se adequaram ao perfil supracitado foram convocados, informados sobre todos os detalhes do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram contatados 836 idosos. Destes, 636 foram excluídos pelos seguintes motivos: não cumprir o critério de inclusão (n=318), desistir de participar antes da randomização (n=127) e por outros motivos (n=191), como, por exemplo, não ser possível entrar em contato, não ser possível o deslocamento até o local ou realizar os treinos nos horários disponíveis. Assim, 200 idosos foram considerados elegíveis, sendo que 154 voluntários eram mulheres, que foram randomizadas em 7 grupos (22 mulheres por grupo), e 46 eram homens, que foram randomizados em 2 grupos (23 homens por grupo). Após a alocação dos grupos, como ilustrado detalhadamente no fluxograma apresentado na Figura 5, 13 voluntários desistiram por motivos pessoais e 12 voluntários desistiram por problemas de saúde não relacionados com o protocolo proposto. Em relação aos dois grupos utilizados para a análise deste presente estudo, apenas no grupo Leucina houve *dropout* do protocolo (n=4): duas voluntárias desistiram por motivos pessoais, uma por

contraindicação médica independente do protocolo (fratura no sacro) e a outra por contrair dengue durante as avaliações iniciais. No grupo Placebo Alanina nenhuma voluntária desistiu do protocolo após a randomização dos grupos.

Legenda: IDT: Intenção de Tratamento.

Figura 5. Fluxograma dos voluntários.

4.3. Avaliações iniciais para a inclusão no protocolo

4.3.1. Critério de fragilidade

Perda de peso não intencional, fraqueza, auto relato de fadiga crônica, velocidade lenta de caminhada e baixo nível de atividade física são os critérios de classificação para fragilidade estabelecidos por Fried et al. (2001) (6) (ANEXO 1). Os voluntários foram classificados em pré-frágeis, quando apresentaram um ou dois critérios, e em frágeis, quando apresentaram três ou mais critérios. Desta forma, foram consideradas as seguintes definições para a caracterização dos critérios:

- 1) auto relato de perda de peso não intencional no último ano ($\geq 4,55$ kg do peso corporal ou $\geq 5\%$ do peso corporal);
- 2) força de preensão manual medida por dinamômetro de mão (*handgrip*), ajustada por sexo e IMC (kg/m^2), utilizando os pontos de corte apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Ponto de corte para força de preensão manual que caracteriza a fragilidade.

Homens		Mulheres	
IMC (kg/m^2)	FPM (kg)	IMC (kg/m^2)	FPM (kg)
≤ 24	≤ 29	≤ 23	≤ 17
24,1 - 26	≤ 30	23,1 - 26	$\leq 17,3$
26,1 - 28	≤ 30	26,1 - 29	≤ 18
> 28	≤ 32	> 29	≤ 21

FPM = força de preensão manual

O participante foi orientado a permanecer em posição ereta segurando o equipamento (TKK 5101; Takei, Tokyo, Japão) com a mão dominante, realizando três tentativas máximas de cinco segundos, com intervalo de descanso de 1 minuto entre elas, tendo a maior pontuação a registrada. Todos os testes foram realizados pelo mesmo

avaliador, a fim de evitar viés. O coeficiente de variação (CV) para o *handgrip* foi de 5,10%.

3) auto relato de exaustão, avaliada por dois itens da versão brasileira do *Center for Epidemiologic Studies Depression Scale* (CES-D). Os participantes foram questionados sobre a frequência em que se sentiram, na última semana, nas condições das seguintes frases: “senti que tive que fazer esforço para fazer tarefas habituais” (item 7) e “não consegui levar adiante minhas coisas” (item 20). As respostas foram pontuadas da seguinte maneira:

- Raramente ou em nenhum momento (menos de 1 dia) = 0
- Poucos momentos (1 a 2 dias) = 1 ponto
- Parcela moderada de tempo (3 a 4 dias) = 2 pontos
- Maioria do tempo = 3 pontos

Foram considerados elegíveis neste critério aqueles que apresentaram dois ou três pontos em cada um dos itens;

4) baixa velocidade de marcha foi caracterizada quando o indivíduo apresentou < 20% da velocidade média da população (mesma idade, sexo e massa corporal) para 4,6m de distância. Desta forma, o ponto de corte para homens com altura $\leq 1,73\text{m}$ e mulheres com altura $\leq 1,59\text{m}$ foi de 7 segundo ou mais. Para os indivíduos com altura superior à especificada, o ponto de corte utilizado foi de 6 segundos ou mais;

5) a classificação do baixo nível de atividade física foi baseado na versão traduzida e adaptada do *Minnesota Leisure Time Activities Questionnaire* para idosos (85) (ANEXO 2), que lista as diversas atividades realizadas pelo indivíduo agrupadas em nove categorias (caminhada, exercícios de condicionamento, atividades aquáticas, atividades de inverno, esportes, golfe, atividades de horta/jardim, atividades de reparos domésticos, pesca e outras atividades). A partir deste questionário foi calculado o consumo energético

(em quilocalorias) despendidos pelo indivíduo durante as atividades realizadas por semana, de modo que este critério foi eleito àqueles que ficaram abaixo do percentil 20, sendo 383 kcal/sem para homens e 270 kcal/sem para mulheres (6, 85, 86).

4.3.2. Teste ergométrico

O teste ergométrico foi realizado em esteira rolante (*Centurion 200, Micromed*) com o intuito de avaliar o comportamento cardiovascular (através de um eletrocardiógrafo com 12 derivações e frequência cardíaca [FC] monitorizada) e promover a liberação médica dos voluntários para a efetiva participação do projeto.

No dia anterior, os voluntários receberam por escrito todas as instruções relevantes à execução do teste. Inicialmente foi realizado um exame em repouso, cujos voluntários foram deitados na maca em decúbito dorsal por 10 minutos e instruídos a não falar ou mover-se até que a avaliação fosse completada. Em seguida, foi utilizado um protocolo em rampa que consiste no aumento gradual e progressivo da carga de trabalho (velocidade e/ou inclinação) a cada minuto até atingir 85% da FC máxima predita para idade. Durante o teste, a percepção subjetiva de esforço (PSE) foi verificada com o auxílio da escala de Borg de 6 a 20 (87), sendo considerado critério de interrupção do teste quando os voluntários atingissem a PSE de 17. Desta forma, os voluntários foram avaliados quanto a frequência e o ritmo elétrico do coração, tendo sido excluídos aqueles que apresentaram importantes alterações fisiológicas das referidas variáveis (88).

4.4. Avaliações dos desfechos primários

4.4.1. Composição corporal

A massa muscular e o percentual de gordura corporal foram avaliados pelo método de densitometria de dupla emissão com fonte de raios X (DXA), utilizando o *Hologic®*

QDR 4500 Discovery densitometer (Hologic Inc., Bedford, MA, EUA). Todas as medidas foram executadas pelo mesmo técnico habilitado.

4.4.2. Área de secção transversa muscular

O ultrassom modo-B (HDI-3000, ALT, Bothell, WA, EUA) foi utilizado para obter as imagens do plano axial do músculo vasto lateral, usando um *probe* de arranjo linear de 7.5-MHz (Philips®, VMI, industry and commerce Ltda, Lagoa Santa, Brasil). Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo técnico avaliador, na perna direita do voluntário após este ficar na posição supina por alguns minutos. Durante o procedimento o voluntário foi orientado a relaxar os músculos da perna. A inserção proximal do vasto lateral foi identificada e marcada na pele do voluntário com tinta semipermanente e, então, as secções axiais foram marcadas a cada 30 mm a partir desse ponto. Orientado no plano axial, o transdutor foi alinhado perpendicularmente ao músculo vasto lateral e movido da posição central para a lateral pela zona previamente marcada na pele. O avaliador teve o cuidado em aplicar uma pressão mínima e constante durante o exame para evitar a compressão do músculo. As imagens foram gravadas em vídeo para identificação das que seriam utilizadas para posterior análise. Com isso, para as análises, utilizando as linhas expressas pelas marcas externas de referência, as imagens foram sobrepostas a fim de reconstruir a secção transversa do músculo, cuja área foi mensurada pelo *software* de digitalização de imagens de uso livre (Image J - National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) (89). O CV para a área de secção transversa muscular foi 2,63%

4.4.3. Força muscular dinâmica máxima

A força muscular dinâmica máxima foi avaliada utilizando o teste de 1-RM nos equipamentos isoinerciais *leg press* e supino vertical (Movement®, Pompéia, SP, Brasil). Inicialmente, os participantes foram submetidos às sessões de familiarização de modo a atingir um coeficiente de variação $\leq 5\%$ (estabilização das cargas absolutas) (90). Os testes foram realizados conforme as orientações da Sociedade Americana de Fisiologia do Exercício (91) e respeitaram um intervalo de 48 a 72 horas entre as sessões. Os participantes foram conduzidos a um aquecimento específico composto por duas séries intervaladas por três minutos. Na primeira série de aquecimento foram realizadas oito repetições a 50% de 1-RM, em seguida, três repetições a 75% de 1-RM e, finalmente, até cinco tentativas de 1-RM intervaladas por três minutos. A carga inicial do primeiro dia de familiarização foi estimada por meio do peso corporal dos participantes e os incrementos das cargas (em kg) foram estimados com base na percepção de esforço do participante e experiência prévia do pesquisador. Assumiu-se 1-RM como a maior carga que cada participante conseguia levantar em um ciclo completo de movimento (fases concêntrica e excêntrica).

O protocolo do exercício *leg press* preconizou um ângulo de 90° dos joelhos em relação ao quadril ao apoiarem os pés na plataforma do equipamento. No supino vertical, os participantes foram orientados a permanecerem sentados no equipamento com os braços e antebraços fletidos, formando um ângulo de 90° em relação ao ombro. As referidas posições foram anotadas inicialmente e replicadas nas sessões subsequentes. Os testes de 1-RM foram repetidos após quatro, oito, 12 e 16 semanas de treinamento de modo a respeitar a progressão de treino. O CV para 1-RM no *leg press* e no supino foram de 3,54% e 3,62%, respectivamente.

