UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Area de Nutrição Experimental

Efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos envelhecidos

Daiana Vianna

Dissertação para obternção do grau de MESTRE.

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Area de Nutrição Experimental

Efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos envelhecidos

Daiana Vianna

Dissertação para obternção do grau de MESTRE.

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2009

Daiana Vianna

Efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos envelhecidos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico aos meus pais, irmãos, namorado – meus grandes amigos, companheiros e incentivadores, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado de uma longa caminhada, da qual muitas pessoas fizeram parte. Agradecer pode não ser tarefa fácil, nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Agradeço, primeiramente, a Deus, por tornar tudo isso possível e por me mostrar, através de coisas simples, o seu amor e cuidado para comigo.

À minha mãe, Marli Vianna (em memória) que é meu exemplo de vida – pessso íntegra e amorosa. Sei que você está comigo em todos os meus passos e sinto que em breve estaremos juntas novamente. Te amo!

À minha família, agradeço pelo amor, educação, incentivo, cuidado e paciência. Pai, obrigada por todo carinho, pelas opiniões e pela lição de vida. Soraya, obrigada por fazer parte da nossa família e por me presentear com mais dois irmãos. Aos meus irmãos, Márcio Vianna, Dominique Vicente Vianna e Ciro Clemente Vicente Vianna, obrigada por existirem na minha vida e por torná-la mais linda: amo incondicionalmente vocês.

À minha segunda família, a família Machado, por todo amor, carinho, paciência, apoio e por vibrarem junto comigo a cada conquista. Silvia e Édna, obrigada por tudo. Sem vocês eu nunca teria chegado aqui. Amo muito vocês!

Ao meu companheiro, Giovani Amianti, por me ajudar SEMPRE. Por estar ao meu lado em todos os momentos me apoiando e incentivando. Realmente não dá pra descrever aqui o quanto eu sou grata por tudo o que você tem feito por mim. Sua presença na minha vida se tornou algo indispensável. Amo você!

Ao Professor Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, meu orientador, por confiar em mim, me incentivar com conselhos profissionais e pessoais. Por ajudar no meu

crescimento profissional e pessoal. Também sou grata pelo seu exemplo como pesquisador e pela dedicação. Meu muito obrigada.

Ao amigo José Donato Junior, pela consideração, pela dedicação e pelas discussões que foram essenciais para a conclusão dessa jornada. Espero trabalhar mais vezes com você. Muito obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório, Gaby, Léo, Lucas, Michele, Taty, Emídio, Maris, Ivanir, Camila, Sílvia, Carol, Éder, Vinícius e Aline. Obrigada por toda a ajuda. Vocês fazem do laboratório de bioquímica da nutrição minha segunda casa.

À Gaby, ao Léo e ao Lucas por toda a ajuda no decorrer deste trabalho, com certeza sem vocês eu não iria chegar até aqui. E obrigada principalmente por fazerem parte da minha vida, muito mais do que amigos, como irmãos e companheiros. Espero que possamos trabalhar mais vezes juntos. Seria uma honra tê-los como companheiros de trabalho. “É nois fosforilando...”

A todos os meus amigos, pelo incentivo e pelos bons momentos que tornaram essa caminhada um pouco mais tranquila.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Ao pessoal da secretaria do departamento, Cleo, Edilson e Mônica, e da secretaria de pós-graduação, Jorge e Elaine, pelo auxílio que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa concedido – processo 07/56230-3.

À AJINOMOTO, principalmente ao Sr. Mauro Saito, pela doação dos aminoácidos, que foi de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

VIANNA, D. **Efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros metabólicos de ratos envelhecidos.** São Paulo, 2009. [defesa de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

Diversos estudos demonstraram que a administração aguda de leucina é capaz de atenuar a perda de massa muscular que ocorre no envelhecimento. Contudo, poucos estudos verificaram o efeito crônico dessa suplementação na composição corporal e em parâmetros metabólicos. O presente estudo analisou o efeito da suplementação com leucina durante 40 semanas na composição corporal e nos parâmetros bioquímicos e teciduais de ratos envelhecidos. Para isso, foram utilizados 40 animais Sprague-Dawley, com 6 meses de idade, os quais foram distribuídos em três grupos experimentais. Grupo adulto (n=10), ratos eutanaziados no início do experimento; Grupo Controle, recebeu ração contendo uma mistura de aminoácidos não essenciais por 40 semanas, e Grupo Leucina, recebeu ração contendo 4% de leucina por 40 semanas. Durante o experimento foi avaliado o consumo alimentar e o peso corporal. Após as 40 semanas de experimento os animais foram eutanaziados com intervalo de 5 horas de jejum (período pós-prandial) para coleta de soro sanguíneo e tecidos. Avaliaram-se: a composição química da carcaça; a massa de órgãos e dos músculos gastrocnêmio e sóleo; as concentrações de proteína e RNA no fígado e no músculo gastrocnêmio; o aminograma sanguíneo; as concentrações séricas de IGF-1, insulina, proteínas totais, albumina, glicose e perfil lipídico. Em relação ao peso corporal, o grupo leucina apresentou menor massa corporal, quando comparado ao grupo controle ($p<0,005$). No entanto, não houve diferença entre o grupo leucina e o controle em relação ao consumo alimentar. Ambos os grupos de animais envelhecidos apresentaram aumento da gordura corporal em comparação aos animais adultos, porém o grupo leucina apresentou menor conteúdo de gordura corporal (somatória dos depósitos de gorduras e porcentagem de gordura total) do que o grupo controle. Os animais envelhecidos dos grupos leucina e controle apresentaram maiores concentrações de glicose, triglicérides, colesterol, HDL, LDL, VLDL e insulina quando comparados ao grupo adulto. Os resultados obtidos permitem sugerir que a suplementação crônica com leucina não atenua a perda de massa muscular que ocorre durante o envelhecimento, porém é eficaz em reduzir a gordura corporal de ratos. Entretanto, essa redução de gordura não foi acompanhada de melhora em parâmetros indicativos da homeostase glicêmica e lipídica.

Palavras-chave: Leucina. Envelhecimento. Composição Corporal. Gordura corporal.

ABSTRACT

VIANNA, D. **Effects of chronic leucine supplementation on body composition and metabolic parameters in aged rats.** São Paulo, 2009. [Master´s degree dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo].

Several studies have demonstrated that acute administration of leucine is able to attenuate muscle mass loss which occurs during aging. However, few studies have assessed the chronic effects of this supplementation on the body composition and metabolic parameters. The present study analyzed the effect of leucine supplementation during 40 weeks on body composition, biochemical and tissue parameters in aged rats. For that, 40 Sprague-Dawley rats, 6 months old, were distributed into three experimental groups. In the Adult Group (n=10) rats were sacrificed at the beginning of the experiment; the Control Group received a diet containing a mix of non-essential amino acids during 40 weeks, and the Leucine Group received a diet containing 4% leucine during 40 weeks. Food consumption and body weight were evaluated during the experiment. After 40 weeks of experiment, the animals were sacrificed after a 5-hour fast (post-prandial period) for serum and tissue sampling. The following parameters were evaluated: carcass chemical composition; mass of organs and gastrocnemius and soleus muscles; concentration of protein and RNA in the liver and in the gastrocnemius muscle; blood profile of amino acids; serum concentrations of IGF-1, insulin, total proteins, albumin, glucose and lipid profile. Concerning body weight, the leucine group showed a lower body when compared to control group ($p<0,005$). There was no difference between the leucine group and the control group concerning food consumption. Both groups of aged animals showed increased body fat compared to adult animals, but the leucine group showed a lower body fat content (sum of fat depositions and percent of total fat) than the control group. Both in the leucine and the control groups showed higher concentrations of glucose, triglycerides, cholesterol, HDL, LDL, VLDL, and insulin compared to the adult group. The results obtained in this work allow us suggest that chronic leucine supplementation did not attenuate the loss of muscle mass that occurs during aging, but it is effective in reducing body fat in rats. However, this reduction of fat was not accompanied by improvement in parameters indicative of glucose homeostasis and serum lipid profile.

Keywords: Leucine. Aging. Body Composition. Body fat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das modificações que ocorrem nos compartimentos da composição corporal durante o processo de envelhecimento. ■ Gordura. ■ outros compartimentos. ■ massa muscular. Adaptado de Dardevet *et al.* (2003).....16
Figura 2: Desenho experimental 31
Figura 3: Representação esquemática da determinação do aminograma. 42
Figura 4: Curva de evolução do peso corpóreo dos ratos dos grupos Controle e Leucina durante 10 meses consecutivos.....51
Figura 5: Consumo de rações dos ratos dos grupos controle e leucina durante 10 meses consecutivos. 52
Figura 6: Peso dos depósitos de gordura visceral epididimal, retroperitoneal e a soma dos dois depósitos dos grupos experimentais. 54
Figura 7: Composição química da carcaça em termos percentuais dos grupos experimentais. 55
Figura 8: Concentração de proteína no músculo.....59
Figura 9: Concentração de RNA no músculo. 60
Figura 10: Concentração de proteína no fígado. 61
Figura 11: Concentração de RNA no Fígado. 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações utilizadas no experimento (AIN-93M Modificada) (REEVES et al., 1993).....32
Tabela 2: Porcentagens (%) de aminoácidos nas rações oferecidas. 33
Tabela 3: Composição centesimal das rações oferecidas aos animais dos grupos controle e leucina. 50
Tabela 4: Média do consumo diário da ração e peso corporal durante o experimento. 52
Tabela 5: Peso dos tecidos e órgãos dos grupos experimentais (g/100g de peso)..53
Tabela 6: Parâmetros séricos dos grupos experimentais. 56
Tabela 7: Concentrações de aminoácidos sanguíneos dos grupos experimentais (mg/100g). 58

LISTA DE SIGLAS

ACR	Aminoácido de cadeia ramificada
ATACR	Aminotransferases de aminoácidos de cadeia ramificada
CEEA	Comissão de experimentação animal
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
GH	Hormônio do crescimento
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	Índice de resistência à insulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IQ	Instituto de Química
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mTOR	Alvo da rampamicina em mamíferos
RNA	Ácido ribonucléico
UCP-3	Proteína desacopladora 3
ULDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS **5**

RESUMO **8**

ABSTRACT **9**

LISTA DE FIGURAS **10**

LISTA DE TABELAS **11**

LISTA DE SIGLAS **12**

SUMÁRIO **13**

1 INTRODUÇÃO **15**

2 JUSTIFICATIVA **27**

3 OBJETIVOS **29**

3.1 OBJETIVO GERAL **29**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **29**

4 MATERIAL E MÉTODOS **30**

4.1 ANIMAIS **30**

4.1.1 Grupos e desenho experimentais 30

4.1.2 Ração 31

4.1.3 Manipulação dos animais e determinação do peso corporal e consumo de ração 33

4.1.4 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos 34

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL **35**

4.2.1 Umidade 35

4.2.2 Lipídeo 36

4.2.3 Proteína e massa magra 36

4.3 PARÂMETROS SÉRICOS **39**

4.3.1 Colesterol total 39

4.3.2 Colesterol HDL, VLDL e LDL 40

4.3.3 Triacilglicerol 40

4.3.4 Aminograma 41

4.3.5 Glicose 42
4.3.6 Insulina 43
4.3.7 Índice de resistência à insulina (HOMA) 44
4.3.8 Albumina 44
4.3.9 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF 1) 44
4.3.10 Proteína total sérica 47
4.4 PARÂMETROS TECIDUAIS 47
4.4.1 Extração de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio e fígado . 47
4.4.2 Determinação da concentração de proteína no músculo gastrocnêmio e fígado 48
4.4.3 Determinação da concentração de RNA total no músculo gastrocnêmio e fígado 48
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 49
5 RESULTADOS 50
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS RAÇÕES 50
5.2 PESO CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO 50
5.3 MASSA DE TECIDOS E ÓRGÃOS 52
5.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARCAÇA 53
5.5 PARÂMETROS SÉRICOS 55
5.6 AMINOGRAMA SANGUÍNEO 57
5.7 PARÂMETRO TECIDUAL 59
5.7.1 Proteínas e RNA totais no músculo 59
5.7.2 Proteínas e RNA totais no fígado 60
6 DISCUSSÃO 63
7 CONCLUSÕES 72
8 REFERÊNCIAS 73
9 ANEXOS 86
ANEXO 1. INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOUTORADO. 87
ANEXO 2. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA). 89

1 INTRODUÇÃO

A transição demográfica ocorrida no último século converge para aumento do número de idosos em todo o mundo, inclusive no Brasil, uma vez que a taxa de aumento da população caiu de 3% (entre 1950 e 1960) para 1% no ano de 2008 e poderá chegar a um valor negativo em 2050 (IBGE, 2008), quando os idosos na faixa dos 65 anos representarão cerca de 23% do total de habitantes do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Com esse aumento da população idosa, cresce a preocupação com os problemas associados à saúde, já que com o avançar da idade aumenta a incidência de doenças em decorrência das alterações fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento. Com isso, há diminuição da qualidade de vida, acarretando o aumento das dificuldades enfrentadas pelos idosos, principalmente levando à maior gasto financeiro com a saúde (WICK *et al.*, 2000). Dessa forma, o estudo das alterações fisiológicas e a identificação de estratégias que possam minimizar ou até mesmo reverter estas alterações são de grande importância para o idoso e para a população em geral.

O envelhecimento manifesta-se pelo declínio das funções dos diversos órgãos que, caracteristicamente, tende a ser linear em função do tempo, não se conseguindo definir um ponto exato de transição, como nas demais fases de crescimento. O envelhecimento tem início relativamente precoce, ao final da segunda década da vida, perdurando por longo tempo, de forma pouco perceptível, até que surjam, no final da terceira década, as primeiras alterações funcionais e/ou estruturais atribuídas a esta fase (PAPALÉO NETTO, 1999).

Já é definido na literatura que o corpo humano pode ser quimicamente separado em dois grupos de massas teciduais: a massa gorda (gordura corporal) e a massa magra (livre de gordura). A massa magra é constituída por proteínas, água intra e extracelular e conteúdo mineral ósseo, e a massa gorda é constituída por gordura corporal (LOHMAN *et al.*, 1991). Durante o processo de envelhecimento ocorrem modificações na composição corporal, como redução do teor de água e declínio da massa muscular esquelética (Figura 1). Por outro lado, ocorre acúmulo

de gordura corporal, como pode ser observado na Figura 1, sendo que esse aumento da gordura corporal predomina na região intra-abdominal. Por sua vez, o acúmulo de gordura intra-abdominal, ou também chamada de visceral, está associado a diversos fatores de risco cardiovasculares (SILVA *et al*., 2006; RIBEIRO, DONATO e TIRAPEGUI, 2006; SHERLOCK e TOOGOOD, 2007).

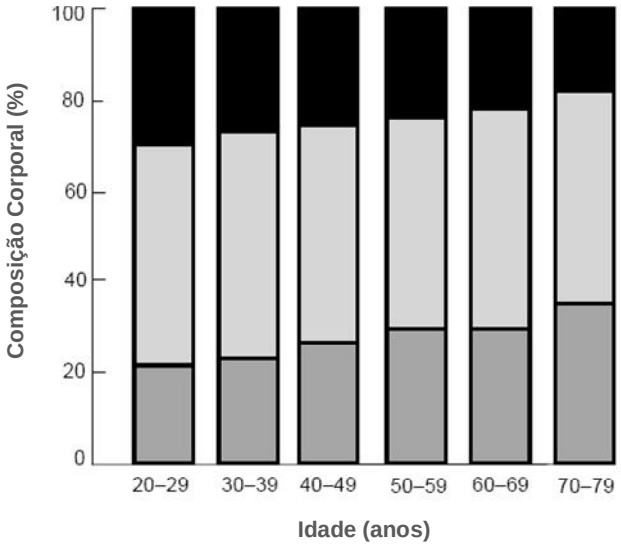

Figura 1: Representação esquemática das modificações que ocorrem nos compartimentos da composição corporal durante o processo de envelhecimento. ■ Gordura. ■ outros compartimentos. ■ massa muscular. Adaptado de Dardevet *et al.* (2003).

A obesidade é definida como um desequilíbrio entre o consumo de energia e seu gasto, cujo qual resulta em acúmulo de gordura corporal (WHO, 2000).

A prevalência de idosos obesos vem crescendo muito nos últimos anos. Nos Estados Unidos estima-se que 30% dos idosos são obesos (ZAMBONI *et al*., 2007). Já na população brasileira, 50,3% dos idosos possuem excesso de peso (Índice de Massa Corporal > 25kg/m²) e 13,5% são obesos (Índice de Massa Corporal > 30kg/m²) (Ministério da Saúde, 2007). Estimativas apontam que em 2010 39,6% da população mundial de idosos será classificada como obesa (ARTERBURN, CRANE e SULLIVAN, 2004). O ganho de peso que ocorre com o envelhecimento exerce

divergentes efeitos nos subcompartimentos da gordura corporal, como o aumento da gordura visceral abdominal e a diminuição da gordura subcutânea abdominal. Estas alterações trazem importantes consequências no perfil metabólico desses indivíduos (ZAMBONI *et al*., 2007).

Concomitante ao aumento da massa gorda, estima-se que a partir dos 40 anos ocorra perda de 5% de massa muscular a cada década, com declínio mais rápido após os 65 anos, particularmente nos membros inferiores. As mulheres apresentam ainda maior declínio muscular do que os homens (ROUBENOFF e HUGHES, 2000). Essa perda não resulta em queda ponderal em função do concomitante acúmulo de gordura corporal (EVANS, 1995; PROCTOR *et al*., 1998).

