UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeitos da suplementação de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina

Carlos Eduardo Carvalho Martins

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo – SP 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos Área de Nutrição Experimental

Efeitos da suplementação de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina

Carlos Eduardo Carvalho Martins

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo – SP 2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Martins, Carlos Eduardo Carvalho

M386e Efeitos da suplementação de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina / Carlos Eduardo Carvalho Martins. -- São Paulo, 2016.

95p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando

Diabetes mellitus
 Atrofia muscular
 Aminoácidos
 Treinamento de força I. T. II. Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.

616.462 CDD

Carlos Eduardo Carvalho Martins

Efeitos da suplementação de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo Orientador/Presidente

Prof. Dr. Inar Alves de Castro 1º. Examinador

Prof. Dr. Marilia Cerqueira Leite Seelaender 2º. Examinador

EPÍGRAFE

"Suspeito que nossas escolas ensinem com muita precisão a ciência de comprar as passagens e arrumar as malas. Mas tenho sérias dúvidas de que elas ensinem os alunos a arte de ver enquanto viajam"

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Julio Tirapegui pela orientação e amizade.

Agradeço em especial a Vanessa Lima pela ajuda, amizade e companheirismo, aos meus colegas de laboratório (USP) que me ajudaram nesta etapa acadêmica e aos amigos e familiares.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa a mim concedida.

Agradeço também aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma colaboraram para a finalização desta etapa.

RESUMO

MARTINS, CEC. Efeitos da suplementação de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina. 2016. Dissertação (mestrado) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Neste trabalho, avaliamos os efeitos da suplementação crônica de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética. 40 ratos machos da linhagem Wistar Hannover foram distribuídos em 5 grupos: controle, não diabético (C), diabético não tratado (D), diabético treinado (DT), diabético suplementado com leucina e treinado (DLT). O início das intervenções ocorreu na 4ª semana de vida dos animais, e perdurou por 8 semanas. Foram avaliados: massa corporal, consumo de ração e água, concentrações sanguíneas de glicose, insulina e perfil lipídico; capacidade funcional muscular voluntária através de testes de força de preensão e de ambulação; conteúdo intracelular de proteínas relacionadas à via anabólica mTOR e p70S6K, totais e fosforiladas, no músculo extensor longo dos dedos. Os ratos diabéticos não tratados (grupo D) apresentaram hiperglicemia e hipoinsulinemia moderada, menor massa corporal, maior consumo de ração e água, menor peso absoluto dos músculos extensor longo dos dedos e gastrocnêmio, menor força de preensão, menor capacidade de ambulação e menor atividade das proteínas mTOR e p70S6K comparado ao grupo C, o que caracteriza o quadro de miopatia diabética. O peso relativo do músculo gastrocnêmico (peso absoluto/100g de peso do animal) foi maior nos grupos DT e DLT comparado com o grupo D, e maior no grupo DLT comparado com o grupo DL (p < 0.05). Não houve diferença estatística entre os grupos DL e D sobre os pesos relativos dos músculos, ou seja, a suplementação crônica de leucina não afetou este parâmetro nos ratos diabéticos. Interessantemente, houve diferença estatística entre os grupos DL e D sobre a força muscular (p < 0,05), sem haver diferença entre grupos DL e C quanto à glicemia; ou seja, a dieta suplementada com leucina foi capaz de controlar a glicemia e atenuar a perda de força muscular. O treinamento de força também controlou a glicemia, recuperou a força muscular e melhorou a capacidade de ambulação, bem como a regulação da via mTOR-p70S6K. A fosforilação da via mTOR-p70S6K foi maior nos grupos DT e DLT comparado com o grupo D (p < 0,05), e sem diferença entre estes grupos treinados e o grupo C, sugerindo que o treinamento de força combinado com a suplementação de leucina recuperou a atividade da via do mTORp70S6K nos animais diabéticos, que pode refletir em maior síntese proteica muscular. O colesterol total do grupo D foi maior comparado com o do grupo C; e nos grupos diabéticos treinados (DT e DLT), este parâmetro foi menor do que no grupo D (p < 0,05). Adicionalmente, o HDL-c aumentou nos grupos treinados (DT e DLT) quando comparado com o grupo D, mas não alterou no grupo que recebeu apenas a suplementação de leucina (grupo DL). Portanto, neste estudo, a suplementação crônica de leucina por si só normalizou a glicemia e melhorou a força muscular dos animais diabéticos. Além disso, o treinamento de força foi responsável pelo maior aumento de força e da massa muscular, bem como pela normalização da glicemia, pela elevação da concentração de HDL-c e pela redução do colesterol total dos animais diabéticos e ambas foram capaz de recuperar a via mTOR-p70S6K.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, atrofia muscular, leucina, treinamento de força.

ABSTRACT

MARTINS, CEC. Effects of leucine supplementation and resistance training on diabetic myopathy in experimental diabetes mellitus induced by streptozotocin. 2016. Dissertation (Masters) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2016.

In this study, we evaluated the effects of chronic supplementation with leucine and resistance training on diabetic myopathy. 40 Wistar Hannover rats were divided into 5 groups: control, non-diabetic (C), untreated diabetic (D), trained diabetic (DT), diabetic supplemented with leucine and trained (DLT). The beginning of the interventions occurred in the 4th week of life of the animals, and lasted for 8 weeks. Were evaluated: body weight, food and water intake, blood concentrations of glucose, insulin and lipid profile; voluntary muscle functional capacity through grip strength and ambulation test; intracellular content of proteins related to the anabolic mTOR and p70S6K pathway, total and phosphorylated in the extensor digitorum longus muscle. Diabetics untreated mice (group D) had hyperglycemia and moderate hypoinsulinemia, lower body mass, food and water intake, reduced absolute weights of the muscles of the long extensor digitorum, and gastrocnemius, the lower grip strength, lower ambulation capacity and lower activity of mTOR and p70S6K protein compared the C group, featuring diabetic myopathy. The relative weight of the gastrocnemius muscle (absolute weight / 100g of body weight) was greater in DT and DLT groups compared with group D, and higher in the DLT group compared to the DL group (P < 0.05). No statistical difference between the DL and D groups on the relative weights of the muscles, that is, chronic supplementation of leucine did not affect this parameter in diabetic rats. Interestingly, there was statistical difference between the DL and D groups on muscle strength (P < 0.05), with no difference between groups DL and C on the blood glucose; that is, the diet supplemented with leucine was able to control glycemia and avoid loss of muscle strength of diabetic animals. Resistance training also controlled glycemia, recovered muscle strength and improved the capacity of ambulation of diabetic animals and the regulation of the mTOR-p70S6K pathway. The phosphorylation of mTOR-p70S6K pathway was higher only in the DT and DLT groups compared with the D group (P < 0.05), and no difference between the DT and C groups, suggesting that the training recovered muscle mass in diabetic animals. Total cholesterol was greater in Group D compared to the group C: and trained diabetic groups (DLT and DT), this parameter was lower than that of the D group (P < 0.05). In addition, HDL-C increased in trained groups (DT and DLT) as compared to group D, but had no effect the group that received only supplementation (DL group). Therefore, in this study, supplementation of leucine alone normalized glucose and improved muscle strength of diabetic animals. In addition, resistance training was responsible for the largest increase in strength and muscle mass, as well as the normalization of glucose, elevated concentrations of HDL-C and reduction in total cholesterol of animals diabetics and both were able to recover mTOR- p70S6K pathway.

Keywords: Diabetes mellitus, muscular atrophy, leucine, strength training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinalização envolvida na síntese proteica mediada por leucina, insulina,
IGF-1 e exercício de força19
Figura 1 do artigo1/capitulo1: Evolução semanal da massa corporal dos grupos
experimentais54
Figura 2 do artigo1/capitulo1: Parâmetros funcionais da musculatura esquelética
dos grupos experimentais56
Figura 3 do artigo1/capitulo1: Leucina e treinamento de força sobre a via
dependente de mTOR (mTOR, p70S6K)
Figura 1 do artigo2/capitulo2: Perfil lipídico sérico e glicemia de jejum de ratos
diabeticos induzidos por estreptozotocina submetidos à suplementação de leucina e
treinamento de força71
Figura 2 do artigo2/capitulo2: Massa corporal na 12ª semana de vida de ratos
diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos à suplementação de leucina e
treinamento de força72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 do artigo1/capitulo1: Efeitos do treinamento de força e leucina no	peso
dos músculos absoluto e relativo, glicose pós-prandial e de jejum, insulina de je	jum e
consumo de ração e água dos grupos experimentais	55

LISTA DE SIGLAS

4E-BP1 Proteína ligante do fator de iniciação 4E

AAI Índice antiaterogênico

ADP Adenosina difosfato

AIN American Institute of Nutrition

Akt Proteína quinase B

AMP Adenosina monofosfato

AMPK Proteína quinase ativada por AMP

BCAA Aminoácidos de cadeia ramificada

DM Diabetes mellitus

EDL Extensor longo dos dedos

elF Fator de iniciação dos eucariotos

elF4E Fator de iniciação dos eucariotos 4E

elF4G Fator de iniciação dos eucariotos 4G

elF4F Complexo de fatores de iniciação dos eucariotos 4F

FoxO Forkhead Box-O

GAS Gastrocnêmio

GDH Glutamato desidrogenase

IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IgG Imunoglobulina G

IRS-1 Substrato 1 do receptor de insulina

KIC α-cetoisocaproato

LCAT Lecitina-colesterol aciltransferase

LEU Leucina

MAFbx Muscle atrophy F-box

mTOR Alvo da Rapamicina em Mamíferos

mTORC1 Complexo mTOR 1

MuRF-1 muscle RING finger 1

NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo

PARP Poli ADP-ribose polimerase

PBST Solução salina tamponada com fosfato acrescida de *Tween*

PI3K Fosfatidilinositol 3 quinase

RM Repetição máxima

RNAm RNA mensageiro

SDS Sodium duodecyl sulfate

SL Suplementação de leucina

SOL Sóleo

SPM Síntese proteica muscular

STZ Estreptozotocina

TEMED Tetrametiletilenediamina

TF Treinamento de força

UPS Sistema ubiquitina proteassoma

xMAPTM Multiple analyte profiling

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SIGLAS	11
SUMÁRIO	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Animais	25
4.1.1 Indução do diabetes	25
4.2 Desenho e grupo experimental	26
4.2.1 Rações	26
4.2.2 Treinamento de força	27
4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA E SISTÊMICA	29
4.4 Teste funcional do músculo esquelético	29
4.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	30
4.6 Análises séricas	30
4.6.1 PERFIL LIPÍDICO NO SORO	30
4.6.2 GLICOSE DE JEJUM NO SORO	30
4.6.3 INSULINA DE JEJUM NO SORO	31

4.7 WESTERN BLOTTING
4.7.1 Extração de proteínas
4.7.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL
4.7.3 Preparo do gel de policrilamida
4.7.4 SDS-PAGE
4.7.5 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GEL PARA A MEMBRANA
4.7.6 SONDAGENS DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPOS
4.7.7 REVELAÇÃO COM SISTEMAS QUIMIOLUMINESCENTE
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA34
6 CAPÍTULO 1/ARTIGO 135
7 CAPÍTULO 2/ARTIGO 259
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS73
9 REFERÊNCIAS74
10 ANEXOS 86
ANEXO 1. INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO87
ANEXO 2. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEUA)
ANEXO 3. FICHA DO ALUNO90
ANEXO 4. CURRÍCULO LATTES

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica que é resultante da deficiência e/ou resistência à insulina. No Brasil, estimase que o número de indivíduos diabéticos corresponderá a mais que 10 milhões em 2030, sendo o diabetes tipo I e II, as formas mais prevalentes (WILD et al., 2004; WHITING et al., 2011; ADA, 2012).

No DM tipo 1, além dos sintomas clássicos (poliúria, polidipsia e polifagia), pode ocorrer a perda de massa corporal associada ao aumento do metabolismo energético basal, sendo que a disfunção metabólica nesta doença é resultante predominantemente pela falência das células β pancreáticas (HEIMANN, 2003; POORNIMA, PARIKH & SHANNON, 2006; HEBERT & NAIR, 2010). É também comum o aparecimento de degenerações do músculo esquelético, decorrente da menor capacidade oxidativa, contratilidade e capilarização deste tecido, o que culmina com um quadro de miopatia diabética, no qual a atrofia muscular é a característica mais marcante (AUGHSTEEN, KHAIR & SULEIMAN, 2006; ZOLL et al., 2006; KRAUSE et al., 2009; KRAUSE et al., 2013).

A hiperglicemia crônica, no DM tipo 2, está diretamente relacionada com distúrbios na cascata de sinalização da insulina. Nesta doença também ocorrem prejuízos na funcionalidade do músculo esquelético devido à menor capacidade de síntese de glicogênio e de utilização da glicose como substrato energético, bem como à menor taxa de oxidação de lipídeos decorrente da disfunção mitocondrial, o que reduz a capacidade da musculatura esquelética de produzir energia em indivíduos diabéticos. Assim, por se tratar de uma doença degenerativa, tanto o DM tipo I quanto tipo II pode comprometer a funcionalidade do músculo esquelético e causar a atrofia deste tecido que pode evoluir para um quadro de miopatia diabética (RABOL et al., 2010; ZELEZNIAK et al., 2010; KRAUSE, RIDDELL & HAWKE, 2011).

A atrofia muscular é caracterizada por uma redução da área de secção transversa da fibra muscular e do seu conteúdo proteico, o que prejudica a capacidade do músculo esquelético de produzir força e potência, bem como aumenta a fatigabilidade deste tecido, comprometendo a aptidão física do indivíduo diabético

(PAVY-LE, et al., 2007; EVANS, 2010; KRAUSE; RIDDELL & HAWKE, 2011). Rodríguez et al. (1997) mostraram que o diabetes causa uma redução no conteúdo de proteína total e no tamanho da fibra muscular. Neste estudo, o músculo gastrocnêmio de ratos machos diabéticos foi reduzido cerca de 30%, enquanto que o conteúdo de proteína diminuiu em torno de 51%. Além disso, o DM pode reduzir a capacidade contrátil do músculo esquelético. Um estudo de Andersen, Schmitz e Nielsen (2005) evidenciou que a hiperglicemia aguda decorrente de uma infusão de glicose reduziu drasticamente a força contrátil isométrica do músculo esquelético em indivíduos diabéticos tipo 1.

No diabetes, a etiologia da doença degenerativa do músculo esquelético é multifatorial, podendo ser decorrente da acidose metabólica (FRANÇA et al., 2012), do mau funcionamento das células satélites (JEONG, CONBOY & CONBOY 2013), da hiperglicemia e do estado inflamatório crônico causados por falhas na secreção e/ou ação da insulina, sendo estes últimos importantes ativadores do sistema ubiquitina proteassoma (UPS) (SACHECK et al., 2007; LOKIREDDY et al., 2012). Este sistema é uma das principais vias responsáveis pela degradação proteica muscular que contribui para a atrofia muscular esquelética (COHEN et al., 2009; LOKIREDDY et al., 2012; WORKENEH & BAJAJ, 2013; COHEN, NATHAN & GOLDBERG, 2014).

Defeitos na cascata de fosforilação da insulina como, por exemplo, uma inibição do "eixo" substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1)/fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K)/Akt ativará o fator de transcrição *Forkhead Box-O* (FoxO) e no núcleo estimulará a expressão de ubiquitinas ligases E3 específicas (ou atrogenes): *Muscle atrophy F-box* (MAFbx), também conhecida como atrogin-1, e a *muscle RING finger 1* (MuRF-1) (MITCH & GOLDBERG, 1996; WANG et al., 2006; MASCHER et al., 2008). Estes atrogenes ligam moléculas de ubiquitinas às proteínas miofibrilares, as quais são sinalizadas, reconhecidas e degradadas no proteassoma, uma organela composta por um complexo catalítico central, o 20S. As proteínas miofibrilares correspondem cerca de 85% das proteínas musculares esqueléticas. Portanto, a ativação deste sistema (UPS) no diabetes contribui para a atrofia muscular nesta doença (WHITEHOUSE & TISDALE, 2001; GLICKMAN & CIECHANOVER, 2002; MÔNICO-NETO et al., 2013).

Outro fator que contribui para a acelerada perda de massa muscular no diabetes é a manifestação crônica da cetoacidose. Workeneh e Bajaj (2013) afirmam que na cetoacidose diabética ocorre uma alteração no metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA). Estes autores demonstraram que ratos diabéticos com cetoacidose apresentaram elevadas taxas de descarboxilação oxidativa e transaminação de aminoácidos, principalmente de valina e de leucina, o que contribuiu de sobremaneira para a perda de massa muscular. Esta disfunção metabólica atua diretamente no aumento da atividade da enzima desidrogenase de cetoácidos derivados dos BCAA, o que eleva o catabolismo oxidativo destes aminoácidos; além disso, aumenta a atividade de transaminases, enzimas que transferem grupos aminas dos BCAA para cetoácidos (WORKENEH & BAJAJ, 2013).

Além do elevado grau de catabolismo proteico observado no diabetes, é fato conhecido que o prejuízo no anabolismo proteico também contribui de maneira importante para a atrofia muscular nesta doença. No DM, a diminuição da sensibilidade à insulina causa um fenômeno conhecido por resistência anabólica muscular, no qual a célula muscular é incapaz de responder ao estímulo induzido pela insulina pós-prandial para que ocorra a síntese proteica. Assim, a redução na síntese de proteínas musculares também compromete a capacidade motora funcional e acentua a disfunção metabólica nesta doença (PRADO et al., 2008; NARICI & MAFFULLI, 2010; FARNFIELD et al., 2012). No diabetes, a perda de massa muscular é, portanto, uma consequência de distúrbios envolvidos no equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas intramusculares (NEWSHOLME et al., 2011).

Para esclarecer aspectos da complexa fisiopatologia do diabetes mellitus, o uso de modelos experimentais de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente explorado. No interior das células β pancreáticas, esta droga aumenta a produção de radicais livres que ocasionam dano ao DNA celular. A lesão celular, por sua vez, ativa a enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP) que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como substrato, reduzindo a sua concentração no meio intracelular, o que causa morte da célula beta (MURATA et al., 1999; TAKADA et al., 2007; LENZEN, 2008).

A indução do diabetes com a injeção de STZ em ratos no período neonatal provoca a destruição seletiva e progressiva das células β do pâncreas, causando hiperglicemia, intolerância à glicose associada à hiperinsulinemia transitória, no

início da doença; e hipoinsulinemia moderada na fase adulta, características semelhantes ao curso natural do diabetes em humanos (TAKADA et al., 2007). Por ser um período de intensa diferenciação e replicação celular (período neonatal), a síntese de insulina é mantida pela atividade das células beta remanescentes nas semanas iniciais que sucedem a injeção de STZ. No entanto, por volta da oitava semana de vida dos animais, ocorre a exaustão funcional das células β pancreáticas que causa uma hipoinsulinemia moderada, o que eleva a concentração de glicose no sangue, na fase adulta (TAKADA et al., 2007).

Estudos experimentais com diabetes já evidenciaram que qualquer alteração na transdução do sinal da insulina prejudica a resposta anabólica muscular por interferir na expressão de genes relacionados à síntese proteica (GRZELKOWSKA et al., 1999; GRZELKOWSKA-KOWALCZYK & WIETESKA, 2005). Em outro estudo, o de Wieteska-Skrzeczynska et al. (2009) foi constatado uma redução na expressão de genes que regulam a tradução proteica no músculo esquelético de ratos diabéticos induzido por STZ, como o fator de iniciação eucariótico (eIF) 4E-binding protein 1 (4E-BP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G), o que afeta a síntese proteica e pode causar um desequilíbrio no turnover proteico muscular.