4.4.4. Força isométrica balística máxima

O pico de torque isométrico e a taxa de desenvolvimento de torque do membro inferior dominante foram avaliados durante contrações voluntárias isométricas balísticas máximas, em um dinamômetro isocinético *Biodex® Balance System SD* (*Biodex Medical Systems, Inc., Shirley, NY, EUA*). No início de cada sessão o dinamômetro foi calibrado de acordo com as especificações do fabricante. Os participantes foram posicionados sentados no equipamento com o ângulo da articulação do quadril em 85°, com os membros superiores flexionados e as mãos sobre o peitoral. O eixo de rotação do dinamômetro foi alinhado com o côndilo femoral lateral do membro inferior. Para evitar movimentos adicionais no corpo dos participantes, o tronco, a pelve e os membros inferiores foram fixados com cintos acoplados no dinamômetro. Todos os ajustes e posicionamentos foram registrados e utilizados durante as avaliações.

Na semana precedente a avaliação, as participantes realizaram duas sessões de familiarização intervaladas por 48 horas. Cada sessão foi composta por um aquecimento submáximo de 10 tentativas intervaladas por dois minutos, seguidas de duas tentativas máximas intervaladas por três minutos. Após um intervalo mínimo de 48 horas da familiarização os participantes realizaram uma sessão de avaliação. Durante a sessão de avaliação, os participantes realizaram um aquecimento composto por duas contrações submáximas intervaladas por dois minutos. Após três minutos, os participantes realizaram três tentativas de contrações voluntárias isométricas balísticas máximas com duração de cinco segundos em um ângulo de 60° (extensão completa = 0°). Um intervalo de recuperação de três minutos foi adotado entre as tentativas. O pico de torque isométrico foi determinado como o maior valor registrado durante as contrações voluntárias isométricas balísticas máximas. A taxa de desenvolvimento de torque foi determinada como a inclinação mais íngreme das contrações voluntárias isométricas balísticas

máximas calculadas pela seguinte relação: $\Delta\text{Torque}/\Delta\text{Tempo}$. O maior valor do pico de torque isométrico e taxa de desenvolvimento de torque foram utilizados nas análises. Anteriormente as avaliações, os participantes foram instruídos a realizarem suas contrações voluntárias isométricas balísticas máximas “tão rápido quanto possível”. Os participantes foram avaliados e incentivados verbalmente por apenas um pesquisador treinado.

4.4.5. Avaliações da funcionalidade

O Risco de quedas e o equilíbrio foram avaliados no equipamento *Biodex Balance Systemc*® (Biodex®, Inc., Shirley, New York, EUA) cuja reprodutibilidade foi previamente confirmada (92) e representa uma importante ferramenta clínica para avaliação do equilíbrio em idosos. Os voluntários se deslocam até o Laboratório de Treinamento de Força da Universidade de São Paulo em duas ocasiões: para a sessão de familiarização e para o teste. Os participantes foram posicionados com os pés na plataforma do equipamento e foram orientados a posicionarem as mãos nos ombros, de maneira que os membros superiores se mantivessem cruzados. A posição dos pés foi anotada para ser usada em todas as sessões. Cada voluntário foi instruído a permanecer tão imóvel quanto possível olhando para uma tela posicionada à sua frente. Esta tela acoplada ao equipamento fornecia um feedback visual aos idosos sobre o seu centro de gravidade. Em seguida, a plataforma do equipamento que inicialmente fica travada era desbloqueada para, então, registrar o grau de inclinação do eixo sagital e transversal. Os protocolos foram aplicados do maior ao menor grau de estabilidade (12 era o nível mais estável, seis era moderado e dois era o menos estável), com três tentativas por nível, 20 segundos de duração e 30 segundos de intervalo entre cada tentativa. A média das tentativas foi utilizada pelo software da máquina para calcular índices de estabilidade

global, eixo sagital e transversal. Os maiores valores obtidos representam a maior mudança no centro de gravidade e na inclinação do equipamento, indicando menor equilíbrio. Para a avaliação do risco de quedas, foram executadas três tentativas com 20 segundos de duração e 30 segundos de intervalo entre elas. Neste protocolo, o voluntário deveria controlar seu centro de massa dentro de sua base de apoio sem sair do centro de plataforma que iniciaria no nível 12 de estabilidade e, gradualmente, diminuiria até o nível dois. Em seguida, era gerado um índice de estabilidade geral. Os resultados do teste foram comparados com os dados normativos dependentes da idade que eram gerados pela plataforma. O maior escore indicava um possível déficit na força dos membros inferiores e nos sistemas sensoriais. Todos os testes foram conduzidos pelo mesmo examinador para minimizar possíveis vieses (93).

A resistência muscular de membros inferiores foi determinada pelo *timed-stands-test* adaptado (94). Os participantes realizaram uma sessão de familiarização e, após um período mínimo de 48 horas, uma sessão de teste. Na sessão de teste, foi registrado o número de vezes que os participantes conseguiam levantar e se sentar de uma cadeira, sem auxílio dos braços, em um período de 30 segundos. Foram realizadas duas tentativas e o menor tempo foi utilizado para as análises. A mobilidade funcional foi avaliada por meio do *timed-up-and-go test* (95). Inicialmente, os participantes realizaram uma sessão de familiarização e, após um período mínimo de 48 horas, na sessão de teste era determinado o tempo (em segundos) em que o participante requeria para levantar de uma cadeira, caminhar três metros, dar uma volta de 180° e se sentar novamente na cadeira. Duas tentativas eram realizadas e o menor tempo foi utilizado para as análises. O CV para o *timed-stands test* e o *timed-up-and-go test* foram de 5,88% e 5,18%, respectivamente.

4.5. Avaliações dos desfechos secundários

4.5.1. Densidade mineral óssea

A densidade mineral óssea (DMO) foi avaliada pelo método de DXA, utilizando o *Hologic® QDR 4500 Discovery densitometer* (Hologic Inc., Bedford, MA, EUA). A área óssea (cm²) foi calculada utilizando o software fornecido junto ao densitômetro. A massa óssea foi analisada na coluna lombar (vértebras lombares L1 a L4), no colo femoral e no corpo inteiro. Todas as medidas foram executadas pelo mesmo técnico habilitado. O erro para as medidas da DMO foi determinado de acordo com os padrões que constam nos protocolos da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (96). A mudança mínima significativa foi 0,033 g/cm², 0,047 g/cm² e 0,010 g/cm² para coluna lombar, colo femoral e corpo inteiro, respectivamente.

4.5.2. Avaliações sanguíneas

Os participantes foram orientados a comparecer ao Laboratório Central do Hospital das Clínicas de São Paulo no período da manhã em jejum de 8 horas. Foram coletados 6 ml de sangue da veia antecubital para posterior análises. As amostras foram coletadas em tubo contendo ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em isopor com gelo. Imediatamente após as coletas, as amostras foram centrifugadas a 1800 g durante 10 minutos a 4°C. O plasma foi pipetado e dispensado em microtubos (alíquotas), que foram congelados a -80°C para as subseqüentes análises.

4.5.2.1. Dosagem glicêmica e insulinêmica

Para dosagem glicêmica, 30 µl de cada amostra sanguínea foi homogeneizada em fluoreto de sódio (NaF) 2% na razão 1:1 em microtubos no momento da coleta e centrifugadas a 1800 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi imediatamente

congelado a -80°C e a glicemia foi dosada utilizando kit de glicose enzimático colorimétrico (BioTécnica®, São Paulo, SP – Brasil). As dosagens insulinêmicas foram determinadas pela técnica de ensaio enzimático quantitativo (Linco Research Inc, St. Louis, MO – EUA).

O índice HOMA-IR (*Homeostase Model Assessment of Insulin Resistance*) foi calculado a partir dos valores de glicemia e insulinemia de jejum de acordo com Matthews et al. (1985) (97):

$$HOMA-IR (mmol/mU/l) = insulinemia (mU/l) \times glicemia (mmol/l) / 22,5$$

4.5.2.2. Perfil lipídico

O colesterol total, HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade), LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e os triglicerídeos (TG) plasmáticos foram dosados por meio de método enzimático colorimétrico (BioTécnica®, São Paulo, SP – Brasil). A partir do resultado de TG plasmáticos foi calculada a concentração de VLDL-colesterol (lipoproteína de densidade muito baixa), de acordo com a equação de Friedewald et al. (1972) (98):

$$VLDL-colesterol (mg/dl) = TG / 5$$

4.5.3. Outras análises bioquímicas

Foram realizadas outras análises a fim de avaliar parâmetros de saúde geral, tais como massa óssea, função hepática, função renal, bem como, hormônios e enzimas musculares. Como o “Pro-Elderly Study” engloba outros grupos e outras perguntas, alguns parâmetros, como os de massa óssea, função renal e hormonal, por exemplo, foram essenciais para a análise ou subanálise realizada por estes. Considerando a randomização

em blocos e que os grupos eram cegos, todos os voluntários foram submetidos as mesmas análises.

Foram analisados: vitamina D (25OHD, ng/mL), por método de quimioimunoensaio AR; cálcio sérico (mg/dL), por método 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA); paratormônio (PTH, pg/mL), por método de eletroquimioluminescência – CORELAB; fosfatase alcalina (APP, U/L), por ensaio colorimétrico de acordo com IFCC; aspartato amino transferase (AST, U/L), por método cinético UV-IFCC; alanina amino transferase (ALT, U/L), por método cinético UV-IFCC; desidrogenase láctica (DHL, U/L), por teste UV-IFCC; ácido úrico (mg/dL), por ensaio colorimétrico enzimático; amônia ($\mu\text{mol/L}$), por método enzimático com glutamato desidrogenase; creatinina sérica (g/L), por ensaio colorimétrico cinético baseado no método Jaffé; creatinina urinária (g/L), por ensaio colorimétrico cinético baseado no método Jaffé; ureia sérica (mg/dL), por método cinético UV através da ação da uréase; ureia urinária (g/dL), por teste cinético com urease e glutamato desidrogenase; microalbuminúria (mg/L), por ensaio imunoturbidimétrico; proteinúria (g/L), por método turbidimétrico; enzima creatino fosfoquinase total (CPK, U/L), por teste UV; velocidade de hemossedimentação (VHS, mm), por método manual de Westergreen – primeira hora; fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, ng/mL), por quimioluminescência IDS; hormônio de crescimento (GH, ng/mL), por quimioluminescência BK, globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG, nmol/L), por eletroquimioluminescência – CORELAB; testosterona total (ng/dL), por eletroquimioluminescência – CORELAB; testosterona livre (pmol/L), baseado no cálculo de testosterona total e do SHBG dosados por eletroquimioluminescência – CORELAB; e cortisol ($\mu\text{g/dL}$), por quimioimunoensaio AR.