O envelhecimento também promove o desequilíbrio nas taxas de síntese e degradação de proteínas (tunorver protéico), o qual favorece redução de proteína corporal total e declínio da massa muscular esquelética. A proteína, excluindo a água, é o maior componente do músculo esquelético, representando 20% do peso total. Sendo assim, o avanço da idade está relacionado com a redução da capacidade do músculo esquelético de sintetizar novas proteínas (PROCTOR *et al*., 1998).

O turnover protéico não é somente crítico por manter a integridade estrutural e as concentrações de proteínas, como a miosina e actina, mas também é necessário para a manutenção de outras funções musculares, como síntese de enzimas. A redução de enzimas ativas no idoso pode ser explicada também pela redução da síntese protéica mitocondrial, favorecendo o aumento de mutações no DNA mitocondrial (BALAGOPAL, PROCTOR e NAIR, 1997).

Outra alteração relacionada ao processo de envelhecimento pode ser notada na estrutura muscular esquelética, cujas fibras do tipo II b (glicolíticas) e do tipo II a (oxido-glicolíticas) são diminuídas. Entretanto, a quantidade das fibras tipo I (oxidativas) não sofre alteração. Esses acontecimentos são acompanhados por perda de massa muscular esquelética e de força, também denominada sarcopenia (CARLSON, 1995).

No processo de envelhecimento ocorre, ainda, diminuição dos níveis de hormônios anabólicos que contribuem com as mudanças na composição corporal,

por estarem relacionados com desordens metabólicas. Sendo o hormônio do crescimento (GH) o mais afetado (ROUBENOFF e CASTANEDA, 2001).

Recentes pesquisas sugeriram que a secreção do GH cessa na sétima década de vida. A redução deste hormônio está relacionada com o aumento do volume de adipócito e a diminuição do desempenho físico e dos níveis de testosterona (SHERLOCK e TOOGOOD, 2007).

Cabe ressaltar que também há diminuição da produção dos hormônios sexuais (andrógenos e estrógenos) que afetam a composição corporal, principalmente na redução da massa muscular esquelética, por influenciar a síntese protéica (MARCUS, 1996; ROUBENOFF e CASTANEDA, 2001).

Ou seja: o envelhecimento está relacionado com mudanças na composição corporal, incluindo o aumento da gordura corporal, prevalecendo a obesidade e da redução da massa muscular e força, sendo definida recentemente como obesidade sarcopênica (ROUBENOFF, 2004).

Diante disso, vários autores tem sua teoria para definir obesidade sarcopênica. Villareal *et al*. (2004) definiram a obesidade sarcopênica como sendo a qualidade do músculo e a infiltração de gordura no mesmo. Ambos, o envelhecimento e a obesidade, estão envolvidos com a progressiva deterioração da qualidade muscular. Em sua pesquisa comparando 52 idosos obesos com 52 idosos não-obesos, os autores observaram que os sujeitos obesos possuíam maior peso absoluto de massa muscular, quando comparados com o outro grupo experimental. Além disso, esses idosos obesos apresentaram redução do estado funcional, da capacidade aeróbica e da força muscular e aumento na infiltração de gordura intramuscular. Esses achados são interessantes, pois mostram que, apesar do maior peso da massa muscular, os idosos obesos tem menor qualidade de músculo, expressa pela taxa entre força muscular e capacidade funcional.

Diante destas evidências é recomendado que idosos se submetam a algum tratamento para atenuar o declínio da massa muscular e o incremento de gordura corporal, a fim de reduzir as chances de mortalidade e controlar as doenças relacionadas à obesidade sarcopênica. Nesse sentindo, várias intervenções

terapêuticas são propostas, como a reposição de esteróides sexuais e do GH, a prática de exercício físico e a suplementação alimentar.

Quanto ao GH, sua propriedade anabólica tem sido sugerida por manipular o eixo GH/IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), sendo uma possível opção terapêutica para o tratamento de muitas mudanças que ocorrem com o envelhecimento. Estudos em populações idosas que usaram GH encontraram efeitos positivos na composição corporal, na força muscular, na densidade mineral óssea e no desempenho físico (SHERLOCK e TOOGOOD, 2007).

Um estudo conduzido por Rudman *et al*. (1990) analisou o efeito da suplementação com GH em homens com idade entre 60 e 81 anos. Neste estudo foram notadas várias mudanças no grupo tratado com GH, dentre as quais o aumento do IGF-1, de massa magra (8,8%) e da densidade mineral óssea (1,6%) e a diminuição de gordura corporal total (14,4%), quando comparado com o grupo não tratado.

Nesse contexto, Marcus *et al*. (1990) avaliaram o efeito da suplementação com GH em idosos (60 anos) durante 7 dias. Nesta pesquisa observou-se menor excreção urinária de nitrogênio e sódio, sugerindo aumento do anabolismo protéico. Essas mudanças anabólicas também foram verificadas em outro estudo com protocolo experimental semelhante, mas com duração de 4 semanas (THOMPSON *et al*., 1995).

Outros dois estudos usando a terapia com GH combinado com exercício mostraram aumento na proporção de fibras tipo II, o que levou os autores a concluir que o tratamento durante 3 meses com GH, combinado com o exercício físico, não altera a degradação e a síntese proteica muscular (turnover) (TAAFFE *et al*., 1996; HENNESSEY *et al*., 2001).

Apesar de existirem várias evidências positivas do uso de GH, também há reações adversas relacionadas ao hormônio, como aparecimento de câncer de colon e de próstata, além de outras doenças (SHERLOCK e TOOGOOD, 2007).

Com relação à testosterona, existem evidências indicando que a administração deste hormônio aumenta a massa muscular e a força em idosos com deficiência na produção de andrógenos (BROSS, JAVANBAKHT e BHASIN, 1999).

Tenover (1992) tratou homens idosos com 100mg de testosterona durante 12 semanas e constatou aumento na massa magra de 1,8kg quando comparado com o grupo controle. Em outro estudo semelhante, foram administrados 200mg de testosterona e houve discreto aumento da força; no entanto, não houve mudanças na composição corporal (HADDAD *et al.*, 1994).

Recentemente, Page *et al.* (2005) avaliaram o efeito da suplementação crônica com testosterona em homens idosos (65 anos) durante 36 meses. Os autores encontraram aumento da massa magra, da força e do desempenho físico e diminuição da gordura corporal e das concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e leptina.

Embora vários estudos mostrem efeito positivo do uso de testosterona, existem diversos estudos indicando os efeitos adversos da administração prolongada deste hormônio. Entre estes efeitos indesejáveis destacam-se: irritação da pele, edema, agregação plaquetária, policitemia, anormalidades funcionais no fígado, podendo favorecer o desenvolvimento de câncer hepático, câncer de próstata, além de ser fator de risco para o desenvolvimento de doenças coronarianas (JORDAN *et al.*, 1998; KAUFMAN, 2003; GOOREN e BUNCK, 2004; WALD *et al.*, 2006). A estratégia de reposição hormonal, quando utilizada por longos períodos, pode ocasionar reações adversas como: morte súbita, aumento do hematócrito, ginecomastia, desenvolvimento de câncer e alteração do perfil lipídico e glicêmico (SILVA *et al.*, 2006).

Sendo assim, uma das estratégias mais indicadas para retardar a perda de massa muscular e da força, além de diminuir a gordura corporal total, é o exercício físico. O treinamento de força é indicado neste contexto por alterar a composição corporal em idosos (ZHONG, CHEN e THOMPSON, 2007).

Em um estudo conduzido por Yaresheski *et al.* (1995) foi constatado que o treinamento resistido em homens idosos (65-75 anos) aumentou a síntese proteica muscular (~50%) e a força muscular depois de 16 semanas de treino. Outro estudo verificou aumento da taxa de síntese protéica no músculo vasto lateral de homens e mulheres entre 72 e 92 anos, depois de 3 meses de treinamento resistido (Yaresheski *et al.*, 1999).

Assim, esta estratégia é considerada eficiente para atenuar ou reverter a obesidade sarcopênica. Estudos com treinamento em curto prazo, 10 a 12 semanas, treinando duas ou três vezes na semana, indicaram ganho de força em mulheres e homens idosos, sendo que este aumento também foi verificado em idosos com 90 anos ou mais (McCARTNEY *et al*., 1996; VANDERVOOT, 2002; DOHERTY, 2003; TAAFFE, 2006; ZHONG, CHEN e THOMPSON, 2007).

Embora a prática do treinamento físico ainda seja a intervenção mais usualmente indicada para aumentar a massa e a força muscular e reduzir a gordura corporal em idosos, em alguns momentos a realização de treinamento torna-se um obstáculo, em função da dificuldade motora que muitos idosos apresentam.

Desse modo, a suplementação alimentar pode representar uma forma de manutenção da massa muscular, de redução da gordura corporal, sendo uma maneira de reduzir a chance de desenvolvimento da obesidade sarcopênica na população idosa (SILVA *et al*., 2006). A justificativa para o uso de um suplemento nutricional para atenuar ou impedir a perda de massa muscular, além de reduzir a gordura corporal ocasionada pela obesidade sarcopênica, baseia-se na suposição de que o suplemento alimentar estimula a síntese proteica em diversos tecidos – por ativar vias de sinalização responsáveis pela síntese protéica (PADDON-JONES e RAUSMUSSEN, 2009).

Aproximadamente de 15% a 38% dos homens e de 27% a 41% das mulheres idosas tem o consumo de proteínas abaixo do estipulado pela *Recommended Dietary Allowance* (RDA), que é de 0,8g/kg por dia – e representa a necessidade mínima da população idosa. Ressaltando que o aumento moderado do consumo de proteína pode favorecer o anabolismo proteico muscular e reduzir a perda de massa muscular que ocorre no envelhecimento (CAMPBELL *et al*., 2001; CAMPBELL *et al*., 2002; PADDON-JONES *et al*., 2008; PADDON-JONES e RASMUSSEN, 2009).

Nessa perspectiva, com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos pelos quais o exercício físico e a alimentação adequada favorecem a preservação da massa magra, Campbell *et al*. (2002) avaliaram a composição corporal de homens e mulheres entre 54 e 74 anos durante 14 semanas de treinamento resistido e dieta adequada em proteína segundo a RDA (0,8g/kg/d). Os autores verificaram

que a ingestão de proteína seguindo a indicação da RDA, associada à prática de exercício (treinamento resistido), não é capaz de promover a hipertrofia muscular, o que sugere a reavaliação da quantidade recomendada de proteínas para idosos que praticam atividade física.

Estudos com humanos e ratos idosos constataram decréscimo no estímulo da síntese proteica muscular, após o consumo de refeição normoprotéica (0,8g/kg/d). A origem desta alteração permanece obscura, uma vez que esta síntese responde normalmente quando grande quantidade de aminoácidos é fornecida a animais e humanos (DARDEVET *et al*., 2002; RIEU *et al*., 2003).

Nesse sentido, Katsanos *et al*. (2006) demonstraram que o consumo de pequenas quantidades de aminoácidos essenciais (7g) foi insuficiente para estimular a síntese proteica em sujeitos adultos e idosos; entretanto, quando a quantidade destes aminoácidos foi dobrada, a síntese proteica ocorreu normalmente.

Recentemente, Houston *et al*. (2008) constataram que o aumento do consumo de proteína (0,9g/kg/d) por idosos diminuiu o declínio muscular, favorecendo modificações na composição corporal. Existem evidências de que as dietas com maior proporção de proteínas e menor de carboidrato promovem maior perda de peso, por reduzir a gordura corporal e atenuar o declínio da massa magra, quando comparada às dietas convencionais (LAYMAN *et al*., 2003; 2005).

O uso de dietas hiperproteícas é benéfica para o tratamento ou a redução do risco de desenvolver obesidade, osteoporose, diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólica, doenças coronarianas e sarcopenia (LAYMAN, 2009). Nessa perspectiva, alguns estudos mostraram que o consumo de dietas contendo 1,5g/Kg/d de proteína e carboidrato menor que 150g/d favoreceu a perda de peso e de gordura corporal, atenuou o declínio da massa magra e promoveu o controle glicêmico, além de ter reduzido os triacilgliceróis séricos (FOSTER *et al*., 2003; LAYMAN *et al*., 2005).

A manutenção da proteína corporal é crítica não somente para conservar a independência física, mas também para a sobrevivência. A perda de aproximadamente 30% da proteína corporal resulta em implicações respiratórias e circulatórias devido à fraqueza muscular, à redução da função imune e ao

inadequado efeito da barreira do epitélio, que eventualmente resultarão em morte (TIMMERMAN e VOLPI, 2008).

Desde 1960, vem sendo estudado o papel de dietas ricas em proteínas na composição corporal (FELIG, MARLISS e CAHILL, 1969). Alguns dos benefícios dessas dietas com alto teor protéico são devido à presença dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), que são constituídos por leucina, valina e isoleucina, que controlam o peso corporal, atenuam o declínio da massa muscular e o ganho de gordura corporal (LAYMAN e WALKER, 2006; SHE *et al*., 2007).

Alguns aminoácidos e o hormônio insulina são capazes de estimular o anabolismo proteico, atuando em uma etapa posterior à transcrição gênica, ou seja, na tradução protéica. Contudo, o mecanismo pelo qual os aminoácidos estimulam a tradução protéica ainda não está totalmente esclarecido (PROUD, 2002). Dentre todos os aminoácidos, a leucina vem recebendo maior destaque por ser secretagogo da insulina e por ser o aminoácido mais eficaz em estimular a síntese protéica, reduzir a proteólise e, portanto, favorecer o balanço nitrogenado positivo. Esses efeitos acontecem pelo fato da leucina ativar a proteína alvo da rampamicina em mamíferos (mTOR), a qual ativa uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que culminam na fosforilação de proteínas envolvidas na etapa de tradução protéica (KIMBALL e JEFFERSON, 2006; DONATO *et al*., 2007; VIANNA, TEODORO e TIRAPEGUI, 2008).

Com base nessas informações, Anthony *et al*. (2000), com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos pelos quais a leucina estimula a síntese protéica, avaliaram a resposta da síntese protéica no músculo esquelético de animais que sofreram restrição alimentar por 18 horas e em animais que tiveram livre acesso à comida. Foi administrado por via oral leucina ou carboidrato ou leucina associada com carboidrato. Os autores verificaram que as administrações com leucina restauraram a síntese protéica de forma semelhante ao grupo sem restrição, em função da fosforilação de proteínas envolvidas na síntese protéica. Os resultados sugeriram que a leucina estimulou a síntese protéica no músculo esquelético, possivelmente por meio da ativação mediada por este aminoácido na via de sinalização da mTOR.

Outro estudo, conduzido pelos mesmos pesquisadores, demonstrou aumento significativo na taxa de síntese protéica nos músculos gastrocnêmio e sóleo de ratos diabéticos suplementados com grandes doses de leucina (1,35 g/kg) (ANTHONY *et al.*, 2002). Em um outro experimento utilizando a mesma dosagem em ratos submetidos à restrição alimentar, a síntese protéica também foi estimulada (Crozier *et al.*, 2005).

Recentemente, Norton *et al.* (2009) avaliaram o efeito de um complemento alimentar rico em leucina (*whey protein*) em estimular a síntese protéica. Para isso foram utilizados ratos machos que receberam, durante cinco dias, três refeições contendo 20% de *whey protein* (10,9% de leucina), 50% de carboidrato e 30% de gordura. Os resultados indicam que o complemento alimentar rico em leucina estimulou a síntese protéica muscular pós-prandial e isso se deve ao papel chave na leucina em estimular proteínas envolvidas no maquinário da síntese protéica.

Estudos em idosos demonstraram que o músculo envelhecido é menos responsivo ao efeito anabólico da concentração fisiológica de leucina. Todavia, o músculo envelhecido ainda é capaz de responder a estes efeitos quando o consumo deste aminoácido é aumentado (Dardevet *et al.*, 2002, COMBARET *et al.*, 2005).

Em um estudo conduzido por Dardevet *et al.* (2002) avaliou o efeito da suplementação com leucina na síntese muscular de ratos adultos (8 meses) e idosos (22 meses) após uma hora de ingestão da mesma. Os resultados indicaram que ocorreu síntese protéica muscular nos ratos idosos similarmente ao observado nos ratos adultos. Sendo assim, os autores concluíram que a suplementação aguda com leucina é suficiente para estimular a síntese protéica pós-prandial em ratos idosos.

Um estudo realizado por Rieu *et al.* (2006) apontou elevação significativa na taxa de síntese protéica muscular no período pós-prandial em idosos suplementados com leucina (0,052 g/ kg) quando comparados ao grupo controle (0,083 ± 0,008% versus 0,053 ± 0,009%, respectivamente, $P<0,05$). Outro estudo, conduzido pelo mesmo grupo de pesquisadores, demonstrou que proteínas ricas em leucina favoreceram a síntese protéica muscular em ratos envelhecidos (RIEU *et al.*, 2007).

Nesse contexto, Katsanos *et al.* (2006) verificaram o efeito de uma mistura com aminoácidos essenciais, acrescidos com 26% e 41% de leucina, na dieta, no

metabolismo das proteínas musculares em jovens (30 anos) e idosos (66 anos). Os resultados indicaram que a mistura de aminoácido essencial com leucina estimulou a síntese protéica e resultou em acréscimo de proteína muscular pós-prandial nos idosos. Por outro lado, nos jovens, não houve estímulo na síntese protéica.