Uma eficiente ativação da cascata de fosforilação de insulina e uma adequada homeostase glicêmica são importantes para a manutenção da massa muscular esquelética (MEDEIROS et al., 2011; NEWSHOLME et al., 2011; FRANÇA et al., 2012). Neste âmbito, a suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada, em especial a leucina, e o treinamento de força apresentam um papel anabólico importante por serem potentes sinalizadores do maior regulador miogênico, a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e, dessa forma, promovem aumentos na força e massa muscular, melhorando o *turnover* proteico e a capacidade funcional deste tecido. Portanto, a recuperação ou o aumento da massa muscular no DM por meio destas intervenções podem contribuir para melhora da homeostase glicêmica (DREYER et al., 2006; VOLEK et al., 2013).

Já foi evidenciado que a leucina é capaz de aumentar a fosforilação das proteínas alvo do mTOR, a proteína quinase ribossomal S6 de 70kDa (p70S6K) e o fator de iniciação eucariótico (elF) 4E-binding protein 1 (4E-BP1) e, assim, modula para mais o anabolismo proteico muscular (LIU et al., 2006; COFFEY et al., 2011; MACOTELA, 2011). Por meio da ativação do mTOR, a proteína p70S6K é fosforilada

e ativada, ao passo que a 4E-BP1 é fosforilado e inibido. Quando o 4E-BP1 é fosforilado, o fator de iniciação da tradução proteica (eIF4E) é liberado e pode se unir ao fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) formando o eIF4F. Esse complexo é necessário para a continuação da etapa de tradução do RNAm em proteína (ANTHONY et al., 2001). (Figura 1)

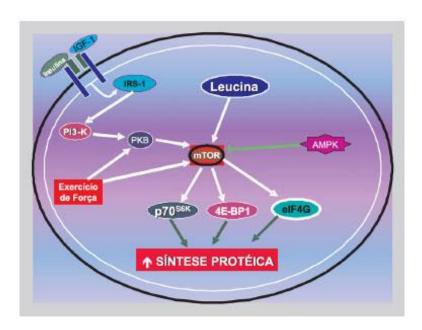


Figura 1 – Sinalização envolvida na síntese proteica mediada por leucina, insulina, IGF-1 e exercício de força. Modificado de Deldicque, Theisen e Francaux (2005). (mTOR = proteina quinase denominada alvo rapamicina em mamífero; p70S6K = proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA; elF4G = fator de iniciação eucariótico 4G; 4E-BP1 = inibidor do fator de iniciação da tradução proteica denominada elF4E; AMPK = proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMP); PKB = proteína quinase B; IRS-1 = substrato do receptor de insulina 1; PI3-K = fosfatidilinositol-3-quinase). (→ indica ativação; ¬ indica inibição).

Estudos realizados em humanos revelam que a suplementação aguda ou crônica de leucina aumenta a taxa de síntese proteica muscular (SPM). Wall et al. (2013) mostraram que a coingestão de 2,5g de leucina e 20g de caseína manteve a SPM elevada por até 6h em homens idosos quando comparada com a ingestão de caseína isolada. Em outro estudo, a ingestão de leucina (10g/L) juntamente com whey protein (60g/L) logo após uma sessão de treinamento de força aumentou significativamente a SPM e o *turnover* proteico em homens idosos (KOOPMAN et al.; 2006). Casperson et al. (2012) revelaram que 2 semanas de suplementação de leucina (12g/dia) aumentou a sinalização da via mTOR-p70S6K e a SPM em

homens idosos; apesar de não ter sido observado sinais de hipertrofia muscular, talvez pelo curto tempo de intervenção.

A leucina também apresenta uma potente característica insulinotrópica, ou seja, é capaz de aumentar a concentração de insulina pós-prandial. Este aminoácido atua sobre as células β pancreáticas e estimula a liberação dos estoques de insulina (fase rápida da secreção deste hormônio) (MANDERS et al. 2006). Estudos realizados em idosos também já evidenciaram o aumento da concentração de insulina no sangue com a suplementação de leucina (LEENDERS et al., 2011; WALL et al., 2013). Este efeito insulinotrópico da leucina também aumenta a biodisponibilidade de aminoácidos para a síntese proteica e/ou inibe o catabolismo de proteínas miofibrilares, favorecendo um balanço positivo do *turnover* proteico muscular. Uma vez que a fibra muscular é responsável pela captação de 75 a 80% da glicose pós-prandial, o efeito da leucina no anabolismo muscular pode regular a homeostase glicêmica no DM (GREENHAFF et al., 2008; NICASTRO et al., 2011; MANDERS et al., 2012).

Baseado nos efeitos da leucina sobre a secreção de insulina e ativação do mTOR, é possível que a suplementação com este aminoácido possa vencer a resistência anabólica muscular no diabetes, ou seja, a ingestão elevada de leucina ativa a via PI3K-Akt-mTOR-p70S6K e, em resposta ao aumento da insulina pósprandial, fornece subsídios para que a célula muscular esquelética recupere sua capacidade em sintetizar proteínas miofibrilares (MANDERS et al., 2012). Além do seu papel na síntese proteica já classicamente descrito, a leucina é também capaz de inibir a proteólise muscular (KIMBALL & JEFFERSON, 2006; KIMBALL, 2007; PROUD, 2007). Em um estudo de Zanchi, Nicastro e Lancha (2008) foi demonstrado que a administração de 0,35-1,35g de leucina atenua o catabolismo muscular esquelético durante a restrição energética em idosos.

Outra intervenção que tem sido destacada por favorecer o aumento da massa muscular esquelética é a prática regular do exercício de força. O treinamento de força, quando realizado regularmente, promove o remodelamento muscular (alteração na massa/volume do tecido muscular) e altera a expressão das isoformas de miosina de cadeia pesada, importantes constituintes do músculo esquelético. Tais respostas causam adaptações neuromusculares caracterizadas por aumento na força e potência muscular (KRAEMER & RATAMESS, 2005; GARBER et al., 2011).

A hipertrofia muscular é caracterizada pelo aumento da área de secção transversa do músculo esquelético, sendo uma das principais adaptações decorrentes deste tipo de treinamento (GOLDSPINK & BOOTH 1992; HELLYER et al., 2012). Esta adaptação morfológica muscular envolve inúmeros mecanismos que vão desde a deformação mecânica das fibras musculares até a ativação de processos de transcrição e tradução proteica para síntese de proteínas miofibrilares (SPIERING et al., 2008; OGASAWARA, 2013).

O mecanismo pelo qual o treinamento de força modula a diferenciação e aumento do tamanho da fibra muscular envolve a regulação da sinalização da miostatina e da via Akt-mTOR-p70S6K (LEGER et al., 2006; FUJITA et al., 2007; DRUMMOND et al., 2009; SCHOENFELD, 2010). Por meio da ação de fatores de crescimento liberados após uma sessão de TF, ocorre a ativação da fosforilação de proteínas musculares que, consequentemente, causa o remodelamento muscular e aumenta a força contrátil muscular esquelética (FERNANDES et al., 2012; HELLYER et al., 2012).

A sinalização da via do IGF-1-PI3K-Akt que ocorre após a sessão do exercício de força é também um mecanismo que favorece a ativação da via do mTOR (**Figura 1**), e é crucial para promover hipertrofia muscular bem como inibir a FoxO e as ubiquitinas ligases (MuRF-1 e MAFbx), proteínas de degradação proteica muscular. Portanto, a prática regular de TF é capaz de ativar a síntese proteica muscular e atenuar ou inibir o catabolismo proteico (SANDRI et al., 2004; LATRES et al., 2005; SPIERING et al., 2008; MASCHER et al., 2008).

Hornberger et al. (2003 e 2006) ressaltaram que a ativação do mTOR após o exercício de força intenso também pode ocorrer independentemente de insulina (**Figura 1**). Dessa forma, o TF é uma importante estratégia para aumentar a massa e a força muscular esquelética, otimizando a capacidade física do indivíduo, inclusive no diabetes (DREYER et al., 2006; BURD et al., 2010; GOODMAN et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; AGUIRRE, VAN LOON & BAAR 2013; SHAMSI et al., 2015).

De acordo com Corcoran, Lamon-Fava e Fielding (2007), o aumento da massa muscular causado pelo TF pode ser benéfico para indivíduos diabéticos, visto que a maior parte da glicose pós-prandial é captada pelo músculo esquelético. Dessa forma, a boa funcionalidade da musculatura é importante para melhorar a tolerância à

glicose, sensibilidade à insulina e a capacidade motora de pacientes diabéticos (CORCORAN, LAMON-FAVA & FIELDING, 2007).

Outro aspecto importante a ser destacado é que os efeitos do TF podem ser potencializados com a ingestão concomitante de leucina, devido a influência dessas intervenções sobre a via de sinalização do mTOR (BREEN & PHILLIPS, 2012). Em um estudo de Hulmi et al. (2009), a ingestão de 15g de *whey protein* (1,7g de LEU) imediatamente antes e após as sessões de treino de força potencializou a sinalização do mTOR, favorecendo a hipertrofia e o aumento de força muscular. Esses autores observaram que houve uma ação sinérgica das intervenções sobre a morfologia e funcionalidade do tecido muscular (HULMI et al., 2010; FARUP et al., 2014; AGUIRRE, VAN LOON & BAAR 2013). Essas estratégias podem ser, portanto, bastante eficazes em indivíduos diabéticos com atrofia muscular.

Considerando, portanto, a atrofia muscular em indivíduos diabéticos, bem como o papel da leucina e do treinamento de força no remodelamento muscular, torna-se assim relevante investigar os efeitos crônicos da suplementação deste aminoácido e do treinamento de força (isolados ou combinados) sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina, podendo ser útil para o desenvolvimento de intervenções para auxílio no tratamento do diabetes mellitus.

2. JUSTIFICATIVA

A disfunção metabólica no diabetes mellitus contribui para perda de massa muscular e redução da capacidade funcional do músculo esquelético, que pode ocorrer mesmo quando o indivíduo diabético recebe insulina exógena regularmente, pois o estímulo para que ocorra a síntese proteica muscular pós-prandial também depende de uma elevada ingestão de proteínas (CASO & MCNURLAN, 2010; KRAUSE, RIDDELL & HAWKE, 2011; GARG, 2011; BELLE, COPPIETERS & HERRATH, 2011).

Nessa perspectiva, tem se destacado o uso de estratégicas terapêuticas alternativas para controlar a perda de massa magra e, portanto, melhorar a capacidade motora muscular, a sensibilidade à insulina e a intolerância a glicose no DM. Destacam-se assim, o papel da leucina juntamente com o treinamento de força como importantes reguladores da biossíntese de proteínas musculares. Por vias dependentes e independentes de insulina, a leucina e o treinamento de força são potentes ativadores do mTOR, proteína que está envolvida com o aumento da taxa de tradução de RNAm em proteínas miofibrilares (SANS et al., 2006; MILLWARD et al., 2008; DRUMMOND et al., 2009; DURAN et al., 2011; AGUIRRE, VAN LOON & BAAR 2013; OGASAWARA et al., 2013). É importante ressaltar que a suplementação leucina associada ao treinamento de força mostrou eficácia na promoção do remodelamento muscular em condições de catabolismo proteico muscular (TIPTON et al., 2009).

Considerando, portanto, o impacto negativo da perda da massa muscular e da reduzida capacidade motora funcional na saúde geral de indivíduos diabéticos, bem como o efeito anabólico muscular da leucina e do treinamento de força, torna-se relevante investigar os efeitos destas intervenções sobre a miopatia diabética e o seu impacto no quadro clínico da doença, para que possam ser úteis como coadjuvantes no tratamento do diabetes mellitus.

3. OBJETIVOS

3. Objetivo Geral

Investigar os efeitos crônicos da suplementação de leucina e do treinamento de força (isolados ou combinados) sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina.

3.1 Objetivos específicos

Verificar a presença da hiperglicemia e hipoinsulinemia no modelo experimental de diabetes;

Avaliar a capacidade motora e funcional muscular esquelética em animais diabéticos que não receberam qualquer tipo de tratamento;

Avaliar os efeitos da suplementação crônica de leucina sobre a via mTOR-p70S6K, força muscular e capacidade de ambulação de ratos diabéticos;

Avaliar os efeitos do treinamento de força sobre a via mTOR-p70S6K, força muscular e capacidade de ambulação de ratos diabéticos;

Verificar se houve efeito sinérgico entre a suplementação crônica de leucina e o treinamento de força sobre a sobre a via mTOR-p70S6K, força muscular e capacidade de ambulação de ratos diabéticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 40 ratos machos da linhagem *Wistar Hannover*, acompanhados do nascimento até completarem doze semanas de vida. Os animais foram mantidos em caixas individuais, sob condições de temperatura ambiente controlada de 22 ± 2 °C e de umidade relativa do ar de 55 ± 10%, 15 a 20 trocas de ar por hora e com ciclo biológico invertido de 12/12 horas, com água e ração *ad libitum*. Todos os cuidados e procedimentos realizados no biotério de experimentação seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, aprovado sob o número de ofício 14.2014-P451, protocolo de n. 451.

4.1.1 Indução do diabetes

No quinto dia de vida, os animais foram separados de suas mães para induzir jejum de 8 horas. A separação foi feita cuidadosamente, de maneira que os animais permanecessem aquecidos na gaiola com maravalha da respectiva mãe. Em seguida, os neonatos receberam uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) - 120 mg/kg de peso corporal - diluída em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 4,5. Os animais do grupo controle (sem a doença) receberam uma injeção intraperitoneal contendo apenas tampão citrato para simular o mesmo tipo de estresse pelo qual os animais doentes passaram. Após o procedimento, todos os animais foram mantidos com suas respectivas mães até completarem três semanas de vida (momento do desmame).

4.2 Desenho e grupos experimentais

Foram 40 ratos *Wistar Hannover*, machos, recém-desmamados, distribuídos em cinco grupos:

- i) Grupo C sedentário, não diabético e sem suplementação (água e ração *ad libitum*);
- ii) Grupo D sedentário, diabético e suplementado com uma mistura de aminoácidos não essenciais (água e ração *ad libitum*);
- iii) Grupo DL sedentário, diabético e suplementado com leucina (água e ração ad libitum);
- iv) Grupo DT diabético, suplementado com uma mistura de aminoácidos não essenciais e que realizou treinamento de força (água e ração *ad libitum*);
- v) Grupo DLT diabético, suplementado com leucina e que realizou treinamento de força (água e ração *ad libitum*).

4.2.1 Rações

As rações foram preparadas, em forma de *pellets*, nas dependências do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (REEVES, 1997).

Ração controle — Cada quilograma da ração AIN-93M possui 620,692g de amido, 100g de sacarose, 50g de celulose, 140g de caseína, 1,8g L-cistina, 40g óleo de soja, 35g de mistura de minerais, 10g mistura de vitaminas, 2,5g de bitartarato de colina e 0,008g de terc-butil-hidroquinona.

Ração suplementada com aminoácidos não essenciais - Objetivando manter o mesmo teor de nitrogênio em relação à ração suplementada com leucina, a ração AIN-93M foi adaptada, havendo o acréscimo de uma mistura de aminoácidos não essenciais, sendo eles: alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina. Não acrescentamos um único aminoácido não essencial para minimizarmos os possíveis

efeitos metabólicos que possam gerar qualquer dúvida sobre o papel efetivo da suplementação de leucina.

Para o cálculo da dieta isonitrogenada, o peso molecular do nitrogênio foi dividido pelo peso molecular da leucina e, assim, obter o valor da quantidade de nitrogênio por grama de aminoácido (N/g de leucina). Em seguida, ocorreu à multiplicação deste resultado pela quantidade em gramas de leucina que foi suplementada por quilo de ração (50g/kg) e, posteriormente, este resultado foi dividido pelo número de aminoácidos não essenciais adicionados à ração controle. Ao final, este novo resultado foi multiplicado pelo peso molecular de cada aminoácido adicionado e dividido pelo peso molecular do nitrogênio, resultando enfim, na quantidade em gramas de cada aminoácido adicionado na ração controle.

A quantidade dos aminoácidos adicionados foi de 6,79g de alanina, 10,16g de ácido aspártico, 5,72g de glicina, 8,78g de prolina e 8,01g de serina. Para o acréscimo de 39,46g da mistura de aminoácidos, foi retirada a mesma quantidade de amido da ração para manter o mesmo valor energético entre as rações.

Ração suplementada com leucina – partindo da formulação da dieta AIN-93M, foi adicionada 5% de L-leucina (50g/1000g), ou seja, 50g de amido foram substituídos por L-leucina. Esta dose encontra-se dentro do maior nível de ingestão em que não alterou a concentração plasmática de ureia, marcador de toxicidade renal devido ao excesso de nitrogênio, após 13 semanas em ratos (TSUBUKU et al., 2004). Além disso, Matskaki et al. (2005) não encontrou qualquer alteração na massa corporal, na ingestão alimentar, na atividade de biomarcadores de toxicidade as enzimas aspartato aminotransferase, hepática e renal como alanina aminotransferase. fosfoquinase fosfatase creatina alcalina ratos suplementados com 5% de leucina.

4.2.2 Treinamento de força

O protocolo de treinamento de força utilizado neste experimento foi proposto por Hornberger e Farrar (2004), com duração de oito semanas. Os animais dos grupos DT e DTL foram submetidos a uma única sessão de treinamento por dia, três dias/semana, durante oito semanas (24 sessões ao total). O treino foi realizado com

auxílio de uma escada de 1,10 metros de comprimento/18 cm de largura, inclinada a 80°, com espaço de dois cm entre os degraus (1,1m x 0,18m x 2cm, 80° de inclinação). Após o desmame (3ª semana de vida), todos os animais foram familiarizados às escaladas na escada desde a base até a parte superior do aparato. Ao longo desta semana de adaptação, esta familiarização foi repetida várias vezes até que os animais conseguissem voluntariamente escalar três vezes consecutivas sem necessidade de estímulo. Na 4ª semana de vida do animal, foi iniciada a primeira sessão de treinamento que consistiu em 4-8 escaladas na escada. Na primeira escalada, cargas equivalentes a 75% da massa corporal de cada animal foram anexadas à base da sua cauda que, ao chegar ao topo da escada, descansou por 2 minutos. A partir da segunda escalada foi acrescentado 30g a mais na cauda do animal (YANG et al., 2006). Este acréscimo de carga (+ 30g) ocorreu em cada escalada, até que o rato não consiga mais escalar todo o aparato (falha). A falha em escalar foi determinada quando o animal não conseguiu progredir na subida da escada após três estímulos sucessivos na cauda. A maior carga carregada por toda a escada foi considerada como a capacidade máxima de carregamento do rato, e foi tomada como base para a próxima sessão.

A partir da segunda sessão de treinamento, os ratos realizaram entre 4 a 9 escaladas. Estas sessões consistiram de quatro escaladas com 50%, 75%, 90% e 100% da capacidade máxima de carregamento do animal que foi determinada na sessão anterior. Durante as escaladas subsequentes, foram adicionados 30g até que uma nova capacidade máxima de carregamento foi determinada. Caso os ratos apresentassem dificuldades em escalar com a nova carga, a carga máxima obtida na sessão anterior foi mantida.

Antes da realização de cada sessão de treino, cada rato realizou duas escaladas sem peso anexado à sua cauda (aquecimento). Para verificar se a força dos animais treinados aumentou em relação à dos ratos sedentários e em relação a eles mesmos quando comparado com o início do treinamento, os animais de todos os grupos realizaram dois testes de força máxima (uma repetição máxima; 1 RM): no início da 4ª semana de vida (equivalente à primeira semana de treinamento), e outro no início da 10ª semana de vida (equivalente à sétima semana de treinamento). Neste teste, a carga carregada previamente à fadiga dos animais (momento em que os animais não estavam aptos a escalarem a escada após três tentativas) foi

considerada a carga máxima levantada no teste. Também foi feito o cálculo de carga máxima carregada em relação à massa corporal do animal.