4.5.4. Avaliação do consumo alimentar e avaliação do estado nutricional

No período basal e ao final do estudo foram conduzidas avaliações do consumo alimentar por meio de diários alimentares em três dias não consecutivos (dois dias úteis e um do final de semana), para que, a variação da ingestão que normalmente ocorre neste período, constasse na avaliação. Para auxílio na quantificação das porções alimentares, foi utilizada uma cartilha com desenhos de utensílios e porções, desenvolvida e validada pelo nosso grupo (99, 100), além de um livro contendo fotos de 100 porções alimentares (101).

Os diários foram conferidos, juntamente com o respectivo voluntário, por uma nutricionista treinada ou por uma aluna de iniciação científica de nutrição treinada. Os dados das três avaliações foram tabulados por um único avaliador experiente, com o auxílio do programa Avanutri® em sua versão *online* (Avanutri®, Avanutri Evaluation Equipment Ltda, Três Rios, RJ, Brasil). Foram avaliadas a ingestão de energia (kcal/dia), proteína total (g), proteína relativizada pelo peso corporal (g/kg de peso corporal/dia) e distribuição de proteínas por refeição (g).

Também foi aplicada a Mini Avaliação Nutricional (MAN), utilizada para identificar o risco de desnutrição nesta população. O MAN é um questionário composto por 18 itens que englobam avaliação antropométrica, dietética, da clínica global, da autopercepção de saúde e do estado nutricional do voluntário. O resultado obtido, através de pontos, classifica o idoso em bem-nutrido, sob risco nutricional ou com desnutrição (102).

4.5.5. Avaliação da qualidade de vida

A avaliação da qualidade de vida foi realizada por meio do *Medical Outcomes Study 36 – Item Short Form Healthy Survey* (SF-36). Trata-se de um questionário

genérico, multidimensional, formado por 36 itens que podem ser agrupados em dois grandes componentes: físico e mental, cujos resultados são transformados em uma escala de 0 a 100, cujo zero corresponde ao pior estado geral de saúde e 100 ao melhor estado de saúde para cada domínio (103).

4.6. Suplementação e vendamento

Foram fornecidos aos voluntários 7,5 g de leucina e 6g do placebo isonitrogenado (alanina), fracionados em três doses diárias para serem consumidos concomitante as três principais refeições: café da manhã, almoço e jantar. Os suplementos foram fornecidos em pó e os voluntários foram orientados por um nutricionista treinado que, mensalmente, entregava os suplementos para os participantes e reforçava as orientações a cada encontro. Para confirmar a aderência da suplementação foi solicitado o preenchimento dos dias e horários de consumo dos suplementos, bem como foi efetuada a pesagem mensal das sobras dos suplementos. Ao final do protocolo, os participantes foram inquiridos acerca do suplemento ingerido. Desta forma, a porcentagem de acerto foi comparada entre os grupos como estratégia de assegurar a eficácia do vendamento.

4.7. Protocolo de treinamento

O programa de TF possui duração de 16 semanas, composto por duas sessões semanais alternadas por 72 horas. As sessões de treino foram compostas por cinco exercícios: *leg press*, cadeira extensora, supino vertical, desenvolvimento e puxada frontal. A progressão do TF se deu por meio da manipulação do número de séries, repetições, intensidade e intervalo de recuperação entre as séries conforme apresentado na Tabela 2 e respeitou as avaliações periódicas de 1-RM realizadas nas semanas quatro,

oito, 12 e 16. Todas as sessões de treino foram registradas e supervisionadas por profissionais experientes em TF para idosos.

Tabela 2. Progressão do treinamento de força durante as 16 semanas de intervenção.

Etapas	I	II	III	IV
Semanas	1-4	5-8	9-12	13-16
Séries	2	3	3	4
Intensidade	50% de 1-RM	50% de 1-RM	60% de 1-RM	70% de 1-RM
Repetições	10-15	10-15	8-12	8-12
IR (s)	60	90	90	120

IR = Intervalo de recuperação entre as séries.

4.8.Cálculo do tamanho amostral

O tamanho da amostra foi estimado usando o programa G-Power® (versão 3.1.2). Com base no tamanho de efeito entre grupos de 0,33, estimado a partir de dados anteriores para ganhos de massa muscular em idosos (em função do exercício e ingestão de proteínas) (31), foi projetado que seriam necessários 18 indivíduos, por grupo, para fornecer 80% de poder amostral ($\alpha=0,05$). Levando em consideração possíveis desistências, aumentamos o tamanho amostral em 20%.

4.9.Análise estatística

Antes da análise inferencial, foi verificada a presença de “outliers” e testada à esfericidade dos dados. Para comparações basais entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) por um fator com post hoc de Tukey para comparações múltiplas. As comparações entre os grupos nos períodos PRÉ e PÓS foram realizadas por análise de modelos mistos para medidas repetidas. Os valores de score dos questionários MAN e SF-36 foram testados por meio de análise não paramétrica (teste de McNemar e Wilcoxon). Os grupos e os períodos foram considerados fatores fixos e os sujeitos,

definidos como fatores aleatórios. Foi calculado o intervalo de confiança de 95% e todos os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância adotado para rejeitar a hipótese nula foi de $p < 0,05$. As análises foram realizadas segundo o princípio de intenção de tratamento.

5. RESULTADOS

As principais características dos participantes no momento inicial do estudo são apresentadas na Tabela 3. Não houve diferença entre os grupos experimentais no momento basal ($p>0,05$).

Tabela 3. Principais características dos participantes.

Variável	Leucina (n=22)	Placebo (n=22)
Idade (anos)	73 ± 5	71 ± 5
IMC (kg/m ²)	29,0 ± 7,0	29,1 ± 3,9
Massa Magra (kg)	38,7 ± 6,5	41,8 ± 4,4
Gordura Corporal (%)	37,4 ± 7,8	38,8 ± 5,0
Baixo Peso/ Sobrepeso (n)*	2/19	1/21
Pré Frágil/ Frágil (n)	19/ 3	22/0
Bem Nutrido/Risco Nutricional (n)	19/3	19/3
Doença (n)		
Hipertensão	11	10
<i>Diabetes mellitus</i> Tipo 2	6	3
Dislipidemia	8	6
Osteopenia/ Osteoporose	13/3	13/5
Medicamentos (n)		
Anti-hipertensivos	11	11
Hipoglicemiantes	6	3
Estatinas	8	7
Antidepressivos	3	3
Tiroidianos	7	4

Os valores de idade, IMC, massa magra e gordura corporal são expressos em média ± desvio-padrão. As demais variáveis são apresentadas pelo número de participantes. IMC: Índice de Massa Corporal.

*Referência utilizada para classificação Lipschitz (1994) (104).

Três voluntárias foram classificadas como frágeis e 41 como pré frágeis. A média de idade das participantes do estudo foi 72 ± 5 anos. Nesse estudo, foram comparados os efeitos da suplementação de leucina vs. placebo isonitrogenado.

Não foram observadas diferenças intra ou entre grupos em relação ao consumo energético total ou proteico (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo energético e proteico antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.

Variável	Leucina (n=22)		Placebo (n=22)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Consumo Energético Total (Kcal)	1351,57 (1174,93 a 1528,21)	1337,59 (1125,76 a 1549,42)	1361,72 (1197,59 a 1525,85)	1421,29 (1249,90 a 1592,68)
Consumo Proteico Total (g)	51,59 (44,23 a 58,95)	57,42 (48,95 a 65,88)	55,27 (48,42 a 62,11)	56,80 (49,67 a 63,94)
Consumo Proteico Total (%)	15,58 (13,94 a 17,22)	17,54 (15,60 a 19,48)	16,95 (15,43 a 18,47)	16,22 (14,62 a 17,82)
Consumo Proteico Total (g/kg/dia)	0,81 (0,69 a 0,93)	0,87 (0,74 a 1,01)	0,79 (0,69 a 0,89)	0,81 (0,70 a 0,92)
Consumo Proteico por Refeição (g)				
Café da Manhã	10,34 (8,27 a 12,60)	10,88 (7,67 a 13,16)	10,97 (8,54 a 13,39)	10,91 (8,25 a 13,60)
Almoço	21,42 (17,26 a 25,86)	22,81 (16,18 a 29,59)	25,77 (21,93 a 29,61)	24,78 (20,31 a 29,64)
Jantar	14,43 (10,92 a 18,26)	13,86 (10,29 a 18,19)	12,89 (9,71 a 16,07)	15,22 (10,63 a 19,57)

Dados expressos em média (95% intervalo de confiança). Pré: período basal; Pós: após 16 semanas de intervenção.

Os dados de função muscular (Tabela 5) mostram os efeitos do treinamento (efeito principal de tempo) em 1-RM no *leg press* ($p<0,0001$; diferença estimada: 14,28; IC95% 11,23 a 17,33 kg), 1-RM no supino ($p<0,0001$; diferença estimada: 4,53; IC95% 3,27 a 5,78 kg), pico de torque isométrico ($p<0,0001$; diferença estimada: 9,62 ; IC95% 5,01 a 14,23 Nm), taxa de desenvolvimento de torque ($p=0,0005$; diferença estimada: 61,21; IC95% 28,50 a 93,62 Nm/s), *timed-up-and-go test* ($p=0,0156$; diferença estimada: 0,14; IC95% 0,03 a 0,26 s), e *timed-stands test* ($p<0,0001$; diferença estimada: 1,37; IC95% 1,04 a 1,70 rep). A força de preensão manual, risco de quedas e equilíbrio se mantiveram inalterados ($p>0,05$). Não houve efeito da suplementação (tempo x interação do grupo) em todas as variáveis dependentes ($p>0,05$).

A massa magra apendicular ($p=0,0078$, diferença estimada: 0,36; IC95% 0,10 a 0,63 kg) e a AST do músculo vasto lateral aumentaram com o treinamento (efeito principal de tempo; $p=0,0002$, diferença estimada: 0,56; IC95% 0,29 a 0,84 cm²), sem influência da suplementação de leucina (grupo x interação de tempo, $p>0,05$). Os valores de massa magra, gordura corporal total e densidade mineral óssea se mantiveram estáveis durante a intervenção ($p>0,05$), como apresentado na Tabela 6.

