

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição experimental

Restrição calórica e suplementação com leucina no destreinoamento físico: parâmetros lipídicos e de sensibilidade à insulina no fígado

Kelcylene Gomes da Silva

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição experimental

Restrição calórica e suplementação com leucina no destreinoamento físico: parâmetros lipídicos e de sensibilidade à insulina no fígado

Kelcylene Gomes da Silva

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr Júlio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2015

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

S586r Silva, Kelcylene Gomes da
Restrição calórica e suplementação com leucina no destreinamento físico: parâmetros lipídicos e de sensibilidade à insulina no fígado / Kelcylene Gomes da Silva. -- São Paulo, 2015.
112p.

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

Orientador : Tirapegui Toledo, Julio Orlando

1. Esporte : Nutrição I. T. II. Tirapegui Toledo, Júlio Orlando, orientador.

641.1 CDD

Kelcylene Gomes da Silva

Restrição calórica e suplementação com leucina no destreinamento físico: parâmetros lipídicos e de sensibilidade à insulina no fígado

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Júlio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

*“Coragem é a resistência ao medo, o domínio do medo -
não a ausência do medo”*

Mark Twain

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais por me ensinarem a nunca
desistir e estarem sempre ao meu lado apoiando
meus sonhos!*

DEDICATÓRIA

*Ao meu namorado Ricardo por seu
companheirismo, lealdade e amor*

AGRADECIMENTOS

Início os meus agradecimentos com a frase de Simone de Beauvoir: “Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. Abdicar é algo corriqueiro durante a pós-graduação, e conseguir se manter firme durante essa caminhada não seria possível sem a fé a existência de algumas pessoas. Sendo assim agradeço,

À **Deus**, por me proteger e me ensinar que sem fé nada é possível. Por permitir que eu convivesse com pessoas tão especiais e iluminadas.

À minha **Mãe** por mesmo não querendo a distância, me incentivou todos os dias e não me deixou faltar amor um só segundo. Ao meu **Pai**, por me fortalecer com seus conselhos e não me deixar desistir nunca. Vocês são meus exemplos de vida, caráter, conquistas e amor. Obrigada por tudo! Eu amo muito vocês!

Ao meu irmão **Kelson** e minha irmã **Kelly** por simplesmente serem quem são. Tão diferentes e tão iguais ao mesmo tempo... obrigada por serem os melhores irmãos que eu poderia ter.

À minha cunhada **Lidiane** por sempre puxar minha orelha e ser um exemplo de profissional e pessoa. Ao meu cunhado **Onofre** pelo apoio.

Aos meus sobrinhos amados **Gui** e **Davi** por serem tão lindos, inteligentes, apaixonantes e me ensinarem mesmo à distância a pureza do amor. Sinto saudade diária de vocês meus príncipes.

Ao meu namorado **Ricardo** por estar sempre ao meu lado, por aguentar minhas crises do mestrado (não foram poucas rs), me incentivar e me ajudar na realização desse projeto. Obrigada meu amor!

À minha sogrinha **Regina** e ao meu sogrinho **Mauro** por serem tão fofos e me receberem tão bem, amenizando a saudade de casa. Vocês foram muito importantes nesse momento, muito obrigada!

À **Michelle, Ulisses, Gui, Branco** por serem os melhores cunhados e sobrinho que eu poderia ganhar!

Ao **Prof. Júlio** pela oportunidade de fazer o mestrado e pela confiança depositada em mim. Os seus conselhos foram muito importantes e engrandecedores.

Ao **Leo** por me apresentar ao professor Júlio e por compartilhar comigo um pouquinho do seu conhecimento e paixão pela pesquisa. Léo, nenhuma palavra conseguiria resumir o quanto você foi importante para a realização desse projeto. Muito obrigada!

À minha maninha **Lili** por ser um anjinho na minha vida e sempre ter a palavra certa! Agradeço sempre à Deus por ter colocado você na minha vida! Saudades!

À minha maninha **Aninha Mara** por compartilhar sua sabedoria e amizade! Sinto saudade das nossas conversas por horas e horas.

À minha abelhinha-irmã-amiga **Kelly Souza** por me ajudar a trilhar os últimos meses do mestrado (não foram fáceis, né?). Obrigada pelas leituras e lanches na madrugada rs. À **Mariel** por sua amizade e positividade frente aos desafios! Obrigada meninas, que a nossa amizade dure para sempre!

A minha neguinha **Thaís Hipólito (Thatha)** pelas conversas e leituras incansáveis. Quantas horas discutindo essa dissertação e os planos futuros? Rs Muito obrigada neguinha, você foi fundamental para que esse momento chegasse.

Ao **Chris**, o melhor iniciação científica que alguém poderia ter! Não era meu, mas eu “roubei” e tornou o dia-a-dia no laboratório mais feliz! Volta logo!

À **May, Lala e Nice** por mesmo estando longe cuidaram de mim como sempre! Meninas vocês são e sempre serão minhas “amigas lindas”! Amo vocês!

À **Verônica (Vê)** por sua amizade! Vêvê que sufoco essa jornada hein? Foi muito bom compartilhar com você as disciplinas e os desesperos da pós! Rs.

Às queridas **Leilinha e Lu** pelas conversas e risadas independente da loucura do dia-a-dia!

À duplinha **Bru e Grazi** por compartilharem suas experiências e o biscoito (bolacha) rs na hora do lanche.