4.3 Avaliação clínica e sistêmica

A partir da quarta semana de vida até o final do experimento, foi realizado o acompanhamento semanal (3 vezes/semana) da massa corporal dos animais com auxílio de balança digital e, na 12ª semana, o consumo de ração e água e da glicemia pós-prandial com aparelho de glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®) em amostras de sangue retiradas da veia caudal.

4.4 Teste funcional do músculo esquelético

Para avaliar a capacidade motora voluntária dos animais diabéticos, foram realizados testes de contração muscular voluntária na terceira e décima primeira semana de vida dos animais, os quais são descritos a seguir.

Grip Meter ou Grip Strength — é feito por meio de um aparelho chamado dinamômetro que avalia a força de preensão. Os animais foram testados pelo sistema de força de preensão (modelo: DFE-002, San Diego Instruments, San Diego, Cal, USA), que é uma grade ligada a um transdutor de força. Por instinto, o animal se prende à grade com a pata dianteira enquanto o experimentador gentilmente puxa sua cauda e o aparelho mede a força de tração máxima aplicada e registrada em Newton (N). Neste teste, foram realizadas 3 séries de 10 aferições da força dos animais com uma pausa de 5 minutos entre as séries (BLANCO, ANDERSON & STEWARD, 2007; BUENO Jr et al., 2012; OSTLER et al., 2014).

Teste de ambulação – este teste determina o comprimento médio e a largura entre uma passada e outra das patas dianteiras, que foram tingidas com tinta não tóxica. Por três vezes consecutivas, o animal percorre livremente sobre papel em branco um pequeno corredor de madeira (50 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura das paredes laterais) (KENNEL et al., 1996; BUENO Jr et al., 2010).

4.5 Eutanásia dos animais

Ao completarem a 12ª semana de vida, os animais foram eutanasiados. Para evitar a influência de possíveis efeitos agudos do treinamento, os animais que pertenciam aos grupos DT e DLT foram eutanasiados 48h após a ultima sessão de treino (DONATTO et al., 2013). Amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas [(Jouan BR4i) 4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos] para obtenção do soro. Imediatamente após a eutanásia, os músculos EDL, sóleo e gastrocnêmio, localizado na pata traseira, foram extraídos, pesados e rapidamente imerso em nitrogênio líquido. Posteriormente, estas amostras foram armazenas em *freezer* (-80 °C)

4.6 Análises séricas

4.6.1 Perfil lipídico no soro

As concentrações séricas de triacilglicerol, HDL-colesterol, LDL-colesterol e colesterol total foram determinadas por método enzimático-colorimétrico, utilizando-se kits da LABTEST, por meio do aparelho LABMAX. O VLDL-c foi calculado usando a equação de Friedewald da seguinte forma: VLDL-c = TG/5. O índice antiaterogênico (AAI) foi calculado de colesterol total e HDL-c usando a fórmula: AAI=HDL-c X 100 / CT – HDL-c (GUIDO & JOSEPH, 1992).

4.6.2 Glicose de jejum no soro

Para a determinação da concentração sérica de glicose, foi utilizado um *kit* comercial (LabTest – Glicose PAP), e consiste num método proposto por Bergmeyer (1974) que envolve as seguintes reações:

Glicose + O_2 + O_2 + O_2 Glicose oxidase Ácido Glucônico + O_2 Antipirilquinonimina + Fenol + O_2 Antipirilquinonimina + Fenol + O_2

O peróxido de hidrogênio formado na oxidação da glicose reage com 4-Aminoantipirina e fenol em reação catalisada pela peroxidase, formando antipirilquinonimina, cuja coloração vermelha tem intensidade proporcional à concentração de glicose da amostra.

4.6.3 Insulina de jejum no soro

A análise da concentração de insulina no soro foi realizada por meio do método imunoensaio multiplex, utilizando o *kit rat serum adipokine panel 2 LINCOplex*. Os *kits LINCOplex* utilizam a tecnologia *Multiple Analyte Profiling* (xMAPTM) que compreende processo de coloração interna de microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção precisa destes dois fluorocromos, foram criados conjuntos de esferas, cada uma com sua individualização baseada em um código de cor. Cada esfera foi conjugada a um anticorpo analito-específico e lida em equipamento Lincoplex 200, através de sistema duplo de *lasers* que incide enquanto ela fluirá através do fluxo celular. Um feixe de *laser* detectará a microesfera (com um código de cor específico para o ensaio), enquanto o outro *laser* quantificará o sinal de repórter.

4.7 Western Blotting

4.7.1 Extração de proteínas

Em tampão de extração (água Milli-Q, RIPA 10x, 0,3M PMSF inibidor e inibidores de proteases e fosfatases 100x), o músculo EDL foi homogeneizado com auxílio de um *polytron* (Ika T10 basic) na velocidade máxima, em 3 *bursts* de aproximadamente 10 segundos cada. As amostras foram então centrifugadas por 25 minutos a 13.000 rpm e 4° C, em seguida, o sobrenadante foi coletado, transferido para outro *eppendorf* e armazenado em *freezer* -80 ° C.

4.7.2 Quantificação de proteína total

A concentração de proteína total do homogeneizado foi determinada por meio de um *kit* comercial (*BCA Protein Assay kit – Pierce*), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.7.3 Preparo do gel de poliacrilamida

Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empilhamento) constituída de acrilamida a 5 %, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % persulfato de amônia e 0,1 % TEMED; e o gel inferior (gel de separação) preparado com poliacrilamida nas concentrações de 7,5% e 10 %, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

4.7.4 SDS-PAGE

Baseado nos dados de proteína total obtida pelo kit de BCA, foi padronizado um total de 25 µg de proteína em cada amostra que foram combinadas com uma solução contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40 % glicerol, 0,8 % SDS, 200 mM betamercaptoetanol e 0,02 % azul de bromofenol. Após o aquecimento e resfriamento prévios destas amostras (durante 5 minutos cada etapa), as amostras foram submetidas à corrida no gel de poliacrilamida em eletroforese, inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas ultrapassaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida.

4.7.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana

O gel contendo a corrida das amostras foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada por imersão em tampão

de transferência. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese contendo tampão de transferência sob corrente de 25 V durante 90 min.

4.7.6 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, por 60 min sob agitação. Os anticorpos primários específicos para cada proteína de interesse [mTOR, phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸), p70S6K e phospho-p70S6K (Thr³⁸⁹)] foram diluídos em PBST e, em seguida, foram utilizados para a incubação *overnight* das membranas sob agitação em geladeira a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada com PBST por 3 vezes e, em seguida, foi incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (anticorpo secundário) diluído 1:10000 em PBST, durante 1 h sob agitação em geladeira.

4.7.7 Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada a partir da mistura dos reagentes 1 e 2 do *kit* ECL *Advance* (GE Healthcare) na proporção 1:1, sendo esta mistura utilizada para umedecer as membranas. Os *blots* foram visualizados por um sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare) que captura imagens por 7 minutos, e, logo após, as imagens foram analisadas pelo *software* ImageQuant TL (GE Healthcare).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste estudo foram expressos em média \pm erro-padrão (SEM). Para análise estatística, foi feita a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações entre as médias. Foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software, Inc*) e adotado o valor de p \leq 0,05.

6. CAPÍTULO 1/ARTIGO 1

Treinamento de força e suplementação de leucina na melhora da miopatia diabética e do controle glicêmico de ratos diabéticos

Carlos Eduardo C Martins¹*, Vanessa B de Sousa Lima¹, Henrique Quintas Teixeira Ribeiro¹ e Julio Tirapegui¹.

¹Department of Food & Experimental Nutrition in Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of Sao Paulo – Sao Paulo, SP, Brazil

*Correspondência: martinscec@usp.br

Contribuição dos autores:

C.E.C.M.; V.B.S.L. e J.T. formulação do projeto; C.E.C.M.; V.B.S.L.; HQTR. conduziram a pesquisa; C.E.C.M.; V.B.S.L. analisaram os dados; C.E.C.M.; V.B.S.L. e J.T. escreveram o artigo; J.T. orientador que revisou os dados e o manuscrito.

Autor correspondente

Carlos Eduardo Carvalho Martins*

Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil

Tel.: +55-11-3091-3309; fax: +55-11-3815-4410

E-mail address: martinscec@usp.br

Enviado para o periódico: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Fator de Impacto: 4.046.

RESUMO

O músculo esquelético é um tecido fundamental na produção de força muscular, no movimento e na regulação do metabolismo em geral. No diabetes, é comum a manifestação de uma doença degenerativa do músculo esquelético, que é conhecida por miopatia diabética e é caracterizada principalmente pela perda de força e de massa muscular. Por serem potentes reguladores da via anabólica do mTOR e da síntese proteica muscular, têm sido destacado a importância da suplementação de leucina e do treinamento de força como intervenções para a manutenção das características morfológicas e funcionais do músculo esquelético. Neste estudo, foram investigados os efeitos crônicos da suplementação de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de mellitus induzido por estreptozotocina. Ambas as intervenções isoladamente foram eficazes em melhorar a força muscular e normalizar a glicemia de jejum e pós-prandial. Porém, o treinamento de força foi o maior responsável pelas maiores adaptações morfológicas e funcionais no músculo esquelético de ratos diabéticos, ou seja, proporcionou maior aumento de força e de massa muscular destes animais. Este estudo fornece informações importantes para o desenvolvimento de estratégias não farmacológicas para o tratamento da diabetes mellitus.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, atrofia muscular, miopatia diabética, leucina, treinamento de força.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma doença crônica que afeta quase todos os processos biológicos, incluindo o metabolismo de proteínas, que resulta na diminuição de massa muscular esquelética, na perda da aptidão física, redução da produtividade e da qualidade de vida [1]. Apesar das causas de cada forma de diabetes (Tipo 1 ou Tipo 2) serem distintas, os distúrbios metabólicos resultantes da doença frequentemente se coincidem. Em ambos os tipos diabetes, é muito comum haver alterações degenerativas da massa muscular que prejudicam a morfologia e a funcionalidade deste tecido, que culmina com o quadro de miopatia diabética [2,3].

Atenuar a disfunção metabólica associada ao diabetes parece ser um desafio, no entanto, muitos estudos fornecem informações importantes sobre a etiologia celular e molecular da diminuição da massa muscular esquelética associada ao diabetes, e estes achados podem ser bastante úteis no desenvolvimento de novas terapias para indivíduos diabéticos [4].

Estudos têm demonstrado que a suplementação de leucina (LEU) e a realização do treinamento de força (TF) apresentam um papel no anabolismo muscular por estimularem o início do processo de transcrição e tradução de proteínas por meio da sinalização na via do mTOR, que promove aumentos na força e massa muscular e regula o *turnover* proteico; assim, estas intervenções podem recuperar ou melhorar a capacidade funcional muscular [5,6,7], podendo desta maneira ser alternativas para prevenir as complicações do diabetes.

O treinamento de força induz o aumento na síntese de proteína muscular que pode se manter por horas ou dias após a sessão do treino, pois os esforços repetitivos destas sessões podem manter o *turnover* proteico muscular positivo. Este balanço proteico exige que a taxa de síntese proteica muscular (SPM) exceda a taxa de degradação de proteína muscular (MPB) [8], para que assim ocorra a hipertrofia muscular. O aumento da força muscular concomitante à hipertrofia do músculo esquelético é importante para indivíduos diabéticos com atrofia muscular. Nestes indivíduos, por meio da resistência a uma carga mecânica imposta sobre o músculo, o TF estimula processos celulares e moleculares que induzem a resposta hipertrófica, além de melhorar a sinalização da via de insulina e aumentar o transporte de glicose no tecido muscular esquelético [9,10,11].

A ingestão de proteínas após o treinamento de força aumenta a disponibilidade de aminoácidos no plasma que ativam moléculas de sinalização, o que aumenta na SPM e induz hipertrofia muscular. Neste contexto, a leucina tem se destacado por ser um aminoácido que estimula a iniciação da tradução da síntese de proteínas por ativar a via do mTOR [12]. Além deste efeito, é provável que os benefícios da suplementação de leucina no tratamento do diabetes mellitus também estejam relacionados com a melhoria do metabolismo energético, do *turnover* proteico e da homeostase glicêmica [13].

Portanto, diante do papel anabólico muscular da suplementação de leucina e do treinamento de força no remodelamento muscular, torna-se relevante investigar os efeitos crônicos destas intervenções (isolados ou combinados) na miopatia

diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina (STZ).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Tratamentos

Ratos machos com 5 dias de vida (40 animais ao total) foram separados de suas respectivas mães por 8 h e distribuídos em 2 grupos: um grupo diabético (n=32) que recebeu uma injeção intraperitoneal (ip) de STZ [120 mg/kg de peso corporal] diluído em tampão citrato [10mM de citrato de Na (pH 4,5)], e outro não diabético (n=8) que recebeu somente a injeção (ip) de tampão citrato com volume equivalente, sendo considerado o grupo controle (grupo C). No desmame (21 dias após o nascimento), todos os ratos que pertenciam ao grupo diabético apresentaram uma glicemia igual ou superior a 150 mg/dl, e foram incluídos no estudo. Em seguida, eles foram distribuídos em quatro grupos: grupo D (n=8) que recebeu uma ração isonitrogenada AIN-93M, que foi definida como dieta controle; o grupo DT (n=8) que recebeu a mesma ração isonitrogenada e que realizou o treinamento de força; o grupo DL (n=8) recebeu uma ração suplementada com 5% de L-leucina; e o grupo DLT (n=8) que consumiu a ração suplementada com 5% de L-leucina e que realizou o treinamento de força. As intervenções foram realizadas durante 8 semanas.

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN-93M). Com base nesta dieta, 50g de amido de milho/kg de ração foi substituída por 50g de L-leucina (dieta suplementada com 5% de L-leucina), ou por 50g de uma mistura de aminoácidos não essenciais (alanina, acido aspártico, glicina, prolina e serina) com quantidades equivalentes de nitrogênio comprado a ração com L-leucina, sendo assim uma dieta isonitrogenada [14].

O protocolo de exercício de força consistiu em subir 9 vezes uma escada inclinada a 85°. As sessões de treinamento foram realizadas três vezes por semana na parte da manhã. Este protocolo corresponde a um modelo de treinamento de força utilizado em estudos com animais, e que mostra as mesmas adaptações fisiológicas deste tipo de treinamento em humanos [15]. Todos os métodos utilizados

neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética local no Uso de Animais de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (protocolo: 14,2014-P451).

Os animais foram mantidos em caixas individuais sob condições de temperatura ambiente controlada de 22 ± 2 °C e de umidade relativa do ar de 55 ± 10%, 15 a 20 trocas de ar por hora e com ciclo biológico invertido de 12/12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foi realizado o acompanhamento semanal da massa corporal dos animais. O consumo de ração, água e a glicemia pós-prandial foram acompanhados semanalmente, no entanto, foram inseridos apenas os resultados da última semana. O acompanhamento semanal aconteceu desde 4ª semana até o final do. Ao final da 12ª semana de vida, os animais foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de TF, com jejum de 6 horas. Os músculos extensor longo dos dedos (EDL), gastrocnêmio (GAS) e o sóleo (SOL) foram extraídos, pesados e congelados a -80° C. Também foram coletadas amostras de sangue que foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C, para obtenção do soro, para posterior análises das concentrações de glicose e insulina.

Concentrações de glicose e insulina no soro

A concentração de glicose no soro foi avaliada pelo método colorimétricoenzimático, utilizando kits de reagentes Labtest®, já a de insulina sérica foi avaliada por meio do método de imunoensaio multiplex utilizando o kit *rat serum adipokine panel 2 LINCOplex.*

Teste funcional do músculo esquelético

Para avaliar a força muscular, os animais foram testados pelo sistema de força de preensão chamado *grip strength* (modelo: DFE-002, *San Diego Instruments, San Diego, Cal, USA*), que é uma grade ligada a um transdutor de força. Por instinto, o animal se prende à grade com a pata dianteira enquanto o experimentador gentilmente puxa sua cauda e o aparelho mede a força de tração máxima aplicada e registrada em Newton (N). Neste teste, foram realizadas 3 séries de 10 aferições da força dos animais com uma pausa de 5 minutos entre as séries [16,17].

O segundo teste funcional foi o teste de ambulação, no qual se determina o comprimento e a largura entre uma passada e outra das patas dianteiras que foram tingidas com tinta não tóxica. Por três vezes consecutivas, o animal percorreu livremente sobre papel em branco em um pequeno corredor de madeira (50 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura das paredes laterais) [18,19]. Foi obtida a média dos dados de comprimento e de largura das 3 vezes consecutivas.

Análise de Western Blotting

Em tampão de extração, o músculo EDL foi homogeneizado com auxílio de um polytron (Ika T10 basic) na velocidade máxima, em 3 bursts de aproximadamente 10 segundos cada. As amostras foram então centrifugadas por 25 minutos a 13.000 rpm e 4° C, em seguida, o sobrenadante foi coletado, transferido para outro eppendorf. A concentração de proteína total deste homogeneizado foi determinada por meio de um kit comercial (BCA Protein Assay kit – Pierce), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Baseado nos dados de proteína total obtida pelo kit BCA, 25 µg de proteína em cada amostra foi solubilizada em tampão Laemmli, sujeitas a SDS-PAGE (7,5% ou 10%) e, então, transferida para membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE healthcare, AMERSHAM Biosciences, UK). Após a incubação por 1 hora com solução de bloqueio com 5% de albumina bovina sérica (BSA), as membranas foram incubadas com anticorpos primários: mTOR, phosphomTOR (Ser²⁴⁴⁸), p70S6K e phospho-p70S6K (Thr³⁸⁹). Posteriormente, foi feita incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho), marcado com enzima peroxidase (HRP) (sigma), diluído 1:1.000 durante 1 hora. Após a lavagem das membranas com PBST 1x, as membranas foram expostas à reação com Kit ECL (Luminol 1,1%, Ácido P-Cumárico 0,48%, Tris 1M pH 8,5 11,1%, H2O destilada) por dois minutos para detecção das bandas resultantes por meio do sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare) que captura imagens por 7 minutos, e, logo após, as imagens foram analisadas pelo software ImageQuant TL (GE Healthcare).

Análise estatística

Os resultados deste estudo foram expressos em média ± erro-padrão (SEM). Para análise estatística, foi feita a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações entre as médias. Foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software, Inc*) e adotado o valor de p ≤ 0,05.

RESULTADOS

Massa corporal; glicemia e insulina de jejum; glicemia pós-prandial; consumo de ração e água

A Figura 1 e a Tabela 1 mostram a massa corporal e o peso dos músculos EDL, GAS e SOL, bem como a glicemia pós-prandial, glicemia e insulina de jejum os grupos experimentais. A partir da nona semana de vida até o final do experimento, a massa corporal dos ratos diabéticos não tratados (grupo D) foi menor comparada com o grupo C (p < 0,05). Neste estudo, não houve diferença estatística dos grupos DL, DT e DLT em relação ao grupo D (p > 0,05); por outro lado, também não foi observada diferença dos grupos DL, DT e DLT comparado com o grupo C (p > 0,05), o que indica que as intervenções propostas (isoladas ou combinadas) atenuaram a perda de massa corporal que é característica dos animais diabéticos.