Após a intervenção não houve diferença nos valores dos domínios presentes no questionário de qualidade de vida SF-36 como ilustrado na Tabela 7. Adicionalmente, na Tabela 8 são apresentados os parâmetros bioquímicos de controle dos pacientes: não houve efeito de grupo x interação de tempo para todos os parâmetros ($p>0,05$), mas houve efeito principal de tempo para 25OHD ($p=0,0188$; diferença estimada: 1,22; IC95% 2,01 a 4,45 ng/mL), PTH ($p=0,0066$; diferença estimada: 4,17; IC95% 1,26 a 7,08 pg/mL), DHL ($p=0,0019$; diferença estimada: 10,30; IC95% 1,73 a 18,88 U/L) e cortisol ($p=0,0139$; diferença estimada: 1,96; IC95% 0,42 a 3,50 µg/dL).

Tabela 5. Força e função muscular antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.

Variável	Leucina (n=22)		Placebo (n=22)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
1-RM <i>Leg Press</i> (kg)*	51,87 (43,49 a 60,25)	59,01 (50,24 a 67,78)	41,18 (32,65 a 49,71)	55,45 (46,92 a 63,99)
1-RM Supino (kg)*	25,02 (22,30 a 27,74)	29,44 (26,60 a 32,29)	24,09 (21,37 a 26,81)	28,73 (26,01 a 31,45)
Taxa de Desenvolvimento de Torque (Nm/s)*	405,32 (310,93 a 499,72)	460,59 (363,19 a 557,99)	451,15 (356,75 a 545,55)	518,30 (423,91 a 612,70)
Pico de Torque Isométrico (Nm)*	73,38 (63,78 a 82,98)	80,87 (71,62 a 96,50)	87,45 (74,67 a 100,23)	99,20 (81,17 a 117,23)
<i>Handgrip</i> (kg)	21,48 (19,26 a 23,71)	22,89 (20,40 a 25,39)	24,68 (22,49 a 26,88)	24,79 (22,51 a 27,07)
<i>Timed-Up-and-Go</i> (s)*	7,23 (6,82 a 7,64)	7,10 (6,69 a 7,52)	6,95 (6,54 a 7,35)	6,79 (6,39 a 7,19)
<i>Timed-Stands</i> (s)*	13,10 (12,13 a 14,06)	14,29 (13,32 a 15,27)	13,23 (12,29 a 14,17)	14,77 (13,83 a 15,71)
Equilíbrio				
Risco de Quedas	1,50 (1,16 a 1,83)	1,60 (1,16 a 1,81)	1,49 (1,29 a 1,69)	1,47 (1,26 a 1,68)
Instabilidade Baixa	0,74 (0,59 a 0,89)	0,73 (0,60 a 0,82)	0,70 (0,60 a 0,80)	0,74 (0,65 a 0,84)
Instabilidade Moderada	1,42 (1,21 a 1,62)	1,32 (1,05 a 1,49)	1,27 (1,13 a 1,41)	1,30 (1,16 a 1,45)
Instabilidade Alta	2,49 (1,63 a 3,35)	2,19 (1,33 a 3,17)	2,54 (1,93 a 3,16)	2,63 (2,06 a 3,19)

Dados expressos em média (95% intervalo de confiança). Pré: período basal; Pós: após 16 semanas de intervenção; 1-RM: força dinâmica máxima. * indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo.

Tabela 6. Área de secção transversa muscular e DEXA antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.

Variável	Leucina (n=22)		Placebo (n=22)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
AST Vasto Lateral (mm ²)*	16,86 (15,26 a 18,47)	17,58 (15,97 a 19,19)	19,65 (18,16 a 21,13)	20,05 (18,57 a 21,54)
Massa Magra (Kg)	39,00 (36,63 a 41,37)	39,46 (37,08 a 41,84)	41,76 (39,40 a 44,13)	41,96 (39,60 a 44,33)
Massa Magra Apendicular (Kg)*	15,99 (14,81 a 17,18)	16,31 (15,11 a 17,50)	16,87 (15,69 a 18,05)	17,28 (16,10 a 18,46)
Gordura Corporal (%)	37,28 (34,50 a 40,06)	37,17 (34,37 a 39,96)	38,50 (36,03 a 41,58)	38,36 (35,58 a 41,13)
Densidade Mineral Óssea (g/cm) ²				
Coluna Lombar (L1-L4)	0,92 (0,85 a 0,98)	0,92 (0,86 a 0,99)	0,89 (0,82 a 0,95)	0,88 (0,82 a 0,95)
Colo Femoral	0,70 (0,65 a 0,75)	0,70 (0,65 a 0,75)	0,67 (0,62 a 0,72)	0,67 (0,62 a 0,72)
Corpo Inteiro	1,02 (0,97 a 1,07)	1,03 (0,98 a 1,07)	0,98 (0,93 a 1,03)	0,98 (0,94 a 1,03)

Dados expressos em média (95% intervalo de confiança). Pré: período basal; Pós: após 16 semanas de intervenção; AST: área de secção transversa. * indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo.

Tabela 7. Domínios do questionário de qualidade de vida SF-36 antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.

Variável	Leucina (n=22)		Placebo (n=22)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Capacidade Funcional	75,0 (65,0 a 85,0)	72,5 (65,0 a 85,0)	77,5 (65,0 a 80,0)	80,0 (65,0 a 85,0)
Aspectos Físicos	20,0 (20,0 a 20,0)	20,0 (20,0 a 20,0)	20,0 (20,0 a 20,0)	20,0 (20,0 a 20,0)
Dor	72,0 (51,0 a 100,0)	61,0 (46,0 a 100,0)	72,0 (52,0 a 84,0)	72,0 (51,0 a 84,0)
Estado Geral da Saúde	82,5 (75,0 a 90,0)	87,5 (80,0 a 92,5)	82,5 (65,0 a 90,0)	85,0 (70,0 a 95,0)
Vitalidade	80,0 (65,0 a 85,0)	67,5 (65,0 a 90,0)	75,0 (60,0 a 80,0)	77,5 (70,0 a 90,0)
Aspectos sociais	100,0 (88,0 a 100,0)	94,0 (75,0 a 100,0)	100,0 (75,0 a 100,0)	100,0 (88,0 a 100,0)
Aspectos emocionais	23,0 (23,0 a 23,0)	23,0 (23,0 a 23,0)	23,0 (23,0 a 23,0)	23,0 (23,0 a 23,0)
Saúde Mental	76,0 (60,0 a 88,0)	78,0 (68,0 a 90,0)	84,0 (76,0 a 88,0)	86,0 (80,0 a 92,0)

Dados expressos em mediana (intervalo interquartil). Pré: período basal; Pós: após 16 semanas de intervenção.

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos antes e depois de 16 semanas de treinamento de força combinado com a suplementação de leucina ou de placebo.

Variável	Leucina (n=22)		Placebo (n=22)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
25OHD (ng/mL)*	27,53 (23,44 a 31,62)	26,31 (21,92 a 30,70)	24,86 (20,87 a 28,86)	20,52 (16,18 a 24,86)
Cálcio Sérico (mg/dL)	9,55 (9,34 a 9,75)	9,51 (9,30 a 9,73)	9,41 (9,22 a 9,60)	9,50 (9,30 a 9,70)
PTH (pg/mL)*	50,10 (41,50 a 58,70)	56,14 (47,33 a 64,95)	51,18 (42,95 a 59,41)	53,48 (45,06 a 61,91)
Fosfatase Alcalina(U/L)	67,44 (60,93 a 73,94)	70,93 (64,36 a 77,49)	68,56 (62,21 a 74,92)	68,68 (62,33 a 75,04)
Aspartato Aminotransferase (U/L)	19,16 (15,57 a 22,74)	20,46 (16,84 a 24,09)	21,39 (17,89 a 24,89)	21,06 (17,54 a 24,58)
Alanina Aminotransferase (U/L)	17,39 (13,46 a 21,32)	18,32 (14,31 a 22,32)	20,47 (16,63 a 24,30)	19,32 (15,45 a 23,19)
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,79 (0,73 a 0,85)	0,80 (0,74 a 0,86)	0,78 (0,72 a 0,84)	0,81 (0,75 a 0,87)
Creatinina Urinária (g/dL)	0,73 (0,49 a 0,97)	0,74 (0,48 a 1,01)	1,04 (0,80 a 1,27)	1,06 (0,82 a 1,29)
Uréia Sérica (mg/dL)	35,95 (31,09 a 40,81)	35,25 (30,33 a 40,16)	36,53 (31,79 a 41,28)	35,03 (30,29 a 39,78)
Uréia Urinária (g/dL)	11,76 (8,84 a 14,67)	13,53 (10,43 a 16,63)	16,47 (13,64 a 19,29)	14,88 (12,06 a 17,71)
Microalbuminuria (mg/L)	31,85 (14,80 a 48,90)	22,43 (4,59 a 40,27)	10,50 (-5,96 a 26,96)	10,81 (-5,65 a 27,27)
Proteinúria Urinária (g/dL)	0,12 (0,07 a 0,17)	0,12 (0,08 a 0,17)	0,09 (0,05 a 0,13)	0,08 (0,04 a 0,13)
Colesterol (mg/dL)	180,37 (162,15 a 198,59)	192,06 (173,04 a 211,09)	207,14 (189,43 a 224,84)	209,56 (191,86 a 227,27)

HDL (mg/dL)	56,90 (47,91 a 65,89)	56,52 (47,12 a 65,92)	60,07 (51,33 a 68,81)	66,69 (57,95 a 75,43)
LDL (mg/dL)	113,10 (98,53 a 127,67)	113,20 (98,33 a 128,07)	122,26 (108,24 a 136,28)	123,51 (109,49 a 137,52)
VLDL (mg/dL)	22,30 (18,09 a 26,51)	25,09 (20,70 a 29,47)	24,30 (20,22 a 28,38)	24,89 (20,79 a 28,96)
Triglicérides (mg/dL)	111,70 (90,74 a 132,66)	127,29 (105,44 a 149,15)	120,73 (100,37 a 141,08)	124,50 (104,14 a 144,86)
CPK (U/L)	125,75 (59,47 a 192,03)	165,17 (97,27 a 233,06)	134,91 (71,05 a 198,78)	161,91 (97,32 a 226,50)
DHL (U/L)*	192,80 (177,48 a 208,12)	205,61 (189,89 a 221,33)	192,30 (177,52 a 207,07)	200,09 (185,14 a 215,04)
Ácido Úrico (mg/dL)	4,46 (3,94 a 4,98)	4,40 (3,87 a 4,93)	4,69 (4,18 a 5,19)	4,69 (4,19 a 5,19)
Amônia (μmol/L)	21,25 (18,36 a 24,14)	22,91 (19,87 a 25,96)	19,70 (16,88 a 22,52)	22,67 (19,85 a 25,49)
VHS (mm)	11,86 (7,29 a 16,43)	13,45 (8,22 a 18,68)	13,08 (8,33 a 17,82)	11,98 (6,62 a 17,34)
Cortisol (μg/dL)*	9,93 (8,24 a 11,61)	11,54 (9,65 a 13,42)	9,48 (7,83 a 11,13)	11,79 (10,01 a 13,56)
GH (ng/mL)	1,08 (0,41 a 1,74)	0,90 (0,21 a 1,60)	0,73 (0,09 a 1,38)	1,21 (0,55 a 1,87)
IGF-1 (ng/mL)	113,55 (93,69 a 133,41)	109,75 (88,94 a 130,55)	131,43 (112,36 a 150,49)	136,31 (116,94 a 155,68)
Testosterona Livre (pmol/L)	6,45 (0,88 a 12,02)	7,50 (1,85 a 13,15)	9,07 (3,75 a 14,39)	9,92 (4,57 a 15,26)
Testosterona Total (ng/dL)	21,85 (10,06 a 33,64)	20,46 (8,51 a 32,41)	25,53 (14,26 a 36,79)	25,60 (14,29 a 36,92)
SHBG (nmol/L)	74,57 (59,28 a 89,85)	70,93 (55,15 a 86,71)	73,61 (58,97 a 88,26)	66,85 (52,05 a 81,65)