Às amigas **Jaque e Raquel** pelos momentos compartilhados dentro e fora da USP.

À **Lurdinha** pelo café maravilhoso que me salvou várias vezes nas horas em que o cansaço falava mais alto.

Ao **Guto, Ilana, Lu e Fe (Santa)** pelo carinho e amizade! Espero que a ponte Nordeste-Sudeste-Sul dure para sempre!

A **Lu Nishi** por permitir fazer parte desse projeto e por ser minha amiga japa mais linda e fofa! Lulu, a sua doçura e simplicidade são exemplos que vou levar sempre comigo.

À **Ivi** por ter me ajudado na realização das análises e seu carinho de mãe e conselhos! Obrigada neguinha.

Ao **João Alfredo** por também ter me aceito no projeto e ter me ajudado na execução desse mestrado.

Ao pessoal do laboratório de Nutrição e Câncer, em especial a **Ju e May** pela amizade e as conversas no corredor rs.

À *Mônica, Edilson e Roberta* por aguentarem minhas dúvidas incansáveis e sempre me tratarem com carinho.

Aos demais amigos (as) e familiares que não foram citados mas, contribuíram de alguma forma para a concretização desse trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

SILVA, K.G. **Restrição calórica e suplementação com leucina no destreinoamento físico: parâmetros lipídicos e de sensibilidade à insulina no fígado.** Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

INTRODUÇÃO: O treinamento físico promove ao indivíduo benefícios morfológicos, fisiológicos e funcionais. Contudo, o afastamento temporário ou permanente da rotina de treinamento (destreinoamento físico), pode resultar em rápido aumento de peso, dislipidemia, inflamação e resistência à insulina. Em contrapartida, a restrição calórica é uma alternativa nutricional utilizada para perder peso e tem sido associada à ativação de vias envolvidas no metabolismo lipídico, sensibilidade à insulina e inflamação. Além disso, a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada é uma prática comum entre atletas e dentre eles, a leucina demonstra estimular a síntese proteica, a oxidação de ácidos graxos e o metabolismo da glicose. Visto isso, sugere-se que a associação dessas duas intervenções nutricionais possa atenuar os danos no fígado decorrentes do destreinoamento físico. **OBJETIVOS:** Verificar se a restrição calórica de 30% associada ou não à suplementação com 5% de leucina atenua as alterações no perfil lipídico, na inflamação e na via de sinalização da insulina no fígado de animais submetidos ao destreinoamento físico. **MÉTODOS:** Foram utilizados 64 ratos *Sprague-Dawley*, machos e adultos. Os animais foram distribuídos em grupo controle (CON; n=16) e treinado (TR; n=48). Em seguida, os animais do grupo TR foram redistribuídos em 5 grupos: TR (n=16); Destreinoamento (DT; n=8); DT + Suplementação com leucina (LEU; n=8); Grupo DT + Restrição Calórica (RC; n=8); Grupo DT+ RC + LEU (LEU+RC; n=8). A eutanásia ocorreu no final da 14ª semana e foram analisados: consumo de ração, peso corporal, composição corporal, sensibilidade à insulina, tolerância à glicose, concentração de triglicerídeos e colesterol no fígado, adipocinas no soro (adiponectina, leptina, IL-6, IL-10) e no fígado (IL-6, IL-10 e TNF- α). Também foram mensurados no fígado parâmetros moleculares, incluindo a atividade de ligação do NF- κ B, e expressão das proteínas SIRT-1, pAMPK_{Thr172}, AKT total, pAKT₃₀₈ e FoxO1; e os genes PEPCK, PPAR- α , SREBP-1c, FAS e ACC. **ESTATÍSTICA:** A normalidade foi previamente analisada pelo teste *Shapiro-Wilk*. As variáveis nas quais a normalidade não foi confirmada, procedimentos não paramétricos foram utilizados. Os dados foram expressos em média e desvio padrão e o Teste T de Student foi utilizado para amostras independentes. As comparações entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, para identificação dos contrastes significantes. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism versão 5.0. **RESULTADOS:** Os grupos RC e LEU+RC apresentaram peso corporal ($p<0,05$) e % de gordura da carcaça ($p<0,05$) significativamente menores do que os grupos DT e LEU. O grupo DT apresentou maior peso relativo do tecido adiposo em relação aos grupos RC e LEU+RC ($p<0,05$). A insulina sérica e o teste de tolerância à insulina não apresentaram diferença significativa. Na 13ª semana os grupos RC e LEU+RC apresentaram tolerância à glicose significativamente menor do que grupo DT ($p<0,05$). O grupo DT apresentou aumento significativo na tolerância à glicose entre a 8ª e 13ª semana ($p<0,05$). A leptina sérica foi significativamente maior no grupo DT em relação ao grupo RC e LEU+RC ($p=0,0002$), e a adiponectina sérica e a razão adiponectina/leptina não exibiu diferença significativa entre os grupos. O grupo LEU+RC apresentou concentração significativamente maior de IL-6 no soro relação o grupo LEU ($p=0,0064$), contudo houve diferença significativa na concentração de IL-10 ou na razão IL6/IL-10. A razão IL-6/IL-10 ($p=0,0214$) no fígado foi significativamente maior no grupo LEU