Recentemente, Koopman *et al*. (2008) investigaram o efeito da suplementação de leucina fornecida juntamente com proteínas hidrolisadas e carboidrato após o exercício em homens idosos (75 anos). Os autores constataram que o consumo de leucina reduziu a oxidação de proteínas corporais e melhorou o balanço protéico, mas não aumentou a taxa de fração da síntese protéica muscular.

Além de a leucina favorecer a síntese protéica muscular, esta também regula o metabolismo de adipócitos (LYNCH *et al*., 2000; 2006; SHE *et al*., 2007; ZHANG *et al*., 2007).

No estudo realizado por Mourier *et al*. (1997), que avaliaram o efeito da suplementação crônica com ACR em lutadores submetidos a 19 dias de restrição calórica, foi observado que a restrição calórica, aliada à suplementação com ACR, foi mais efetiva na redução do peso e da gordura corporal, quando comparada à restrição calórica isolada. Porém, não foram observadas mudanças significativas na massa magra desses atletas.

Nesse contexto, em um estudo conduzido em nosso laboratório por Donato *et al*. (2006), avaliou-se o efeito da suplementação crônica de leucina sobre a composição corporal e os indicadores do estado nutricional protéico, em ratos submetidos à restrição alimentar de 50%, durante seis semanas. Neste experimento não foi constatada preservação no conteúdo de massa magra e de proteína na carcaça dos animais; entretanto, estes animais apresentaram menor quantidade de gordura corporal em relação aos animais não suplementados. Além disso, foi observada maior concentração de proteína hepática e de RNA no músculo gastrocnêmio dos ratos suplementados. Os resultados indicaram que a suplementação com leucina em ratos submetidos à restrição alimentar estimula a perda de gordura, melhora o estado protéico hepático e a capacidade de síntese protéica muscular.

Em outro estudo, realizado em nosso laboratório, ratos adultos foram submetidos a 3 ciclos de restrição alimentar, intercalados por recuperação nutricional e suplementados cronicamente com leucina e fenilalanina. Foi verificado aumento significativo no conteúdo de proteína corporal (+17,7%) e de massa magra (+11,3%) na carcaça dos animais suplementados, quando esses resultados foram comparados aos obtidos de ratos submetidos à mesma variação de peso e sem suplementação. Também houve tendência de declínio da gordura corporal (18,9%) nos animais suplementados com leucina e fenilalanina (DONATO *et al*., 2007). Os resultados dos últimos dois estudos citados sugerem um papel da leucina na recuperação nutricional, depois de estados catabólicos.

Zhang *et al*. (2007) analisaram o efeito da suplementação com leucina e da dieta rica em gordura durante 14 semanas. Os animais que receberam leucina apresentaram 32% de redução de ganho de peso corporal e 25% de gordura corporal quando comparados com os animais controles.

Por outro lado, Narizi *et al*. (2009) avaliaram o efeito da suplementação com leucina ou com ACR em animais que receberam dietas ricas em gordura para indução da obesidade. Os resultados encontrados foram que a suplementação não afetou o peso corporal, o consumo alimentar, o consumo de oxigênio, a composição corporal, a tolerância à insulina e o colesterol total.

Diante de recentes evidências, a suplementação com leucina parece ter efeito positivo na síntese protéica, ao atenuar a perda de massa muscular, além de favorecer a redução da gordura corporal, como comprovado por algumas pesquisas (MOURIER *et al*., 1997; LAYMAN, 2003; FOSTER *et al*., 2003, DONATO *et al*., 2006; ZHANG *et al*., 2007). Contudo, ainda não há estudos investigando a possível ação da leucina a longo prazo com objetivo de melhorar o perfil lipídico e atenuar o aumento da gordura corporal que ocorre durante o envelhecimento.

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é definida como um desequilíbrio entre o consumo de energia e seu gasto, que resulta em acúmulo de gordura corporal (WHO, 2000). A sarcopenia é definida como sendo a redução de massa e de força muscular que acompanha o envelhecimento (ROSENBERG, 1997). Sendo assim, a obesidade sarcopênica é a combinação do acúmulo de gordura e do declínio da massa muscular que ocorrem durante o processo de envelhecimento (STENHOLM *et al*., 2008). Os fatores que resultam nessa síndrome geriátrica são: inatividade física, processos inflamatórios, resistência à insulina, redução da produção de hormônios anabólicos e má-nutrição.

Já se sabe que a obesidade é fator de risco para a saúde e reduz a qualidade de vida dos idosos. Concomitantemente, o declínio de massa muscular provou reduzir a capacidade funcional, acarretando o aumento das dificuldades enfrentadas pelos idosos e/ou a mortalidade (STENHOLM *et al*., 2008). Diante destas evidências é recomendado que idosos se submetam a algum tratamento para atenuar estas modificações, a fim de reduzir as chances de mortalidades e controlar as doenças associadas à obesidade sarcopênica.

Pensando nisso, diversas evidências idicaram que a suplementação com leucina, aliada à alimentação equilibrada como uma possível intervenção para atenuar essas alterações que ocorrem com o envelhecimento. Nesse sentido, diversos estudos avaliaram a suplementação com leucina na síntese protéica muscular de humanos e ratos idosos, os quais comprovaram que o músculo envelhecido é menos sensível às concentrações fisiológicas de leucina. Verificou-se, contudo, que quando o consumo deste aminoácido é aumentado o músculo responde normalmente, conduzindo à síntese protéica (DARDEVET *et al*., 2002; RIEU *et al*., 2003; COMBARET *et al*., 2005; KATSANOS *et al*., 2006; KOOPMAN *et al*., 2006).

No entanto, não existem estudos que tenham avaliado o efeito da suplementação com leucina na massa muscular e na gordura corporal de ratos durante o processo de envelhecimento. Assim, o presente estudo testou a hipótese de que a suplementação crônica com leucina poderia alterar favoravelmente a

composição corporal, mediante a redução da gordura corporal, atenuando a perda de massa magra – por promover a síntese protéica muscular. Além de favorecer parâmetros metabólicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como principal objetivo investigar os efeitos da suplementação crônica com leucina na composição corporal e em parâmetros do estado nutricional protéico de ratos durante o envelhecimento.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação crônica com leucina na composição corporal de ratos.

Analisar o efeito da suplementação crônica com leucina sobre as concentrações séricas de indicadores do estado nutricional protéico.

Verificar se a suplementação com leucina pode promover efeitos benéficos em parâmetros metabólicos indicadores de risco de doenças crônicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

A amostra foi constituída de 40 ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, com 6 meses de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos em caixas com maravalhas (2 por caixa), sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro ou 12 horas), temperatura de 22 ± 2°C e umidade relativa do ar de 55 ± 10%. Durante todo o período experimental os ratos tiveram livre acesso à água e à ração. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Experimentação Animal (CEEA) da FCF/USP, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em 14/05/2007 (Protocolo nº 150).

4.1.1 Grupos e desenho experimentais

A amostra foi constituída por 40 ratos machos com dois meses de idade, entregues pelo setor de reprodução do biotério. O período de adaptação compreendeu quatro meses. Nesse período, os animais tiveram livre acesso à ração fornecida pelo biotério e à água, visando à adaptação dos mesmo às condições da sala e à manipulação. Após completarem seis meses de idade os animais foram distribuídos em três grupos experimentais:

a) Grupo adulto (n = 10), composto por animais eutanasiados com 6 meses de idade (adultos jovens). Os dados desses animais são uma referência ao estado metabólico antes das alterações decorrentes do envelhecimento.

b) Grupo controle (n = 17), composto por animais que receberam a ração controle a partir dos seis meses de idade.

c) Grupo leucina (n = 13), composto por animais que receberam a ração com 4% de leucina a partir do seis meses de idade.

No início do experimento o grupo adulto foi eutanasiado (6 meses de idade). Os outros 30 animais foram alimentados *ad libitum* durante o período de 40 semanas, quando já eram considerados ratos envelhecidos (SHIMIZU *et al*., 2000; MILLER e NANDO, 2000). Assim, os animais dos grupos leucina e controle foram eutanasiados com 16 meses de idade.

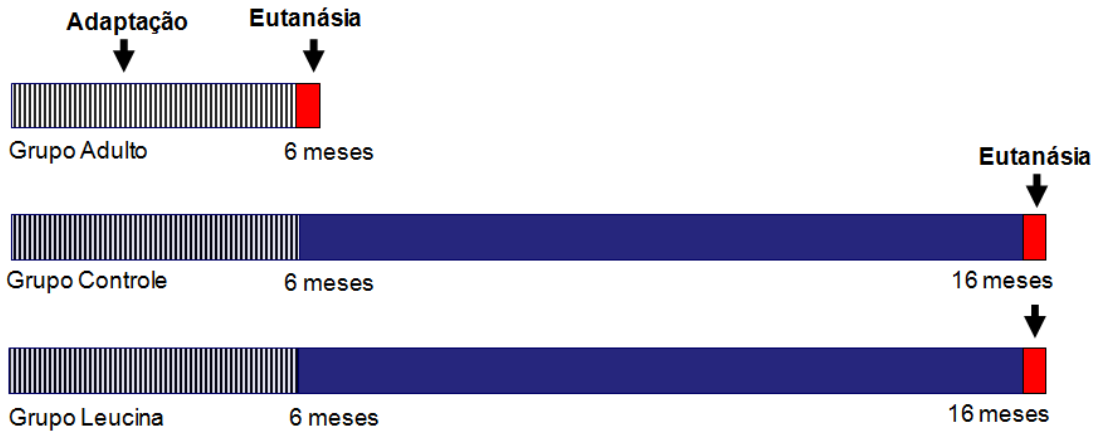

Figura 2: Desenho experimental

4.1.2 Ração

As dietas foram preparadas em nosso laboratório de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores adultos (AIN – 93M) (REEVES *et al*., 1993). Entretanto, as rações utilizadas na experiência foram peletizadas e modificadas. Para cada quilograma da ração suplementada com leucina foram substituídos 29,3g de amido por quantidade equivalente de leucina. Na ração controle foram substituídos 29,3g de amido por uma mistura de aminoácidos não essenciais (alanina, glutamato, glicina, aspartato, prolina e serina), sendo fornecidos 4,89g de cada aminoácido a fim de padronizar o conteúdo de

nitrogênio na dieta (Tabela 3). Estas rações foram analisadas através da sua composição centesimal (umidade, lipídeo, proteína e carboidrato) (Tabela 3), seguindo a mesma metodologia utilizada na determinação química da carcaça.

Tabela 1: Composição das rações utilizadas no experimento (AIN-93M Modificada) (REEVES et al., 1993).

Ingredientes	Ração AIN-93M	Ração controle	Ração 4% leucina
	grama por cada kg de ração		
Amido	620,692	591,392	591,392
Sacarose	100,000	100,000	100,000
Celulose	50,000	50,000	50,000
Caseína	140,000	140,000	140,000
L-cistina	1,800	1,800	1,800
Óleo de soja	40,000	40,000	40,000
Mistura de minerais	35,000	35,000	35,000
Mistura de vitaminas	10,000	10,000	10,000
Bitartarato de colina	2,500	2,500	2,500
Tetrabutil-hidroquinona	0,008	0,008	0,008
Alanina	--------	4,890	---------
Aspartato	--------	4,890	---------
Glutamato	--------	4,890	---------
Glicina	--------	4,890	---------
Prolina	--------	4,890	---------
Serina	--------	4,890	---------
Leucina	--------	---------	29,300

Além da determinação centesimal da ração, também foi realizado o aminograma para a confirmação do conteúdo dos aminoácidos presentes nas rações (Tabela 2). Observa-se, na tabela 2, que a ração com leucina possui 4% deste aminoácido, comprovando que a adição de 29,3g de leucina na dieta, somada com a leucina presente na caseína, representa os 4% deste aminoácido na ração.

Tabela 2: Porcentagens (%) de aminoácidos nas rações oferecidas.

Aminoácidos	Controle	Leucina
Ácido aspártico	1,70	0,84
Ácido glutâmico	3,48	2,69
Serina	0,70	0,69
Glicina	0,94	0,24
Histidina	0,34	0,32
Arginina	0,46	0,45
Treonina	0,49	0,49
Alanina	1,13	0,40
Prolina	1,26	1,23
Tirosina	0,66	0,65
Valina	0,88	0,86
Metionina	0,58	0,54
Cistina	0,06	0,04
Isoleucina	0,67	0,65
Leucina	1,23	4,03
Fenilalanina	0,62	0,61
Lisina	1,05	1,00

Ração controle contendo mix de aminoácidos não essenciais e ração leucina contendo 4% de leucina.

4.1.3 Manipulação dos animais e determinação do peso corporal e consumo de ração

A manipulação dos animais foi realizada em horário fixo, com início entre 13:00 e 15:00 horas, quando ocorria a pesagem de ratos, uma vez por semana (terça-feira), em uma balança com precisão de 0,1g (Marte AL 5000). Todas as terças e sextas-feiras a ração era fornecida e a água dos bebedouros era trocada, sendo determinado o consumo da ração. Para a avaliação do consumo da ração foi calculada a diferença entre a quantidade de ração oferecida e a restante, através de pesagem, utilizando uma balança com precisão de 0,01g.

4.1.4 Eutanásia dos animais e coleta de sangue e tecidos

Em média, os animais foram mantidos em jejum de 5 horas, variando conforme o horário no qual o animal foi eutanasiado. A ração foi removida por volta das 8:00 horas da manhã (ciclo claro) e a eutanásia ocorreu no período da tarde, durante quatro dias consecutivos, sendo eutanasiados seis animais no primeiro dia e oito nos demais dias. Para minimizar possíveis interferências do tempo de jejum e do horário da eutanásia, as ordens dos animais foram rotativas em relação aos grupos, ou seja, um animal de cada grupo era eutanasiado até que se repetisse o mesmo grupo. Com isso, os grupos apresentaram, na média, o mesmo tempo de jejum.

Os animais foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Estes receberam anestesia cinco minutos antes da decapitação para amenizar qualquer forma de sofrimento e/ou estresse por parte dos mesmos. O coquetel anestésico (4,5/4,5/1,8/7,2 u/v) foi composto por: cloridrato de xilazina (20mg/ml), cloridrato de cetamina (100mg/ml), acepromazina (20mg/dl) e água destilada. Após a decapitação, o sangue do tronco foi coletado em dois tubos distintos e identificado com o número de cada animal, os quais não possuíam nenhum anticoagulante visando obtenção da porção sérica do sangue. A cada cinco animais sacrificados, as amostras eram centrifugadas (jouan BR4i) a 3.000 rotações/minuto, por 15 minutos, a 4°C. Entre um animal e outro, os tubos para obtenção do soro eram mantidos em temperatura ambiente até a centrifugação. Depois de centrifugados, os tubos eram mantidos em geladeiras até o final do sacrifício, quando era, então, separada a porção sérica de cada tubo. As amostras de soro foram devidamente armazenadas em microtubos do tipo eppendorf identificados com o número de cada animal. Tomou-se o cuidado de se colocar em cada microtubo a quantidade necessária apenas para uma única análise, para evitar que a amostra tivesse que ser descongelada e congelada várias vezes.

Logo após a coleta de sangue, os músculos gastrocnêmio e sóleo de ambas as patas, além do fígado, foram rápida e cuidadosamente dissecados e coletados. Todos os tecidos citados foram pesados em balança analítica com precisão de

0,0001g (Ohaus), colocados individualmente em saquinhos plásticos, com exceção do músculo sóleo e do músculo gastrocnêmio da pata esquerda, que foram devolvidos à carcaça, já devidamente identificados, e congelados em nitrogênio líquido. Alguns órgãos, como rins, coração, estômago, intestino, baço e os depósitos de tecidos adiposos (epididimal e retroperitoneal) foram pesados e devolvidos à carcaça.

No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrintestinal foi limpo e lavado em solução salina, antes de ser devolvido à carcaça. Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança analítica com precisão de 0,01g (Marte AL 5000).

As amostras de soro e tecidos foram armazenadas em freezer a -80ºC. A carcaça foi armazenada em freezer a -20°C até a determinação da composição corporal.

4.2 Determinação da composição corporal

A composição corporal dos animais foi determinada a partir da análise química da carcaça, a qual avaliou a quantidade absoluta e o percentual de umidade, proteína e lipídeo presentes na carcaça.

A carcaça consistiu de todo o corpo do animal, incluindo a cabeça, com exceção da amostra de sangue (aproximadamente 5mL), do fígado e dos músculo gastrocnêmio (pata direita), removidos para análises teciduais.

4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada a partir da secagem de toda a carcaça em estufa ventilada (aproximadamente 60 °C) durante 7 dias. Para tanto, as carcaças foram colocadas individualmente em embalagens de papel alumínio e dentro de caixa plástica. O tórax e o abdômen dos animais foram abertos ao máximo, para permitir a secagem eficiente. As carcaças foram pesadas antes de serem colocadas na estufa e depois de terem sido dessecadas. A diferença entre os pesos é o valor absoluto de

umidade (g). O percentual de umidade corporal foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%\ \boldsymbol{Umidade\ Corporal} = \frac{\boldsymbol{Umidade\ absoluta\ (g)}}{\boldsymbol{Peso\ Corporal\ Final\ (g)}} . \mathbf{100}$$

4.2.2 Lipídeo

Toda a carcaça seca foi então picada, embrulhada em gaze e envolvida por papel filtro (Whatman). Por meio da técnica de extração, com éter etílico (Synth) como solvente, foi removido todo o lipídeo da carcaça, utilizando-se o aparelho de Soxhlet. Essa técnica consiste em colocar a amostra em um tubo extrator, adicionar éter etílico em um balão coletor que está agregado ao extrator e aquecer o balão com a finalidade de fazer o éter evaporar. O éter atinge a amostra e condensa, pois o tubo extrator é resfriado externamente com água corrente. Ao condensar, o éter lava a amostra, extraindo lipídeo que se acumula no balão coletor.