Glicose Sérica (mg/dL)	104,55 (95,72 a 113,39)	106,62 (97,59 a 115,64)	95,98 (87,79 a 104,16)	96,76 (88,26 a 105,26)
HbA1c Sérica (%)	5,83 (5,58 a 6,07)	5,98 (5,74 a 6,23)	5,72 (5,48 a 5,95)	5,72 (5,48 a 5,95)
Insulina Sérica (µg/mL)	16,10 (12,59 a 19,60)	15,05 (11,34 a 18,76)	11,97 (8,59 a 15,35)	11,53 (8,11 a 14,95)

Dados expressos em média (95% intervalo de confiança). Pré: período basal; Pós: após 16 semanas de intervenção. 25OHD: vitamina D; PTH: paratormônio; HDL: *high-density lipoprotein*; LDL: *low-density lipoprotein*; VLDL: *very low-density lipoprotein*; CPK: creatina fosfoquinase; DHL: lactato desidrogenase; VHS: velocidade de hemossedimentação; GH: hormônio do crescimento; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; SHBG: *sex hormone-binding globulin*; HbA1c: hemoglobina glicada. * indica $p \leq 0,05$ para efeito principal de tempo.

Em relação ao consumo de suplementos houve uma porcentagem de 65% de aderência para o grupo Leucina e 56% para o Placebo. A média do consumo diário do suplemento foi de $4,89 \pm 1,64$ g para o grupo Leucina e de $4,23 \pm 0,80$ g para o grupo Placebo, não havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,0659$). A porcentagem de aderência ao consumo de suplementos diz respeito ao número de dias em que o suplemento foi ingerido da forma correta. A Figura 6 ilustra os dados da média de consumo do suplemento, com a dispersão individual dos voluntários em cada grupo. Quatro voluntárias do grupo Placebo acertaram qual suplemento estavam consumindo enquanto nenhuma voluntária do grupo Leucina acertou.

Os dados de consumo do suplemento foram extraídos da pesagem das sobras dos recipientes devolvidos. Foi decidido não utilizar os registros de dias e horários de ingestão do suplemento feitos pelos idosos, pois muitos deles não foram entregues. Os registros foram importantes no acompanhamento do protocolo para verificar, de maneira geral, se os voluntários haviam entendido a maneira correta de consumir os suplementos, ou seja, se consumiam o suplemento nos horários estipulados (junto com as refeições) e no fracionamento adequado (3 doses diárias).

As linhas horizontais indicam a média $\pm$ desvio-padrão. O gráfico A apresenta o consumo de suplemento (g/dia) e o gráfico B apresenta a adesão à suplementação (%) dos grupos Leucina e Placebo.

Figura 6. Gráficos de dispersão individual do consumo médio de suplemento e adesão à suplementação dos grupos Leucina e Placebo.

A Figura 7 mostra que houve diferença ($p=0,0085$) na média de aderência aos treinos entre os grupos Leucina (65%) e Placebo (80%). Os dados de volume de treino são apresentados na Figura 8. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos para todas as formas de avaliação de volume.

As linhas horizontais indicam a média $\pm$ desvio-padrão.

Figura 7. Gráfico de dispersão individual da adesão ao treinamento de força (%) dos grupos Leucina e Placebo.

Os dados são apresentados com a dispersão individual de volume de treino dos grupos Leucina e Placebo. As linhas horizontais indicam a média $\pm$ desvio-padrão. O gráfico A apresenta o volume de treino total (kg) no leg press, o gráfico B apresenta o volume médio relativo aos dias de treino realizado (kg/dia) no leg press, o gráfico C apresenta o volume de treino total (kg) no supino, o gráfico D apresenta o volume médio relativo aos dias de treino realizado (kg/dia) no supino dos grupos Leucina e Placebo.

Figura 8. Gráficos de dispersão individual de volume de treino no *leg press* e supino.

6. DISCUSSÃO

A redução de força e massa muscular são preditores bem estabelecidos na fragilidade, aumentando o risco de queda, fratura, institucionalização, hospitalização e morte (4-7). Tais alterações podem ser resultantes de uma maior inatividade, doenças associadas ou devido ao curso natural do processo de envelhecimento (105). O TF (65) e a suplementação de leucina (105) têm sido consideradas potenciais estratégias para atenuar esse quadro em idosos que possuem uma menor resposta aos estímulos anabólicos quando comparados à jovens. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi associar essas duas estratégias para combater a sarcopenia em idosos mais vulneráveis. Como resultado, o treino foi eficaz em aumentar a força e a massa muscular e, também, melhorar a funcionalidade das voluntárias, sem o efeito adicional da suplementação de leucina, bem como, sem os efeitos adversos da suplementação.

O benefício da suplementação aguda de leucina vem sendo estudado tanto em jovens quanto em idosos. Jovens apresentam aumentos equivalentes da síntese de proteínas musculares após a ingestão de 25g de *whey*, contendo 3g de leucina, ou 6,25g de *whey*, contendo 5g de leucina (106). Semelhantemente, idosos que fizeram o consumo de doses de 3,5g de leucina, como parte de um suplemento com 10g de aminoácidos essenciais, apresentaram aumento na síntese de proteínas musculares, nas 24h após a suplementação. Porém, o mesmo resultado não foi encontrado no grupo de idosos que utilizaram a dosagem de 1,85g de leucina (107). Apesar da suplementação aguda de leucina se mostrar benéfica ativando a síntese de proteínas musculares em idosos, os resultados positivos não são totalmente elucidados com a suplementação crônica. A meta análise feita por Xu et al. (2015) (108) demonstrou que, apesar da suplementação de leucina se manter efetiva na elevação das taxas de síntese de proteínas musculares, essa

melhora não foi associada ao concomitante aumento de massa muscular com o uso crônico do suplemento, assim como o encontrado no presente estudo. Entretanto, vale a pena destacar que na meta análise foram incluídos diferentes protocolos de suplementação, com diferentes doses de leucina e aminoácidos essenciais, o que pode ter acarretado em doses insuficientes para induzir as adaptações musculares. Ainda, é possível que os sujeitos avaliados nos estudos já tivessem um consumo suficiente de proteínas e aminoácidos, o que poderia mascarar os efeitos da suplementação de leucina em função de uma adequação proteica para idade.

O consumo inadequado de proteínas tem se mostrado um componente bem influente na fragilidade (109), podendo estimular ou sustentar a perda de função e/ou massa muscular em idosos. O “*The Framingham Heart Study Offspring*” observou que o maior consumo proteico é associado com menor risco de perda funcional promovida pelo envelhecimento e, aqueles que tiveram um consumo proteico superior, também apresentaram 41% menos risco de se tornarem dependentes para pelo menos uma tarefa funcional (110). Um estudo prospectivo com idosos acima de 70 anos também sugeriu que a ingestão de proteína superior à *Recommended Dietary Allowances* (RDA) (0,8g/kg de peso corporal/dia) era protetora contra a redução de peso em idosos saudáveis (111). Houston et al. (2008), em um acompanhamento de três anos, avaliaram mais de dois mil idosos e descobriram que, aqueles agrupados no quintil mais alto de ingestão de proteína, perderam 40% menos de músculo quando comparados a indivíduos com menor consumo proteico (112). Com base neste corpo de literatura, um grupo de consenso apontou que o uso de suplementos proteicos-calóricos pode ser uma estratégia eficaz para combater a fragilidade (113), fato este que corrobora com a teoria de que um consumo suficiente de proteínas e aminoácidos não justifica a necessidade de suplementação.

Complementarmente, Murphy et al. (2016) verificaram o efeito da suplementação de leucina em idosos saudáveis com dietas classificadas com alta (1,2g/kg/dia) ou baixa (0,8g/kg/dia) ingestão de proteínas (114). A pesquisa apresentou que, a adição de 5g de leucina por refeição aumenta a síntese de proteínas musculares em ambos os grupos, sugerindo que a suplementação deste aminoácido pode ser benéfica em idosos saudáveis que tenham dietas com consumo proteico semelhante ao encontrado no nosso estudo (0,8g/kg/dia). Porém, a dose da suplementação de leucina utilizada no estudo proposto por estes pesquisadores foi o dobro da dose idealizada pelo presente estudo (5g vs. 2,5g por dose). Desta forma, relacionando tais dados ainda não é possível concluir definitivamente, qual dose de leucina pode desencadear a síntese de proteínas musculares mesmo na ausência de um consumo ótimo de proteínas em idosos com pré fragilidade e fragilidade.

Tem sido especulado que não só o conteúdo total de proteína, mas também sua distribuição por refeição parece ter uma importante implicação na função e massa muscular (115). Loenneke et al. (2016) verificaram que, em adultos e idosos, a força e a massa muscular são associadas com o alto consumo de proteína por refeição (1 a 2 refeições com valores entre 30g e 45g de proteína) (116). Neste presente estudo, o consumo médio por refeição ficou bem aquém (~11g de proteína no café da manhã, 24g no almoço e 14g no jantar) do sugerido pelos autores, podendo ser uma limitação de grande relevância na população de idosos com pré fragilidade e fragilidade que são ainda mais susceptíveis a resistência anabólica quando comparados à população saudável.