Os pesos absolutos dos músculos EDL e GAS foram menores no grupo D comparado com o grupo C (p < 0,05), sugerindo uma atrofia muscular neste modelo experimental de diabetes. Neste estudo, a suplementação de leucina e o treinamento de força (isolados ou combinados) não alteraram o peso absoluto e relativo do músculo EDL dos animais diabéticos. No entanto, não houve diferença estatística no peso absoluto do GAS dos grupos DL, DT, DLT comparado com o grupo C (p > 0,05), sugerindo que a leucina e/ou o treinamento de força podem atenuar a perda de massa muscular detectada nos animais diabéticos não tratados. Além disso, o peso relativo do GAS (peso absoluto do músculo/100g de peso do animal) dos grupos DT e DLT foram maiores em relação ao grupo D, e nestes

grupos treinados quando comparados com o grupo C, demonstrando o efeito anabólico do TF sobre o aumento de massa muscular (p < 0,05). Neste estudo, não houve diferença estatística nos pesos absoluto e relativo do SOL entre os grupos experimentais (p > 0.05); e não houve diferença estatística entre os grupos DL e D sobre os pesos relativos dos músculos avaliados, ou seja, a suplementação crônica de leucina não afetou este parâmetro nos ratos diabéticos.

A suplementação de leucina e o treinamento de força melhoraram a hiperglicemia dos animais diabéticos. Os grupos DT, DL e DLT apresentaram menores valores de glicemias de jejum e pós-prandial comparados com o grupo D (p< 0,05), sem haver diferença estatística com o grupo C (p > 0,05), demonstrando que estas intervenções isoladas ou combinadas foram capazes de normalizar a glicemia neste modelo experimental de diabetes. Neste estudo, os animais diabéticos (grupo D) apresentaram uma hipoinsulinemia moderada quando comparado com o grupo C (p < 0,05), que é característica deste modelo experimental. Não houve diferença estatística entre os grupos DT, DL e DLT em relação ao grupo D, mas também não houve diferença entre estes grupos e o grupo C (p > 0,05), ou seja, as intervenções isoladas ou combinadas não reverteram a hipoinsulinemia dos animais diabéticos, mas foram capazes de melhorar a concentração de insulina sérica nestes animais.

Os animais diabéticos que não receberam as intervenções tiveram maior consumo de ração e água comparado com os animais não diabéticos (grupo C) e animais diabéticos tratados (grupos DT, DL e DLT) (p < 0,05). Vale ressaltar que não houve diferença estatística (p > 0,05) entre os animais não diabéticos (grupo C) vs. animais diabéticos tratados (grupos DT, DL e DLT) (Tabela 1).

Suplementação de leucina e treinamento de força melhoraram a força muscular e a capacidade de ambulação de ratos diabéticos

A Figura 2 mostra que na décima primeira semana de vida, os animais do grupo D apresentaram menor força muscular e, menor comprimento e largura entre as passadas comparadas ao grupo C (p < 0,05), o que indica que a capacidade motora e funcional os animais diabéticos estava comprometida. A força de preensão

(*grip strength*) foi maior nos grupos DT, DL e DLT comparada com o grupo D e, não houve diferença estatística neste parâmetro nos grupos DT e DLT em relação ao grupo C, sugerindo que o treinamento de força isolado ou combinado com leucina pode reverter completamente a perda de força muscular nesta doença. Interessantemente, foi possível observar que a suplementação de leucina por si só foi capaz de atenuar a perda de força muscular. Além disso, a Figura 2A também mostra que houve diferença estatística entre os grupos DL e DLT na força muscular, demonstrando que a combinação das intervenções supera o efeito da leucina isolada sobre este parâmetro.

Sobre a capacidade motora (ou de ambulação) dos animais diabéticos, as intervenções quando combinadas (grupo DLT) foram capazes de melhorar o expressivamente o comprimento e a largura entre as passadas dos animais diabéticos (p < 0, 05; Figuras 2B e 2C). É importante salientar que o treinamento de força isolado melhorou a largura das passadas dos ratos diabéticos.

O treinamento de força combinado com a suplementação crônica de leucina recuperou a sinalização da via mTOR-p70S6K em ratos diabéticos

Para esclarecer os efeitos anabólicos da suplementação de leucina e/ou do treinamento de força sobre a miopatia diabética no diabetes induzido por estreptozotocina foi avaliado a expressão proteica total e fosforilada do mTOR e da p70S6K no músculo EDL; dados mostrados nas Figuras 3A e 3B. Nos animais diabéticos não tratados (grupo D), as razões phospho-mTOR^{Ser2448}/mTOR total e phospho-p70S6K^{Thr389}/p70S6K total foram menores comparadas com a do grupo controle (p < 0,05), o que mostra um prejuízo na ativação da via mTOR-p70S6k e sugere que os animais diabéticos apresentem uma menor SPM a nível molecular.

Neste estudo, houve um aumento na fosforilação do mTOR em serina 2448 nos grupos DT e DLT quando comparados com o grupo D (p < 0,05), sem haver diferenças destes grupos treinados com o grupo C, o que indica que o treinamento de força foi o principal responsável pela fofosrilação do mTOR neste estudo. Sobre a ativação da p70S6K, a fosforilação desta proteína em treonina 389 foi maior apenas no grupo DLT comparado com o grupo D (p < 0,05). Dessa forma, o treinamento de

força combinado com a suplementação de leucina recuperou a atividade da via do mTOR-p70S6K em animais diabéticos, que pode refletir em maior síntese proteica muscular; ao passo que a leucina isolada não afetou a via mTOR/p70S6K.

DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da suplementação crônica de leucina e do treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina. Nossos resultados mostraram que o treinamento de força isolado ou combinado com leucina minimizaram os efeitos deletérios do diabetes mellitus sobre o músculo esquelético por meio do aumento da sinalização de vias moleculares envolvidas na síntese proteica muscular (SPM) e da melhora da capacidade motora funcional, bem como melhoraram alguns parâmetros metabólicos como glicemia de jejum e pós-prandial.

No diabetes mellitus, a atrofia muscular associada à miopatia diabética pode ser resultado da redução da síntese proteica e/ou do aumento exacerbado da degradação proteica muscular. Sabe-se que o músculo esquelético constitui aproximadamente 40% da massa corporal total, assim, qualquer distúrbio degenerativo neste tecido que leve à atrofia muscular está associado com a diminuição na qualidade de vida, com o aumento da morbidade e mortalidade de indivíduos diabéticos [20, 21].

Os resultados do presente estudo mostraram que o treinamento de força combinado com a suplementação de leucina recuperou a atividade da via do mTOR-p70S6K em animais diabéticos, que pode refletir em maior síntese proteica muscular. Isto sugere que o estímulo anabólico do treinamento de força foi o fator predominante para a ativação desta via nos animais diabéticos, e que a leucina possa também ter participado como substrato para a tradução proteica muscular. Alguns estudos mostraram que a LEU ativou diretamente o mTOR após uma sessão de TF. No estudo de Walker et al. [22], a suplementação de LEU após o treino de força manteve a atividade da via do mTOR elevada por várias horas, levando a uma maior SPM em comparação com o grupo que não foi suplementado com leucina. Pasiakos et al. [23] demonstraram também que a LEU após o exercício de força aumentou a SPM.

O TF induz a hipertrofia muscular por ser um potente estimulador de uma cascata sequencial que consiste em: (i) ativação da fibra muscular, (ii) ativação de vias de sinalização resultantes da deformação mecânica das fibras musculares, (iii) liberação de hormônios e indução de respostas imune/inflamatória, (iv) aumento na síntese proteica muscular devido a ativação da transcrição e tradução proteica, (v) aumento da área de seção da fibra muscular [24-27]. Neste tipo de treinamento, a hipertrofia muscular induzida pela sobrecarga mecânica imposta ao músculo é também bastante dependente da sinalização do mTOR no interior das fibras musculares [28,21]. Esta influência do TF sobre a via do mTOR explica os dados obtidos sobre a ativação da via mTOR-p70S6K em animais diabéticos que realizaram treino de força.

Em nosso estudo, a suplementação de leucina (sem o estímulo mecânico do TF) não afetou a via mTOR-p70S6K. Sobre estes resultados, é possível que o tempo de intervenção ou a quantidade fornecida na dieta foram aquém do necessário para vencer a resistência anabólica muscular no diabetes. A leucina se destaca entre os aminoácidos essenciais por estimular a tradução proteica e, subsequentemente, aumentar a taxa de SPM e o crescimento muscular [29,30]. No entanto, para que a leucina promova estes efeitos é necessário que a sua quantidade ingerida seja suficientemente alta para que ocorra ativação da via mTOR-p70S6K e forneça subsídios para que a célula muscular esquelética recupere sua capacidade em sintetizar proteínas miofibrilares, que está prejudicada no DM [31]. No diabetes, a cetoacidose aumenta a taxa de oxidação de aminoácidos de cadeia ramificada, principalmente a leucina, e o estado inflamatório aumenta as taxas de degradação proteica [1], o que possivelmente pode ter prejudicado o efeito da leucina sobre a ativação da via mTOR-p70S6K nos animais diabéticos.

A ativação da via anabólica mTOR-p70S6K por meio do treinamento de força combinado com a dieta suplementada com leucina foi crucial para atenuar a atrofia muscular esquelética em ratos diabéticos. Nossos achados não mostraram diferença estatística no peso absoluto do músculo gastrocnêmio dos grupos DL, DT, DLT comparados com o grupo C, sugerindo que a leucina e/ou o treinamento de força podem atenuar a perda de massa muscular detectada nos animais diabéticos não tratados. O peso relativo do GAS dos grupos que realizaram o treinamento de força (DT e DLT) aumentou aproximadamente 16% e 22%, respectivamente, em relação ao dos animais diabéticos sem tratamento (grupo D), demonstrando o efeito

anabólico do TF sobre o aumento de massa muscular. Embora não tenha mostrado significância estatística, o peso relativo do músculo GAS no grupo que recebeu apenas a suplementação de leucina aumentou 7% comparado com o grupo D. Estes dados sugerem que, em animais diabéticos, o sinal anabólico muscular da LEU e a sua influência na hipertrofia muscular depende do estímulo mecânico do treinamento de força, diferentemente do que ocorre em indivíduos saudáveis [19].

Ainda sobre os resultados dos pesos dos músculos, a suplementação de leucina e o treinamento de força (isolados ou combinados) não alteraram os pesos absoluto e relativo do músculo EDL dos animais diabéticos; a proporção entre o tamanho do músculo e do corpo do animal assim como o tempo de intervenção utilizado neste estudo (8 semanas) podem ter influenciado este resultado. Um músculo pequeno como o EDL provavelmente precisa de um tempo de intervenção mais prolongado para que seja possível observar sinais de hipertrofia deste músculo.

Sobre a capacidade funcional e motora, o treinamento de força isolado ou combinado com leucina recuperou a força muscular e melhorou expressivamente a capacidade de ambulação (comprimento e a largura entre as passadas) dos animais diabéticos. Nosso estudo mostrou que a força de preensão foi maior nos grupos DT e DLT comparados com o grupo D, sem haver diferença estatística entre os grupos treinados e o grupo C, ou seja, o TF aumentou a força muscular em ratos diabéticos. Achados semelhantes foram encontrados nos estudos de Call et al. [32] e de Chen et al. [33]. Por outro lado, no estudo de Kim et al. [34], o treinamento de força não melhorou a força de preensão em ratos diabéticos da linhagem Zucker.

Interessantemente, observamos que a suplementação de leucina por si só foi capaz de atenuar a perda de força muscular dos animais diabéticos. Entretanto, a força de preensão do grupo DT foi maior que a do grupo DL, demonstrando que o treinamento de força supera o efeito da leucina neste parâmetro. Diferentemente do que nosso estudo mostrou no que diz respeito ao teste de ambulação, Zanchi et al. [19] mostrou que a dieta suplementada com leucina prejudicou a capacidade motora em ratos com atrofia muscular induzida por dexametasona.

A suplementação de leucina e o treinamento de força melhoraram a hiperglicemia dos animais diabéticos. Em nosso estudo, os animais diabéticos treinados (DT, DL e DLT) apresentaram menores valores de glicemias de jejum e pós-prandial comparados com o grupo D, sem haver diferença estatística com o grupo C, demonstrando que estas intervenções de maneira isolada foram capazes

de normalizar a glicemia neste modelo experimental de diabetes. Interessantemente, a suplementação de leucina por si só induziu este efeito na glicemia dos animais diabéticos, semelhante ao resultado encontrado por WILKINSON et al. [35] em indivíduos com diabetes tipo 2. Por outro lado, quando administrada em altas doses, a suplementação de leucina pode prejudicar a sinalização de insulina e a captação de glicose de ratos obesos alimentados com dieta alta em gordura, como diz Ham et al. [36]. Dada as controvérsias sobre o papel da leucina na homeostase glicêmica, são necessários mais estudos envolvendo esta abordagem.

Neste estudo, os animais diabéticos não tratados apresentaram uma hipoinsulinemia moderada, que é característica do modelo experimental de diabetes utilizado. A suplementação crônica de leucina e/ou o treinamento de força não reverteram a hipoinsulinemia dos animais diabéticos, mas foram capazes de melhorar a concentração de insulina sérica nestes animais. Alguns trabalhos já mostraram que o TF é capaz de aumentar a produção e secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos com diabetes tipo 1 descompensado [37,38]. Além deste efeito, o TF aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, como o músculo esquelético, e a captação de glicose, efeitos estes que podem persistir por até 24-48 horas após uma sessão de exercício [39,40].

Interessantemente, observamos que a suplementação de leucina por si só foi capaz de melhorar a concentração de insulina sérica nos animais diabéticos. Isto é explicado por meio do efeito da suplementação de leucina como secretagogo de insulina, que ocorre por meio de dois mecanismos: a leucina sofre uma deaminação para, então, produzir o alfa-cetoisocaproato (KIC) [41] ou a leucina ativa alostericamente o glutamato desidrogenase (GDH) [42]. Os dois mecanismos aumentam a razão ATP/ADP intracelular e causa a liberação da insulina (fase rápida de secreção deste hormônio). Esta melhora na concentração de insulina sérica de animais diabéticos após a suplementação crônica de leucina também pode ter contribuído para que estes animais apresentassem uma menor concentração sérica de glicose.

Em adição, a suplementação de leucina bem como o treinamento de força foi capaz de reduzir manifestações clínicas tais como, polifagia e a polidipsia presentes no diabetes (p < 0,05; Tabela 1). Estudos em animais e humanos sugerem que a leucina atua como um nutriente sinalizador da redução do consumo de calorias, seja

por ativar o mTOR, por aumentar as concentrações de colecistoquinina ou por diminuir moderadamente a pressão antral (intestino) [43-45]. Em humanos o treinamento de força é capaz de diminuir a ingestão de gorduras e calorias após 8 meses de treinamento [46].

A partir dos resultados deste estudo, conclui-se que a suplementação crônica de leucina e o treinamento de força foram eficazes em melhorar a força muscular e normalizar a glicemia de jejum e pós-prandial em animais diabéticos. Porém, o treinamento de força foi responsável pelas maiores adaptações morfológicas e funcionais no músculo esquelético de ratos diabéticos, ou seja, proporcionou maior aumento da força e da massa muscular destes animais, bem como foi capaz de normalizar a glicemia de jejum e pós-prandial como a leucina. De fato, o músculo esquelético foi mais sensível ao treinamento de força em comparação a suplementação de leucina, porém, ambos potencializaram os efeitos da síntese proteica no músculo esquelético por meio da regulação da via mTOR-p70S6K e do *turnover* proteico.

Este estudo fornece informações importantes para o desenvolvimento de estratégias não farmacológicas para o tratamento do diabetes mellitus, em particular, naquele indivíduo diabético que depende da insulina exógena. Vale ressaltar que a insulina exógena por si só não é suficiente para estimular a síntese proteica muscular no estado pós-prandial, isto requer uma maior ingestão de quantidade de proteína por meio de uma dieta suplementada com aminoácidos essenciais e de preferência rica em leucina.

REFERÊNCIAS

- 1. WORKENEH, B.; BAJAJ, M. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. Int J Biochem Cell Biol v.45, p.2239-2244, 2013.
- 2. D'SOUZA, D.M.; AL-SAJEE, D.; HAWKE, T.J. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. Front Physiol. v.20 p.1-7, 2013.
- 3. KRAUSE, M.P.; AL-SAJEE, D.; D'SOUZA, D.M.; REBALKA, I.A.; MORADI, J.; RIDDELL, M.C.; HAWKE, T.J. Impaired macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific following injury in diabetic skeletal muscle. PLoS One v.8, e70971, 2013.
- 4. GUMUCIO, J.P.; MENDIAS, C.L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. Endocrine. v.43, p.12-21, 2013.
- 5. HURLEY, B.F.; ROTH, S.M. Strength training in the elderly: effects on risk factors for age-related diseases. Sports Med v.30, p.249-268, 2000.
- 6. CASTANEDA, C.; LAYNE, J.E.; MUNOZ-ORIANS, L.; GORDON, P.L. WALSMITH, J.; FOLDVARI, M.; ROUBENOFF, R.; TUCKER, K.L.; NELSON, M.E. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. Diabetes Care v.25, p.2335-2341, 2002.
- 7. DREYER, .H.C.; FUJITA, S.; CADENAS, J.; CHINKED, D.L.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. J Physiol v.576, p.613-624, 2006.
- 8. BURD, N.A.; TANG, J.E.; MOORE, D.R.; PHILLIPS, S.M. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. J Appl Physiol v.106, p.1692-701, 2009.
- 9. TAKALA, T.O.; NUUTILA, P.; KNUUTI, J.; LUOTOLAHTI, M.; YKI-JARVINEN, H. Insulin action on heart and skeletal muscle glucose uptake in weight lifters and endurance athletes. Am J Physiol v.276, p.E706–11, 1999.
- 10. HADDAD, F.; ADAMS, G.R. Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise. J Appl Physiol v.93, p.394–403, 2002.

- 11. HOLLOSZY, J.O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. J Appl Physiol v.99, p.338–343, 2005.
- 12. GUIMARÃES-FERREIRA, L.; CHOLEWA, J.M.; NAIMO, M.A.; ZHI, X.I.; MAGAGNIN, D.; DE SA, R.B.; STRECK, E.L.; TEIXEIRA, T.S.; ZANCHI, N.E. Synergistic effects of resistance training and protein intake: practical aspects. Nutrition v.30, p.1097-103, 2014.
- 13. PEDROSO, J.A.B.; ZAMPIERI, T.T.; DONATO, J.JR. Reviewing the effects of I-leucine supplementation in the regulation of food intake, energy balance, and glucose homeostasis, Nutrients v.7, p.3914-3937, 2015.
- 14. REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr v.127, p.838S-841S, 1997.
- 15. HORNBERGER T.A.JR.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. Can J Appl Physiol v.29, p.16-31, 2004.
- 16. ANDERSON, K.D.; ABDUL, M.; STEWARD, O. Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. Exp Neurol v.190, p.184–191, 2004.
- 17. NALBANDIAN, A.; NGUYEN, C.; KATHERIA, V.; LLEWELLYN, K.J.; BADADANI, M.; CAIOZZO, V.; KIMONIS, V.E. Exercise training reverses skeletal muscle atrophy in an experimental model of VCP disease. PLoS One v.8, e76187, 2013.
- 18. KENNEL, P.F.; FONTENEAU, P.; MARTIN, E.; SCHMIDT, J.M.; AZZOUZ, M.; JACQUES, B.; GUENET, J.L.; SCHMALBRUCH, H.; WARTER, J.M.; POINDRON, P. Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. Neurobiol Dis v.3, p.137-147, 1996.
- 19. ZANCHI, E.Z.; GUIMARÃES-FERREIRA, L.; SIQUEIRA-FILHO, M.A.; FELITTI, V.; NICASTRO H.; BUENO, C.Jr.; LIRA, F.S.; NAIMO, M.A.; CAMPOS-FERRAZ, P.; NUNES, M.T.; SEELAENDER, M.; CARVALHO, C.R.O.; BLACHIER, F.; LANCHA, A.H.Jr. Dose and latency effects of leucine supplementation in modulating glucose homeostasis: opposite effects in healthy and glucocorticoid-induced insulin-resistance states. Nutrients v.4, p.1851-1867, 2012.