Depois de 4 dias, o solvente foi eliminado por evaporação e o balão pesado. A diferença entre o peso do balão limpo, previamente determinado, e o balão com lipídeo forneceu o valor absoluto de gordura presente em toda a carcaça do animal. O percentual de gordura corporal foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%\ \boldsymbol{Godura\ Corporal} = \frac{\boldsymbol{Gordura\ absoluta\ (g)}}{\boldsymbol{Peso\ Corporal\ Final\ (g)}} . \mathbf{100}$$

4.2.3 Proteína e massa magra

O restante da carcaça, sem umidade nem lipídeo, foi totalmente moído (moinho tecnal TE 631/2). A amostra moída foi peneirada, para remoção dos pêlos que poderiam reduzir sua homogeneidade. Este processo resultou em um pó bastante uniforme, representando o conteúdo protéico de toda a carcaça.

A proteína na carcaça foi analisada por meio do método de Kjeldahl (CECCHI, 1999), que determina o teor de nitrogênio de origem orgânica de uma amostra. Essa

técnica também foi utilizada para a determinação do conteúdo protéico e como teste da homogeneidade das rações. Em ambos os casos, as análises foram realizadas em quadruplicata.

O método baseia-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico, na presença do catalisador (sulfato de cobre e sulfato de potássio). Durante esse processo, o nitrogênio da proteína é reduzido a sulfato de amônia. Posteriormente, adiciona-se NaOH concentrado na amostra. O sulfato de amônia é destilado, ocorrendo liberação da amônia dentro de um volume conhecido de solução de ácido bórico (na presença de solução indicadora), formando borato de amônia. O borato de amônia formado é titulado com solução de ácido clorídrico (HCL).

A normalidade do ácido foi de 0,1N para a análise da carcaça e 0,02N para a determinação do conteúdo de nitrogênio das rações.

Tanto para a ração (caseína como fonte de proteína) quanto para a carcaça, o percentual de nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo fator arbitrário 6,25, para obtenção do percentual de proteína nas amostras, uma vez que o teor de nitrogênio, em ambos os casos, aproxima-se de 16% do conteúdo protéico total. O cálculo realizado para a determinação de nitrogênio foi o seguinte:

$$\% \mathbf{N} = \frac{[\boldsymbol{HCL\ amostra}\ (\boldsymbol{mL}) - \boldsymbol{HCL\ branco}\ (\boldsymbol{mL})].\boldsymbol{N}.\boldsymbol{FC}.\mathbf{14,007}}{\boldsymbol{Peso\ amostra}\ (\mathbf{mg})}$$

Onde:

% N = percentual de nitrogênio da amostra

mL HCL = volume gasto de ácido clorídrico

N = normalidade do HCl. Ração – 0,02N; carcaça – 0,1N

FC = fator de correção do ácido

14,007 = peso equivalente do nitrogênio

mg amostra = massa da amostra analisada

Para a obtenção da porcentagem de proteína na carcaça foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\%\,\boldsymbol{Proteína} = \%\boldsymbol{N}.\,\mathbf{6,25}$$

Onde:

% Proteína = percentual de proteína da amostra

% N = percentual de nitrogênio da amostra

6,25 = fator arbitrário indicativo do conteúdo de nitrogênio da amostra protéica (aproximadamente 16% do total)

O conteúdo absoluto de proteína na carcaça foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\boldsymbol{Proteína\ absoluta}\ (\boldsymbol{g}) = [\boldsymbol{carcaça\ seca}\ (\boldsymbol{g}) - \boldsymbol{lipídeo\ total}\ (\boldsymbol{g})].\,\%\,\boldsymbol{proteína}$$

Deve-se notar que a % proteína não indica o percentual de proteína corporal, mas sim o percentual de proteína na amostra da carcaça moída (base seca). O percentual de proteína corporal foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%\,\boldsymbol{Porteína\ corporal} = \frac{\boldsymbol{Proteína\ absoluta}\ (\boldsymbol{g})}{\boldsymbol{Peso\ corporal\ fina}\ (\boldsymbol{g})}$$

O valor absoluto da massa magra e o percentual de massa magra foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\boldsymbol{Massa\ magra} = \boldsymbol{Peso\ corporal\ final}\ (\boldsymbol{g}) - \boldsymbol{gordura\ total}\ (\boldsymbol{g})$$

$$\%\,\boldsymbol{Massa\ magra} = \frac{\boldsymbol{Massa\ magra\ (g)}}{\boldsymbol{Peso\ corporal\ final}\ (\mathbf{g})}$$

4.3 Parâmetros séricos

Todos os parâmetros séricos foram analisados em duplicatas. A média da duplicata representou o valor de cada animal.

4.3.1 Colesterol total

A concentração de colesterol total sérico foi determinada por meio de *kit* comercial (LabTest – colesterol liquiform CAT. 76). Este método consistiu nas seguintes reações:

$$\text{É}ster\ de\ colesterol \xrightarrow{Colesterol\ Esterase} Colesterol + \text{Á}cidos\ graxos$$

$$Colesterol + O_2 \xrightarrow{Colesterol\ Oxidase} \text{Colest} - 4 - \text{en} - \text{ona} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + Fenol + 4 - Aminoantipirina \xrightarrow{Peroxidase} \text{Antipirilquinonimina} + 4H_2O$$

A antipirilquinonimina formada possui coloração vermelha, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de colesterol da amostra. As amostras foram lidas em comprimento de onda de 540nm (espectrofotômetro UV – Shimadzumini 1240).

4.3.2 Colesterol HDL, VLDL e LDL

As concentrações de colesterol HDL sérico foram determinadas por meio de *kit* comercial específico para ratos (Lab-test-CAt 13). Este método consistiu no princípio de precipitação química das lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL); após centrifugação, o colesterol ligado às proteínas de alta densidade (colesterol HDL) é determinado no sobrenadante. O cálculo realizado foi o seguinte:

$$\boldsymbol{Colesterol\ HDL\ (mg/dL) = \frac{Absorbância\ do\ teste}{Absorbância\ do\ padrão} \cdot 40}$$

Para a determinação do conteúdo de colesterol VLDL e LDL foram utilizadas as fórmulas de Friedewald (1972), onde:

$$\boldsymbol{VLDL\ (mg/dL) = \frac{Triacilglicerol}{5}}$$

$$\boldsymbol{LDL\ (mg/dL) = Colesterol\ total - (HDL - VLDL)}$$

4.3.3 Triacilglicerol

A concentração de triacilglicerol sérico foi determinada por meio de *kit* comercial (LabTest – triglicérides GPO – ANA). Este método consistiu nas seguintes reações:

$$Triacilglicerol \xrightarrow{Lipase\ Lipoprotéica} \text{glicerol + Ácidos graxos}$$

$$Glicerol + ATP \xrightarrow{Glicerolquinase\ Mg^{+2}} Glicerol - 3 - Fosfato + ADP$$

$$Glicerol - 3 - Fosfato + O_2 \xrightarrow{Glicerol-3-Fosfato\ Oxidase} Dihidroxiacetona + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + 4 - aminoantipirina + 4 - Clorofenol \xrightarrow{Peroxidase} Quinoneimina + 4\,H_2O$$

A quinoneimina possui coloração violeta, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de triacilglicerol. As amostras foram lidas em comprimento de onda 540mn (espectrofotômetro UV- Shimadzu mini 1240).

4.3.4 Aminograma

Calculou-se a massa a ser hidrolisada em função do teor de porcentagem de proteína bruta na amostra, pesou-se a massa em um tubo de hidrólise, adicionou-se 9mL de HCl 6N com 3% m/v de fenol, fez-se vácuo no tubo, lacrou-se e acondicionaram-se o mesmo em bloco de reação térmica, deixando por 24h a 110°C. Em seguida, acrescentou-se uma alíquota do padrão interno AAAB. Filtrou-se uma alíquota, secou-se a 70miliTorr em sistema trapp com nitrogênio criogênico. Neutralizou-se com uma solução 4:4:2 de acetato de sódio trihidratado 0,2N, metanol grau HPLC e trietilamina a 99-100%, secou-se novamente, como já descrito. Nesta etapa, adicionou-se o PITC para derivatizar os aminoácidos liberados pela hidrólise formando-se o PTC - aminoácido (Figura 3). Ao tubo contendo os cristais de aminoácidos derivatizados, adicionam-se 500uL de diluente. A detecção foi a 254nm após a cromatografia em fase reversa em gradiente linear binário com fluxo de 1mL/min e temperatura da coluna 58°C, sendo o eluente A um tampão de acetado de sódio 0,14N, acetonitrila (240mL/2000mL de acetado de sódio 0,14N) e trietilamina (1mL/2000mL de acetado de sódio 0,14N). O eluente B foi uma solução 6:4 de acetonitrila (grau HPLC) e água milli-Q. A quantificação foi

feita por inclusão do ácido a-aminobutírico AAAB como padrão interno (WHITE, HART e FRY, 1986; HAGEN, FROST e AUGUSTIN, 1989).

Tanto para a ração (caseína como fonte de proteína) quanto para o soro sanguíneo foram utilizados o mesmo procedimento.

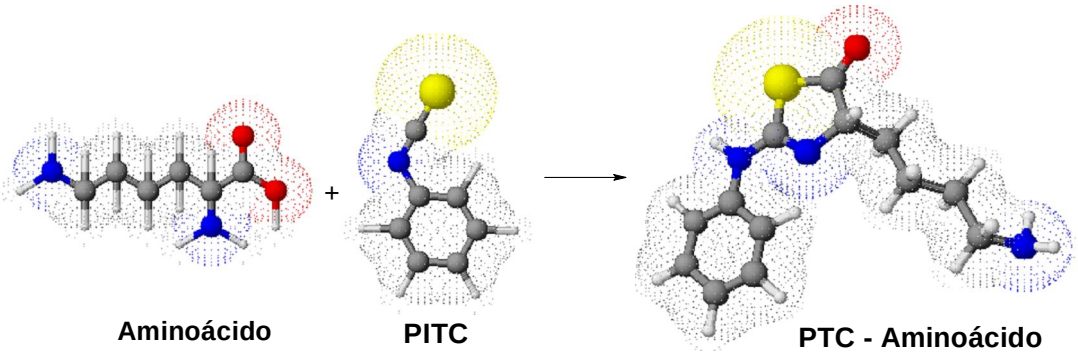

Figura 3: Representação esquemática da determinação do aminograma.

4.3.5 Glicose

A concentração de glicose plasmática foi determinada de acordo com o método de Bergmeyer (1974), que consistiu nas seguintes reações:

A antipirilquinonimina formada possui coloração vermelha, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose da amostra. Para a determinação desta análise foi utilizado um *kit* comercial (Lab teste – glicose PAD). As amostras foram lidas em comprimento de onda de 505nm (espectrofotômetro UV – Shimadzumini 1240).

4.3.6 Insulina

A concentração de insulina foi determinada em duplicata, a partir da amostra 100µL de soro. Utilizou-se um *kit* de raioimunoensaio específico para a determinação de concentração de insulina em ratos (Linco), baseado na técnica de duplo anticorpo/PEG. O primeiro anticorpo foi obtido de porquinho-da-índia, a partir de insulina de ratos altamente purificada, cuja sensibilidade foi de pelos menos 0,1ng/mL em amostras de 100µL. O segundo anticorpo foi obtido a partir do soro de cabras. A insulina foi marcada com 125I.

O princípio do método de raioimunoensaio se baseia na competição entre antígeno radioativo (quantidade conhecida) e um não radioativo (concentração determinada) por um número fixo de sítios de ligação (anticorpo). A quantidade de antígeno radioativo ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração de antígeno não marcado presente. A separação do antígeno livre e do ligado é feita por decantação ou aspiração dos tubos, nesse caso, revestido com anticorpo.

O cálculo é realizado a partir da leitura de emissão de raios gama dos tubos. Esses valores são plotados em uma curva log-linear, obtida a partir da contagem de amostras padrão. Dessa forma, quanto maior for a emissão de raios gamas, menor será a concentração da amostra desconhecida. Nesse sentindo, a amostra da curva padrão de maior contagem é aquela na qual não foi adicionado qualquer antígeno e a de menor contagem é o padrão que possui a maior concentração de antígenos radioativos.

A determinação da insulina foi realizada em dois dias. No primeiro, ocorreu a competição entre a insulina marcada e a presente nas amostras, pela ligação com o anticorpo anti-insulina. No segundo dia, foi adicionada uma solução contendo anticorpo anti-IgG anti-insulina e PEG 3% para a precipitação da insulina. A leitura foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600) durante 1 minuto. As concentrações de insulina presentes no soro dos animais foram calculadas no software Graph Pad Prism versão 4.0 (Graph Pad software, Inc.).

4.3.7 Índice de resistência à insulina (HOMA)

Para a determinação da resistência à insulina foi utilizado o índice conhecido como HOMA (homeostasis model assessment), que utiliza como parâmetros a glicemia e a insulinemia de jejum (MATTHEWS *et al.*, 1985). Para o cálculo, multiplica-se a concentração de glicose (mmol/L) com a concentração de insulina (ng/mL) e divide-se o valor resultante por 22,5. Quanto maior for o valor do índice, significa que mais resistência à insulina o indivíduo ou o animal apresenta. A validade e a utilidade desse modelo vêm sendo continuamente confirmadas (WALLACE, LEVY e MATTHEWS, 2004).

4.3.8 Albumina

A concentração de albumina sérica foi determinada pelo método colorimétrico de verde de bromocresol (DOUMAS, WATSON e BIGGS, 1971). O procedimento consistiu em adicionar 25μL do soro em 5mL do reagente de cor, contendo solução de verde de bromocresol 0,60mM (Merck), tampão de succinato 0,1M (Merck) e surfactante não iônico 35%, em pH 4,0. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240) a 628nm e as concentrações determinadas contra curva linear de calibração de albumina (Sigma), nas concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 g/dL.

4.3.9 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF 1)

A concentração de IGF-1 presente no soro dos animais foi determinada por *kit* comercial de ELISA sem extração (IDS Rat/Mouse IGF-1 Elisa kit) específica para soro de rato.

O principio do método de imunoensaio consiste em duas etapas. No ensaio, padrões, controles e amostras pré-diluídas são incubados em cavidades de microtitulação as quais foram recobertas com anticorpos anti-IGF-1. Após incubação

e lavagem, as cavidades são tratadas com outro anticorpo de detecção anti-IGF-1 marcado com a enzima peroxidase de rábano (HRP). Após a segunda etapa de incubação e lavagem, as cavidades são incubadas com o substrato tetrametilbenzidina (TMB).

Uma solução de interrupção ácida é então adicionada e o grau de reciclagem enzimática do substrato é determinado através da leitura da absorbância em duplo comprimento de onda a 450 e 620 nm.

1° Etapa: pré-tratamento das amostras

Pipetou-se 25µL das amostras e do controle em tubos de polietileno

↓

Adicionou-se 100 µL do tampão de amostra I (RELEASREAG) e agitar bem em vórtex.

↓

Incubou-se à temperatura ambiente (~25 ºC) por 10 minutos.

↓

Adicionou-se 1 mL tampão de amostra II (SAMPDIL) e agitar no vórtex.

2° Etapa: quantificação do IGF-1

Pipetou-se 25µL calibrador (cal) no controle e amostras diluídas.

↓

Adicionou-se 100 µL de Anti-Rat IGF-I Biotin (AB BIOTIN).

↓

Incubou-se por 2 horas em temperatura ambiente (~25 ºC).

↓

Lavou-se cada cavidade 3 vezes com a solução de lavagem.

↓

Adicionou-se 200µL da Solução de Conjugado Anticorpo-Enzima (TMB).

↓

Incubou-se 30 minutos em temperatura ambiente (~25 ºC).

↓

Lavou-se cada cavidade 3 vezes com a solução de lavagem.

↓

Adicionou-se 100µL da solução de Interrupção (HCL).

↓

Realizou-se a leitura da absorbância da solução utilizando uma leitora de microplaca ajustada para 450nm.

As concentrações de IGF-1 presentes no soro dos animais foram calculadas no software Graph Pad Prism versão 4.0 (Graph Pad software, Inc.).

4.3.10 Proteína total sérica

A concentração da proteína sérica total no soro foi medida pelo método do reagente de biureto (sulfato de cobra a 10%) (HENRY, 1974). O princípio do método consistiu na reação das ligações peptídicas das proteínas com o Cu2+ em meio alcalino, dando origem a um complexo de cor violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteína da amostra. As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240) a 545nm e as concentrações foram obtidas contra curva de calibração, realizada com um padrão de proteínas totais (Lab Test).

4.4 Parâmetros teciduais

Cada amostra foi analisada em duplicata. A média da duplicata representou o valor de cada animal.