em relação ao grupo LEU+RC. A razão TNF- α /IL-10 foi significativamente maior no grupo DT em comparação ao grupo LEU ($p=0,0094$). A IL-6 apresentou correlação positiva com peso relativo do tecido adiposo enquanto a IL-10 apresentou correlação negativa. A atividade de ligação do NF-kB não apresentou diferença significativa. A concentração de triglicérides no fígado foi significativamente maior no grupo LEU do que no grupo LEU+RC ($p=0,0127$). A concentração de colesterol foi significativamente maior no grupo DT em comparação ao grupo RC ($p=0,0115$). Nos parâmetros moleculares a expressão da SIRT-1 foi significativamente maior nos grupos RC e LEU+RC em comparação ao grupo DT ($p<0,0005$) e a expressão das demais proteínas não exibiram diferença significativa. O grupo LEU+RC apresentou a expressão significativamente maior dos genes PPAR- α ($p=0,0034$), ACC ($p=0,0003$), FAS ($p<0,0001$) e SREBP-1c ($p=0,0032$) em relação ao grupo DT. O grupo RC apresentou expressão significativamente maior do gene SREBP-1c ($p=0,0032$) em relação ao grupo DT. **CONCLUSÃO:** A restrição calórica amenizou a concentração de colesterol no fígado e quando associada a suplementação com leucina reduziu a síntese de triglicérides nesse órgão. A razão adiponectina/leptina e o teste de OGTT indicaram melhor sensibilidade à insulina e tolerância à glicose nos grupos submetidos à restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina. A expressão dos genes SREBP-1c e PPAR- α e da proteína SIRT-1 demonstraram ser um indicativo de melhor sensibilidade à insulina hepática.

Palavras-chaves: destreinamento físico, restrição calórica, suplementação com leucina

ABSTRACT

SILVA, K. G. **Caloric Restriction and supplementation with leucine in physical detraining: lipid parameters and insulin sensitivity in the liver.** Dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

INTRODUCTION: The physical training promotes the individual morphological, physiological and functional benefits. However, the temporary or permanent departure from the training routine (physical detraining), can result in fast weight gain, dyslipidemia, inflammation and insulin resistance. On the other hand, the caloric restriction is a nutritional alternative to lose weight and have been associated with activation pathways involved in lipid metabolism, insulin sensitivity and inflammation. Besides that, branched-chain amino acid supplementation is a common practice between athletes and among them, the leucine shows stimulate protein synthesis, fatty acid oxidation and glucose metabolism. Based on that, it is suggested that the association of these two nutritional interventions can attenuate liver damage resultant from physical detraining. **OBJECTIVES:** Check if a caloric restriction of 30% associates or not of 5% leucine supplementation attenuates the changes in the lipid profile, inflammation and insulin signaling pathway in the liver of animals subjected to physical detraining. **METHODS:** It were used 64 rats *Sprague-Dawley*, males and adults. The animals were distributed in control group (CON; n=16) and trained (TR; n=48). Then, control group animals were redistributed in 5 groups: TR (n=16); Detraining (DT; n=8); DT + Supplementation with leucine (LEU; n=8); Group DT + Caloric Restriction (CR; n=8); Group DT+ CR + LEU (LEU+CR; n=8). The euthanasia occurred at the end of the 14th week and were analyzed: feed intake, body weight, body composition, insulin sensitivity, glucose tolerance, triglyceride and cholesterol concentration in the liver, adipokines in serum (adiponectin, leptin, IL-6, IL-10) and liver (IL-6, IL-10). Also were measured in the liver molecular parameters, including binding activity from NF- κ B, and protein expression SIRT-1, pAMPK_{Thr172}, AKT total, pAKT₃₀₈ and FoxO1; and the genes PEPCK, PPAR- α , SREBP-1c, FAS and ACC. **STATISTICS:** The normality was previously analyzed by *Shapiro-Wilk* test. The variables where normality wasn't confirmed, non-parametric procedures were used. The data were expressed as mean and standard error and Student's *t-test* was used for independent samples. The comparisons between groups were evaluated using analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test to identify significant contrasts. For all analyzes was considered 5% significance level. The statistical analysis was performed on *software* GraphPad Prism version 5.0. **RESULTS:** The CR and LEU+CR groups showed body weight ($p < 0,05$) and % carcass fat ($p < 0,05$) significantly lower than DT and LEU groups. The DT group showed higher relative weight of adipose tissue in relation to RC and LEU+CR groups ($p < 0,05$). In the serum insulin and insulin tolerance test there were no significant differences. At 13th week the RC and LEU+CR groups showed glucose tolerance significantly lower than DT group ($p < 0,05$). The DT group showed significant increase in glucose tolerance between the 8th and 13th week ($p < 0,05$). The serum leptin was significantly higher in DT group compared to the CR and LEU + CR group ($p = 0,0002$), and the serum adiponectin and the reason adiponectin/leptin showed no significant difference between groups. The LEU+CR group showed significantly higher serum IL-6 concentration compared with the LEU group ($p = 0,0064$), however there was a significant difference in IL-10 concentration or reason IL-6/IL-10. This reason in the liver was significantly higher in LEU group compared to the LEU+CR group. The IL-6 showed positive correlation with relative weight of the adipose tissue while the IL-10 showed negative correlation. The binding activity of NF- κ B showed no significant difference. The concentration of triglycerides