- 20. SRIKANTHAN, P.; KARLAMANGLA, A.S. Muscle mass index as a predictor of longevity in older adults. Am J Med v.127, p.547-53, 2014.
- 21. GOODMAN, C.A.; MAYHEW, D.L.; HORNBERGER, T.A. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. Cell Signal v.23, p.1896-906, 2011.
- 22. WALKER, T.B.; SMITH, J.; HERRERA, M.; LEBEGUE, B.; PINCHAK, A.; FISCHER, J. The influence of 8 weeks of whey-protein and leucine supplementation on physical and cognitive performance. Int J Sport Nutr Exerc Metab v.20, p.409-17, 2010.
- 23. PASIAKOS, S.M.; MCCLUNG, H.L.; MCCLUNG, J.P.; MARGOLIS, L.M.; ANDERSEN, N.E.; CLOUTIER, G.J.; PIKOSKY, M.A.; ROOD, J.C.; FIELDING, R.A.; YOUNG, A.J. Leucine-enriched essential amino acid supplementation during moderate steady state exercise enhances post exercise muscle protein synthesis. Am J Clin Nutr v.94, p.809-18, 2011.
- 24. KUBICA, N.; BOLSTER, D.R.; FARRELL, P.A.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bε mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. J. Biol. Chem. v.280, p.7570-7580, 2005.
- 25. BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70S6kcorrelates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. Am J Physiol v.276, C120-7, 1999.
- 26. SPIERING, B.A.; KRAEMER, W.J.; ANDERSON, J.M.; ARMSTRONG, L.E.; NINDL, B.C.; VOLEK, J.S.; MARESH, C.M. Resistance exercise biology: manipulation of resistance exercise programme variables determines the responses of cellular and molecular signalling pathways. Sports Med v.38, p.527-40, 2008.
- 27. OGASAWARA, R.; KOBAYASHI, K.; TSUTAKI, A.; LEE, K.; ABE, T.; FUJITA, S.; NAKAZATO, K.; ISHII, N. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. J Appl Physiol v.114, p.934-40, 2013.
- 28. BURD, N.A.; HOLWERDA, A.M.; SELBY, K.C.; WEST, D.W.; STAPLES, A.W.; CAIN, N.E.; CASHABACK, J.G.; POTVIN, J.R.; BAKER, S.K.; PHILLIPS, S.M.

- Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. J Physiol v.588, p.3119-30, 2010.
- 29. NORTON, L.E.; LAYMAN, D.K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. J Nutr v.136, p.533S-537S, 2006.
- 30. KELLEHER, A.R.; KIMBALL, S.R.; DENNIS, M.D.; SCHILDER, R.J.; JEFFERSON, L.S. The mTORC1 signaling repressors REDD1/2 are rapidly induced and activation of p70S6K1 by leucine is defective in skeletal muscle of an immobilized rat hindlimb. Am J Physiol Endocrinol Metab v.304, p.E229-36, 2013.
- 31. RALPH, J.M.; JONATHAN, P. L.; SCOTT, C.F.; DARREN, G.C. Insulinotropic and muscle protein synthetic effects of branched-chain amino acids: potential therapy for type 2 diabetes and sarcopenia. Nutrients v.4, p.1664-1678, 2012.
- 32. CALL, J.A.; MCKEEHEN, J.N.; NOVOTNY, S.A.; LOWE, D.A. Progressive resistance voluntary wheel running in the mdx mouse. Muscle Nerve v.6, p.1517-24, 2010.
- 33. CHEN, W.C.; HUANG, W.C.; CHIU, C.C.; CHANG, Y.K.; HUANG, C.C. Whey protein improves exercise performance and biochemical profiles in trained mice. Med Sci Sports Exerc v.46, p.1517-24, 2014.
- 34. KIM, J.Y.; CHOI, M.J.; SO, B.; KIM, H.J.; SEONG, J.K.; SONG, W. The preventive effects of 8 weeks of resistance training on glucose tolerance and muscle fiber type composition in zucker rats. Diabetes Metab J v.39, p.424-33, 2015.
- 35. WILKINSON, D.J.; HOSSAIN, T.; HILL, D.S.; PHILLIPS, B.E.; CROSSLAND, H.; WILLIAMS, J.; LOUGHNA, P.; CHURCHWARD-VENNE, T.A.; BREEN, L.; PHILLIPS, S.M.; ETHERIDGE, T.; RATHMACHER, J.A.; SMITH, K,; SZEWCZYK, N.J.; ATHERTON, P.J. Effects of leucine and its metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. J Physiol v.591, p.2911-23, 2013.
- 36. HAM, D.J.; CALDOW, M.K.; LYNCH, G.S.; KOOPMAN, R. Leucine as a treatment for muscle wasting: a critical review. Clin Nutr v.33, p.937-45, 2014.
- 37. OLIVEIRA, C.A.; PAIVA, M.F.; MOTA, C.A.; RIBEIRO, C.; LEME, J.A.; LUCIANO, E.; MELLO, M.A. Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats. Islets v.2, p.240-6, 2010.

- 38. HUANG, H.H.; FARMER, K.; WINDSCHEFFEL, J.; YOST, K.; POWER, M.; WRIGHT, D.E.; STEHNO-BITTEL, L. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. Exp Diabetes Res v.2011, 2011.
- 39. HOLTEN, M.K.; ZACHO, M.; GASTER, M.; JUEL, C.; WOJTASZEWSKI, J,F.; DELA, F. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. Diabetes v.53, p.294-304, 2004.
- 40. CARTEE, G.D. Mechanisms for greater insulin-stimulated glucose uptake in normal and insulin resistant skeletal muscle after acute exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab v.309, p.E949-59, 2015.
- 41. GAO, Z.; YOUNG, R.A.; LI, G.; NAJAFI, H.; BUETTGER, C.; SUKUMVANICH, S.S.; WONG, R.K.; WOLF, B.A.; MATSCHINSKY, F.M. Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. Endocrinology v.144, 1949-57, 2003.
- 42. SMITH, T.J.; STANLEY, C.A. Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. Trends Biochem Sci v.33, p.557-64, 2008.
- 43. COTA, D.; PROULX, K.; SMITH, K.A.; KOZMA, S.C.; THOMAS, G.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Science v.312, p.927-30, 2006.
- 44. BLOUET, C.; SCHWARTZ, G.J. Brainstem nutrient sensing in the nucleus of the solitary tract inhibits feeding. Cell Metab v.16, p.579-87, 2012.
- 45. STEINERT, R.E.; LANDROCK, M.F.; ULLRICH, S.S.; STANDFIELD, S.; OTTO, B.; HOROWITZ, M.; FEINLE-BISSET, C. Effects of intraduodenal infusion of the branched-chain amino acid leucine on ad libitum eating, gut motor and hormone functions, and glycemia in healthy men. Am J Clin Nutr v.102, p.820-7, 2015.
- 46. BALES, C.W.; HAWK, V.H.; GRANVILLE, E.O.; ROSE, S.B.; SHIELDS, T.; BATEMAN, L.; WILLIS, L.; PINER, L.W.; SLENTZ, C.A.; HOUMARD, J.A.; GALLUP, D.; SAMSA, G.P.; KRAUS, W.E. Aerobic and resistance training effects on energy intake: the STRRIDE-AT/RT study. Med Sci Sports Exerc. v. 44, p.2033-9, 2012.

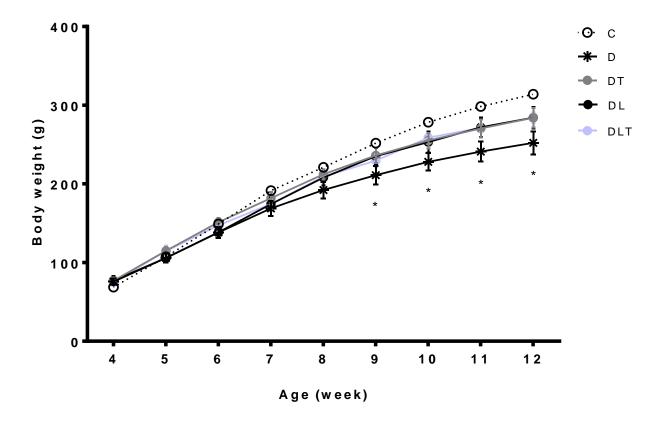


Figura 1. Evolução semanal da massa corporal dos grupos experimentais. Valores em média ± erro padrão (n=7 por grupo). *, p < 0.05 vs. Grupo C. ANOVA two-way seguido por teste de Tukey. C, grupo controle; D, grupo diabético; DT, grupo diabético que realizou apenas o treinamento de força; DL, grupo diabético que recebeu apenas a dieta suplementada com leucina; DLT, grupo diabético que recebeu a ração suplementada com leucina e que realizou o treinamento de força.

Tabela 1. Efeitos do treinamento de força e leucina no peso dos músculos absoluto e relativo, glicose pós-prandial e de jejum, insulina de jejum e consumo de ração e água dos grupos experimentais.

	С	D	DT	DL	DLT
EDL (g)	$0,137 \pm 0,002$	0,106 ± 0,007 ^{\$}	0,115 ± 0,002 ^{\$}	0,114 ± 0,003 ^{\$}	0,114 ± 0,002 ^{\$}
EDL (g/100g)	$0,040 \pm 0,000$	$0,039 \pm 0,002$	$0,040 \pm 0,001$	$0,041 \pm 0,001$	$0,043 \pm 0,000$
GAS (g)	$1,591 \pm 0,027$	1,365 ± 0,072 ^{\$}	$1,565 \pm 0,54$	$1,502 \pm 0,047$	$1,502 \pm 0,047$
GAS (g/100g)	$0,470 \pm 0,007$	$0,467 \pm 0,009$	0,545 ± 0,007 ^{\$#}	$0,500 \pm 0,007^*$	$0,570 \pm 0,024^{\$\#}$
SOL (g)	$0,116 \pm 0,004$	$0,101 \pm 0,005$	$0,116 \pm 0,002$	$0,112 \pm 0,004$	$0,112 \pm 0,007$
SOL (g/100g)	$0,035 \pm 0,000$	$0,085 \pm 0,046$	$0,0417 \pm 0,002$	0.037 ± 0.000	$0,040 \pm 0,000$
Glicose pós-prandial (mg/dl)	$122,8 \pm 3,032^{\#}$	$389,4 \pm 71,14$	163,1 ± 35,08 [#]	146,5 ± 17,88 [#]	129,7 ± 10,29 [#]
Glicose de jejum (mg/dl)	$85,9 \pm 7,29$	310,8 ± 57,38 ^{\$}	175,5 ± 10,18 [#]	181,8 ± 21,11 [#]	176,5 ± 27,78 [#]
Insulina de jejum (pg/ml)	$3022 \pm 406,3$	1362 ± 282,0 ^{\$}	2183 ± 575,8	$1622 \pm 399,8$	1911 ± 320,2
Consumo de ração (g/24h)	15.1±5.27	42.8±5.91\$	30.1±2.73\$#	17.9±6.04#	22.6±2.27\$#
Consumo de água (ml/24h)	33.2±3.28	85.14±27.54\$	41.65±5.11#	26.21±1.96#	27.62±1.98#

EDL, extensor longo dos dedos; GAS, gastrocnêmio; SOL, sóleo. C, grupo controle; D, grupo diabético; DT, grupo diabético que realizou apenas o treinamento de força; DL, grupo diabético que recebeu a ração suplementada com leucina e que realizou o treinamento de força. glicemia pós-prandial, ração e água representam a última semana. Valores em média ± erro padrão, n = 8 por grupo. ANOVA *one-way* seguido por teste de Tukey.

^{\$} Vs. grupo C (p < 0,05)

[#] Vs. grupo D (p < 0,05)

^{*} Vs. grupo DLT (p < 0,05)

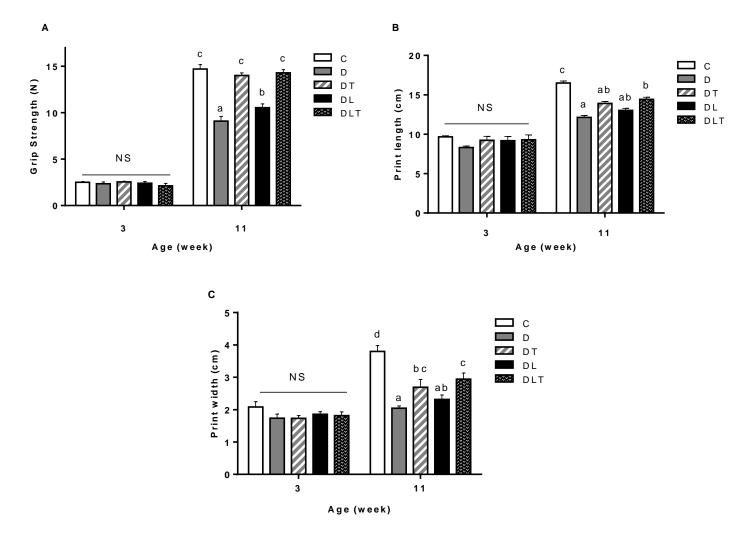


Figura 2. Parâmetros funcionais da musculatura esquelética dos grupos experimentais (n=8 por grupo). (A) *grip strength* (força em N); (B) capacidade de ambulação (comprimento entre as passadas - em cm); (C) capacidade de ambulação (largura entre as passadas em cm). Valores em média ± erro padrão. C, grupo controle; D, grupo diabético; DT, grupo diabético que realizou apenas o treinamento de força; DL,

grupo diabético que recebeu apenas a dieta suplementada com leucina; DLT, grupo diabético que recebeu a ração suplementada com leucina e que realizou o treinamento de força. Colunas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0.05). NS indica sem diferença estatística (p > 0.05).

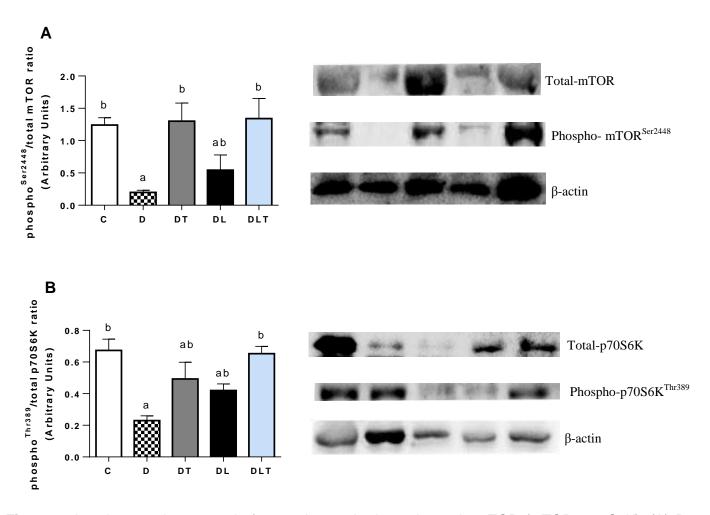


Figura 3. Leucina e treinamento de força sobre a via dependente de mTOR (mTOR, p70S6K). (A) Representa os efeitos de LEU e RT no músculo EDL pela razão phospho/total mTOR, (B) Representa a razão phospho/total p70S6K. Dados estão apresentados em média ± erro padrão e normalizados pela b-actina. Colunas com letras diferentes são significativamente diferentes (p < 0,05). C, grupo controle; D, grupo diabético; DT, grupo diabético e treinamento de força; DL, grupo diabético e leucina; DLT, grupo diabético, leucina e treinamento de força. (n = 8). NS indica sem significância (p > 0,05).

7. CAPÍTULO 2/ARTIGO 2

Treinamento de força isolado ou combinado com suplementação de leucina melhorou o perfil lipídico de ratos diabéticos, enquanto que a leucina isolada não alterou este parâmetro lipídico

Carlos Eduardo C Martins^{1*}, Vanessa B de Sousa Lima¹ e Julio Tirapegui¹.

¹Departmento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Correspondência: martinscec@usp.br

Contribuição dos autores:

C.E.C.M.; V.B.S.L. e J.T. formulação do projeto; C.E.C.M.; V.B.S.L. conduziram a pesquisa; C.E.C.M.; V.B.S.L. analisaram os dados; C.E.C.M.; V.B.S.L. e J.T. escreveram o artigo; J.T. orientador que revisou os dados e o manuscrito.

Autor correspondente

Carlos Eduardo Carvalho Martins*

Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil

Tel.: +55-11-3091-3309; fax: +55-11-3815-4410

E-mail address: martinscec@usp.br

Enviado para o periódico: Lipids in Health and Disease. Fator de Impacto 2.219.

RESUMO

Introdução: Diabetes mellitus está associado com a dislipidemia, o que contribui para um elevado risco de desenvolver trombose, aterosclerose e doenças cardiovasculares. O treinamento de força melhora o perfil lipídico em indivíduos dislipidêmicos; e a suplementação de leucina pode também alterar este parâmetro metabólico em animais obesos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos destas intervenções (isoladas e/ou combinadas) no perfil lipídico sérico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Resultados: Ratos Wistar neonatos com diabetes induzido por estreptozotocina foram tratados com ração suplementada com 5% de leucina e/ou realizaram treinamento de força (3 vezes/semana) durante 8 semanas, e foram distribuídos nos grupos DL, DT e DLT. Os outros dois grupos de animais receberam uma dieta isonitrogenada AIN-93M, que foi definida como dieta controle: Grupo D (diabético não tratado) e grupo C (não diabético). Foram avaliados: colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triglicérides (TG), lipoproteína de densidade baixa (LDL-c), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c), antiaterogênico (AAI) e glicemia de jejum. VLDL-c foi calculado por meio da equação de Friedewald's. O índice AAI (razão HDL-c/CT) possui uma relação inversa com o risco aterogênico, e é considerado um preditor de risco de doença coronariana. O CT do grupo D foi maior do que o do grupo C; e nos grupos diabéticos treinados (DT e DLT), este parâmetro foi menor do que o do grupo D (p< 0,05). Adicionalmente, após 8 semanas de treinamento de força, o HDL-c aumentou nos grupos diabéticos treinados quando comparados com o grupo D (p< 0,05), mas não alterou no grupo que recebeu apenas a ração suplementada com leucina (DL). O AAI dos grupos diabéticos treinados foi maior do que no grupo D (p< 0,05).

Conclusão: A redução no colesterol total, o aumento no HDL-c e o maior índice antiaterogênico em ratos diabéticos treinados demonstram um efeito protetor do treinamento de forca sobre o perfil lipídico. No entanto, a suplementação de leucina isolada não promoveu melhoras significativas nestas lipoproteínas no sangue.

Palavras-chave: treinamento de força, leucina, diabetes mellitus, ratos, perfil lipídico.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é definido como um grupo de doenças metabólicas, no qual a hiperglicemia é acompanhada de uma piora na função ou secreção de insulina em diabetes tipo 1 e 2, respectivamente [1]. Ratos neonatos tratados com estreptozotocina (STZ) desenvolvem, quando adultos, poliuria, polifagia, polidipsia e hiperglicemia moderada (glicemia entre 120 a 360 mg/dl). Estudos já mostraram que, em 8 semanas, os animais apresentam piora da tolerância à glicose e uma queda de 50% na concentração de insulina pancreática, o que causa uma hipoinsulinemia moderada [2,3].

As causas de cada forma de diabetes (tipo 1 ou tipo 2) são distintas, mas as doenças associadas ao DM frequentemente se assemelham. Em ambos os tipos de diabetes, ocorrem alterações no metabolismo de lipídeos e de lipoproteínas. No DM, a dislipidemia está associada com aumento do estresse oxidativo e tem sido implicada na patogênese da doença aterotrombótica macrovascular [1,4]. A hipercolesterolemia em ratos diabéticos induzidos por STZ pode ser resultado da elevada síntese de lipoproteínas ricas em ésteres de colesterol e/ou do bloqueio da remoção das LDL-c no sangue [5].