A hipótese da leucina como “gatilho hipertrófico” é baseada no aumento da leucinemia para induzir uma resposta anabólica (68). No presente estudo, a média do consumo diário do suplemento foi de $4,89 \pm 1,64$ g para o grupo Leucina e de $4,23 \pm 0,80$ g para o grupo Placebo. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos ($p=$

0,0659), a dosagem média consumida foi inferior à proposta pelo protocolo (7,5g de leucina e 6g de placebo). Tal fato limita a extrapolação do estudo, uma vez que a quantidade de leucina ingerida tenha sido possivelmente insuficiente para atingir o limiar necessário para o estímulo hipertrófico.

Entretanto, a dose real de suplemento consumida em nossa pesquisa foi bem superior a utilizada no estudo recente proposto por Holwerda et al. (2019) (117) que teve como objetivo principal verificar se a ingestão adicional de 1,5g de leucina em 15g de *whey* era capaz de aumentar as taxas de síntese de proteínas musculares após o exercício de força em idosos. Os achados sugerem que a adição de leucina pode aumentar a eficiência de pequenas ingestões de proteína (~15g) nessa população. Tal dosagem é muito semelhante à encontrada na refeição jantar (~14,1g), bem inferior à encontrada na refeição almoço (~23,7g) e superior à encontrada na refeição café da manhã da nossa amostra (~10,8g).

Estudos com idosos utilizando o mesmo protocolo de suplementação utilizado no presente estudo (7,5 g/dia de leucina, divididas em três doses diárias) não verificaram evidência de eficácia da suplementação de leucina sobre a força e massa muscular (82, 83). Entretanto, diferentemente deste protocolo, os pesquisadores não tiveram a associação de um TF. Pensando novamente na teoria da leucina como gatilho para síntese proteica muscular, o exercício de força poderia auxiliar nos resultados, aumentando a sensibilidade à leucina e, assim, reduzindo o seu limiar de gatilho (68). Apesar do presente estudo mostrar diferença na média de aderência aos treinos ($p=0,0085$) entre os grupos leucina (65%) e placebo (80%), os dados de volume de treino revelam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos para todas as formas de avaliação de volume, garantindo assim a igualdade de treinos entre os grupos. Em uma recente meta análise, Schoenfeld et al. (2018) mostraram que há fortes evidências de que a frequência

do TF não afeta significativamente a hipertrofia muscular quando o volume é igualado (118). Assim, para um dado volume de treino, os pesquisadores sugerem que os indivíduos podem escolher uma frequência semanal com base na preferência pessoal.

Adicionalmente, a magnitude das adaptações musculares induzidas pelo TF no presente estudo é similar à observada na literatura (119) e parte dos resultados vão ao encontro ao principal achado apresentado por Churchward-Venne et al. (2015) (65) que observaram que todos os idosos, homens e mulheres, respondem aos benefícios do TF. Mesmo com uma grande heterogeneidade na resposta adaptativa referente às melhoras musculares, o TF é indicado como excelente intervenção no envelhecimento da população independente da sua magnitude de resposta.

Apesar de existirem evidências com a eficácia aguda da síntese de proteínas musculares, é possível especular que o potencial efeito anabólico da suplementação de leucina desta pesquisa pode ter sido mitigado por uma dieta insatisfatória referente ao consumo de proteínas, resultando em um *pool* de aminoácidos inadequado para sustentar um balanço proteico positivo ou, ainda, que o consumo do suplemento tenha sido inferior à necessidade fisiológica para contra-atacar a resistência anabólica de idosos com pré fragilidade e fragilidade. Desta forma, o presente estudo não foi isento de limitações: o consumo de proteínas total e por refeição podem ter sido insuficientes para o estímulo anabólico para a população escolhida, além disto, as voluntárias do projeto tiveram a aderência de suplementação de 65% no grupo Leucina e de 56% no grupo Placebo. Complementarmente, não houve nenhuma relação do tipo de suplemento consumido e aderência à suplementação, pois apenas quatro voluntárias do grupo Placebo acertaram qual suplemento estavam consumindo enquanto nenhuma voluntária do grupo Leucina acertou.

Vale a pena destacar que este estudo não foi o único com dificuldade de adesão à intervenção. O estudo proposto por Trabal et al. (2015), que teve o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de leucina combinada ao TF em idosos, contou com um *dropout* de 19 indivíduos de um total de 30 voluntários, limitando seu número amostral em 11 sujeitos. Apesar das dificuldades de manter a adesão das participantes, conseguimos finalizar o protocolo com 40 voluntárias.

A dificuldade prática ainda permanece na viabilidade de aumentar a ingestão dietética de proteínas em uma população mais velha, diante de diversidades relacionadas ao envelhecimento, como mudanças psicológicas e sociais, desconforto gastrointestinal, perda de paladar e olfato, condições dentárias, baixa renda, necessidade de comprar medicamentos, solidão e depressão, entre outros. Esta pesquisa acrescenta à literatura ao demonstrar que em idosos com pré fragilidade e fragilidade, que consomem ~ 0.8 g/kg/d de proteína, não há o benefício da suplementação de leucina na força, função e massa muscular adicional ao TF. Ainda, este estudo coloca o desafio da implementação clínica de aumentar a recomendação de ingestão de proteínas como uma medida para neutralizar/combater a perda muscular e a dinapenia relacionados à fragilidade, potencializada pelos efeitos do TF.

7. CONCLUSÃO

Considerando que a resistência anabólica pode resultar na perda de força, função e massa muscular de idosos, pode-se supor que em uma população ainda mais vulnerável como a de idosos com pré fragilidade e fragilidade, em comparação aos idosos saudáveis, uma ingestão proteica maior do que a consumida nesse estudo, ou doses superiores de leucina, podem ser necessárias para superar a resistência anabólica e se sobrepor aos benefícios do exercício de força. Este ensaio clínico indicou que o TF foi capaz de aumentar a força, função e massa muscular de idosos com pré fragilidade e fragilidade, independente da suplementação de leucina.

8. ANEXOS

ANEXO A. Ficha dos critérios de fragilidade.

1. PERDA DE PESO

No último ano, você perdeu mais de 4,5 kg não intencional? * Sem ser por dieta ou com a prática de exercícios físicos

☐ Sim ☐ Não

Frágil? Sim ☐ Não ☐

2. EXAUSTÃO AUTO-REFERIDA

Lê-se as seguintes frases retiradas do CES-D DepressionScale:	Com que frequência você se sentiu desse jeito na semana passada?
a) Senti que tive que fazer esforço para dar conta de minhas tarefas habituais	☐ 0 = raramente ou nenhuma vez (<1 dia) ☐ 1 = um pouco ou algumas vezes (1-2 dias) ☐ 2 = uma quantidade moderada de tempo (3-4) ☐ 3 = maior parte do tempo
b) Não consegui levar adiante minhas coisas	☐ 0 = raramente ou nenhuma vez (<1 dia) ☐ 1 = um pouco ou algumas vezes (1-2 dias) ☐ 2 = uma quantidade moderada de tempo (3-4) ☐ 3 = maior parte do tempo

* Os que responderem os itens 2 ou 3 para qualquer uma das questões serão considerados frágeis

Frágil? Sim ☐ Não ☐

3. NÍVEL DE ATIVIDADE FÍSICA

Utilizando a versão traduzida e adaptada do *Minnesota Leisure Time Activities Questionnaire* (Lutosa et al., 2011), considera-se frágil: **Homens** < 383 kcal/sem **Mulheres** < 270 kcal/sem

_____ Kcal/sem

Frágil? Sim ☐ Não ☐

4. TEMPO DE CAMINHADA

Tempo de corte para andar 4,6m que caracteriza fragilidade – 1 min de intervalo

Homem		Mulher	
Altura	Tempo	Altura	Tempo
≤ 173 cm	≥ 7 segundos	≤ 159 cm	≥ 7 segundos
> 173 cm	≥ 6 segundos	> 159 cm	≥ 6 segundos

1ª tentativa

2ª tentativa

3ª tentativa _____

FINAL _____ segundos

Frágil? Sim ☐ Não ☐

5. FORÇA DE PREENSÃO MANUAL

Corte para força de preensão manual (FPM) que caracteriza fragilidade – 1 min de intervalo

Homem		Mulher	
IMC	FPM (kg)	IMC	FPM (kg)
≤ 24	≤ 29	≤ 23	≤ 17
24.1 - 26	≤ 30	23.1 - 26	≤ 17.3
26.1 - 28	≤ 30	26.1 - 29	≤ 18
> 28	≤ 32	> 29	≤ 21

Regulagem: _____

1ª tentativa

2ª tentativa _____

3ª tentativa

FINAL _____ Kg

Frágil? Sim ☐ Não ☐

CLASSIFICAÇÃO SAUDÁVEL PRÉ-FRÁGIL FRÁGIL

☐☐☐

ANEXO B. Questionário Minnesota de atividades físicas, esporte e lazer.

	Atividade	Não	Sim	Meses/ ano	Média vezes/mês	Média tempo/ ocasião
Seção A						
10	Caminhada recreativa					
20	Caminhada para o trabalho					
30	Uso de escadas quando o elevador está disponível					
40	Caminhada ecológica					
50	Caminhada com mochila					
60	Alpinismo/escalando montanhas					
115	Ciclismo recreativo/por prazer					
125	Dança – salão, quadrilha e/ou discoteca, danças regionais					
135	Dança/ginástica – aeróbia, balé					
140	Hipismo/andando a cavalo					
Seção B						
150	Exercícios domiciliares					
160	Exercícios em clube/em academia					
180	Combinação de caminhada/corrida leve					
200	Corrida					
210	Musculação					
Seção C						
220	Esqui aquático					
235	Velejando em competição					
250	Canoagem ou remo recreativo					
260	Canoagem ou remo em competição					
270	Canoagem em viagem de acampamento					
280	Natação em piscina (pelo menos 15 metros)					
295	Natação na praia					
310	Mergulho autônomo					
320	Mergulho livre - <i>snorkel</i>					
Seção D						
340	Esquiar na montanha					
250	Esquiar no plano					
360	Patinação no gelo ou sobre rodas					
370	Trenó ou tobogã					
Seção E						
390	Boliche					
400	Voleibol					
410	Tênis de mesa					
420	Tênis individual					
430	Tênis de duplas					
480	Basquete sem jogo (bola ao cesto)					
490	Jogo de basquete					
500	Basquete com juiz					
520	Handebol					
530	<i>Squash</i>					
540	Futebol					
70	Dirigir carro de golfe					
80	Golfe- Caminhada, tirando tacos do carro					
90	Golfe- Caminhada carregando tacos					
Seção F						
550	Cortar a grama dirigindo um carro de cortar grama					
560	Cortar a grama andando atrás do cortador de grama motorizado					
570	Cortar a grama empurrando o cortador de grama manual					
580	Tirando o mato e cultivando o jardim/horta					
590	Afofar, cavando e cultivando a terra no jardim e na horta					
600	Trabalho com ancinho na grama					
610	Remoção de neve/terra com a pá					
Seção G						
620	Carpintaria em oficina					
630	Pintura interna de casa ou colocação de papel de parede					
640	Carpintaria do lado de fora da casa					
650	Pintura exterior de casa					
Seção H						
660	Pesca na margem do rio					
	Pesca em correnteza com botas					
Seção I: Outras atividades						