4.4.1 Extração de proteína e de RNA no músculo gastrocnêmio e fígado

As amostras congeladas do músculo gastrocnêmio e fígado foram pulverizadas em placas de alumínio sob adição constante de nitrogênio líquido, pesadas e imediatamente homogeneizadas com 6 mL de ácido tricloroacético p.a. 10% (TCA, Merck Chemical, Darmstadt, Alemanha) gelado, sendo, posteriormente, centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, à temperatura de 4ºC.

Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso com 10mL de PCA p.a. 2% (Merck Chemical, Darmstad, Alemanha) gelado e centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos à temperatura de 4ºC. Depois o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi, então, ressuspendido com 10mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,3N e mantido em banho aquecido por 1 hora, à temperatura de 37ºC. Durante esse período foi utilizado um bastão de vidro que permitiu a dissolução de qualquer coágulo formado nos tubos. Em seguida, cerca de 0,5mL foram retirados e congelado a -80ºC para posterior determinação de proteína.

O restante da solução foi resfriada em gelo durante 10 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 2mL de PCA 20% gelado, homogeneizado com bastão de vidro e mantido em gelo por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado por 15 minutos, 3.000 rpm, à temperatura de 4ºC. Uma parte do sobrenadante (5mL) foi armazenada a -80ºC para posterior análise da concentração de RNA, enquanto o restante foi desprezado.

4.4.2 Determinação da concentração de proteína no músculo gastrocnêmio e fígado

A concentração de proteína tecidual hepática e do músculo gastrocnêmico foi determinada segundo o método colorimétrico descrito por Lowry *et al*. (1951). O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas da amostra e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de Folin-Ciocalteau. Assim, a intensidade da coloração desse complexo é proporcional à concentração de proteína da amostra. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 660nm em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240). A quantidade de proteína da amostra foi calculada a partir da curva padrão de albumina de soro bovino (Sigma).

4.4.3 Determinação da concentração de RNA total no músculo gastrocnêmio e fígado

As concentrações de RNA total no fígado e no músculo gastrocnêmio foram determinadas pelo método descrito por Munro e Fleck (1966), a partir do sobrenadante, após o processo de extração de proteína da amostra. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 260nm em espectrofotômetro UV (Shimadzu mini 1240). A concentração de RNA da amostra foi calculada a partir da concentração de proteína (µg de RNA/mg de proteína).

4.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o teste One-Way ANOVA para a comparação entre os grupos, os contrastes foram obtidos pelo teste de Newman-Keuls, com exceção da composição centesimal das rações e do consumo alimentar dos animais, para os quais foi utilizado o Teste t-Student. Além disso, as correlações parciais entre os dados foram obtidas por meio de regressão linear (Pearson). Em todas as análises, foi considerado o valor de alfa de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Composição centesimal das rações

A ração suplementada com leucina e a ração controle apresentaram conteúdo equivalente de proteína e nitrogênio (p>0,05), conforme observado na Tabela 3. O valor calórico das dietas foi estimado em aproximadamente 3,72Kcal/g de ração. Assim, as rações controle e suplementada com leucina podem ser consideradas isocalóricas, isoprotéicas e isonitrogenadas.

Tabela 3: Composição centesimal das rações oferecidas aos animais dos grupos controle e leucina.

Composição Centesimal	Ração controle	Ração com leucina	*p*
Proteína (%)	15,02 ± 0,14	15,22 ± 0,05	0,2840
Nitrogênio (%)	2,40±0,02	2,44±0,01	0,2840
Lipídeo (%)	4,44±0,38	4,05±0,17	0,4040
Umidade (%)	11,48±0,46	13,19±0,59	0,0870
Carboidrato (%)	69,31±1,15	67,88±0,83	0,4219

Dados expressos com média e ± erro padrão. Ração controle contém 4% de aminoácidos não essenciais e ração suplementada com leucina contendo 4% de leucina.

5.2 Peso corporal e consumo de ração

Como apontado na Tabela 4, os dados semelhantes do peso inicial entre os grupos mostram que os animais foram aleatorizados adequadamente no início do experimento, mostrando, assim, homogeneidade entre os grupos.

As curvas da evolução do peso corpóreo e do consumo de ração são apresentadas pelas Figura 4 e Figura 5, respectivamente. Na Figura 4, observa-se que os animais do grupo leucina apresentaram menor peso nos meses 6,7, 8 e 11, quando comparados com o grupo controle. Ainda para suporte desses dados, a

Tabela 4 mostra que o grupo leucina apresentou menor peso corpóreo no final do experimento e também menor peso da carcaça (*p*=0,0092) que o grupo controle.

Os resultados, como indicados na Figura 5 e na Tabela 4, mostram que não houve diferença significante no consumo alimentar total (285 dias) entre os grupos controle e leucina.

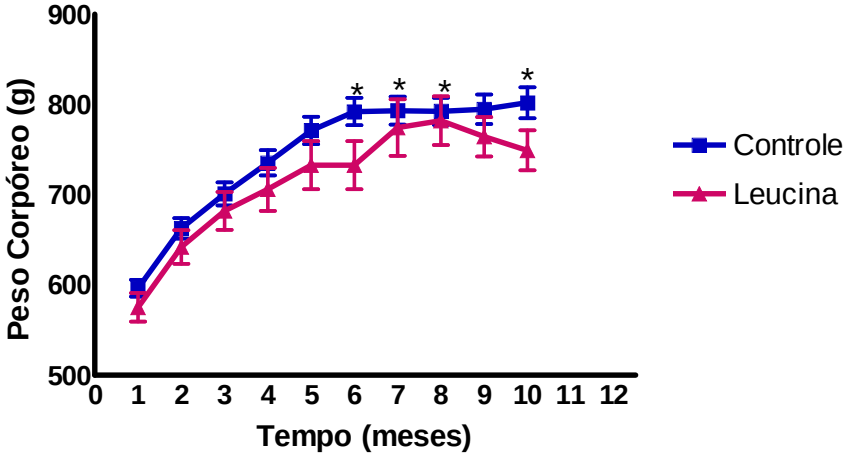

Figura 4: Curva de evolução do peso corpóreo dos ratos dos grupos Controle e Leucina durante 10 meses consecutivos.

Dados expressos em médias. Valores que apresentam o símbolo * possuem diferença estatística. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

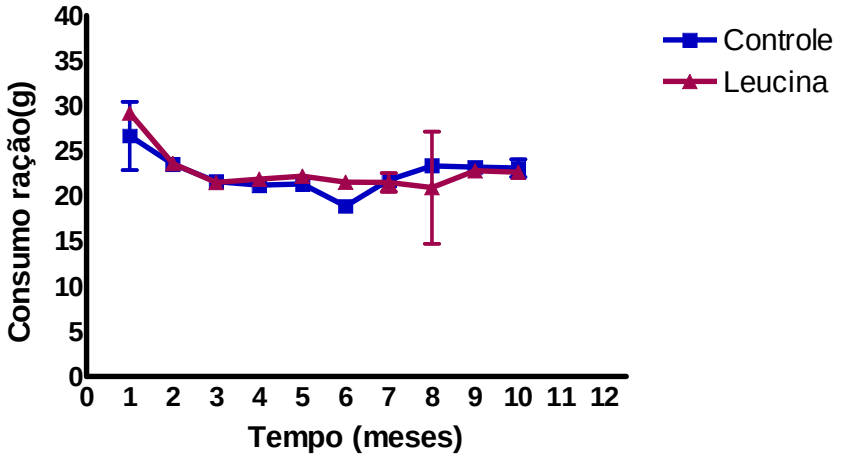

Figura 5: Consumo de rações dos ratos dos grupos controle e leucina durante 10 meses consecutivos.

Dados expressos em médias. Valores que apresentam o símbolo * possuem diferença estatística. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

Tabela 4: Média do consumo diário da ração e peso corporal durante o experimento.

	Adulto	**Controle**	**Leucina**	***p***
Consumo Total (g/dia)		22,4±0,49	22,61± 0,84	0,8280
Peso Inicial (g)	560,93± 8,23	556,49± 9,41	554,62± 12,09	0,7353
Peso Final (g)	560,93± 8,23[a]	806,6± 17,66[b]	748,58± 22,9[c]	**0,0001**
Carcaça (g)	502±8,39[a]	753,1±16,55[b]	695,6±21,89[c]	**0,0001**

Dados expressos com média e ± erro padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

5.3 Massa de tecidos e órgãos

Os dados referentes às massas de tecidos e órgãos foram expressos em grama para cada 100 grama de peso corpóreo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao peso do músculo sóleo; por outro lado, houve diferença nos três grupos experimentais em relação ao

músculo gastrocnêmio. Como pode ser observado na tabela 5, os animais dos grupos controle e leucina apresentaram menor massa de músculo quando comparados aos animais adultos. O grupo leucina apresentou maior conteúdo do músculo que o grupo controle. Este resultado indica que no envelhecimento há redução da massa muscular e que a suplementação com leucina atenuou esse declínio muscular.

Em relação aos órgãos, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais em relação ao fígado e ao rim. No entanto, o grupo controle apresentou menor quantidade de g/(100g) de coração quando comparado com os demais grupos experimentais (Tabela 5).

Tabela 5: Peso dos tecidos e órgãos dos grupos experimentais (g/100g de peso).

	Adulto	**Controle**	**Leucina**	***p***
Sóleo *	0,08 ± 0,004	0,07 ± 0,003	0,07 ± 0,003	0,0722
Gastrocnêmio *	1,07 ± 0,06 [a]	0,41± 0,01 [b]	0,82 ± 0,02[c]	**0,0001**
Coração	0,26 ± 0,01[a]	0,23 ± 0,005[b]	0,25 ± 0,01[a,b]	**0,0366**
Fígado	2,47 ± 0,17	2,53 ± 0,05	2,75 ± 0,10	0,1431
Rim *	0,54 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,73 ± 0,14	0,2757

* representa a soma dos tecidos ou órgãos do lado direito e esquerdo. Dados foram apresentados em grama por cada 100 grama de peso corpóreo de cada animal e expressos com média e ± erro padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

5.4 Composição química da carcaça

Os dados referentes à massa dos depósitos de gordura foram expressos em grama por 100 grama de peso corpóreo. Os animais dos grupos experimentais não apresentaram diferença significativa em relação ao tecido adiposo epididimal. Por outro lado, os grupos leucina e controle apresentaram aumento significativo no depósito de gordura retroperitoneal bem como na porcentagem de gordura corporal,

quando comparados aos animais adultos (Figura 6 e Figura 7). Quando se somou os depósitos de gordura (epididimal + retroperitoneal) observou-se que o grupo leucina apresentou conteúdo semelhante aos animais adultos. Já o grupo controle apresentou maior conteúdo do que os demais grupos. Esses dados mostram que o processo de envelhecimento acarretou maior acúmulo de gordura nos animais. Todavia, a suplementação com leucina reduziu significativamente o ganho de gordura, comparado aos animais que receberam dieta controle. Por outro lado, a suplementação com leucina não atenuou a perda de proteína e massa magra que ocorre com o processo de envelhecimento. Sendo assim, o processo de envelhecimento provocou alterações na composição corporal e a suplementação com leucina foi capaz de reduzir, de forma parcial, apenas o acúmulo de gordura corporal.

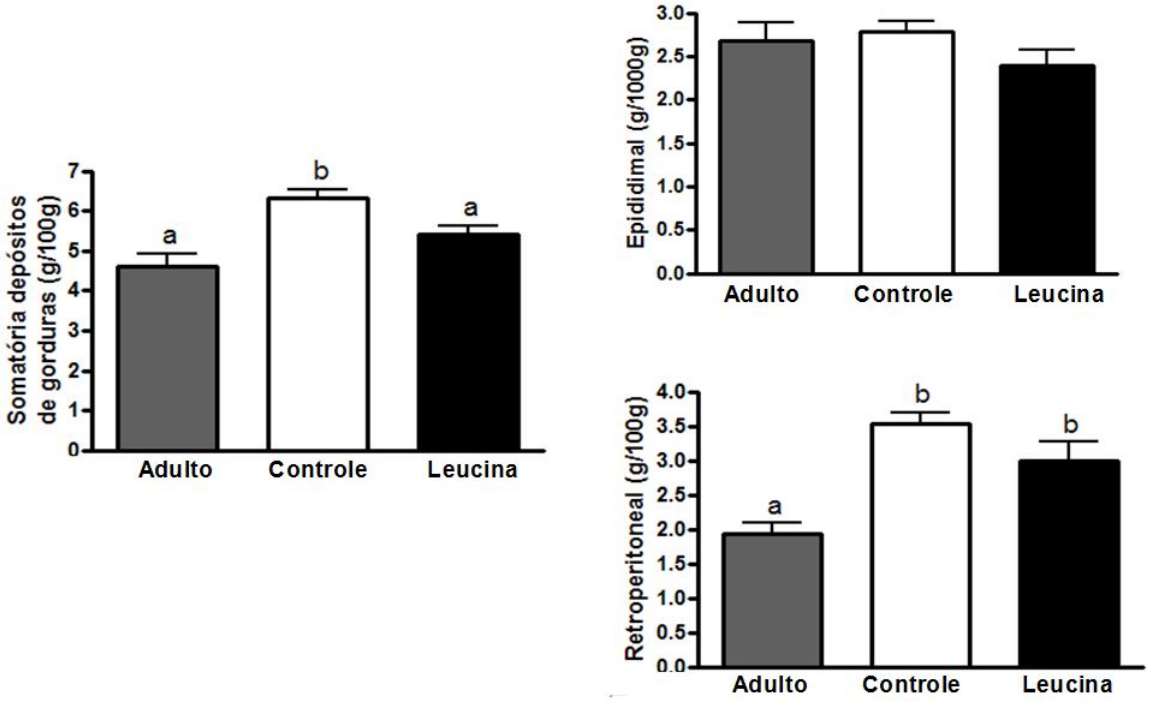

Figura 6: Peso dos depósitos de gordura visceral epididimal, retroperitoneal e a soma dos dois depósitos dos grupos experimentais.

Os dados foram apresentados em g/100g de peso corpóreo e expressos com média e ± erro padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

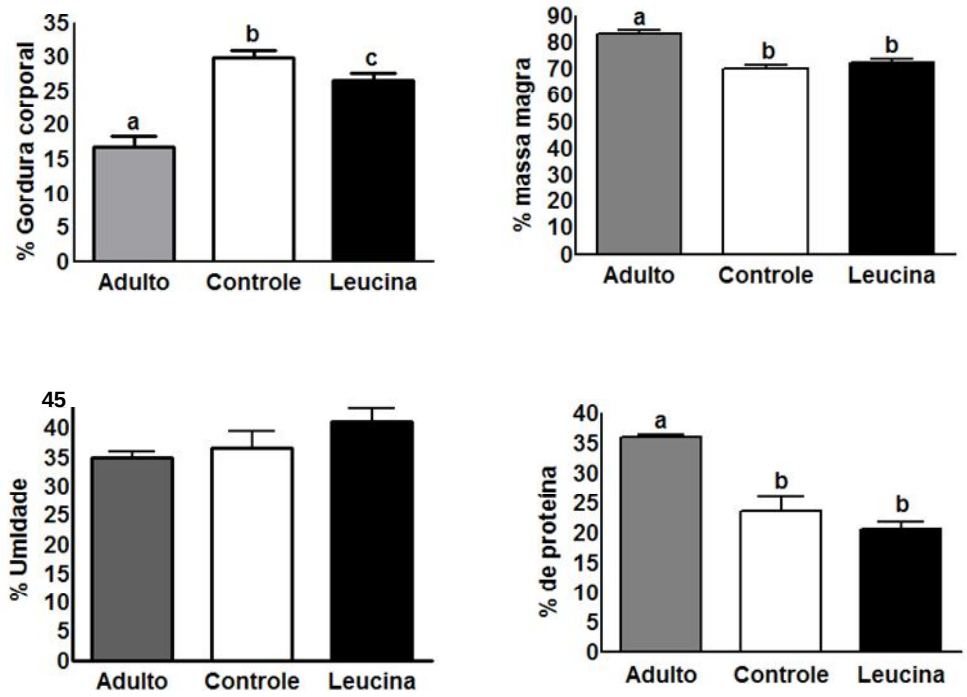

Figura 7: Composição química da carcaça em termos percentuais dos grupos experimentais.

Os dados foram apresentados em porcentagens e expressos com média e ± erro padrão. Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

5.5 Parâmetros séricos

Como pode ser observado na Tabela 6, os animais envelhecidos tiveram maiores concentrações de colesterol, triglicérides, LDL, HDL, VLDL e glicose quando comparados com grupo adulto. Sendo assim, o processo de envelhecimento provocou efeitos negativos no perfil lipídico e na glicemia e a suplementação com leucina não foi capaz de reverter isso

Em relação aos hormônios anabólicos, não houve diferença entre os grupos na concentração de IGF-1 (p>0,05), mas a concentração do hormônio insulina foi

maior nos grupos leucina e controle do que no grupo adulto (*p*=0,0010), indicando aumento da resistência à insulina com o envelhecimento. Ainda na mesma tabela, nota-se que o índice de HOMA foi maior nos grupos controle e leucina quando comparados com o grupo adulto; nesse caso, o índice de HOMA indica que esses animais apresentam alterações metabólicas próprias do envelhecimento.

Observa-se, na Tabela 6 que os grupos controle e leucina apresentaram menores concentrações de proteínas totais (*p*=0,0009) e albumina (*p*=0,001) do que o grupo adulto. A concentração de albumina foi menor no grupo leucina que nos demais grupos experimentais.

Tabela 6: Parâmetros séricos dos grupos experimentais.