A suplementação de leucina (SL) tem potencial efeito terapêutico sobre a síntese proteica muscular, controle da massa corporal e metabolismo de glicose em animais obesos [6-10]. Estes estudos suportam a hipótese de que a leucina possui um importante papel na regulação do metabolismo de glicose e do balanço energético por afetar diretamente tecidos periféricos, como por exemplo, tecido adiposo branco, fígado e músculo. Um estudo recente de Liu et al. [10] mostrou que este aminoácido pode facilitar a captação de glicose induzida pela insulina e a fosforilação de Akt nas células musculares esqueléticas, sustentando a importância da leucina sobre a homeostase glicêmica.

A leucina também pode alterar o perfil lipídico em modelo experimental de obesidade. A SL é capaz de reduzir o colesterol total sérico; e esta resposta é independente de alterações na massa corporal total ou na gordura corporal [11]. Zhang et al. [9] observaram que a redução nas concentrações de colesterol no sangue em ratos obesos suplementados com leucina foi independente da menor

adiposidade corporal. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que explicam as alterações no metabolismo do colesterol resultantes da suplementação de leucina. É possível que este aminoácido estimule uma maior síntese de ácidos graxos no músculo, que é acompanhada pela concomitante redução na síntese destes lipídeos no fígado, sendo considerado um possível efeito da leucina sobre o metabolismo lipídico [12].

Em adição a estes efeitos terapêuticos, o treinamento de força (TF) tem sido considerado uma importante intervenção terapêutica não farmacológica. Em ratos diabéticos induzidos por STZ, o TF aumentou a força muscular e a secreção de interleucina-15 (IL-15) que é uma citocina liberada no músculo esquelético e sua concentração está reduzida no diabetes, além de reduzir a adiposidade e a inflamação associada à obesidade e melhorar o perfil lipídico [13,14]. Na literatura, há poucos estudos que destacam os efeitos do TF sobre o metabolismo de lipoproteínas no diabetes, e alguns destes dados são ainda bastante controversos. Pesquisas já mostraram que TF combinado com treinamento aeróbio aumenta o HDL-c e reduz o LDL-c [15,16]. Por outro lado, estudos realizados em humanos mostraram que TF isolado reduziu ou não alterou as concentrações de LDL-c no sangue [17,18], bem como diminuiu ou aumentou o HDL-c sanguíneo [19,20]. Apesar das controvérsias, Fahlman et al. [21] mostraram que o RT isolado é capaz de alterar o metabolismo de lipoproteínas, o que pode ajudar na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose.

Neste trabalho, investigamos os efeitos de duas intervenções terapêuticas sobre o perfil lipídico de ratos diabéticos induzidos por STZ: um programa de treinamento de força isolado ou combinado com a suplementação crônica de leucina.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratos machos com 5 dias de vida (40 animais ao total) foram separados de suas respectivas mães por 8 h e distribuídos em 2 grupos: um grupo diabético (n=32) que recebeu uma injeção intraperitoneal (ip) de STZ [120 mg/kg de peso corporal] diluído em tampão citrato [10mM de citrato de Na (pH 4,5)], e outro não

diabético (n=8) que recebeu somente a injeção (ip) de tampão citrato com volume equivalente, sendo considerado o grupo controle (grupo C) [22]. No desmame (21 dias após o nascimento), todos os ratos que pertenciam ao grupo diabético apresentaram uma glicemia igual ou superior a 150 mg/dl, e foram incluídos no estudo. Em seguida, eles foram distribuídos em quatro grupos: grupo D (n=8) que recebeu uma ração isonitrogenada AIN-93M, que foi definida como dieta controle; o grupo DT (n=8) que recebeu a mesma ração isonitrogenada e que realizou o treinamento de força; o grupo DL (n=8) recebeu uma ração suplementada com 5% de L-leucina; e o grupo DLT (n=8) que consumiu a ração suplementada com 5% de L-leucina e que realizou o treinamento de força. As intervenções foram realizadas durante 8 semanas.

As dietas experimentais foram preparadas de acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN-93M). Com base nesta dieta, 50g de amido de milho/kg de ração foi substituída por 50g de L-leucina (dieta suplementada com 5% de L-leucina), ou por 50g de uma mistura de aminoácidos não essenciais (alanina, acido aspártico, glicina, prolina e serina) com quantidades equivalentes de nitrogênio comprado a ração com L-leucina, sendo assim uma dieta isonitrogenada [23].

O protocolo de exercício de força consistiu em subir 9 vezes uma escada inclinada a 85°. As sessões de treinamento foram realizadas três vezes por semana na parte da manhã. Este protocolo corresponde a um modelo de treinamento de força utilizado em estudos com animais, e que mostra as mesmas adaptações fisiológicas deste tipo de treinamento em humanos [24]. Todos os métodos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética local no Uso de Animais de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (protocolo: 14,2014-P451).

As concentrações séricas de colesterol total, triglicérides, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e glicemia de jejum foram avaliadas por método enzimático, utilizando kit's Labtest® (Labtest® diagnóstica AS, Brasil). O VLDL-c foi calculado, utilizando a equação de Friedewald da seguinte forma: VLDL-c = TG/5. O índice antiaterogênico foi calculado, usando a fórmula AAI = HDL-c x 100 / CT - HDL-c) [25]. Este índice tem uma relação inversa com o risco de desenvolver doença cardíaca coronariana causada por alterações aterogênicas em lipoproteínas no sangue. O massa corporal da ultima semana também foi

mensurada. Os resultados foram expressos como média ± SEM. As variáveis dependentes foram testadas por *one-way*, seguido pelo pós teste de Tukey para análises de comparação múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando p < 0,05.

RESULTADOS E DICUSSÃO

A Figura 1 mostram os resultados da glicemia de jejum e perfil lipídico no soro dos grupos experimentais. O CT sérico foi maior no grupo D comparado com o grupo C (p < 0,05). Além do seu efeito sobre a captação de glicose, a insulina também desempenha um papel importante no metabolismo dos lipídeos. Em condições normais, a insulina aumenta a remoção de LDL-c do sangue [26], e a redução na ação ou secreção de insulina no diabetes desencadeia um quadro de hipercolesterolemia [26, 27]. Em nosso estudo, o colesterol total sérico foi reduzido apenas nos animais diabéticos que realizaram o treinamento (DT e DL) em relação ao grupo D. Resultados semelhantes foram observados em homens diabéticos tipo 1 que foram submetidos a um treinamento de força [28]. Lira et al. [29] mostraram que o RT realizado em baixa, moderada ou alta intensidades melhora o perfil lipídico em homens não treinados, mas os mecanismos que explicam este efeito ainda não estão claros. Os autores especularam que a redução do colesterol total foi resultado da elevada transferência de ésteres do colesterol provenientes de lipoproteínas e dos tecidos para o HDL-c. Os mecanismos que explicam esta elevada transferência incluem o aumento na atividade da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), enzima responsável pela transferência de éster de colesterol ao HDL-c. Logo após uma sessão de treinamento físico, estudos mostraram que a atividade da LCAT encontrase elevada [29-31].

O HDL-C foi significativamente maior nos grupos DT e DLT comparado com o grupo D (p < 0,05), que também suporta um modelo de diabetes induzida por STZ com treinamento de força [14,32]. Estes dados CT e HDL-c confirmam o efeito benéfico do treinamento de força sobre o perfil lipídico sérico, e que pode ter um efeito protetor contra doenças cardiovasculares, como foi demonstrado pelo índice antiaterogênico (índice AAI) [33,34]. Em nosso estudo, este índice foi maior nos

grupos DT e DLT do que nos grupos C, D e DL (p < 0,05), o que pode estar relacionado com propriedades antiaterogênicas do HDL-c, ou seja, além de transportar o colesterol circulante e entregá-lo para o fígado, esta lipoproteína possui outras funções ateroprotetoras e propriedades anti-inflamatória, antioxidante e vasodilatadora. Uma partícula de HDL-c com estrutura e função normais possui elevada capacidade antioxidante [35].

Alguns estudos relatam que a suplementação de leucina durante 6 semanas reduziu a concentração de CT no soro, mas não a de TG e de HDL-c [11], e 14 semanas de suplementação de leucina em água diminui o CT e o LDL-c em animais obesos induzidos dieta rica em gordura [9]. No entanto, neste estudo, não foram observadas diferenças no CT, TG, HDL-c, LDL-c, VLDL-c e valores de AAI entre os grupos D e DL (p > 0,05), o que mostra que a suplementação de leucina por si só não foi capaz de modular o perfil lipídico no soro. Um possível fator que explica estes resultados discordantes pode estar relacionado com a característica do modelo experimental de diabetes utilizado neste estudo, um modelo de DM não associado à obesidade.

A glicemia de jejum no soro foi menor nos animais diabéticos treinados (grupos DT e DLT) comparados com o grupo D. Este resultado está associado com o fato de que o RT aumenta a captação de glicose sanguínea pelo músculo esquelético por meio de mecanismos dependentes e independentes de insulina. O exercício aumenta a translocação do GLUT-4 para a membrana das células musculares esqueléticas; além de aumentar a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos e a captação de glucose estimulada pela insulina, efeitos que podem persistir por até 24-48 horas após uma sessão de exercício [36, 37].

A redução da concentração sérica de glicose no grupo DL pode estar relacionada com a ação da leucina na recuperação da via de sinalização da cascata de insulina [38]. No estudo de Liu et al. [10], em células musculares esqueléticas, a captação de glicose estimulada pela insulina e a fosforilação da AKT foram inibidas com o uso de wortmanina, inibidor de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), mas esta inibição foi parcialmente revertida pela leucina. Adicionalmente, a recuperação da fosforilação da Akt induzida pela leucina foi bloqueada pela inibição do complexo 2 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2), o que demonstra que este aminoácido pode recuperar a via de sinalização da insulina e a captação de glicose

dependente deste hormônio no músculo esquelético por meio do mTORC1 e o mTORC2, revelando um importante papel da leucina na homeostase da glicose.

A Figura 2 mostra os resultados da massa corporal dos grupos experimentais ao final das 8 semanas de tratamento. Estes dados revelam que não houve diferença na massa corporal entre os grupos D, DT, DLT e DL (p > 0,05). Neste estudo, o treinamento de força isolado ou combinado com leucina reduziu a concentração sérica de glicose e de colesterol total e aumentou o HDL-c, sendo que estas respostas não foram dependentes de mudanças na massa corporal (efeitos diretos dos tratamentos).

Em conclusão, a leucina por si só não melhorou o perfil lipídico sérico, porém o treinamento de força aumentou o HDL-c e o AAI, bem como reduziu o CT no soro neste modelo experimental de diabetes, melhorando assim a dislipidemia nestes animais diabéticos.

REFERÊNCIAS

- 1. D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. Front Physiol. 2013; 4:379.
- de Oliveira AC, Andreotti S, Farias Tda S, Torres-Leal FL, de Proença AR, Campaña AB, de Souza AH, Sertié RA, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J, Lima FB: Metabolic disorders and adipose tissue responsiveness in neonatally STZinduced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. Endocrinology. 2012; 153:2178-88.
- 3. Wang RN, Bouwens L, Kloppel G: Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. Diabetologia. 1996; 39:548-57.
- 4. Bierman EL, Amaral JA, Belknap BH: Hyperlipidemia and diabetes mellitus. Diabetes. 1966; 15:675–9.
- 5. Mathé D: Dyslipidemia and diabetes: animal models. Diabetes Metab. 1995; 21:106-11.

- 6. Bernard JR, Liao YH, Ding Z, Hara, D, Kleinert M, Nelson JL. et al. An amino acid mixture improves glucose tolerance and lowers insulin resistance in the obese Zucker rat. Amino acids 2013; 45:191-203.
- 7. Eller LK, Saha DC, Shearer J, Reimer RA. Dietary leucine improves whole-body insulin sensitivity independent of body fat in diet-induced obese Sprague-Dawley rats. J Nutr Biochem 2013; 24:1285-94.
- Layman DK: The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. J Nutr. 2003; 133:261S-267S.
- Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH: Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. Diabetes 2007, 56:1647-54.
- 10. Liu H, Liu R, Xiong Y, Li X, Wang X, Ma Y, Guo H, Hao L, Yao P, Liu L, Wang D, Yang X. Leucine facilitates the insulin-stimulated glucose uptake and insulin signaling in skeletal muscle cells: involving mTORC1 and mTORC2. Amino Acids. 2014; 46:1971-9.
- 11. Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Teodoro GF, de Capitani MD, Vianna D, Pantaleão LC, Matos-Neto EM, Rogero MM, Donato JJr, Tirapegui J: Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. Nutr Metab (Lond). 2011; 8:62.
- 12. Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K: Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats. Nutrition. 2005; 21:1052-8.
- 13. Shamsi MM, Hassan ZM, Quinn LS, Gharakhanlou R, Baghersad L, Mahdavi M: Time course of IL-15 expression after acute resistance exercise in trained rats: effect of diabetes and skeletal muscle phenotype. Endocrine. 2015; 49:396-403.
- 14. Safarzade A, Talebi-Garakani E: Short term resistance training enhanced plasma apoA-I and FABP4 levels in Streptozotocin-induced diabetic rats. J Diabetes Metab Disord. 2014; 13:41.
- 15. Ades PA, Savage PD, Toth MJ, Harvey-Berino J, Schneider DJ, Bunn JY, Audelin MC, Ludlow M: High-calorie-expenditure exercise: a new approach to cardiac rehabilitation for overweight coronary patients. Circulation. 2009; 119:2671-8.

- 16. Zois C1, Tokmakidis SP, Volaklis KA, Kotsa K, Touvra AM, Douda E, Yovos IG: Lipoprotein profile, glycemic control and physical fitness after strength and aerobic training in post-menopausal women with type 2 diabetes. Eur J Appl Physiol. 2009; 106:901-7.
- 17. Cauza E, Hanusch-Enserer U, Strasser B, Ludvik B, Metz-Schimmerl S, Pacini G, Wagner O, Georg P, Prager R, Kostner K, Dunky A, Haber P: The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus. Arch Phys Med Rehabil. 2005; 86:1527-33.
- 18. Ghanbari-Niaki A, Saghebjoo M, Hedayati M: A single session of circuit-resistance exercise effects on human peripheral blood lymphocyte ABCA1 expression and plasma HDL-C level. Regul Pept. 2011; 166:42-7.
- 19. Williams AD, Almond J, Ahuja KD, Beard DC, Robertson IK, Ball MJ: Cardiovascular and metabolic effects of community based resistance training in an older population. J Sci Med Sport. 2011; 14:331-7.
- 20. Costa RR, Lima Alberton C, Tagliari M, Martins Kruel LF: Effects of resistance training on the lipid profile in obese women. J Sports Med Phys Fitness. 2011; 51:169-77.
- 21. Fahlman MM, Boardley D, Lambert CP, Flynn MG: Effects of endurance training and resistance training on plasma lipoprotein profiles in elderly women. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2002; 57:B54-60.
- 22.Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Costa CE, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Lima FB: Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. Metabolism. 2007; 56:977-84.
- 23. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993; 123:1939-51.
- 24. Hornberger TAJr, Farrar RP: Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance resistance exercise in the rat. Can J Appl Physiol. 2004; 29:16-31.
- 25. Guido S, Joseph T: Effect of chemically different calcium antagonists on lipid profile in rats fed on a high fat diet. Indian J Exp. Biol. 1992; 30:292-4.

- 26. Saravanan R, Pari L: Antihyperlipidemic and antiperoxidative effect of Diasulin, a polyherbal formulation in alloxan induced hyperglycemic rats. BMC Complement Altern Med. 2005; 5:14.
- 27. Gengiah K, Hari R, Anbu J: Antidiabetic antihyperlipidemic and hepato-protective effect of Gluconorm-5: A polyherbal formulation in steptozotocin induced hyperglycemic rats. Anc Sci Life. 2014; 34:23-32.
- 28. Durak EP, Jovanovic-Peterson, L, Peterson CM: Randomized crossover study of effect of resistance training on glycemic control, muscular strength, and cholesterol in type I diabetic men. Diabetes Care. 1990; 13:1039-43.
- 29. Lira FS, Yamashita AS, Uchida MC, Zanchi NE, Gualano B, Martins E Jr, Caperuto EC, Seelaender M: Low and moderate, rather than high intensity strength exercise induces benefit regarding plasma lipid profile. Diabetol Metab Syndr. 2010; 21:2:31.
- 30. Mann S, Beedie C, Jimenez A: Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. Sports Med. 2014; 44:211-21.
- 31. Calabresi L, Franceschini G: Lecithin: cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. Trends Cardiovasc Med. 2010; 20:50–3.
- 32. Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, das Neves W, Valente KS, Lancha AHJr: Leucine supplementation combined with resistance exercise improves the plasma lipid profile of dexamethasone-treated rats. Lipids Health Dis. 2012; 11:7.
- 33. Kraus, W.E., Houmard, J.A., Duscha, B.D., Knetzger, K.J., Wharton, M.B., McCartney, J.S., Bales, C.W., Henes, S., Samsa, G.P., Otvos, J.D., Kulkarni, K.R., Slentz, C.A: Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. N Engl J Med. 2002; 347:1483–92.
- 34. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, Gulanick M, Laing ST, Stewart KJ: Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Circulation. 2007; 116:572-84.
- 35. Podrez, EA: Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2010; 37:719–25.

- 36. Holten MK, Zacho M, Gaster M, Juel C, Wojtaszewski JF, Dela F: Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. Diabetes 2004; 53:294–305.
- 37. Cartee, GD. Mechanisms for greater insulin-stimulated glucose uptake in normal and insulin resistant skeletal muscle after acute exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015. doi: 10.1152/ajpendo.00416.2015.
- 38. Hinault, C, Mothe-Satney, I, Gautier, N, Van Obberghen, E. Amino acids require glucose to enhance, through phosphoinositide-dependent protein kinase 1, the insulin-activated protein kinase B cascade on insulin-resistant adipocytes. Diabetologia. 2006; 49:1017-26.

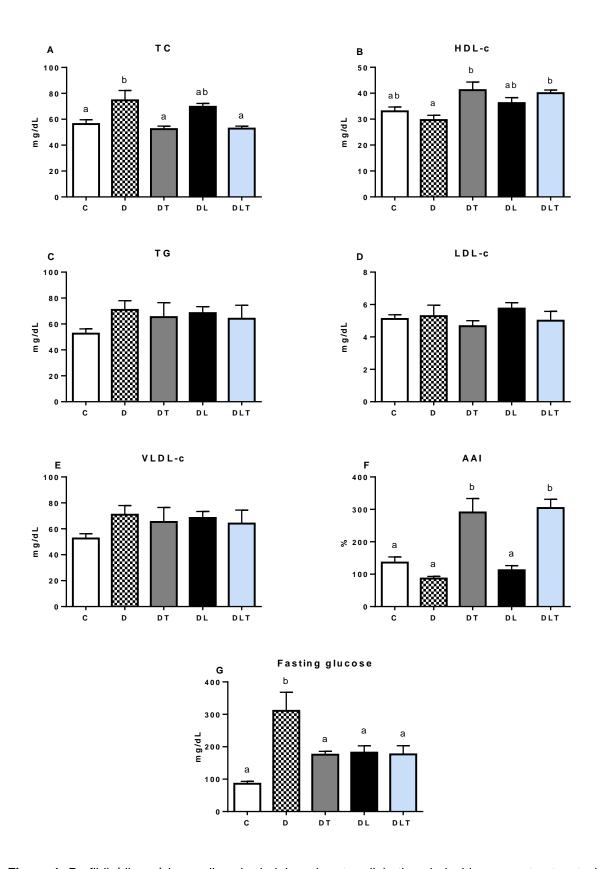


Figura 1. Perfil lipídico sérico e glicemia de jejum de ratos diabeticos induzidos por estreptozotocina submetidos à suplementação de leucina e treinamento de força. CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-c, lipoproteína de alta densidade; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C, lipoproteína de muito baixa densidade; AAI, índice antiaterogênico. C, grupo controle; D, grupo diabético; DT, diabético com treinamento de força; DL, diabético com leucina; DLT, diabético com leucina e

treinamento de força. Os dados estão em média \pm erro padrão. Nota-se que acima de cada barra existem letras. Barras que compartilham as mesmas letras não se diferem estatisticamente. As letras não compartilhadas indicam diferença estatisticamente significativa (P < 0.05).