in the liver was significantly higher in LEU group compared to LEU+CR group ($p=0,0127$). The concentration of cholesterol was significantly higher in DT group compared to the RC group ($p=0,0115$). In the molecular parameters the SIRT-1 expression was significantly higher in CR and LEU+CR group compared to the DT group ($p<0,0005$) and the other protein expression there was no significant difference. The LEU+CR group showed the expression significantly higher of the genes PPAR- α ($p=0,0034$), ACC ($p=0,0003$), FAS ($p<0,0001$) and SREBP-1c ($p=0,0032$) compared to the DT group. The CR group showed expression significantly higher of the gene SREBP-1c ($p=0,0032$) compared of the DT group. **CONCLUSION:** The caloric restriction softened the concentration of cholesterol in the liver and when combined with a leucine supplementation decreased triglyceride synthesis in this organ. The reason adiponectin/leptin and the OGTT test indicated better insulin sensitivity and glucose tolerance in groups submitted caloric restriction with or without leucine supplementation. The expression of SREBP-1c and PPAR- α genes and SIRT-1 protein showed to be indicative of better hepatic insulin sensitivity.

Keywords: physical detraining, caloric restriction, supplementation with leucine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Alterações observadas com a interrupção do treinamento a curto e longo prazo. _	27
Figura 2: Relação da inflamação e da restrição calórica com o gasto energético. _____	29
Figura 3: Vias de metabolismo da leucina em animais. _____	35
Figura 4: Delineamento experimental do estudo. _____	43
Figura 5: Teste de esforço máximo dos grupos experimentais. _____	52
Figura 6: Consumo de ração durante o destreinamento físico. _____	54
Figura 7: Peso inicial, final e variação do peso corporal dos animais. _____	56
Figura 8: Coeficiente de eficácia alimentar. _____	57
Figura 9: Composição das carcaças dos animais ao final do experimento. _____	58
Figura 10: Peso relativo dos coxins adiposos dos animais ao final do experimento. _____	59
Figura 11: Peso relativo dos fígados dos animais ao final do experimento. _____	60
Figura 12: Δ OGTT dos grupos entre as semanas 8 e 13 do experimento. _____	61
Figura 13: Dosagem de insulina sérica dos grupos ao final do experimento. _____	62
Figura 14: Concentrações séricas de adiponectina, leptina e razão adiponectina/leptina. _	64
Figura 15: Correlação do tecido adiposo total com as concentrações séricas de leptina e adiponectina. _____	65
Figura 16: Concentrações séricas e razão das citocinas IL-6 e IL-10. _____	66
Figura 17: Dosagem das citocinas IL-6 e IL-10 e razão IL-6/IL-10 no fígado. _____	67
Figura 18: Correlação das citocinas IL-6 e IL-10 no fígado com o peso relativo do tecido adiposo total. _____	68
Figura 19: Atividade de ligação do NF-kB no fígado. _____	69
Figura 20: Correlação da atividade de ligação do NF-kB com a concentração das citocinas IL-6 e IL-10 no fígado e com peso relativo do tecido adiposo total. _____	70
Figura 21: Concentração hepática de triglicerídeos. _____	71
Figura 22: Concentração hepática de colesterol. _____	71
Figura 23: Análises de Western blot das proteínas SIRT-1, p-AMPK, AKT total, p-AKT ₃₀₈ e p-FOXO-1 ₂₅₆ no fígado. _____	73
Figura 24: Expressão dos genes PEPCK, PPAR- α , ACC, FAS e SREBP-1c. _____	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na reação de PCR em tempo real (qRT-PCR) _	48
Tabela 2: Caracterização dos grupos a partir do peso corporal para distribuição na 8ª semana (baseline) _____	53
Tabela 3: Concentração de aminoácidos no sangue dos animais. _____	55
Tabela 4: Teste de tolerância à glicose (mg/dl/120min) dos grupos experimentais nas semanas 8 e 13. _____	61
Tabela 5: Teste de tolerância à insulina (μ U/ml) nas semanas 8 e 13 dos grupos experimentais _____	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ OGTT	Variação do teste de tolerância à glicose
α -KIC	α cetoisocaproato
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
AIN-93M	American Institute of Nutrition – 1993 para adultos
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína ativada pelo AMP
ANOVA	Análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BCAA	Branched chain amino acids
BCAT	Enzima aminotransferase de cadeia ramificada
BCKD	Complexo enzimático desidrogenase de cadeia ramificada
CEA	Coefficiente de eficácia alimentar
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CON	Controle
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase 1
Ct	Cycle threshold
DM2	Diabetes tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT	Grupo destreinamento
EPI	Epididimal
FAS:	Ácido graxo sintetase
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FoxO-1	Fator de transcrição “ <i>forkhead</i> ” 1 da família da FoxO
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMB	β -hidroxi- β -metilbutirato-CoA
HMG-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima-A

HMGCR	Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
HRP	Horseadish Peroxidase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEU	Grupo leucina
LEU-RC	Grupo leucina e restrição calórica
LKB1	Serina-treonina quinase
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de massa corporal
IVA-CoA	Isovaleril-CoA
ITT	Teste de tolerância à insulina
KICD	Enzima dioxigenase de α -CIC
KITT	Taxa de desaparecimento da glicose plasmática
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Cofator b-nicotinamida adenina dinucleotídeo
OGTT	Teste de tolerância à glicose
PPAR- α	Proliferador de peroxissoma alfa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PCR	Proteína C reativa
RC	Grupo restrição calórica
R-CON	Ração controle
NF-kB	Fator nuclear kappa B
R-LEU	Ração suplementada com leucina
R-RC	Ração restrição calórica
R-RC+LEU	Ração restrição calórica suplementada com leucina
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Cadeia de polimerase em tempo real
RTP	Retroperitoneal
SED	Grupo sedentário
SIRT	Sirtuína
SIRT-1	Sirtuína 1
Sir-2	Regulador de informação silenciosa