9. REFERÊNCIAS

1. Breen L, Phillips SM. Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the 'anabolic resistance' of ageing. *Nutr Metab (Lond)*. 2011 Oct 05;8:68.
2. Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc*. 2002 May;50(5):889-96.
3. Morley JE. Sarcopenia in the elderly. *Fam Pract*. 2012 Apr;29 Suppl 1:i44-i8.
4. Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I, et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ*. 2005 Aug 30;173(5):489-95.
5. Rockwood K, Mitnitski A. Frailty defined by deficit accumulation and geriatric medicine defined by frailty. *Clin Geriatr Med*. 2011 Feb;27(1):17-26.
6. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001 Mar;56(3):M146-56.
7. Bagshaw SM, McDermid RC. The role of frailty in outcomes from critical illness. *Curr Opin Crit Care*. 2013 Oct;19(5):496-503.
8. Evans WJ. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr*. 2010 Apr;91(4):1123S-7S.
9. Cooper C, Dere W, Evans W, Kanis JA, Rizzoli R, Sayer AA, et al. Frailty and sarcopenia: definitions and outcome parameters. *Osteoporos Int*. 2012 Jul;23(7):1839-48.
10. Bauer JM, Sieber CC. Sarcopenia and frailty: a clinician's controversial point of view. *Exp Gerontol*. 2008 Jul;43(7):674-8.
11. Aoyama M, Suzuki Y, Onishi J, Kuzuya M. Physical and functional factors in activities of daily living that predict falls in community-dwelling older women. *Geriatr Gerontol Int*. 2011 Jul;11(3):348-57.
12. Landi F, Cruz-Jentoft AJ, Liperoti R, Russo A, Giovannini S, Tosato M, et al. Sarcopenia and mortality risk in frail older persons aged 80 years and older: results from the SIRENTE study. *Age Ageing*. 2013 Mar;42(2):203-9.
13. Rizzoli R, Reginster JY, Arnal JF, Bautmans I, Beaudart C, Bischoff-Ferrari H, et al. Quality of life in sarcopenia and frailty. *Calcif Tissue Int*. 2013 Aug;93(2):101-20.
14. Samuel D, Rowe P, Hood V, Nicol A. The relationships between muscle strength, biomechanical functional moments and health-related quality of life in non-elite older adults. *Age Ageing*. 2012 Mar;41(2):224-30.
15. Harmell AL, Jeste D, Depp C. Strategies for successful aging: a research update. *Curr Psychiatry Rep*. 2014 Oct;16(10):476.
16. Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc*. 2004 Jan;52(1):80-5.
17. Narici MV, Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br Med Bull*. 2010;95:139-59.
18. Wall BT, van Loon LJ. Nutritional strategies to attenuate muscle disuse atrophy. *Nutr Rev*. 2013 Apr;71(4):195-208.
19. Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein

- synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Aug;291(2):E381-7.
20. Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, et al. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J*. 2005 Mar;19(3):422-4.
 21. Drummond MJ, Dreyer HC, Pennings B, Fry CS, Dhanani S, Dillon EL, et al. Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol* (1985). 2008 May;104(5):1452-61.
 22. Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundermann DM, Timmerman KL, et al. Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):11.
 23. Kumar V, Selby A, Rankin D, Patel R, Atherton P, Hildebrandt W, et al. Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol*. 2009 Jan 15;587(Pt 1):211-7.
 24. Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB, Wolfe RR. Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *JAMA*. 2001 Sep 12;286(10):1206-12.
 25. Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 1):E122-9.
 26. Dideriksen KJ, Reitelseder S, Petersen SG, Hjort M, Helmark IC, Kjaer M, et al. Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals. *Scand J Med Sci Sports*. 2011 Dec;21(6):e372-83.
 27. Symons TB, Sheffield-Moore M, Mamerow MM, Wolfe RR, Paddon-Jones D. The anabolic response to resistance exercise and a protein-rich meal is not diminished by age. *J Nutr Health Aging*. 2011 May;15(5):376-81.
 28. Pennings B, Koopman R, Beelen M, Senden JM, Saris WH, van Loon LJ. Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein-derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men. *Am J Clin Nutr*. 2011 Feb;93(2):322-31.
 29. Rosendahl E, Lindelof N, Littbrand H, Yifter-Lindgren E, Lundin-Olsson L, Haglin L, et al. High-intensity functional exercise program and protein-enriched energy supplement for older persons dependent in activities of daily living: a randomised controlled trial. *Aust J Physiother*. 2006;52(2):105-13.
 30. Bembien MG, Witten MS, Carter JM, Eliot KA, Knehans AW, Bembien DA. The effects of supplementation with creatine and protein on muscle strength following a traditional resistance training program in middle-aged and older men. *J Nutr Health Aging*. 2010 Feb;14(2):155-9.
 31. Tieland M, Dirks ML, van der Zwaluw N, Verdijk LB, van de Rest O, de Groot LC, et al. Protein supplementation increases muscle mass gain during prolonged resistance-type exercise training in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc*. 2012 Oct;13(8):713-9.
 32. Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, Clements KM, Solares GR, Nelson ME, et al. Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*. 1994 Jun 23;330(25):1769-75.
 33. Bonnefoy M, Cornu C, Normand S, Boutitie F, Bugnard F, Rahmani A, et al. The effects of exercise and protein-energy supplements on body composition and muscle function in frail elderly individuals: a long-term controlled randomised study. *Br J Nutr*. 2003 May;89(5):731-9.

34. Gannon NP, Vaughan RA. Leucine-induced anabolic/catabolism: two sides of the same coin. *Amino Acids*. 2016 Feb;48(2):321-36.
35. Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H, van Loon LJ. Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr*. 2011 May;93(5):997-1005.
36. Burd NA, Wall BT, van Loon LJ. The curious case of anabolic resistance: old wives' tales or new fables? *J Appl Physiol* (1985). 2012 Apr;112(7):1233-5.
37. Raj IS, Bird SR, Shield AJ. Aging and the force-velocity relationship of muscles. *Exp Gerontol*. 2010 Feb;45(2):81-90.
38. Nair KS. Aging muscle. *Am J Clin Nutr*. 2005 May;81(5):953-63.
39. Doherty TJ. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Oct;95(4):1717-27.
40. Porter MM, Vandervoort AA, Lexell J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. *Scand J Med Sci Sports*. 1995 Jun;5(3):129-42.
41. Mitchell WK, Williams J, Atherton P, Larvin M, Lund J, Narici M. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Front Physiol*. 2012;3:260.
42. Booth FW, Weeden SH, Tseng BS. Effect of aging on human skeletal muscle and motor function. *Med Sci Sports Exerc*. 1994 May;26(5):556-60.
43. Lexell J, Taylor CC, Sjostrom M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci*. 1988 Apr;84(2-3):275-94.
44. Boros K, Freemont T. Physiology of ageing of the musculoskeletal system. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017 Apr;31(2):203-17.
45. Biressi S, Rando TA. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Oct;21(8):845-54.
46. Garcia-Prat L, Sousa-Victor P, Munoz-Canoves P. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):4051-62.
47. Jejurikar SS, Henkelman EA, Cederna PS, Marcelo CL, Urbanek MG, Kuzon WM, Jr. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp Gerontol*. 2006 Sep;41(9):828-36.
48. Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Aug;35(8):1151-6.
49. Narici MV, Maganaris CN, Reeves ND, Capodaglio P. Effect of aging on human muscle architecture. *J Appl Physiol* (1985). 2003 Dec;95(6):2229-34.
50. Kubo K, Kanehisa H, Azuma K, Ishizu M, Kuno SY, Okada M, et al. Muscle architectural characteristics in young and elderly men and women. *Int J Sports Med*. 2003 Feb;24(2):125-30.
51. Blazeovich AJ, Sharp NC. Understanding muscle architectural adaptation: macro- and micro-level research. *Cells Tissues Organs*. 2005;181(1):1-10.
52. Burd NA, Gorissen SH, van Loon LJ. Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging. *Exerc Sport Sci Rev*. 2013 Jul;41(3):169-73.
53. Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, Tang JE, Glover EI, Wilkinson SB, et al. Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan;89(1):161-8.
54. Pennings B, Groen B, de Lange A, Gijsen AP, Zorenc AH, Senden JM, et al. Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Apr 15;302(8):E992-9.

55. Wall BT, Gorissen SH, Pennings B, Koopman R, Groen BB, Verdijk LB, et al. Aging Is Accompanied by a Blunted Muscle Protein Synthetic Response to Protein Ingestion. *PLoS One*. 2015;10(11):e0140903.
56. Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR. Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am J Clin Nutr*. 2005 Nov;82(5):1065-73.
57. Volpi E, Mittendorfer B, Rasmussen BB, Wolfe RR. The response of muscle protein anabolism to combined hyperaminoacidemia and glucose-induced hyperinsulinemia is impaired in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;85(12):4481-90.
58. Boirie Y, Gachon P, Beaufrere B. Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr*. 1997 Feb;65(2):489-95.
59. Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, Mittendorfer B, Roy M, Rowe VL, et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):768-9.
60. Dickinson JM, Drummond MJ, Coben JR, Volpi E, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle amino acid transporter expression when essential amino acids are ingested after exercise. *Clin Nutr*. 2012 Apr;32(2):273-80.
61. Jourdan M, Deutz NE, Cynober L, Aussel C. Features, causes and consequences of splanchnic sequestration of amino acid in old rats. *PLoS One*. 2011;6(11):e27002.
62. Morton RW, Traylor DA, Weijs PJM, Phillips SM. Defining anabolic resistance: implications for delivery of clinical care nutrition. *Curr Opin Crit Care*. 2018 Apr;24(2):124-30.
63. Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjaer M. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scand J Med Sci Sports*. 2010 Feb;20(1):49-64.
64. Korhonen MT, Cristea A, Alen M, Hakkinen K, Sipila S, Mero A, et al. Aging, muscle fiber type, and contractile function in sprint-trained athletes. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Sep;101(3):906-17.
65. Churchward-Venne TA, Tieland M, Verdijk LB, Leenders M, Dirks ML, de Groot LC, et al. There Are No Nonresponders to Resistance-Type Exercise Training in Older Men and Women. *J Am Med Dir Assoc*. 2015 May 01;16(5):400-11.
66. Luiking YC, Deutz NE, Memelink RG, Verlaan S, Wolfe RR. Postprandial muscle protein synthesis is higher after a high whey protein, leucine-enriched supplement than after a dairy-like product in healthy older people: a randomized controlled trial. *Nutr J*. 2014;13:9.
67. Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Sep;107(3):987-92.
68. Phillips SM. A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy. *Sports Med*. 2014 May;44 Suppl 1:S71-7.
69. Balage M, Dardevet D. Long-term effects of leucine supplementation on body composition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 May;13(3):265-70.
70. Buse MG, Reid SS. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest*. 1975 Nov;56(5):1250-61.
71. 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.