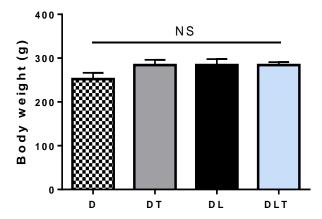


Figura 2. Massa corporal na última semana de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos à suplementação de leucina e treinamento de força. Os valores estão em média ± erro padrão (n=8). NS indica não significativa entre os grupos D, DL, DT e DLT (p > 0,05) analisado por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação crônica de leucina e o treinamento de força foram eficazes em melhorar a força muscular e normalizar a glicemia de jejum e pós-prandial em animais diabéticos. Porém, o treinamento de força foi responsável pelas maiores adaptações morfológicas e funcionais no músculo esquelético de ratos diabéticos, ou seja, proporcionou aumento da força e da massa muscular destes animais, além de ter melhorado o perfil lipídico. De fato, o músculo esquelético foi mais responsivo ao treinamento de força do que à suplementação de leucina. No entanto, ambos potencializaram os efeitos da síntese proteica no músculo esquelético por meio da regulação da via mTOR-p70S6K. Logo, conclui-se que ambas as intervenções são potentes agentes não-farmacológicos para atenuação dos efeitos deletérios causados pela miopatia diabética e no diabetes em geral.

9. REFERÊNCIAS

AGUIRRE, N.; VAN LOON, L.J.; BAAR, K. The role of amino acids in skeletal muscle adaptation to exercise. Nestle Nutr Inst Workshop Ser v.76, p.85-102, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care, v.35, p.11S-63S, 2012.

ANDERSEN, H.; SCHMITZ, O.; NIELSEN, S. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycemia in type 1 diabetic patients. Diabet Med v.22, p.1401-1407, 2005.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. J. Nutr. v.131, p.856S-860S, 2001.

AUGHSTEEN, A.A.; KHAIR, A.M.; SULEIMAN, A.A. Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rat. JOP v.7, p.382-9, 2006.

BELLE, T.L.V.; COPPIETERS, K.T.; HERRATH, M.G.V. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiol Rev v.91, p.79-118, 2011.

BLANCO, J.E.; ANDERSON, K.D.; STEWARD, O. Recovery of forepaw gripping ability and reorganization of cortical motor control following cervical spinal cord injuries in mice. Exp Neurol v.203, p.333-348, 2007.

BREEN, L.; PHILLIPS, S.M. Nutrient interaction for optimal protein anabolism in resistance exercise. Curr Opin Clin Nutr Metab Care v.15, p.226-232, 2012.

BUENO Jr, C.B.; FERREIRA, C.B.; PEREIRA, M.G.; BACURAU, A.V.N.; BRUM, P.C. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca2+ handling-

related protein expression. In sympathetic hyperactivity-induced heart failure. J Appl Physiol v.109, p.702-709, 2010.

BUENO Jr, C.B.; PANTALEÃO, L.C.; VOTARELLI, V.A.; BOZI, L.H.M.; BRUM, P.C.; ZATZ, M. Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance. PLoS ONE v.7, p.1-9, 2012.

BURD, N.A.; HOLWERDA, A.M.; SELBY, K.C.; WEST, D.W.D.; STAPLES, A.W.; CAIN, N.E.; CASHABACK, J.G.A.; POTVIN, J.R.; BAKER, S.K.; PHILLIPS, S.M. Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signaling molecule phosphorylation in young men. J Physiol v.16, p.3119-3130, 2010.

CASPERSON, S.L.; SHEFFIELD-MOORE, M.; HEWLINGS, S.J.; PADDON-JONES, D. Leucine supplementation chronically improves muscle protein synthesis in older adults consuming the RDA for protein. Clin Nutr v.31, p.512-4, 2012.

COFFEY, V.G.; MOORE, D.R.; BURD, N.A.; RERECICH, T.; STELLINGWERFF, T.; GARNHAM, A.P.; PHILLIPS, S.M.; HAWLEY, J.A. Nutrient provision increases signalling and protein synthesis in human skeletal muscle after repeated sprints. Eur J Appl Physiol v.7, p.1473-1483, 2011.

CASO, G.; MCNURLAN, M.A. Effect of insulin on whole body protein metabolism in children with type 1 diabetes. Curr Opin Clin Nutr Metab Care v.13, p.3-6, 2010.

COHEN, S.; BRAULT, J.J.; GYGI, S.P.; GLASS, D.J.; VALENZUELA, D.M.; GARTNER, C.; LATRES, E.; GOLDBERG, A.L.. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. J. Cell Biol v.185, p.1083-1095, 2009.

COHEN, S.; NATHAN, J.A.; GOLDBERG, A.L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. Nat Rev Drug Discov v.1, p.58-74, 2014.

CORCORAN, M.P.; LAMON-FAVA, S.; FIELDING, R.A. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of AGE dietary fatty acids and exercise. Am J Clin Nutr v.85, p.662-677, 2007.

DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; FRANCAUX, M. Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. Eur. J. Appl. Physiol v.94, p.1-10, 2005.

DONATTO, F.F.; NEVES, R.X.; ROSA, F.O.; CAMARGO, R.G.; RIBEIRO,H.; MATOS-NETO, E.M.; SEELAENDER, M. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. Cytokine v.61, p.426–432, 2013.

DREYER, .H.C.; FUJITA, S.; CADENAS, J.; CHINKED, D.L.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. J Physiol v.576, p.613,624, 2006.

DRUMMOND, M.J.; FRY, C.S.; GLYNN, E.L.; DREYER, H.C.; DHANANI, S.; TIMMERMAN, K.L.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis. J Physiol v.587, p.1535-1546, 2009.

DURAN, A.; AMANCHY, R.; LINARES, J.F.; JOSHI, J.; ABU-BAKER, S.; POROLLO, A.; HANSEN, M.; MOSCAT, J.; DIAZ-MECO, M.T. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. Mol Cell v.7, p.134-146, 2011.

EVANS, W.J. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. Am J Clin Nutr v.91, p.1123S-1127S, 2010.

FARNFIELD, M.M.; BREEN, L.; CAREY, K.A.; GARNHAM, A.; CAMERON-SMITH, D. Activation of mTOR signalling in young and old human skeletal muscle in response to combined resistance exercise and whey protein ingestion. Appl Physiol Nutr Metab v.37, p. 21-30, 2012.

FARUP, J.; RAHBECK, S.K.; VENDELBO, M.H.; MATZON, A.; HINDHEDE, J.; BEJDER, A.; RINGGARD, S.; VISSING, K. Whey protein hydrolysate augments tendon and muscle hypertrophy independent of resistance exercise contraction mode. Scand J Med Sci Sports v.24, p.788-98, 2014.

FERNANDES, T.; SOCI, U.P.R.; MELO, S.F.S.; ALVES, C.R.; OLIVEIRA, E.M. Signaling Pathways that Mediate Skeletal Muscle Hypertrophy: Effects of Exercise Training. In: Cseri, J. Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations. Hard Cover, p.189-218, 2012.

FRANÇA, C.M.; LOURA, S.C.; TAKAHASHI, C.B.; ALVES, A.N.; SOUZA, M.A.P.; FERNANDES, K.P.; SILVA, F.T.D.; BUSSADORI, S.K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effect of laser therapy on skeletal muscle repair process in diabetic rats. Lasers Med Sci v.28, p.1331-1338, 2012.

FUJITA, S.; ABE, T.; DRUMMOND, M.J.; CADENAS, J.G.; DREYER, H.C.; SATO, Y.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. J Appl Physiol v.103, p.903-910, 2007.

GARBER, C.E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M.R.; FRANKLIN, B.A.; LAMONTE, M.J.; LEE, I.M.; NIEMAN, D.C.; SWAIN, D.P. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. Med Sci Sports Exerc. v.43, p.1334-1359, 2011.

GARG, V. Noninsulin pharmacological management of type 1 diabetes mellitus. Indian J of Endocrinol Metabol v.15, p.5S-11S, 2011.

GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteassome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev v.82, p.373-428, 2002.

GOLDSPINK, G.; BOOTH, F. General remarks: mechanical signals and gene expression in muscle. Am J Physiol v.262, p.327-328, 1992.

GOODMAN, C.A.; FREY, J.W.; MALBREY, D.M.; JACOBS, B.L.; LINCOLN, H.C.; YOU, J.S.; HORNBERGER, T.A. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. J Physiol v.589, p.5485-5501, 2011.

GREENHAFF, P.L.; KARAGOUNIS, L.G.; PEIRCE, N.; SIMPSON, E.J.; HAZELL, M.; LAYFIELD, R.; WACKERHAGE, H.; SMITH, K.; ATHERTON, P.; SELBY, A.; RENNIE, M.J. Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab v.295 p.E595-604, 2008.

GRZELKOWSKA, K.; DARDEVET, D.; BALAGE, M.; GRIZARD, J. Involvement of the rapamycin-sensitive pathway in the insulin regulation of muscle protein synthesis in streptozotocin-diabetic rats. J Endocrinol v.160, p.137-45, 1999.

GRZELKOWSKA-KOWALCZYK K, WIETESKA W. Changes of insulin-mediated protein kinases phosphorylation and the expression of IGFBP-3 in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic mice. Pol J Vet Sci v.8, p.231-240, 2005.

GUIDO, S.; JOSEPH, T. Effect of chemically different calcium antagonists on lipid profile in rats fed on a high fat diet. Indian J Exp. Biol v.30, p.292-4, 1992.

HEBERT, S.L.; NAIR, K.S. Protein and metabolism in type 1 diabetes. Clin Nutr v. 29, p.13-17, 2010.

HEIMANN, A. O gene da enzima conversora de angiotensina influencia nas alterações do diabetes. 2003. Tese Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

HELLYER, N.; NOKLEBY, J.J.; THICKE, B.M.; ZHAN, W.Z.; SIECK, G.C.; MANTILLA, C.B. Reduced ribosomal protein S6 phosphorylation following

pregressive resistance exercise in growing adolescent rats. J Strength Cond Res v.26, p.1657-1666, 2012.

HORNRBERGER, T.A.; CHU, W.K.; MAK, Y.W.; HSIUNG, J.W.; HUANG, S.A.; CHIEN, S. The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci v.103, p.4741-4746, 2006.

HORNRBERGER, T.A. MCLOUGHLIN, T.J.; LESZCZYNSKI, J.K; ARMSTRONG, D.D.; JAMESON, R.R.; BOWEN, P.E.; HWANG, E.R.; HOU, H.; MOUSTAFA, M.E.; CARLSON, B.A.; HATWELD, D.L.; DIAMOND, A.M.; ESSER, K.A. Selenoprotein-deficient transgenic mice exhibit enchanced exercise-induced muscle growth. J Nutr v.133, p.3091-3097, 2003.

HORNRBERGER, T.A.Jr.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. Can. J. Appl. Physiol v.29, p.16-31, 2004.

HULMI, J.J.; LOCKWOOD, C.M.; STOUT, J.R. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: a case for whey protein. Nutr Metab v.7, p.1-11, 2010.

HULMI, J.J.; TANNERSTEDT, J.; SELANNE, H.; KAINULAINEN, H.; KOVANEN, V.; MERO, A. A. Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. J Appl Physiol v.106, p.1720-1729, 2009.

JEONG, J.; CONBOY, M.J.; CONBOY, I.M. Pharmacological inhibition of myostatin/TGF-β receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. Acta Pharmacol Sin v.34, p.1052-1060, 2013.

KENNEL, P.F.; FONTENEAU, P.; MARTIN, E.; SCHMIDT, J.M.; AZZOUZ, M.; JACQUES, B.; GUENET, J.L.; SCHMALBRUCH, H.; WARTER, J.M.; POINDRON, P. Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. Neurobiol Dis v.3, p.137-147, 1996.

KIMBALL, S.R. The role of nutrition in stimulating muscle protein accretion at the molecular level. Biochem. Soc. Trans. v.35, p.1298-1301, 2007.

KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. J. Nutr v.136, p.227S-231S, 2006.

KOOPMAN, R.; VERDIJK, L.; MANDERS, R.J.; GIJSEN, A.P.; GORSELINK, M.; PIJPERS, E.; WAGENMAKERS, A.J.; VAN LOON, L.J. Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. Am J Clin Nutr v.84, p.623-32, 2006.

KRAEMER, W.J.; RATAMESS, N.A. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med v.35, p.339-361, 2005.

KRAUSE, M.P.; RIDDELL, M.C.; GORDON, C.S.; IMAM, S.A.; CAFARELLI, E.; HAWKE, T.J Diabetic myopathy differs between Ins2Akita+/- and streptozotocin-induced Type 1 diabetic models. J Appl Physiol v.106, p.1650-9, 2009.

KRAUSE, M.P.; RIDDELL, M.C.; HAWKE, T.J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. Pediatric Diabetes v.12, p.345-364, 2011.

KRAUSE, M.P.; AL-SAJEE, D.; D'SOUZA, D.M.; REBALKA, I.A.; MORADI, J.; RIDDELL, M.C.; HAWKE, T.J. Impared macrophage and satellite cell infiltration occurs in a muscle-specific following injury in diabetic skeletal muscle. PLoS One v.8, p.70971, 2013.

LATRES, E.; AMINI, A.R.; AMINI, A.A.; GRIFFITHS, J.; MARTIN, F.J.; WEI, Y.; LIN, H.C.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. J Biol Chem v.280, p.2737-2744, 2005.

LEENDERS, M.; VERDIJK, L.B.; VAN DER HOEVEN, L.; VAN KRANENBURG, J.; HARTGENS, F.; WODZIG, W.K.; SARIS, W.H.M.; VAN LOON. Prolonged leucine supplementation does not augment muscle mass or affect glycemic control in elderly type 2 diabetic men. J Nutr v.141, p.1070-1076, 2011.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia v.51, p.216-226, 2008.

LEGER, B.; CARTONI, R.; PRAZ, M.; LAMON, S.; DERIAZ, O.; CRETTENAND, A.; GOBELET, C.; ROHMER, P.; KONZELMANN, M.; LUTHI, F.; RUSSELL, A.P. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. J Physiol v.576, p.923-933, 2006.

LIU, Z.; LONG, W.; FRYBURG, D.A.; BARRETT, E.J. The regulation of body and skeletal muscle protein metabolism by hormones and amino acids. J Nutr v.136, p.212S-217S, 2006.

LOKIREDDY, S.; WIJESOMA, I.W.; TENG, S.; BONALA, S.; GLUCKMAN, P.D.; MCFARLE, C.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. The ubiquitin ligase Mul1 induces mitophagy in skeletal muscle response to muscle-wasting stimuli. Cell Metabolism v.16, p.613-624, 2012.

MACOTELA, Y.; EMANUELLI, B.; BANG, A.M.; ESPINOZA, D.O.; BOUCHER, J.; BEEBE, K.; GALL, W.; KAHN, C.R. Dietary leucine – an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. PLoS ONE v.6, p.1-13, 2011.

MANDERS, J.R.; LITTLE, J.P.; FORBES, S.C.; CANDOW, D.G.. Insulinotropic and muscle protein synthetic effects of branched-chain amino acids: potential therapy for type 2 diabetes and sarcopenia. Nutrients v.4, p.1664-1678, 2012.

MANDERS, R.J.; KOOPMAN, R.; SLUIJSMANS, W.E.; VAN DEN BERG, R.; VERBEEK, K.; SARIS, W.H.; WAGENMAKERS, A.J.; VAN LOON, L.J. Co-ingestion

of a protein hydrolysate with or without additional leucine effectively reduces postprandial blood glucose excursions in type 2 diabetic men. J Nutr v.136, p.1294e9, 2006.

MASCHER, H.; TANNERSTEDT, J.; BRINK-ELFEGOUN, T.; EKBLOM, B.; GUSTAFSSON, T.; BLOMSTRAND, E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab v.294, p.43-51, 2008.

MEDEIROS, C.; FREDERICO, M.J.; DA LUZ, G.; PAULI, J.R.; SILVA, A.S.; PINHO, R.A.; VELLOSO, L.A.; ROPELLE, E.R.; DE SOUZA, C.T. Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats. J Cell Physiol v.226, p.666-674, 2011.

WANG, X.; HU, Z.; HU, J.; DU, J.; MITCH, W.E. Insulin resistance accelerates muscle pro-tein degradation: activation of the ubiquitin–proteasome pathway by defectsin muscle cell signaling. Endocrinology v.147, p.4160-8, 2006.

MILLWARD, D.J.; LAYMAN, D.K.; TOMÉ, D.; SCHAAFSMA, G. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. Am J Clin Nutr v.87, p.1576S-1581S, 2008.

MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Mechanisms of muscle wasting: The role of the ubiquitin-proteasome pathway. N Engl J Med v.19, p.1897-905, 1996.

MÖNICO-NETO, M.; ANTUNES, H.K.; DATTILO, M.; MEDEIROS, A.; SOUZA, H.S.; LEE, K.S.; DE MELO, C.M.; TUFIK, S.; DE MELO, M.T. Resistance exercise: a non-pharmacological strategy to minimize or reverse sleep deprivation-induced muscle atrophy. Med Hypotheses v.80, p.701-705, 2013.

MURATA, M.; TAKAHASHI, A.; SAITO, I.; KAWANISHI, S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. Biochem Pharmacol v.57, p.881-887, 1999.

NARICI, M.V.; MAFFULLI, N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. Br Med Bull v.95, p.139-159, 2010.

NICASTRO, H.; ARTIOLI, G.G.; COSTA, A.S.; SOLIS, M.Y.; LUZ, C.R.; BLACJIER, F.; LANCHA Jr, A.H. An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. Amino Acids v.40, p.287-300, 2011.

OGASAWARA, R.; KOBAYASHI, K.; TSUTAKI, A.; LEE, K.; ABE, T.; FUJITA, S.; NAKAZATO, K.; ISHII, N. mTor signaling response to resistance exercise in altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. J Appl Physiol v.114, p.934-940, 2013.

OSTLER, J.E.; MAURYA, S.K.; DIALS, J.; ROOF, S.R.; DEVOR, S.T.; ZIOLO, M.T.; PERIASAMY, M. Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models. Am J Physiol Endocrinol Metab v.306, p.E592-E605, 2014.

POORNIMA, I.G.; PARIKH, P.; SHANNON, R.P. Diabetic Cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. Circ Res v.98, p.596-605, 2006.

PAVY-LE, T.A.; HEER, M.; NARICI, M.V.; RITTWEGER, J.; VERNIKOS, J. From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). Eur J Appl Physiol v.101, p.143-194, 2007.

PRADO, C.M.; LIEFFERS, J.R.; MCCARGAR, L.J.; REIMAN, T.; SAWYER, M.B.; MARTIN, L.; BARACOS, V.E. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. Lancet Oncol v.9, p.629-635, 2008.

PROUD, C.G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. Biochem J v.403, p.217-234, 2007.

RABOL, R.; BOUSHEL, R.; ALMDAL, T.; HANSEN, C.N.; PLOUG, T.; HAUGAARD, S.B.; PRATS, C.; MADSBAD, S.; DELA, F. Opposite effects of pioglitazone and rosiglitazone on mitochondrial respiration in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab v.12, p.806-14, 2010.

REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr v.127, p.838S-841S, 1997.

RODRÍGUEZ, T.; ALVAREZ, B.; BUSQUETS, S.; CARBÓ, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Increased skeletal muscle protein turnover of streptozotocin diabetic rat is associated with high concentrations of branched-chain amino acids. Bioch Mol Med v.61, p.87-94, 1997.