SREBP-1c	Proteína 1c ligadora ao elemento regulado por esteróis
SUB	Subcutâneo
TAB	Tecido adiposo branco
TEM	Teste de esforço máximo
TEMED	Tetrametiletilenediamina
TR	Grupo treinado
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1. DESTREINAMENTO FÍSICO.....	26
2.2. EXCESSO DE PESO: INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA À INSULINA	27
2.3. RESTRIÇÃO CALÓRICA E SEUS EFEITOS NO FÍGADO	29
2.4. LEUCINA E SEUS EFEITOS NO FÍGADO.....	33
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	39
4.1. OBJETIVO GERAL.....	39
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	40
5.2 RAÇÕES	40
5.2.1 <i>Ração controle (R-CON)</i>	40
5.2.2 <i>Ração suplementada com leucina (R-LEU)</i>	40
5.2.3 <i>Rações restrição calórica (R-RC) e restrição calórica suplementada com leucina (R-RC+LEU)</i>	41
5.3 PROTOCOLO DE RESTRIÇÃO CALÓRICA	41
5.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO	41
5.5 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO (TEM)	42
5.6 DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO	42
5.7 EUTANÁSIA E ANÁLISES.....	44
5.7.1 <i>Análises in vivo</i>	44
5.7.1.1 <i>Peso corporal</i>	44
5.7.1.2 <i>Teste de tolerância à glicose (OGTT)</i>	44
5.7.1.3 <i>Teste de tolerância à insulina (ITT)</i>	44
5.7.2 <i>Eutanásia e coleta de amostras</i>	45
5.7.3 <i>Análises após a eutanásia</i>	46
5.7.3.1 <i>Composição química da carcaça</i>	46
5.7.3.2 <i>Parâmetros séricos</i>	46
5.7.3.3 <i>Parâmetros teciduais</i>	46
5.7.3.3.1 <i>Dosagem de citocinas</i>	46
5.7.3.3.2 <i>Ensaio de ligação da unidade p65 do NF-kB</i>	47
5.7.3.3.3 <i>Concentrações de colesterol e triglicérides</i>	47
5.7.3.3.4 <i>Expressão gênica</i>	47
5.7.3.3.5 <i>Quantificação protéica</i>	49
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6.0 RESULTADOS	52
6.1 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO	52
6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS APÓS OITO SEMANAS DE TREINAMENTO (<i>BASELINE</i>).....	53

6.3	CONSUMO DE RAÇÃO	53
6.4	AMINOGRAMA.....	54
6.5	PESOS DOS ANIMAIS	55
6.6	COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR.....	57
6.7	COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	57
6.8	PESO RELATIVO DOS FÍGADOS E COXINS ADIPOSOS	58
6.9	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE, À INSULINA E DOSAGEM DE INSULINA SÉRICA.	60
6.10	DOSAGEM DE CITOCINAS NO SORO	63
6.11	DOSAGEM DE CITOCINAS NO FÍGADO.....	66
6.12	ATIVIDADE DE LIGAÇÃO DO NF-κB NO FÍGADO.....	69
6.13	DOSAGEM DE TRIGLICERÍDEOS E COLESTEROL NO FÍGADO DOS ANIMAIS.....	70
6.14	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NO FÍGADO.....	72
6.15	EXPRESSÃO GÊNICA	74
7.0	DISCUSSÃO	76
8.0	CONCLUSÃO.....	82
9.0	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A.....	98
	ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

O treinamento físico é considerado uma categoria da atividade física por apresentar o diferencial de planejamento, estruturação e repetição (CASPERSEN et al, 1985). O mesmo favorece benefícios significativos à saúde, como redução da massa adiposa, melhora do perfil lipídico, aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da gordura visceral. Além disso, estudos demonstram que o treinamento físico reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumenta a sensibilidade à insulina, reduz as concentrações de glicose sanguínea, aumenta $VO_{2máx}$ e melhora a capacidade aeróbia. Contudo, esses resultados são influenciados pela genética e dependem da frequência, intensidade e da modalidade praticada (ADAMSON et al. 2014; CLARK, 2015; FERNANDEZ; MELLO; TUFIK, 2004; GLEESON et al., 2011; RICHARDS et al., 2010; SKRYPNIK et al., 2015; TORRES-LEAL, 2009).

O treinamento físico integra a tríade do gasto energético, que é formada pela atividade física, fator térmico do alimento e o gasto energético de repouso. Partindo desse pressuposto, quando o treinamento físico é interrompido há redução do gasto energético total, o que contribui para o ganho de peso corporal (REDMAN et al, 2009). Essa interrupção do treinamento é conhecida por destreinamento físico e pode ocorrer devido à lesão, doença ou período pós-temporada (MUJIKÁ; PADILLA, 2000). Como o treinamento físico associado ou não a intervenções nutricionais proporciona diversos benefícios ao organismo, é esperado que a sua interrupção comprometa o desempenho e a saúde do indivíduo, como redução da massa magra, aumento da massa adiposa, inflamação, alteração no perfil lipídico, resistência à insulina e deposição de gordura no fígado (KALAPOTHARAKOS, DIAMANTOPOULOS e TOKMAKIDIS, 2010; PETIBOIS et al., 2004; SHEPARD et al., 2001). As consequências dessa interrupção variam de acordo com a duração e a condição física do indivíduo no momento da interrupção (KOUNDORAKIS et al., 2014).