72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Vary TC, Lynch CJ. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. *J Nutr.* 2007 Aug;137(8):1835-43.
76. Scognamiglio R, Avogaro A, Negut C, Piccolotto R, de Kreutzenberg SV, Tiengo A. The effects of oral amino acid intake on ambulatory capacity in elderly subjects. *Aging Clin Exp Res.* 2004 Dec;16(6):443-7.
77. Scognamiglio R, Piccolotto R, Negut C, Tiengo A, Avogaro A. Oral amino acids in elderly subjects: effect on myocardial function and walking capacity. *Gerontology.* 2005 Sep-Oct;51(5):302-8.
78. Scognamiglio R, Testa A, Aquilani R, Dioguardi FS, Pasini E. Impairment in walking capacity and myocardial function in the elderly: is there a role for nonpharmacologic therapy with nutritional amino acid supplements? *Am J Cardiol.* 2008 Jun 2;101(11A):78E-81E.
79. Borsheim E, Bui QU, Tissier S, Kobayashi H, Ferrando AA, Wolfe RR. Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clin Nutr.* 2008 Apr;27(2):189-95.
80. Solerte SB, Gazzaruso C, Bonacasa R, Rondanelli M, Zamboni M, Basso C, et al. Nutritional supplements with oral amino acid mixtures increases whole-body lean mass and insulin sensitivity in elderly subjects with sarcopenia. *Am J Cardiol.* 2008 Jun 2;101(11A):69E-77E.
81. Dillon EL, Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Gilkison C, Sanford AP, Casperson SL, et al. Amino acid supplementation increases lean body mass, basal muscle protein synthesis, and insulin-like growth factor-I expression in older women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1630-7.
82. Leenders M, Verdijk LB, van der Hoeven L, van Kranenburg J, Hartgens F, Wodzig WK, et al. Prolonged leucine supplementation does not augment muscle mass or affect glycemic control in elderly type 2 diabetic men. *J Nutr.* 2011 Jun;141(6):1070-6.
83. Verhoeven S, Vanschoonbeek K, Verdijk LB, Koopman R, Wodzig WK, Dendale P, et al. Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am J Clin Nutr.* 2009 May;89(5):1468-75.
84. Trabal J, Forga M, Leyes P, Torres F, Rubio J, Prieto E, et al. Effects of free leucine supplementation and resistance training on muscle strength and functional status in older adults: a randomized controlled trial. *Clin Interv Aging.* 2015;10:713-23.
85. Lustosa LP, Pereira DS, Dias RC, Britto RR, Parentoni AN, Pereira LSM. Tradução e adaptação transcultural do Minnesota Leisure Time Activities Questionnaire em idosos. *Geriatrics & Gerontologia.* 2011;5(2):57-65.
86. Taylor HL, Jacobs DR, Jr., Schucker B, Knudsen J, Leon AS, Debacker G. A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *J Chronic Dis.* 1978;31(12):741-55.
87. Borg G, Hassmen P, Lagerstrom M. Perceived exertion related to heart rate and blood lactate during arm and leg exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1987;56(6):679-85.

88. Association AH. Electrocardiogram (ECG or EKG). 2015 [updated 2015; cited]; Available from: <http://www.heart.org/HEARTORG>.
89. Reeves ND, Maganaris CN, Narici MV. Ultrasonographic assessment of human skeletal muscle size. *Eur J Appl Physiol*. 2004 Jan;91(1):116-8.
90. Silva-Batista C, Tricoli V, Laurentino G, Batista M, Okuno N, Ugrinowitsch C. Efeito da familiarização na estabilização dos valores de 1RM. *Motriz*. 2011;17(4):610-7.
91. Brown L, Weir J. ASEP procedures recommendation I: accurate assessment of muscular strength and power. *Journal of Exercise Physiology*. 2011;4(3):1-21.
92. Jose A. Parraca PRO, Ana Carbonell-Baeza, Virginia A Aparicio, Jose C. Adsuar, Nacis Gusi. Test-Retest reliability of Biodex Balance SD on physically active old people. *JOURNAL OF HUMAN SPORT & EXERCISE* 2011;6(2):444-51.
93. Sieri T, Beretta G. Fall risk assessment in very old males and females living in nursing homes. *Disabil Rehabil*. 2004 Jun 17;26(12):718-23.
94. Newcomer KL, Krug HE, Mahowald ML. Validity and reliability of the timed-stands test for patients with rheumatoid arthritis and other chronic diseases. *J Rheumatol*. 1993 Jan;20(1):21-7.
95. Podsiadlo D, Richardson S. The timed "Up & Go": a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J Am Geriatr Soc*. 1991 Feb;39(2):142-8.
96. Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Jr., Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry; 2005.
97. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
98. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.
99. Polacow V, Scagliusi F, Lancha Jr A, editors. Qualitative evaluation of an auxiliary tool for portion sizes estimation among a Brazilian sample. 5th International Conference on Dietary Assessment Methods; 2003.
100. Polacow V, Scagliusi F, Lancha Jr A, editors. Validation of a portion-size measurement aid in a Brazilian sample. 5th International Conference on Dietary Assessment Methods; 2003.
101. Hess M. Portion Photos of Popular Foods. Chicago: American Dietetic Association; 1997.
102. Vellas B, Guigoz Y, Garry PJ, Nourhashemi F, Bennahum D, Lauque S, et al. The Mini Nutritional Assessment (MNA) and its use in grading the nutritional state of elderly patients. *Nutrition*. 1999 Feb;15(2):116-22.
103. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Revista brasileira de reumatologia*. 1999;39(3):143-50.
104. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care*. 1994 Mar;21(1):55-67.
105. Borack MS, Volpi E. Efficacy and Safety of Leucine Supplementation in the Elderly. *J Nutr*. 2016 Dec;146(12):2625S-9S.
106. Churchward-Venne TA, Breen L, Di Donato DM, Hector AJ, Mitchell CJ, Moore DR, et al. Leucine supplementation of a low-protein mixed macronutrient

beverage enhances myofibrillar protein synthesis in young men: a double-blind, randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2014 Feb;99(2):276-86.

107. Dickinson JM, Gundermann DM, Walker DK, Reidy PT, Borack MS, Drummond MJ, et al. Leucine-enriched amino acid ingestion after resistance exercise prolongs myofibrillar protein synthesis and amino acid transporter expression in older men. *J Nutr*. 2014 Nov;144(11):1694-702.

108. Xu ZR, Tan ZJ, Zhang Q, Gui QF, Yang YM. The effectiveness of leucine on muscle protein synthesis, lean body mass and leg lean mass accretion in older people: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*. 2015 Jan 14;113(1):25-34.

109. Bartali B, Frongillo EA, Bandinelli S, Lauretani F, Semba RD, Fried LP, et al. Low nutrient intake is an essential component of frailty in older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006 Jun;61(6):589-93.

110. Mustafa J, Ellison RC, Singer MR, Bradlee ML, Kalesan B, Holick MF, et al. Dietary Protein and Preservation of Physical Functioning Among Middle-Aged and Older Adults in the Framingham Offspring Study. *Am J Epidemiol*. 2018 Jul 1;187(7):1411-9.

111. Gray-Donald K, St-Arnaud-McKenzie D, Gaudreau P, Morais JA, Shatenstein B, Payette H. Protein intake protects against weight loss in healthy community-dwelling older adults. *J Nutr*. 2014 Mar;144(3):321-6.

112. Houston DK, Nicklas BJ, Ding J, Harris TB, Tylavsky FA, Newman AB, et al. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *Am J Clin Nutr*. 2008 Jan;87(1):150-5.

113. Morley JE, Vellas B, van Kan GA, Anker SD, Bauer JM, Bernabei R, et al. Frailty consensus: a call to action. *J Am Med Dir Assoc*. 2013 Jun;14(6):392-7.

114. Murphy CH, Saddler NI, Devries MC, McGlory C, Baker SK, Phillips SM. Leucine supplementation enhances integrative myofibrillar protein synthesis in free-living older men consuming lower- and higher-protein diets: a parallel-group crossover study. *Am J Clin Nutr*. 2016 Dec;104(6):1594-606.

115. Murphy CH, Oikawa SY, Phillips SM. Dietary Protein to Maintain Muscle Mass in Aging: A Case for Per-meal Protein Recommendations. *J Frailty Aging*. 2016;5(1):49-58.

116. Loenneke JP, Loprinzi PD, Murphy CH, Phillips SM. Per meal dose and frequency of protein consumption is associated with lean mass and muscle performance. *Clin Nutr*. 2016 Dec;35(6):1506-11.

117. Holwerda AM, Paulussen KJM, Overkamp M, Goessens JPB, Kramer IF, Wodzig W, et al. Leucine co-ingestion augments the muscle protein synthetic response to the ingestion of 15 g protein following resistance exercise in older men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019 May 21.

118. Schoenfeld BJ, Grgic J, Krieger J. How many times per week should a muscle be trained to maximize muscle hypertrophy? A systematic review and meta-analysis of studies examining the effects of resistance training frequency. *J Sports Sci*. 2018 Jun;37(11):1286-95.

119. Cadore EL, Rodriguez-Manas L, Sinclair A, Izquierdo M. Effects of different exercise interventions on risk of falls, gait ability, and balance in physically frail older adults: a systematic review. *Rejuvenation Res*. 2012 Apr;16(2):105-14.