	Adulto	**Controle**	**Leucina**	***P***
Glicose (mg/dL)	104,86±6,69[a]	251,9±12,46[b]	253,24±16,01[b]	**0,0001**
Colesterol (mg/dL)	96,14 ± 6,14[a]	186,4 ± 9,04[b]	178,92 ± 20,2[b]	**0,0001**
HDL (mg/dL)	54,14 ± 3,80[a]	86,45 ± 6,62[b]	75,85 ±7,53[b]	**0,0080**
LDL (mg/dL)	71,12±3,36[a]	124±8,36[b]	117,8±14,39[b]	**0,0035**
VLDL (mg/dL)	17,58±1,13[a]	37,57±4,62[b]	41,97±9,11[b]	**0,0355**
Triglicérides (mg/dL)	87,9 ± 5,65 [a]	187,8±23,12[b]	209,9 ±45,59[b]	**0,0355**
Proteína total (g/dL)	8,06 ± 0,28[a]	6,3 ± 0,24[b]	6,12 ± 0,44[b]	**0,0009**
Albumina (g/dL)	5,08 ± 0,07[a]	3,06 ± 0,09[b]	2,73 ± 0,13[c]	**0,0001**
Insulina (ng/mL)	1,65±0,03[a]	1,80±0,02[b]	1,74±0,02 [b]	**0,0003**
HOMA	0,034±0,005[a]	0,107±0,011[b]	0,106±0,011[b]	**0,0001**
IGF-1 (ng/mL)	907,8±65,66	861,1±48,68	765,5±44,90	0,2685

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

5.6 Aminograma sanguíneo

Na Figura 7 observam-se as concentrações dos aminoácidos sanguíneos dos grupos experimentais; destacam-se os aminoácidos ácido aspártico, serina, treonina, prolina e cistina, que apresentaram-se em menores concentrações no grupo adulto quando comparado com os demais grupos estudados. Cabe salientar que os ACR não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais. Os demais aminoácidos foram semelhantes em todos os grupos.

Tabela 7: Concentrações de aminoácidos sanguíneos dos grupos experimentais (mg/100g).

	Adulto	Controle	Leucina	P
Glutamina	6,57±0,25	7,34±0,19	7,80±0,47	0,0687
Ácido aspártico	0,53±0,03[a]	0,57±0,03[b]	0,74±0,07[b]	**0,0181**
Ácido glutâmico	3,08±0,25	3,15±0,25	2,70±0,23	0,4194
Serina	2,33±0,14[a]	3,04±0,15[b]	3,53±0,22[b]	**0,0002**
Glicina	2,18±0,15	2,44±0,18	2,28±0,28	0,6909
Histidina	0,88±0,06	0,78±0,02	0,95±0,05	0,0694
Arginina	2,07±0,14	2,21±0,24	2,05±0,26	0,8514
Treonina	1,94±0,09[a]	2,78±0,13[b]	3,09±0,20[b]	**0,0001**
Alanina	4,52±0,38	5,17±0,27	5,49±0,35	0,1366
Prolina	1,55±0,09[a]	1,83±0,09[b]	1,82±0,04[b]	**0,0295**
Tirosina	1,59±0,10	1,74±0,05	1,74±0,08	0,375
Valina	1,78±0,06	1,55±0,11	1,49±0,07	0,0700
Metionina	1,17±0,04	1,25±0,03	1,21±0,03	0,2660
Cistina	0,28±0,03[a]	0,46±0,03[b]	0,41±0,04[b]	**0,0111**
Isoleucina	1,28±0,04	1,42±0,04	1,35±0,05	0,1489
Leucina	1,84±0,09	1,56±0,08	1,65±0,09	0,1104
Fenilalanina	1,15±0,06	1,10±0,03	1,15±0,04	0,6725
Lisina	4,05±0,19	4,90±0,16	5,15±0,32	0,2022
Taurina	5,19±0,24	5,33±0,22	5,42±0,32	0,8375
Soma dos Aminoácidos	37,74±1,69	40,96±1,19	39,33±0,91	0,2251

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

5.7 Parâmetro tecidual

5.7.1 Proteínas e RNA totais no músculo

Nota-se, na Figura 8, que não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação à concentração de proteína muscular durante o experimento (*p*>0,05).

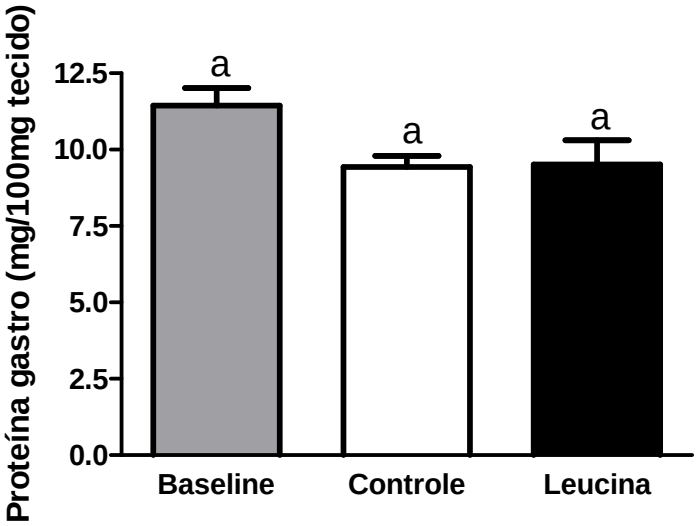

Figura 8: Concentração de proteína no músculo.
Os valores não apresentaram diferença estatística (p>0,05). Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

De acordo com a Figura 9, o grupo leucina não apresentou alteração na concentração de RNA quando comparado aos demais grupos experimentais. No entanto, a concentração de RNA no grupo controle foi significativamente menor do que o grupo adulto.

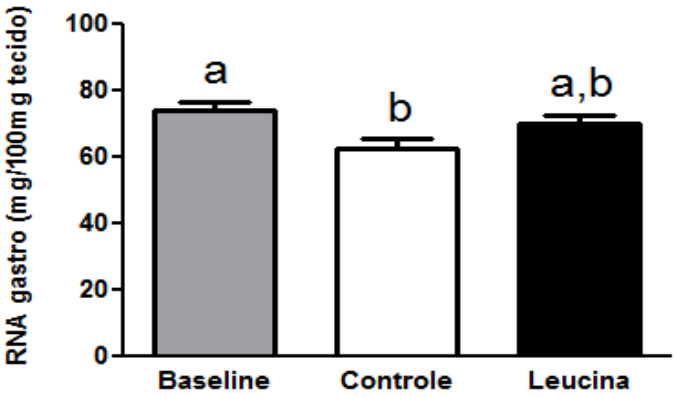

Figura 9: Concentração de RNA no músculo.

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

5.7.2 Proteínas e RNA totais no fígado

A Figura 10 apresenta os valores das concentrações de proteína hepática. Ao contrário da concentração de proteína muscular, houve diferença entre todos os grupos experimentais em relação à proteína hepática, sendo que o grupo leucina e o grupo controle apresentaram maior quantidade de proteína no fígado, quando comparado com o grupo adulto, e o grupo leucina teve menor quantidade de proteína do que o grupo controle (p=0,05).

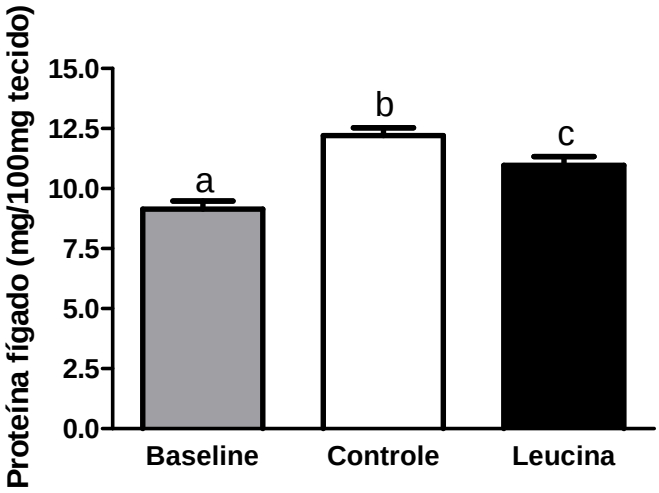

Figura 10: Concentração de proteína no fígado.

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não apresentam diferença estatística. Grupo adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

Quando comparadas as concentrações de RNA no fígado entre os grupos foi verificado que os animais dos grupos leucina e controle possuem quantidades semelhantes de RNA com o grupo adulto (p>0,05), (Figura 11).

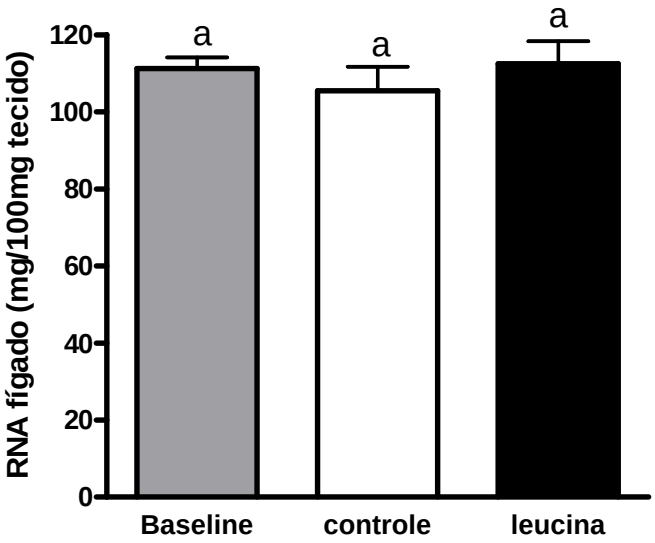

Figura 11: Concentração de RNA no Fígado.

Os valores que apresentam pelo menos uma letra em comum não possuem diferença estatística. Grupo Adulto (6 meses, n=10), grupo de referência. Grupo Controle (16 meses, n=17), com ração controle contendo 4% de aminoácidos não essenciais; e Grupo Leucina (16 meses, n=13), com ração contendo 4% de leucina.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou o efeito da suplementação com leucina sobre a composição corporal e os parâmetros teciduais, bioquímicos e metabólicos, em ratos durante o processo de envelhecimento. A hipótese testada foi de que a suplementação crônica com leucina poderia alterar favoravelmente a composição corporal, mediante a redução da gordura corporal, atenuando a perda de massa magra, por promover a síntese protéica.

Cabe ressaltar que os dados obtidos neste estudo apontam que os animais com idade de 16 meses apresentam sinais de envelhecimento, pois, quando comparados com o grupo adulto, mostraram diferenças típicas deste período, como aumento da gordura corporal, redução do estado nutricional protéico e alteração de indicadores do perfil glicêmico e lipídico.

Estudos com humanos e ratos idosos constataram decréscimo no estímulo da síntese protéica muscular, após o consumo de uma refeição normoprotéica. A origem desta alteração permanece obscura, uma vez que esta síntese responde normalmente quando uma grande quantidade de aminoácidos é fornecida aos idosos. (DARDEVET *et al*., 2002; RIEU *et al*., 2003; KATSANOS *et al*., 2006; HOUSTON *et al*., 2008).

Na literatura existem evidências que indicam que a maior ingestão de leucina pode reduzir a gordura e o peso corporal, melhorar a glicemia e elevar a síntese protéica (MOURIER *et al*., 1997; ANTHONY *et al*., 2000; CROZIER *et al*., 2005; DARDAVETE *et al*., 2002; COMBARET *et al*., 2005; RIEU *et al*., 2006; RIEU *et al*., 2007). Diante do exposto, a presente pesquisa avaliou os efeitos da suplementação com leucina por 40 semanas em animais durante o processo de envelhecimento.

No presente estudo, a intervenção nutricional com leucina a 4% na ração resultou em menor ganho de peso corporal que a dieta controle. Como suporte para este dado, o grupo leucina apresentou menor peso da carcaça quando comparado com o grupo controle. Este achado é contraditório a outras pesquisas com animais envelhecidos e suplementados com leucina, as quais mostram que não há diferença entre os grupos experimentais em relação ao peso corporal (Rieu *et al*., 2003; 2007;

Dardevet *et al*., 2002; Combaret *et al*., 2005). Por outro lado, esses estudos não utilizaram protocolo experimental crônico e sim agudo, o que difere do presente estudo. Assim, os dados deste trabalho sugerem que a leucina é eficaz em reduzir o peso corporal quando é suplementada durante um período prolongado de tempo.

Uma possível explicação para a redução do peso corporal poderia estar vinculada ao menor consumo alimentar. Contudo, não houve diferença entre os grupos experimentais em relação ao consumo de rações, como também foi observados nos estudos referenciados a cima. Em contrapartida, no trabalho de Rieu *et al*. (2007) o grupo que recebeu maior quantidade de leucina apresentou menor consumo de ração comparado com o controle.

Nesse sentindo, Cota *et al*. (2006) mostraram que administração de leucina intracerebroventricular ativa a via da mTOR no hipotálamo e suprime o consumo alimentar em ratos. Neste mesmo estudo, a administração oral de leucina não interferiu no consumo alimentar. A possível explicação para a discrepância aparente inclui as doses e as vias de oferta deste aminoácido, bem como a diferença das espécies e a idade. Cabe ressaltar que isto não impede o possível envolvimento do sistema nervoso central na mediação dos efeitos da leucina no gasto de energia, tanto em animais que receberam administração centralizada quanto nos que receberam por via oral (ZHANG *et al*., 2007).

Essa diferença em relação ao peso corporal ainda poderia estar relacionada a dois fatores. Primeiro, a diferença da composição das rações experimentais, em que uma recebe adição do aminoácido essencial leucina e a outra uma mistura de aminoácidos não essenciais (Tabela 1). Existem evidências de que dietas com maior proporção de proteínas, principalmente aminoácidos de cadeia ramificada, promovem maior perda de peso quando comparada à dieta de mesmo valor calórico (LAYMAN *et al*., 2003; 2005). No entanto, as duas rações eram isocalórias, isoprotéicas e isonitrogenadas, ou seja, possuiam a mesma quantidade de calorias, proteínas e nitrogênio (Tabela 3). Sendo assim, o efeito da dieta na redução do peso corporal pode ser atribuído à leucina. De fato, estudos têm sugerido que parte dos efeitos benefício de dietas com grandes quantidades de proteínas é atribuída à leucina. Segundo esta hipótese, a maior oferta deste aminoácido não seria apenas

para aumentar a disponibilidade de substratos para a síntese protéica, mas também por estimular processos anabólicos (LAYMAN e WALKER, 2006).

A leucina é precursora da síntese protéica por estimular vias intracelulares associadas com esse processo como, por exemplo, aumento e ativação dos ribossomos – aparatos celulares responsáveis pelo processo de tradução protéica, resultando em maior capacidade celular para síntese de proteínas (LYNCH *et al.*, 2002; CROZIER *et al.*, 2005). A composição corporal dos animais pode ser considerada outra variável que poderia influenciar na alteração do peso corporal. Os dados obtidos sobre esse componente mostraram que os animais que consumiram a ração com 4% de leucina apresentaram menor peso na somatória dos tecidos adiposos e % de gordura corporal do que os animais do grupo controle, como pode ser observado nas Figura 6 e Figura 7. Em concordância com esses dados, Mourier et al. (1997) e Zhang *et al.* (2007) observaram que o aumento no consumo de leucina resultou na redução de 48% do tecido adiposo visceral e 25% da gordura corporal.

Desta maneira, observa-se, neste estudo, que a perda de peso é composta principalmente de gordura corporal. Algumas hipóteses foram propostas para explicar os efeitos favoráveis da dieta com maior proporção de leucina na composição corporal: 1) ocorre ativação da via de sinalização protéica no adipócito, principalmente da via da mTOR (LYNCH *et al.*, 2000); 2) maior expressão da proteína desacopladora 3 (UCP-3) nos tecidos adiposos e músculo esquelético, cuja qual tem implicação na regulação da temperatura, do gasto energético e do peso corporal (BOSCHINI e GARCIA JUNIOR, 2005; ZHANG *et al.*, 2007); 3) maior concentração de leptina, pelo fato da leucina estimular a secreção deste hormônio (ROH *et al.*, 2003). A leptina regula o peso corporal por controlar a saciedade, o consumo alimentar e a temperatura corporal, além de favorecer a lipólise e o gasto energético (LYNCH *et al.*, 2006). 4) Aumento da síntese protéica no músculo esquelético, por ativação da via de sinalização da mTOR (VIANNA, TEODORO, TIRAPEGUI, 2008). No presente estudo, essas proteínas envolvidas na sinalização celular e na UCP-3 não foram determinadas, fato que limita uma discussão com base nesses parâmetros.

Todavia, foi constatado que a maior redução de gordura corporal observada no grupo leucina não está associada aos conteúdos de massa magra ou de proteína da carcaça dos animais suplementados, pois não houve diferença significativa nestes parâmetros entre o grupo leucina e o grupo controle. Apenas houve diferença no grupo adulto quando comparado com os demais grupos. Os dados da massa magra e da % de proteína na carcaça dos grupos de animais envelhecidos (leucina e controle), quando comparados com os animais adultos, indicaram que com o processo de envelhecimento há declínio da massa magra e que a suplementação com leucina não foi capaz de reverter isso. Embora, neste estudo, a suplementação com leucina não tenha sido eficaz em atenuar a perda de massa magra que ocorre com o processo de envelhecimento, evidências experimentais sugerem que a leucina atenua o declínio muscular que ocorre com avanço da idade.