Uma vez que a participação do treinamento físico sob o gasto energético é interrompida parcialmente ou por completo (MUJIKÁ; PADILLA, 2000), intervenções nutricionais podem ser utilizadas na tentativa de assegurar que modificações metabólicas adquiridas com o treinamento perdurem durante o destreinamento físico. Dentre essas intervenções, a restrição calórica tem um papel de destaque uma vez que a sua aplicação acompanhada ou não do treinamento físico, demonstra efeitos positivos na redução do peso corporal, melhora no perfil lipídico e na sensibilidade à insulina, dentre outros benefícios que contribuem para o aumento da longevidade em humanos e animais (BORDONE; GUARENTE, SILVA, K.G

2005; CALBET et al, 2014; CAVA; FONTANA, 2013; ERIKSSON; TAIMELA e KOIVISTO, 1997; MERCKEN et al., 2012; REDMAN; RAVUSSIN, 2011; REDMAN et al, 2009).

A restrição calórica consiste na redução na ingestão de calorias de 10 a 30% quando comparada a uma dieta *ad libitum*, sem causar a desnutrição (LEE; MIN, 2013; MA et al, 2015). Entretanto, em alguns casos a restrição pode atingir valores superiores a esses mencionados (CALBET et al., 2014; MERCKEN et al., 2012; NICKLAS et al., 2015). Inicialmente a restrição calórica age provocando um desequilíbrio no balanço energético em decorrência da menor oferta energética, resultando na perda de peso. Em seguida, o equilíbrio energético é reestabelecido e o corpo retorna a um estado de manutenção energética e consequente estabilização do peso corporal (DEIGHTON; BATTERHAM e STENSEL, 2014; LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2000; REDMAN et al, 2011).

Paralelamente à restrição calórica, os suplementos alimentares também podem ser encarados como uma alternativa nutricional para amenizar essas alterações decorrentes do destreinamento físico, por serem utilizados na prática esportiva com o intuito de melhorar o desempenho, proporcionar a hipertrofia e o emagrecimento (FARUP et al., 2013; JITOMIR et al., 2008; PENCHARZ; ELANGO e BALL, 2012). Dentre esses suplementos, os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), leucina, isoleucina e valina, conhecidos pela sigla em inglês BCAA (*branched chain amino acids*) são potencialmente associados ao aumento da síntese proteica (BLOMSTRAND et al., 2006; CROZIER et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2006). Eles também podem atuar na regulação do peso corporal, na homeostase glicêmica e estimular a oxidação de ácidos graxos (GARCIA-CARABALLO et al., 2013; KAINULAINEN; HULMI e KUJALA, 2013; LYNCH; ADAMS, 2014). Dentre os BCAA, a suplementação isolada com leucina tem demonstrado resultados no que condiz com a perda de peso, melhora da sensibilidade à insulina e do perfil lipídico (BRUCKBAUER; ZEMEL, 2011; LI et al., 2012), por atuar na regulação do metabolismo e equilíbrio energético, afetando diretamente os tecidos periféricos, tais como o tecido adiposo branco (TAB), músculos e fígado. No entanto, o efeito direto da leucina na sinalização hepática e os mecanismos associados ainda não são totalmente compreendidos (BINDER et al., 2013; LU et al., 2013; PÁDUA et al., 2009; PEDROSA et al., 2010).

Tendo em vista que tanto a restrição calórica como a suplementação com leucina atuam no metabolismo lipídico e na via de sensibilidade à insulina, o presente estudo foi proposto com a perspectiva de elucidar se a associação dessas duas intervenções nutricionais pode ser utilizada como uma medida nutricional eficaz para a redução do risco atribuído aos efeitos

deletérios decorrentes do destreinamento físico, em especial no fígado devido o seu importante papel sobre a homeostase da glicose e de lipídios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Destreinamento físico

O destreinamento físico é visto como a interrupção total ou apenas a redução em termos de duração, intensidade e frequência do treinamento e, sua duração pode ser em curto (<4 semanas) ou longo prazo (>4 semanas). Na interrupção do treinamento são observadas mudanças significativas como o aumento de peso, a redução na massa muscular e, em alguns casos pode ocorrer alterações metabólicas como a resistência à insulina, inflamação e alterações no perfil lipídico (KOUNDORAKIS et al, 2014; MUJIK; PADILLA, 2000; PETIBOIS et al., 2004; SERTIÉ et al, 2013).