SACHECK, J.M.; HYATT, J.P.K.; RAFAELLO, A.; JAGOE, R.T.; ROY, R.R.; EDGERTON, V.R.; LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during system diseases. FASEB J v.21, p.140-155, 2007.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S.H.; GOLBERG, A.L. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell v.117, p.399-412, 2004.

SANS, M.D.; TASHIRO, M.; VOGEL, N.L.; KIMBALL, S.R.; D'ALECY, L. G.; WILLIAMS, J. A. Leucine activates pancreatic translational machinery in rats and mice through mTOR independently of CCK and insulin. J Nutr v.136, p.1792-1799, 2006.

SCHOENFELD, B.J. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. J Strength Cond Res v.24, p.2857-2872, 2010.

SHAMSI, M.M.; HASSAN, Z.M.; QUINN, L.S.; GHARAKHANLOU, R.; BAGHERSAD, L.; MAHDAVI, M. Time course of IL-15 expression after acute resistance exercise in

trained rats: effect of diabetes and skeletal muscle phenotype. Endocrine v.49, p.396-403, 2015.

SPIERING, B.A.; KRAEMER, W.J.; ANDERSON, J.M.; ARMSTRONG, L.E.; NINDL, B.C.; VOLEK, J.S.; MARESH, C.M. Resistance exercise biology: manipulation of resistance exercise programme variables determines the responses of cellular and molecular signalling pathways. Sports Med v.38, p.527-540, 2008.

TAKADA, J.; MACHADO, M.A.; PERES, S.B.; BRITO, L.C.; BORGES-SILVA, C.N.; COSTA, C.E.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F.B. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. Metabolism v.56, p.977-984, 2007.

TIPTON, K.D.; ELLIOTT, T.A.; FERRANDO, A.A.; AARSLAND, A.A.; WOLFE, R.R. Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. Appl Physiol Nutr Metab v.34, p.151–161, 2009.

VOLEK, J.S.; VOLK, B.M.; GÓMEZ, A.L.; KUNCES, L.J.; KUPCHAK, B.P.; FREIDENREICH, D.J.; ARISTIZABAL, J.C.; SAENZ, C.; DUNN-LEWIS, COURTENAY.; BALLARD, K.D.; QUANN, E.E.; KAWIECKI, D.L.; FLANAGAN, S.D.; COMSTOCK, B.A.; FRAGALA, M.S.; EARP, J.E.; FERNANDEZ, M.L.; BRUNO, R.S.; PTOLEMY, A.S.; KELLOGG, M.D.; MARESH, C.M.; KRAEMER, W. Whey protein supplementation during resistance training augments lean body mass. J Am Coll Nutr v.32, p.122-135, 2013.

WALL, B.T.; HAMER, H.M.; DE LANGE, A.; KISKINI, A.; GROEN, B.B.; SENDEN, J.M.; GILSEN, A.P.; VERDIJK, L.B.; VAN LOON, L.J. Leucine co-ingestion improves post-prandial muscle protein accretion in elderly men. Clin Nutr v.32, p.412-419, 2013.

WHITEHOUSE, A.S.; TISDALE, M.J. Downregulation of ubiquitin-dependet proteolysis by eicosapentaenoic acid in acute starvation. Biochem Biophys Res Commum v.3, p598-602, 2001.

WHITING, D.R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2001 and 2030. Diabetes Res Clin Pract v.94, p.311-321, 2011.

WIETESKA-SKRZECZYNSKA, W.; GRZELKOWSKA-KOWALCZYK, K.; JANK, M.; MACIEJEWSKI, H. Transcriptional dysregulation of skeletal muscle protein metabolism in streptozotocin-diabetic mice. J Physiol Pharmacol v.60, p.29-36, 2009.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care v.27, p.1047-1053, 2004.

WORKENEH, B.; BAJAJ, M. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. Int J Biochem Cell Biol v.45, p.2239-2244, 2013.

ZANCHI, N.E.; NICASTRO, H.; LANCHA Jr. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and vivo studies. Nutr Metab (Lond) v.5, p.20, 2008.

ZELEZNIAK, A.; PERS, T.H.; SOARES, S.; PATTI, M.E.; PATIL, K.R. Metabolic network topology reveals transcriptional regulatory signatures of types 2 diabetes. PLos Comput Biol v.6, p.e1000729, 2010.

ZOLL, J.; MONASSIER, L.; GARNIER, A.; N'GUESSAN, B.; METTAUER, B.; VEKSLER, V.; PIQUARD, F.; VENTURA-CLAPIER, R.; GENY, B. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. J Appl Physiol v.101, p.385-91, 2006.

ANEXO 1. INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

- 1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
- 2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
- 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
 - 3. A sessão de defesa será aberta ao público.
- 4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.
- 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
- 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
- 5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 2. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Oficio CEUA/FCF 33.2014-P451

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "Efeito da suplementação crônica com L-leucina e treinamento resistido sobre a capacidade motora e a atividade de vias de síntese proteica e proteólise muscular em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina" (Protocolo CEUA/FCF/451), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) Carlos Eduardo Carvalho Martins, sob orientação do(a) Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui de Toledo, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 11 de abril de 2014. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo relatório final.

São Paulo, 14 de abril de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A. Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafct@usp.br

ANEXO 3. FICHA DO ALUNO.



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8697423/1 - Carlos Eduardo Carvalho Martins

Email: martinsceo@usp.br Data de Nascimento: 31/07/1988

Cédula de Identidade: RG - 2103858-9 - AM Local de Nascimento: Estado do Amazonas

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Nutrição - Centro Universitário do Norte - Amazonas - Brasil -

2011

Curso: Mestrado

Programa: Ciência dos Alimentos Área: Nutrição Experimental

Data de Matricula: 04/06/2013 Inicio da Contagem de Prazo: 04/06/2013 Data Limite para o Depósito: 04/04/2016

Orientador: Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 04/06/2013 até o presente.

Email: tirapegu@usp.br

Proficiência em Linguas: Inglês, Aprovado em 04/06/2013

Trancamento(s): 120 dias

Período de 20/08/2015 até 17/12/2015

Data de Aprovação no Exame de

Qualificação:

Aprovado em 28/08/2014

Data do Depósito do Trabalho:

Titulo do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da

Banca:

Data de Aprovação da Banca: Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa: Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 04/06/2013

Trancado em 20/08/2015



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8697423/1 - Carlos Eduardo Carvalho Martins

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc	Exc.	Situação
EFE5747- 2/2	Bioenergética Aplicada ao Treinamento da Potência Aeróbia (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	01/10/2013	11/11/2013	60	4	100	A	N	Concluida
HNT5756- 4/2	Epidemiologia da Atividade Física (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	23/10/2013	04/12/2013	30	2	100	A	N	Concluida
BIF5707- 3/1	Regulação da Expressão Gênica em Processos Fisiológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	24/04/2014	120	8	100	A	N	Concluida
EFE5746- 3/3	Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	08/04/2014	17/06/2014	90	6	100	С	N	Concluida
EFB5760- 1/1	Modelos Experimentais Aplicados à Nutrição e Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	13/10/2014	09/11/2014	60	4	100	В	N	Concluida
EFB5759- 1/3	Suplementação Nutricional Aplicada à Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	05/11/2014	02/12/2014	60	4	100	В	N	Concluida

	Créditos m	Créditos obtidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Concelto a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T
 - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

ANEXO 4. CURRÍCULO LATTES.



Carlos Eduardo Carvalho Martins

- Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/9800249811212058
- Última atualização do curriculo em 18/03/2016

Possui Graduação em Nutrição pelo Centro Universitário do Norte (2010). Especialização em Nutrição Esportiva e Estética pelo Centro Universitário São Camilo (2012). Já atuou em Consultório, na parte Clínica e de Alta Performance. Atualmente faz parte do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Nutrição e Esporte da Universidade de São Paulo (USP). Tem experiência na área de Nutrição Esportiva, atuando principalmente nos seguintes temas: Nutrição, Suplementação Dietética, Hipertrofia Muscular, Emagrecimento e Attividade Fisica. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Carlos Eduardo Carvalho Martins *

Nome em citações bibliográficas MARTINS, C.E.C.;MARTINS, CARLOS EDUARDO CARVALHO

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2013 Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Titulo: Efeito da suplementação com leucina e treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes melitus. induzido por estreptorotocina,Orientador: Se Julio Orlando Trapegui Toledo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2011 - 2012 Especialização em Nutrição Espertiva e Estática. (Carga Horária: 488h). Centro Universitário São Camilo, CUSC, Brasil.

Titulo: Efeitos da suplementação de proteira do soro do leite no treinamento com posos sobre a composição corporal.

Orientador: Lucas Carminatti Pantaleão.

2007 - 2010 Graduação em Nutrição. Centro Universitário do Norte, UNINORTE, Brasil.

Titulo: Consumo de suplementos distóticos em frequentadores de academia em Manaus. Orientador: Luciana Rossell Malinsky.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vinculo institucional

2013 - 2016 Vinculo: , Enquadramento Funcional:

Centro Universitário São Camilo, CUSC, Brasil.

Vinculo institucional

2011 - 2012 Vinculo: , Enquadramento Funcional:

Tropical Hotel Manaus, THM, Brasil.

Vinculo institucional

2009 - 2009 Vinculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário de Nutrição, Carga horária: 30

Outras informações Estágio Estra Curricular em Nutrição

Projetos de pesquisa

2013 - 2016 Efeito da suplementação com leucina e treinamento de força sobre a miopatia diabética em modelo experimental de diabetes mellitus induzido por

Descrição: O diabetes melitus relacionado com resistência à insulina favorece a protedise nos miócitos, contribuindo para perda de massa muscular e redução da capacidade fisica e metabólica do músculo esquelético, mesmo em situações nas quais o individuo diabético recebe insulina exógena de forma regular, contribuindo para a manutenção da hiperglicemia crónica. Lembrando que a insulina exógena isolada não é suficiente para estimular a sintose proteica muscular no estado pós-absortivo, sendo necessária a ingestão de proteinas para o estimulo. Nessa perspectiva, há crescente interesse em buscar estratógicas terapôuticas como abemativas para o controle da perda de massa magra que está associada à diminuição da capacidade motora muscular, sensibilidade à insulna e intolerância a glicose no DM. Destacam-se assim, o papel da laucina concomitantemente com o treinamento de l'orça como importantes reguladores da biossintese de proteinas. A laucina juntamente com o treinamento de l'orça são potentes ativadores do mTCR, o qual está envolvido no aumento da taxa de tradução de RNAm durante a sintese de proteinas musculares, independentemente da presença da insulna. É digno ressaltar que a suplementação aliada ao treinamento de l'orça mostrou eficicia na promoção do remodelamento miscular em algumas condições de catabolismo e perda muscular. Considerando, portanto, a perda da massa muscular e consequentemente diminuição da capacidade motora funcional muscular em individuos diabéticos, bem como a ação positiva da laucina e o treinamento de força, toma se assim relevante investigar os efeitos dessas duas intervenções, o que podem ser úteis para o desenvolvimento de estratógias para auxiliar no tratamento do diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. Situação: Concluido: Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) Doutorado: (2)

Integrantes: Carlos Eduardo Carvalho Martins - Integrante / Vanessa Batista de Sousa Lima - Integrante / Julio Tirapegui - Coordenador / RIBERO, HQT - Integrante.

2011 - 2012 Efeitos da suplementação de proteina do sero do leite no treinamento com pases sobre a composição corporal.

Descrição: Independente de idade ou gênero, individuos graticantes de exercícios de força têm buscado, com o consumo de determinados suplementos dietáticos como a proteina isolada do soro do leite (Whey protein), estratógias que favoreçam o alcance de resultados satisfatórios quanto à imagem corporal. O objetivo deste estudo foi revisar bibliograficamente, por meio de pesquisas em acervos literários, os efeitos da sublementação de proteina isolada do soro do leite aliada ao treinamento de forca sobre a composição composi. O treinamento de forca favorece a hiportrofia musicular e a secreção de hormónios anabólicos, requerendo maior ingestão de proteínas na dieta. Concomitantemente, sabe-se que a proteína do soro do leite é uma molécula com grande biodisponibilidade, fornecendo nutrientes favoráveis à construção do músculo e à redução da gordura corporal, estimulando diretamente a síntese proteíca no músculo esquelático. Conclui-se que a suplementação da proteína do sero do leite aliado ao treinamento de força se mostra eficaz nos aspectos referentes à hipertrofia e à redução da gordura corporal, sendo uma estratógia satisfatória resses quesitos. Logo, se faz necessário aos profissionais nutricionistas o conhecimento desses mecanismos para major esclarecimento quanto ao seu consumo. Situação: Concluido; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Carlos Eduardo Carvalho Martins - Integrante / Lucas Carminatti Pantaleão - Coordenador / Thiago Antônio Salla - Integrante.

2010 - 2010 Consumo de suplementos dietáticos entre praticantes de exercícios físicos em uma academia de Manaus. AM.

Descrição: O projeto teve como principal objetivo avaliar o consumo de suplementos dietáticos entre praticantes de exercícios físicos em uma academia de Manaus, AM. Foram entrevistados 33 praticantes de exercicios físicos de ambos os sexos com idade superior a 18 anos, qui praticavam 45 minutos ou mais de exercícios físicos, pelo menos três vezes por semana. Foi utilizado um questionário com perguntas objeos com idade superior a 18 aros, que e sócio demográficas, auto-administrado e elaborado para este estudo. Os sujeitos da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Findo isso, os questionários submeteram-se a análise de dados, resultando em construção de tabelas e gráficos. Entre os entrevistados 60,6% consomem suplementos e desses, 75% eram homens e 25% eram mulheros, com idade móda de 25,8 anos. 75% disseram utilizar pelo menos um tipo de suplemento, dentre eles 49% dos usuários possuárm o ensino médio. O suplemento mais consumido foi o suplemento protico 39%; 59% referiram fazer uso diariamente. 49% relataram usar pelo motivo de aumentar a energia e performance atlética e apenas 5%, ou seja, apenas 1 relatou utilizar para corrigir deficiência da alimentação; 39% dos entrevistados consumiam estes produtos por auto indicação. Observou-se que a utilização de suplementos detéticos é feita sem orientação adequada. Ressalta-se que é considerável o número de usuários, portanto se faz necessário a atuação de nutricionistas nas academias para que haja uma melhor orientação. no consumo destes produtos.

Situação: Concluido; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (3) .

Integrantes: Carlos Eduardo Carvalho Martins - Integrante / Mateus Rossato - Coordenador / Enica Nascimento - Integrante / Josefa Pinto -

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar po	r	
Ordern 0	Cronológica	•

1. 🗪 DO AMARAL, RAFAEL BRUNO ; MARTINS, CARLOS EDUARDO CARVALHO ; LANCHA JUNIOR, ANTONIO HERBERT ; PAINELLI, VITOR DE SALLES . A suplementação de laucina pode atenuar a atrofia muscular? Uma revisão da literatura. Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano (Impresso), v. 17, p. 496,

Textos em jornais de notícias/revistas

- MARTINS, C.E.C.. O que é que tem na lancheira do neném?. Revista Suplementação, São Paulo.
- 2. MARTINS, C.E.C.. O super selâniot. Revista Suplementação, São Paulo.
- 3. MARTINS, C.E.C.. Desacoplar para gastar mais energia e viver mais. Revista Suplementação, São Paulo.
- 4. MARTENS, C.E.C.. Beta-alarina ou bicarbonato de sódio para melhora da performance em exercícios de alta intensidade?. Revista Suplementação, São Paulo.
- 5. MARTINS, C.E.C.. Pea protein proteina da ervilha. Revista Suplementação, São Paulo.
- 6. MARTINS, C.E.C.. "Comer de tudo, mas com moderação": verdade ou mito?. Revista Suplementação, São Paulo.
- 7. MARTINS, C.E.C.; LIMA, V. B. S. . Sucoterapia. Pense leve, Higienópolis São Paulo.
- 8. MARTINS, C.E.C.. Banana para fortalecer a imunidade. Revista Pense leve, Higienópolis São Paulo.
- 9. MARTENS, C.E.C.. Baixa testesterona e risco cardiovascular. Musculação & Fitness, São Paulo.
- MARTINS, C.E.C.. Suplementos dietéticos na alimentação e nutrição de crianças. Musculação & Fitness, São Paulo.
- 11. MARTINS, C.E.C.. Suco de beterraba como suplemento?. Revista Suplementação, São Paulo.

Resumos publicados em anais de congressos

- RIBEIRO, H. Q. T.; MARTINS, C.E.C.; LIMA, V. B. S.; TIRAPBOUI, 1. Can resistance training and supplementation with leucine attenuate the loss of strength in diabetic rats?. In: European College of Sports Science, 2015, Malmo. Can resistance training and supplementation with leucine attenuate the loss of strength in diabetic rats?, 2015.
- MARTENS, C.E.C.; LIMA, V. B. S.; RIBEIRO, HQT; TIRAPEGUI, 1. Leucine did not enhance resistance training-induced improvements in motor performance in diabetic rats. In: XVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 2015, Punta Cana. XVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), 2015.

Apresentações de Trabalho

1. MARTINS, C.E.C.. Almentação saudável nas escolas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Outras produções bibliográficas

1. MARTINS, C.E.C.. Ghrelin in health and disease. São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014 (Resenha).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

- 1. What to expect from genetic testing in sports?, 2015. (Seminário).
- 2. Percutaneous Needle Muscle Biopsy Theoretical Basis, Clinical and Research Applications, 2014. (Seminário).
- 3. Lactic Acid Bacteria, Dairy Proteins and Dairy Products: Structure-Function Relationships and Different Uses. 2013. (Seminário).
- 4. XII Simpósio de Biossegurança e Descartos de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Posquisa, 2013. (Simpósio).
- 5. 3º Sports Nutrition Convention. 2012. (Encontro).
- 6. 6º Congresso Paulista de Nutrição. 2011. (Congresso).
- 7. III Congresso Paulista de Nutrição Esportiva. 2011. (Congresso)
- 8. Fórum Internacional SESI-SP de Nutrição Esportiva. 2011. (Encontro).
- 9. Il Mesting Probiótica de Nutrição e Suplementação Nutricional. 2011. (Encontro).
- 10. I Workshop: Nutrição Esportiva nas Diferentes Modalidades. 2011. (Encontro).
- 11. Nutricao Esportiva e Suplementação, 2010, (Congresso),

- 12. Nutrição Esportiva 2: Atualizações em Relação ao uso de Recursos Ergogânicos para o Desempenho no Esporte. 2010. (Congresso).
- Nutrição Esportiva 1: Avaliação do Gasto Energêtico e da Composição Corporal: Existe um Protocolo Ideal?. 2010. (Congresso).
- 14. Diferenças Nutricionais na Dieta de Atletas e Esportistas. 2010. (Seminário).
- 15. Ergogênicos e Atividade Física, 2010. (Seminário).
- 16. Controle dos Portos Críticos na Produção de Alimentos. 2009. (Seminário).
- 17. 5º Módulo de Curso de Capacitação Técnica em Musculação, 2009. (Saminário).
- 18. Nutrição Funcional e Qualidade de Vida. 2009. (Simpósio).
- 19. Treinamento de Vinhos. 2009. (Encontro).
- 20. Projeto de Estensão Nutri Vida no Lar São Vicente de Paula, 2009. (Encontro).
- 21. Integração Metabólica, 2008. (Seminário).
- 22. Nutrição e Atividade Fisica. 2008. (Seminário).
- 23. Interação Droga Nutriente. 2008. (Seminário).
- 24. Nutrição Saudável e Ciclos da Vida. 2008. (Simpósio).
- 25. D. Simpósio LUNSC Nutrição Esportiva e suas Vertentes. 2008. (Simpósio).