Nesse contexto, alguns estudos demonstraram que o músculo envelhecido é menos responsivo ao efeito anabólico da concentração fisiológica de leucina. Todavia, o mesmo ainda é capaz de responder a estes efeitos quando o consumo deste aminoácido é aumentado, conduzindo à restauração da síntese protéica e à inibição da degradação de proteínas (DARDEVET *et al*., 2002, KATSANOS *et al*., 2006; COMBARET *et al*., 2005; RIEU *et al*., 2003, 2006 e 2007; KOOPMAN *et al.*, 2006).

Dardevet *et al*. (2002) mostraram que a suplementação com leucina favoreceu a síntese protéica muscular em ratos envelhecidos e que esse estímulo foi similar ao observado em ratos adultos. Sendo assim, a suplementação aguda com leucina é eficaz em restaurar a síntese protéica muscular pós-prandial em ratos envelhecidos. Nesse contexto, Rieu *et al*. (2006) também encontraram efeito da suplementação aguda com leucina na síntese protéica muscular de sujeitos idosos. Este efeito foi devido ao aumento da disponibilidade de leucina. Haja vista que sua concentração plasmática foi maior no grupo suplementado com leucina do que no grupo controle.

Além disso, em um estudo realizado em nosso laboratório, ratos adultos foram submetidos a 3 ciclos de restrição alimentar, intercalados por recuperação nutricional e suplementação crônica com leucina e fenilalanina. Foi verificado

aumento significativo no conteúdo de proteína corporal (+17,7 %) e de massa magra (+11,3 %) na carcaça dos animais suplementados, quando esses resultados foram comparados aos obtidos de ratos submetidos à mesma variação de peso e sem suplementação (DONATO *et al.*, 2007).

Por outro lado, um estudo conduzido por Koopman et al. (2007) sugeriu que o consumo de uma bebida padronizada com carboidrato mais proteína hidrolisada e adição de leucina, seguido de exercício físico, não elevou a taxa de síntese protéica muscular em idosos quando comparado ao grupo que recebeu a bebida com carboidrato mais proteínas hidrolisadas.

A ausência de efeitos em relação à porcentagem de massa magra e à porcentagem de proteína na carcaça dos animais do grupo leucina pode ser atribuída a três fatores: 1) as concentrações plasmáticas de leucina; a 2) proteólise muscular e 3) o tempo de suplementação. Os animais dos grupos leucina e controle apresentaram concentração sérica de leucina semelhante ao grupo adulto. Uma vez que há diminuição da sensibilidade, a leucina na síntese protéica muscular em ratos idosos e na via de sinalização celular é menos responsiva ao aminoácido, pois é necessário que ocorra maior concentração de leucina sérica para que a síntese protéica seja estimulada no músculo esquelético (DARDEVET *et al.*, 2003).

Nesse contexto, Dardevet *et al.* (2000) constataram que um dos substratos modulados pela via do mTOR foi estimulado pela leucina em ambos os animais, adultos e idosos, e essa ativação ocorreu porque houve aumento na concentração de leucina sérica (110 vs 260 µmol/l, respectivamente). Em conformidade com esses dados, outros estudos realizados com humanos idosos também constataram que para ocorrer a síntese protéica muscular é necessário o aumento na disponibilidade de leucina plasmática (RIEU *et al.,* 2006; KATSANOS *et al.*, 2006; RÉMON *et al.*, 2007).

O que difere o presente trabalho dos demais estudos citados é o tempo de jejum para a coleta de sangue. O nosso estudo apresentou 5 horas de jejum enquanto que nos demais trabalhos citados acima o tempo de jejum variou entre 30 minutos e 7 horas, lembrando que existe diferença entre o ser humano e o animal. Provavelmente, o período de 5 horas de jejum adotado no protocolo deste estudo

tenha equalizado as concentrações de aminoácidos sanguíneos. Talvez, se tivéssemos coletado o sangue logo após o animal receber uma refeição (após 40 minutos), por exemplo, teríamos a concentração de leucina sérica aumentada, haja vista que a suplementação a 4% de leucina é o suficiente para aumentar a concentração sanguínea deste aminoácido.

Alguns estudos relatam que quando há aumento na circulação de leucina pode ocorrer redução de outros aminoácidos essenciais (NAIR *et al.*, 1992; TOM e NAIR, 2006), vendo que o efeito mais evidente é na redução de isoleucina e de valina, porque existe antagonismo entre os ACR. No entanto, o presente estudo apresentou concentrações semelhantes de isoleucina e valina nos grupos experimentais; estes resultados estão de acordo com outras pesquisas (DARDEVET *et al.*, 2002; RIEU *et al.*, 2003). Por outro lado, o grupo adulto apresentou menores concentrações de ácido as pártico, serina, treonina, prolina e cistina. Isso pode ser justificado pelo fato do grupo adulto ter recebido a ração providenciada pelo biotério, sendo que sua composição é diferente das rações fornecidas aos outros dois grupos experimentais. Sendo assim, a possível explicação para esse achado seria que a suplementação com leucina possa até ter favorecido a síntese protéica, mas isso não foi suficiente para superar a degradação protéica, a ponto de preservar a quantidade de proteína e massa magra corporal.

Cabe ressaltar que os efeitos da leucina sobre a síntese protéica no músculo esquelético não estão sempre associados ao estímulo na síntese protéica. De fato, pesquisas constataram que a infusão intravenosa de altas doses (3 a 7 g) de leucina produziram modificações anabólicas no turnover protéico e no balanço nitrogenado (PLATELL *et al.*, 2000; MATTHEWS, 2005), possivelmente por promover a supressão da proteólise no músculo sem apresentar efeito adicional sobre a síntese protéica. Em contrapartida, baixas doses de leucina otimizam a síntese protéica no músculo; contudo, não demonstram efeito sobre a proteólise deste tecido.

Diante disso, é sugerido que a dose de leucina capaz de causar efeitos máximos sobre a degradação protéica pode ser maior do que a necessária para causar efeitos máximos sobre a síntese de proteínas em condições de balanço nitrogenado negativo. Estes resultados tornam-se relevantes, haja vista que a perda

do músculo em estado catabólico poderia ser revertida pela suplementação de leucina em doses específicas (ZANCHI, NICASTRO e LANCHA, 2008). Lynch *et al.* (2002) levantaram a hipótese de que possam existir efeitos exclusivos da leucina em tecidos específicos e que os mecanismos envolvidos na síntese protéica possam ser diferentes aos efeitos agudo e crônico da suplementação com leucina. Talvez esta hipótese explique o efeito da leucina na gordura corporal e não na massa magra.

Em relação aos parâmetros séricos, sabe-se que a leucina é secretagogo do hormônio insulina e que elevadas concentrações deste hormônio inibem a proteólise e estimulam a síntese protéica e a captação dos aminoácidos (BIOLO, DECLAN FLEMING e WOLFE, 1995). Porém, nota-se, neste trabalho, que o grupo suplementado com leucina não alterou as concentrações sérica de insulina e de IGF-1 quando comparado ao grupo controle; estes dados estão de acordo com a literatura (ANTHONY *et al.*, 2000; DARDEVET *et al.*, 2002; LYNCH, *et al.*, 2002; RIEU *et al.*, 2003).

A suplementação com leucina na ração não reverteu o efeito induzido pelo processo de envelhecimento associado ao perfil lipídico e à glicemia. Diversos estudos têm relatado que o avanço da idade está relacionado a alterações no perfil lipídico, incluindo aumento de LDL, triglicérides e colesterol total (HEITMANN, 1996; SCHUBERT *et al.*, 2006). Por outro lado, alguns estudos mostram que a suplementação com ACR, especialmente a leucina, reduz o colesterol plasmático e o LDL-colesterol, independentemente da redução do peso corporal (TEPLAN *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2007) mostraram que os animais que consumiram dieta rica em gordura, suplementada com leucina durante 14 semanas, diminuíram o colesterol total em 27% ($p<0,01$) e o LDL-colesterol em 53% ($p<0.001$), ainda preveniu a indução da hiperglicemia, mantendo a glicemia normal e diminuindo a concentração plasmática de insulina. Mais recentemente, Nairizi *et al.* (2009) constaram que a suplementação com leucina em dieta rica em gordura por 15 semanas não melhorou as concentrações de colesterol e de triglicérides sanguíneo. A possível explicação para a discrepância entre esses resultados ainda não está definida.

Cabe salientar que o presente estudo não encontrou diferença significativa entre o grupo leucina e o grupo controle a respeito da concentração sérica de glicose e de insulina séria. Além disso, o índice de HOMA, que é um indicativo do grau de resistência periférica à insulina, não foi diferente entre esses dois grupos experimentais.

Todos esses resultados indicam que apesar da leucina favorecer a redução de gordura corporal, os animais do grupo leucina ainda apresentavam expressivo aumento de gordura corporal quando comparado ao grupo adulto. Assim, a suplementação com leucina não foi eficaz em melhorar parâmetros metabólicos indicativos de risco de doenças crônicas não transmissíveis (resistência à insulina, glicemia, insulinemia, perfil lipídico). Talvez a leucina só seria eficaz nesses parâmetros séricos se os animais perdessem mais gordura corporal.

O presente estudo também testou a hipótese de que a suplementação com leucina durante 40 semanas poderia melhorar parâmetros metabólicos indicadores do estado nutricional protéico, em ratos envelhecidos. Entretanto, o grupo que recebeu dieta rica em leucina não apresentou alterações significativas na concentração sérica de proteína total em relação ao grupo controle e nem alterações nos conteúdos de RNA e de proteínas totais teciduais em relação ao outros grupos experimentais. Com exceção da concentração sérica de albumina e de proteína no fígado, em que o grupo leucina apresentou menor conteúdo do que os demais grupos experimentais. Uma possível explicação para esse resultado seria que no fígado não há expressão da enzima aminotransferases de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR) envolvida no metabolismo dos ACR (LYNCH *et al.*, 2002; ROGERO e TIRAPEGUI, 2008). O conteúdo de aminoácido no fígado é extremamente importante para a síntese de proteínas essenciais, como a albumina (NAIR e SHORT, 2005), mas, como mostrado no presente estudo, o conteúdo de proteína no fígado dos animais que receberam leucina foi menor do que nos demais grupos, podendo, assim, interferir na síntese da albumina por não haver substratos para esse processo.

Cabe ressaltar que por mais que não tenha ocorrido alteração no conteúdo de RNA tecidual, isso não significa que não houve síntese protéica. Segundo o estudo

conduzido por Lynch *et al.* (2002), a suplementação com leucina, durante 12 dias aumentou a taxa de síntese protéica no músculo gastrocnêmio de ratos com ração ad libitum. Esses autores notaram, também, que a suplementação não alterou a concentração de RNA neste tecido, atribuindo à maior eficiência do processo de tradução o efeito encontrado na taxa de síntese protéica. De fato, tem sido verificado que a suplementação, tanto aguda quanto crônica, de leucina aumenta a taxa de síntese protéica (ANTHONY *et al*., 2001; LYNCH *et al*., 2002; KIMBALL e JEFFERSON, 2006). Isto ocorre porque a leucina estimula eventos moleculares, que ainda não são totalmente compreendidos, mas que envolvem a ativação da mTOR, que é responsável pelo desencadeamento de uma cascata de reações intracelulares que ativam o processo de tradução protéica (ANTHONY *et al*., 2001; LYNCH *et al*., 2002; KIMBALL e JEFFERSON, 2006, VIANNA, TEODORO, TIRAPEGUI, 2008).

Pelo presente estudo fica difícil afirmar que houve efeito da suplementação com leucina na síntese protéica muscular, pois os dados verificados não mostram alterações nesses parâmetros. Além disso, não foi analisado nenhum componente da cascata de ativação da síntese protéica e nem da via de degradação protéica. Surgindo, assim, novos questionários: o aminoácido leucina favoreceu a síntese protéica e essa não foi suficiente para atenuar a degradação protéica ou se realmente a suplementação com leucina não foi eficaz em estimular a síntese protéica. Também pode haver mecanismos diferentes para a ação da leucina quando oferecida de forma crônica ou aguda. Assim, embora a disponibilidade aguda de leucina seja um potente estímulo para a síntese protéica, estes dados revelam pela primeira vez que, a longo prazo, possíveis mecanismos compensatórios impedem que a leucina cause melhora significativa de parâmetros indicadores do estado nutricional protéico de ratos suplementados durante o período de envelhecimento.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo indicam que a suplementação com leucina durante 40 semanas teve efeito positivo na composição corporal, favorecendo a redução de gordura corporal.

Apesar da suplementação crônica com leucina ter reduzido a gordura corporal, esta não foi eficaz em melhorar parâmetros metabólicos indicadores de doenças crônicas não transmissíveis e nem o estado nutricional protéico.

Apesar de vários estudos demonstrarem que a leucina favorece agudamente a síntese protéica em idosos, os resultados do presente estudo tornam-se relevantes por mostrar que a suplementação crônica com leucina não atenuou o declínio da massa magra que ocorre com o processo de envelhecimento.

8 REFERÊNCIAS

ANTHONY, J.C.; YOSHIZAWA, F.; ANTOHONY, T.C.; VARY, T.C.; JEFFERSON L.S.; KIMBALL, S.R. Leucine stimulates translation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rampamycin-sensitive pathway. **J. Nutr.** v.130, p. 2413-2419, 2000.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. **J. Nutr.**, v.131, p.1171-1176, 2001.

ANTHONY, J.C.; REITER, A.K.; ANTHONY, T.G.; CROZIER, S.J.; LANG, C.H.; MACLEAN, D.A.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. **Diabetes**. v. 51, p. 928–936, 2002.

ARTERBURN, D.E.; CRANE, P.K.; SULLIVAN, S.D. The coming epidemic of obesity in elderly Americans. **J. Am. Geriatr. Soc**. v. 52, p. 1907-1912, 2004.

BALAGOPAL, P.; PROCTOR, D.; NAIR, K.S. Sarcopenia and hormonal changes. **Endocrinol.** v. 7, p. 57–60, 1997.

BERGMEYER, H.U. Determination with glucose oxidase and peroxidase.In: _____. **Methods of enzymatic analyses**, p. 1205-1212, 1974.

BIOLO, G.; DECLAN FLEMING, R.Y.; WOLFE, R.R. Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle. **J. Clin. Invest**. v.95, p. 811-819, 1995.

BOSCHINI, R. P., GARCIA JUNIOR, J. R. Regulação da expressão das UCP2 e UCP3 pela restrição energética, jejum e exercício físico. **Rev. Nutr**. v.18, n. 6, p.753-764, 2005.

BROSS, R.; JAVANBAKHT, M.; SHALENDER, B. Anabolic interventions for aging-associated sarcopenia. **J. Clinical. Endocrinol. Metab**. v. 84, n. 10, p. 3420-3430, 1999.

CAMPBELL, W.W.; TRAPPE, T.A.; WOLFE, R.R.; EVANS, W.J. The recommended dietary allowance for protein may not be adequate for older people to maintain skeletal muscle. **J. Geront. Bio. Sci. Med. Sci.** v. 56, p. 373–80, 2001.

CAMPBELL, W.W.; TRAPPE, T.A.; JOZSI, A.C.; KRUSKALL, L.J.; WOLFE, R.R.; EVANS, W.J. Dietary protein adequacy and lower body versus whole body resistive training in older humans. **J. Physiol**. v. 542, p. 631–42, 2002.

CARLSON, B.M. Factors influency the repair and adaptation of muscles in aged individuals. **J. Gerontol.** v. 50A, p. 96–100, 1995.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Unicamp, 1999.

COMBARET, L.; DARDEVET, D.; RIEU, I.; POUCH, M.N.; BÉCHET, D.; TAILLANDIER, D.; GRIZARD, J.; ATTAIX, D. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. **J. Physiol**. v. 569, p. 489-499, 2005.

CROZIER, J.S.; KIMBALL, S.R.; EMMERT, S.W.; ANTHONY, J.C.; JEFFERSON, L.S. Oral administration stimule protein synthesis in rat skeletal muscle. **J. Nutr.** v. 135, p. 376-386, 2005.

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. 927–930, 2006.

DARDEVET, D.; SORNET, C.; BALAGE, M.; GRIZARD, J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **J. Nutr.** v. 130, p. 2630-2635, 2000.

DARDEVET, D.; SORNET, C.; BAYLE, G.; PRUGNAUD, J.; POUYET, C.; GRIZARD, J. Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. **J. Nutr**. v.132, p. 95–100, 2002.

DARDEVET, D.; RIEU, I.; FAFOURNOUX, P.; SORNET, C.; COMBARET, L.; BRUHAT, A.; MORDIER, S.; MOSONI, L.; GRIZARD, J. Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? **Nutr. Res. Rev**. v.16, p 61-70, 2003.

DOHERTY, J.T. Aging and sarcopenia. **J. Appl. Physiol**. v. 95, p. 1717-1727, 2003.

DONATO, J.Jr.; PEDROSA, R.G.; CRUZAT, V.F.; PIRES, I.S.O.; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition**. v. 22, p. 520-527, 2006.

DONATO, J.JR.; PEDROSA, R.G.; ARAUJO, J.A.Jr.; PIRES, I.S.O.; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine and phenylalanine supplementation during intermittent periods of food restriction and refeeding in adult rats. **Life Sci**. v. 81, p. 31-39, 2007.

DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. **Clin. Chem. Acta.** v.31, p.87-96, 1971.

EVANS, W.J. Effects of exercise on body composition and functional capacity of the elderly. **J. Gerontol**. v. 50, p. 147–150, 1995.