Como pode ser observado na Figura 01, as consequências da interrupção do treinamento variam conforme a duração do mesmo. Por exemplo, em ratos um período curto de destreinamento físico (4 semanas) é suficiente para promover o rápido ganho de peso corporal e estimular a síntese de triglicerídeos (SERTIE et al., 2013; 2015). Já em atletas pode não ser observado aumento do peso corporal no destreinamento a curto prazo, no entanto, em alguns casos, pode haver aumento da circunferência da cintura (LIU T. C. et al., 2008). Quando o período de destreinamento é estendido para além de 4 semanas pode ser observado além do aumento da circunferência da cintura (CHEN et al., 2006), aumento do peso e do índice de massa corporal (IMC), mudanças na composição corporal (aumento da massa adiposa e redução da massa magra), no perfil lipídico (aumento do LDL colesterol e redução do HDL colesterol), na sensibilidade à insulina, na captação de glicose e na capacidade aeróbica em indivíduos sedentários ou atletas (LIU et al, 2008; MITSUHASHI et al, 2011; PETIBOIS et al, 2004).

No que concerne aos efeitos do destreinamento diretamente sobre o fígado, os resultados ainda não são conclusivos. Yasari et al (2007), mencionaram que há poucos dados relacionando a infiltração de gordura no fígado como uma consequência da interrupção do treinamento físico. Em seu estudo associaram o rápido ganho de massa adiposa em decorrência do destreinamento físico ou da restrição alimentar, à resposta do corpo em manter o peso corporal. O trabalho basicamente consistiu em ofertar dieta hiperlipídica aos animais distribuídos nos grupos sedentário, treinado e destreinado. Como resultado, todos os grupos apresentaram maior infiltração de triglicerídeos hepáticos em comparação à semana inicial, sendo que o grupo que interrompeu o treinamento por 4 semanas (destreinado) apresentou valores significativamente maiores em relação aos demais grupos. Esses resultados exibem a

iniciado um processo inflamatório local (SHOELSON, LEE e GOLDFINE, 2006; YE e McGUINNESS, 2013).

Tem sido relatado que a expansão do tecido adiposo acarreta a superexpressão do fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e maior produção de leptina. Em contrapartida são observadas a subexpressão da IL-10 e menor produção de adiponectina (CARVALHO; COLAÇO e FORTES, 2006; JUGE-AUBRY; HENRICHOT e MEIER, 2005; FASSHAUER; BLUER, 2015).

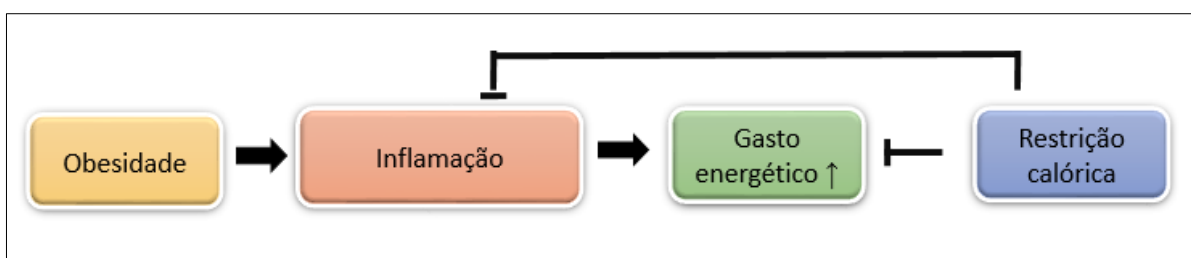
A secreção de leptina e adiponectina respondem de forma diferenciada à quantidade de tecido adiposo. Enquanto que a concentração plasmática de leptina é proporcionalmente maior ao tamanho do tecido, a concentração de adiponectina é inversamente proporcional a adiposidade (AL-ALMODI et al., 2014, GIBY et al., 2014).

A leptina regula a ingestão alimentar, está envolvida com a regulação do *status* energético, hormonal e inflamatório. Em concentrações normais a leptina aumenta o gasto energético, diminui o apetite, favorece a oxidação de ácidos graxos, diminui a lipogênese e melhora a sensibilidade à insulina, além de propiciar menor deposição ectópica de gordura no fígado e músculo. Por outro lado, concentrações elevadas a longo prazo causa resistência à leptina, condição frequentemente observada em indivíduos obesos (AL-HAMODI et al., 2014; FASSHAUER E BLUHER, 2015; GIBY et al., 2014). Ao contrário da leptina, a adiponectina tem propriedade anti-inflamatória e antidiabética e apresenta concentrações séricas diminuídas em indivíduos com obesidade e estados de resistência à insulina, como a esteatose hepática não-alcóolica, aterosclerose e diabetes tipo 2 (DM2). Como exemplo, Al-Hamodi et al. (2014), verificaram que a obesidade foi fator determinante para a redução nas concentrações de adiponectina e aumento nas concentrações de leptina em indivíduos obesos com ou sem DM2.

Em relação às citocinas, a IL-6 possui atividades pró e anti-inflamatórias, embora também exiba relação com a resistência à insulina. Essa citocina pode prejudicar a via de sinalização da insulina por induzir a fosforilação dos substratos dos receptores de insulina em serina₄₇₃ ao invés de tirosina₃₀₈, diminuindo a fosforilação da proteína quinase B (AKT) no músculo esquelético e no fígado. (CARVALHO-FILHO et al., 2007; JUGE-AUBRY; HENRICHOT e MEIER, 2005; TORRES-LEAL et al., 2010). Enquanto que a IL-6 pode atuar de duas formas sobre a inflamação, a IL-10 tem ação unicamente anti-inflamatória, basicamente ela atua suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6 e o TNF- α , melhorando a sensibilidade à insulina (JUGE-AUBRY; HENRICHOT e MEIER, 2005; SHOELSON, LEE e GOLDFINE, 2006).