FELIG, P.; MARLISS, E.; CAHILL, G.F.Jr. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. **N. Engl. J. Med**. v. 281, p. 811-816, 1969.

FOSTER, G.D.; WYATT, H.R.; HILL, J.O.; MCGUCKIN, B.G.; BRILL, C.; MOHAMMED, S.; SZAPARY, P.O.; RADER, D.J.; EDMAN, J.S.; KLEIN, S.A randomized trial of a low carbohydrate diet for obesity. **N. Engl. J. Med**. v. 348, p. 2082–90, 2003.

GOOREN, L.J.; BUNCK, M.C. Androgen replacement therapy: present and future. **Drugs.** v. 64, p. 1861 -1891, 2004.

HAGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatization And Liquid-Chromatography of Amino-Acids In Food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. v. 72, p. 912-916, 1989.

HEITMANN, B.L. The effects of gender and age on associations between blood lipid levels and obesity in Danish men and women aged 35–65 years. **J. Clin. Epidemiol**. v. 45, p. 693–702, 1996.

HENNESSEY, J.V.; CHROMIAK, J.A.; DELLA VENTURA, S.; REINERT, S.E.; PUHL, J.; KIEL, D.P.; rosen, c.j.; vandenburgh, h.; maclean, d.b. Growth hormone administration and exercise effects on muscle fiber type and diameter in moderately frail older people. **J. Am. Geriatr. Soc.** v. 49, n. 7, p. 852-858, 2001.

HENRY, R.J; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W.; In:_____. **Clinical chemistry: principles and techniques**. 2. ed., v. 1, Hargerstown: Haper & How, p. 405-502, 1974.

HOUSTON, D.K.; NICKLAS, B.J.; DING, J.; HARRIS, T.B.; TYLAVSKY, F.A.; NEWMAN, A. B.; LEE, J.S.; SAHYOUN, N.R.; VISSER, M.; KRITCHEVSKY, S.B. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults: the health, aging, and body composition (health ABC) study. **Am. J. Cinical Nutri.** v. 87, n.1. p. 150-155, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estimativas Populacionais para os municípios brasileiros em 01/07/2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2008/default.shtm> acessado em: 16/jan/2009.

JORDAN, W.P.; ATKINSON, L.E.; LAI, C. Comparison of the skin irritation potential of two testosterone transdermal systems: an investigational system and a marketed product. **Clin. Ther**. v. 20, p. 80 -87, 1998.

KATASANOS, C.S.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; AARSLAND, A.; WOLFE, R.R. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acid in the elderly. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.291, p.381-387, 2006.

KAUFMAN J.M. The effect of androgen supplementation therapy on the prostate. **Aging Male.** v. 6, p. 166 -174, 2003.

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. 227–231, 2006.

KOOPMAN, R.; VERDIJ L.k.; MANDERS, R.; GIJSEN, A.P.; GORSELINK, M.; PIIPERS, E.; WAGENMAKERS, A.J.M.; LOON, L.J.C. 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.

KOOPMAN, R.; VERDIJK, L.B.; BEELEN, M.; GORSELINK, M.; NIEUWENHUIJZEN, K.; WAGENMAKERS, A.J.M.; KUIPERS, H.; VAN LOON, L.J.C. Co-ingestion of leucine with protein does not further augment pos-exercise muscle protein synthesis rates in elderly men. **British J. Nutrition.** v. 99, p. 571-580, 2007.

KOOPMAN, R.; VERDIJK, L.B.; BEELEN, M.; GORSELINK, M.; NIEUWENHUIJZEN, K.; WAGENMAKERS, A.J.M.; KUIPERS, H.; VAN LOON, L.J.C. Co-ingestion of leucine with protein does not further augment pos-exercise muscle protein synthesis rates in elderly men. British **J. Nutri**. v. 99, p. 571-580, 2008.

LAYMAN, D.K. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. **J. Nutr.** v. 133, p. 261-267, 2003.

LAYMAN, D.K.; WALKER, D.A. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. **J. Nutr**. v. 136, p. 319-323, 2006.

LAYMAN, D.K. Dietary guidelines should reflect new understandings about adult protein needs. **Nutr. metab.** v. 13, p. 6-12, 2009.

LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. **Abridged edition.** v.1, p. 90, 1991.

LYNCH, C.J.; FOX, H.L.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S.; KIMBALL, S.R. Regulation of amino acid-sensitive TOR signaling by leucine analogues in adipocytes. **J. Cell. Biochem.** v.77, p.234–251, 2000.

LYNCH, C.J.; PATSON, B.J.; ANTHONY, J.; VAVAL, A.; JEFFERSON, L.S.; VARY, T.C. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.283, p.503-153, 2002.

LYNCH, C.J.; GERN, B.; LIOYD, S.M.; EICHER, R.; VARY, T.C. Leucine in food mediates of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v.291, p. 621-630, 2006.

MARCUS, R.; BUTTERFIELD, G.; HOLLOWAY, L.; GILLILAND, L.; BAYLINK, D.J.; HINTZ, R.L.; SHERMAN, B.N. Effects of short term administration of recombinant human growth hormone to elderly people. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v. 70, n. 2, p. 519–527, 1990.

MARCUS, R. Should all older people be treated with growth hormones? **Drug and Aging.** v. 8, p. 1–4, 1996.

MATTHEWS, D.E. Observations of branched-chain amino acid administration in humans. **J. Nutr.** v.135, p.1580-1584, 2005.

MCCARTNEY, N.; HICKS, A.L.; MARTIN, J.; WEBBER, C.E. A longitudinal trial of weight training in the elderly: continued improvements in year 2. J. **Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** v. 51, p. 425-433, 1996.

MILLER, R.A.; NANDO, N.L. Principles of animal use for gerontological research**. J. Geront. Biol. Sci.** v. 55A, n°3, p.117-123, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Proporção de idosos na população: Proporção (%) por ano segundo Região e UF Brasil, 1991, 1996-2006, ambos os sexos. Disponível em**:<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/a14uft.htm>** Acessado em: 18/nov/2008.

MOURIER, A.; GAUTIER, J.F.; De KERVILER, E.; BIGARD, A.X.; VILLETTE, J.M.; GARNIER, J.P.; DUVALLET, A.; GUEZENNEC, C.Y.; CATHELINEAU, G. Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM: effects of branched-chain amino acid supplements. **Diabetes Care.** v.20, p.385-391, 1997.

NAIRIZI, A.; SHE, P.; VARY, T.C.; LYNCH, J. Leucine supplementation of drinking water does not alter susceptibility to diet-induced obesity in mice. **J. Nutr.** v.139, p. 1-5, 2009.

NAIR ,K.S.; SCHWARTZ, R.G.; WELLE, S. Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. **Am. J. Physiol.** v. 263, p. 928-934, 1992.

NAIR ,K.S.; SCHWARTZ, R.G.; WELLE, S.; BRAIMAN, T. Effect of leucine on amino acid and glucose metabolism in humans. **Metabolism.** v. 42, p. 643-648, 1992.

NAIR, K.S.; SHORT, K.R. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. **J. Nutr.** v. 135, p. 1547-1552, 2005.

NORTON, L.E.; LAYMAN, D.K.; BUNPO, P.; ANTHONY, T.G.; BRANA, D.V.; GARLICK, P.J. The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. **J. Nutr.** v. 139, p.1103-1109, 2009

PADDON-JONES, D.; SHORT, K.R.; CAMPBELL, W.W.; VOLPI, E.; WOLFE, R.R. Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. **Am. J. Clinical. Nutrition.** v. 87, n° 5, p. 1562-1566, 2008.

PADDDON-JONES, D.; RASMUSSEN, B. Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia. **Curr. Opin. Nutr. Metab. Care**. v. 12, p. 86-90, 2009.

PAGE, S.T.; AMORY, J.K.; BOWMAN, F.D.; ANAWALT, B.D.; MATSUMOTO, A.M.; BREMNER, W.J.; TENOVER, J.L. Testosterone replacement therapy for older men exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum T. **J. Cli. Endocrinol. metab**. v. 90, n. 3, p. 1502-1510, 2005.

PAPALÉO NETTO, M. Gerontologia: **A velhice e o envelhecimento em visão Globalizada**. São Paulo: Atheneu, 1999.

PLATELL, C.; KONG, S.E.; MCCAULEY, R.; HALL, J.C. Branched-chain amino acids. **J. Gastroenterol. Hepatol**. v.15, p.706-717, 2000.

PROCTOR, D.N.; BALAGOPAL, P.; NAIR, S. Age-Related Sarcopenia in Humans Is Associated with Reduced Synthetic Rates of Specific Muscle Proteins. **J. Nutr.** v.128, p.351–355, 1998.

PROUD, C.G. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. **Eur. J. Biochem.** v. 269, p. 5338-5349, 2002.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. 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.** v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RÉMOND, D.; MACHEBEUF, M.; YVEN, C.; BUFFIÈRE, C.; MIOCHE, L.; MOSONI, L.; MIRAND, P.P. Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal isinfluenced by chewing efficiency in elderly subjects. **J. Clin. Nutr.** v.85, p. 1286–1292, 2007.

RIBEIRO, S.M.; DONATO, J.J.; TIRAPEGUI, J. Nutrição e envelhecimento. In: **Nutrição, Fundamentos e Aspectos Atuais.** TIRAPEGUI, J. 2 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 10, 2006, p. 127-142.

RIEU, I.; SORNET, C.; BAYLE, G.; PRUGNAUD, J.; POUYET, C.; BALAGE, M.; PAPET, I.; GRIZARD, J.; DARDEVET, D. leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postrandial muscle protein synthesis in old rats. **J. Nutr.** v.133, p. 1198-1205, 2003.

RIEU, I.; BALAGE, M.; SORNET, C.; GIRAUDET, C.; PUJOS, E.; GRIZARD, J.; MOSONI, L.; DARDEVET, D. leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. **J. Physiol.** v.575, p. 305-315, 2006.

RIEU, I.; BALAGE, M.; SORNET, C.; DEBRAS, E.; RIPES, S.; ROCHON-BONHOMME, C.; POUYET, C.; GRIZARD, J.; DARDEVET, D. Increase availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. **Nutrition.** v. 23, p. 323-331, 2007.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Rev. Bras. Ciências Farm**. v. 44, p. 563-574, 2008.

ROH, C.; HAN, J.; TZATSOS, A.; KANDROR, K.V. Nutrient-sensing mTOR mediated pathway regulates leptin production in isolated rat adipocytes. **Am. J. Physiol. Endocrionol. Metab.** v. 284, p. 322-330, 2003.

ROSENBERG, I.G. Sarcopenia:origins and clinical relevance. **J. Nutr**. v. 127, p. 990-991, 1997.

ROUBENOFF, L.P.; HUGHES, V.A. Sarcopenia: current concepts. **J. Gerontol. A. boil. Sci. Med. Sci.** v. 55, p. 716-24, 2000.

ROUBENOFF, R.; CASTANEDA, C. sarcopenia-understanding the dynamics of aging muscle. **JAMA.** v. 286, p. 1230-1231, 2001.

ROUBENOFF, R. Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics. **Obes. Res.** v. 12, p. 887-888, 2004.

SCHUBER,C.M., ROGERS N.L., REMSBERG E. K., SUN S.S., CHUMLEA W.C.,DEMERATH E.W., Czerwinski S.A., Towne B.,Siervogel R.M. Lipids, lipoproteins, lifestyle, adiposity and fat-free mass during middle age: the Fels Longitudinal Study. **Int. J. Obes.** v. 30, p. 251-260, 2006.

SHE, P.; VAN HORN, C.; REID, T.; HUTSON, S.M.; COONEY, R.N.; LYNCH, C.J. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. **Am. J. Physiol. Endocrionol. Metab.** v. 293, p. 1552-1563, 2007.

SHERLOCK. M.; TOOGOOD, A. A. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. **Pituitary.** v. 10, p. 189–203, 2007.

SHIMIZU, N.; YAMAGUCHI, M.; UESU, K.; GOSEKI, T.; ABIK, Y. Stimulation of prostaglandin E2 and Interleukin-1β production from old rat periodontal ligament cells subjected to mechanical stress**. J. geront. Biol. Sci**., v.55A, n°10, p.489-495, 2000.

SILVA, T.A.; FRISOLI JUNIOR, A.; PINHEIRO, M.M. Sarcopenia associada ao envelhecimento: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. **Rev. Bras. Reumatol**. v. 46, p. 391-397, 2006.

STENHOLM, S.; HARRIS, T.B.; RANTANEN, T.; VISSER, M.; KRITCHEVSKY, S.B.; FERRUCCI, L. Sarcopenic obesity –definition, etiology and consequences. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v. 11, p. 693-700, 2008.

TAAFFE, D.R.; JIN, I.H.; VU, T.H.; HOFFMAN, A.R.; MARCUS, R. Lack of effect of recombinant human growth hormone (GH) on muscle morphology and GH-insulin-like growth factor expression in resistance-trained elderly men. **J. Clinical. Endocrinol. Metab**. v. 81, p. 425-429, 1996.

TAAFFE, D.R. Sarcopenia - exercise as a treatment strategy. **Aust. Fam. Physician**. v. 35 p. 130–4, 2006.

TEPLAN, V.; SCHUCK,O.; VOTRUBA, M.; POLEDNE, R.; KAZDOVA, L.; SHIBOVA, J.; MALY, J. Metabolic effects of keto acid-amino acid supplementation in patients with chronic renal insufficiency receiving a low-protein diet and recombinant human erytropoietina randomized controlled trial. **Wien. Klin. Wochenschr**. v. 113, p. 661-669, 2001.

TENOVER, J.S. Effects of testosterone supplementation in the aging male. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v.75, p. 092–1098, 1992.

TIMMERMAN, K.L.; VOLPI, E. Amino acid metabolism and regulatory effects in aging. **Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. v.11, p. 45-49, 2008.

THOMPSON, J.L.; BUTTERFIELD, G.E.; MARCUS, R.; HINTZ. R.L.; VAN LOAN, M.; GHIRON, L.; The effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and growth hormone on body composition in elderly women. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v. 80, n. 6, p. 1845-1852, 1995.

TOM, A.; NAIR, K.S. Assessment of brached-chain amino acid status and potential for biomarkers. **J. Nutr.** v. 136, p. 324-330, 2006.

VANDERVOORT, A.A. Aging of the human neuromuscular system. Muscle. **Nerve.** v. 25, p. 17-25, 2002.

VIANNA, D.; TEODORO, G.F.R.; TIRAPEGUI, J. Leucina: novo modulador no processo de síntese protéica? **Nutrição Em Pauta**. v.16, n. 93, p.12-15, 2008.

VILLAREAL, D.; BANKS, M.; SIENER, C.; SINACORE, D.R.; KLEIN, S. Physical frailty and body composition in obese elderly mend and women. **Obes. Res**. v. 12, p. 913-920, 2004.

WALD, M.; MEACHAM, R.B.; ROSS, L.S.; NIEDERBERGER, C.S. Review testosterone replacement therapy for older men. **J. Androl**. v. 27, p. 126-132, 2006.

WALLACE, T.M.; LEVY, J.C. & MATTHEWS, D.R. Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care.** v.27, p.1487-1495, 2004.

WICK, G.; JANSEN-DURR, P.; BERGER, P.; BLASCO, I.; GRUBECK-LOEBSTEIN, B. Diseases of aging. **Vaccine**. v. 18, p. 1567-1583, 2000.

WILSON, M.M.G.; MORLEY, J.E. Aging and energy balance. **J. Appl. Physiol**. v. 95, p.1728 –1736, 2003.

WHITE, J.A.; HART, R.J.; FRY, J.C. An Evaluation Of The Waters Pico-Tag System For The Amino-Acid-Analysis Of Food Materials. **J. Automatic. Chemistry**. v.8, p. 170-177, 1986.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. **WHO Tech. Report. Series.** v.894, p.1-251, 2000.

YARASHESKI, K.E.; ZACHIEJA, J.J.; CAMPBELL, J.A.; BIER, D.M. Effect of growth hormone and resistence exercise on muscle growth and strength in older men. Am. **J. Physiol. Endocrinol. Metab**. v. 268, p. 268-276, 1995.

YARASHESKI, K.E.; PAK-LODUCA, J.; HASTEN, D.L.; OBERT, K.A.; BROWN, M.B.; SINACORE, D.R. Resistance exercise training increase mixed muscle protein synthesis rate frail women and men ≥76 yr old. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. v. 277, p. 118-125, 1999.

ZAMBONI, M.; MAZZALI, G.; FRANCESCO, F.; ROSSI, A.; DI-FRANCESCO, V. Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** v. 18, p 388-395, 2008.

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

ZHANG, Y.; GUO, K.; LEBLANC, R. E.; LOH, D.; SCHWARTZ, G. J.; YU, Y.H. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. **Diabetes.** v. 56, p.1647-1654, 2007.

ZHONG, S.; CHEN, C.N.; THOMPSON, L.V. Sarcopenia of ageing: functional, structural and biochemical alterations. **Rev. Bras. Fisioter.** v. 11, n. 2, p. 91-97, 2007.

9 ANEXOS

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, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 31 /2007

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Efeitos da suplementação crônica com leucina na composição corporal durante o envelhecimento. Estudo em ratos**" (Protocolo CEEA nº150), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Daiana Vianna** e do orientador(a) Prof. Julio Orlando Tirapegui de Toledo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 14/05/2007.*

São Paulo, 14 de maio de 2007.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br