Na maioria das vezes o aumento da inflamação é colocado como uma condição prejudicial para o organismo. Contudo, estudos recentes apresentam a inflamação por uma nova perspectiva (WANG; YE, 2015; YE; KELLER, 2010). Tem sido levantado que em condições de obesidade, exercício físico e caquexia, a inflamação não é de um todo prejudicial ao organismo, como no caso das citocinas TNF- α e IL-6, que podem simultaneamente comprometer a via de sinalização da insulina e podem atuar de forma benéfica aumentando o gasto energético. A restrição calórica, por sua vez, é associada com a redução da inflamação e consequente redução do gasto energético (ERIKSSON, TAIMELA e KOAVISTO, 1997; YE; MACGUINNESS, 2013; YE; KELLER, 2010) (FIGURA 02).

Figura 2: Relação da inflamação e da restrição calórica com o gasto energético.



Fonte: Adaptado de Wang e Ye (2015). A inflamação derivada da obesidade estimula o aumento do gasto energético ao passo que a restrição calórica reduz o mesmo.

2.3. Restrição calórica e seus efeitos no fígado

A restrição calórica tem demonstrado resultados satisfatórios para a redução do peso corporal, apesar de reduzir o gasto energético de repouso. Quando se aborda o tema da restrição calórica, é importante considerar sua relevância em prolongar o tempo de vida e retardar o aparecimento de patologias decorrentes do envelhecimento, como o diabetes, câncer e doenças cardiovasculares em diferentes espécies incluindo, levedura, moscas, vermes, peixes, roedores, macacos e seres humanos (KOTAS; GORECKI e GILLUM, 2013; MOHAMMADI et al., 2014; QUINONES et al., 2014). Algumas melhorias proporcionadas por essa intervenção incluem a diminuição dos danos teciduais induzidos pelos radicais livres, melhora da sensibilidade à insulina e diminuição da inflamação (MASORO, 2004; MCELWEE et al., 2007; REDMAN; RAVUSSIN, 2011). A restrição calórica de curto prazo é classificada em um período de

intervenção com duração entre 1 mês e 1 ano e acima desse período já é considerada uma restrição calórica de longo prazo (SOARE; WEISS e POZZILLI, 2014).

O organismo possui a capacidade de alternar a utilização dos substratos energéticos, priorizando a utilização de substratos não-glicogênicos como as proteínas e os lipídios no período de jejum e, de substratos glicogênicos no período alimentado. Essa capacidade do organismo em alternar a ordem de oxidação dos substratos, sugere que processos anabólicos como a lipogênese aconteça de forma eficiente em organismos submetidos à restrição calórica, enquanto que a gliconeogênese seja ativada no período de jejum (TO et al., 2007). Durante a gliconeogênese são utilizados substratos não glicogênicos para manter a oferta energética, dentre eles, o glicerol presente no tecido adiposo. Por constituir a estrutura dos triglicerídeos, a utilização do glicerol como fonte de energia resultará em menor formação e conseqüentemente menor circulação e deposição de triglicerídeos em outros órgãos, especialmente no fígado (YU; JIA e CHO, 2014). Um exemplo disso, foi observado no trabalho de Bowman et al., (2010), em que os ratos com baixa capacidade aeróbia ao serem submetidos a 30 % de restrição calórica por 3 meses apresentaram redução nas concentrações de triglicerídeos, aumento na captação de glicose e melhora da sensibilidade à insulina bem como da inflamação no fígado.

Resultados semelhantes foram observados por Ding et al., (2012) ao submeterem ratos não-obesos a 45 % de restrição calórica por 4 meses. Após o período de restrição os animais apresentaram redução da massa corporal total, do tecido adiposo epididimal e das concentrações plasmáticas de insulina. Enquanto que a lipólise e as concentrações de adiponectina, ácidos graxos livres e glicerol plasmático, aumentaram. Em um estudo com humanos obesos submetidos a 30 % de restrição calórica por 7 meses observou-se redução da massa corporal total, da massa adiposa, das concentrações de insulina, glicose, proteína C reativa (PCR), além do aumento da concentração de adiponectina e da sensibilidade à insulina (AHMADI et al., 2011).

A explicação para a gama de benefícios proporcionados pela restrição calórica pode ser baseada na ativação de sensores metabólicos, como as sirtuínas (SIRT) e a proteína quinase ativada pelo AMP (AMPK) (CANTÓ; AUWERX, 2012). Dentre as sirtuínas, a SIRT-1, um homólogo em mamíferos do regulador de informação silenciosa (*Sir-2*) encontrado em leveduras, tem sido bastante estudada por sua atuação em múltiplos processos celulares, bem como sua ampla distribuição nos tecidos, incluindo fígado, cérebro, coração, pâncreas, adiposo e muscular (CUI et al., 2013; KITADA et al., 2013; KOTAS; GORECKI e GILLUM, 2013; KULKARNI et al., 2013; NOGUEIRAS et al., 2012).

Tanto a expressão quanto a atividade da SIRT-1 são sensíveis à razão NAD^+/NADH . De modo geral ela utiliza NAD^+ para desacetilar a proteína, e os produtos dessa reação são a nicotinamida e o O-acetil-ADP-ribose. A nicotinamida é um inibidor da função das sirtuínas e na restrição calórica esse produto é convertido em niacina, favorecendo a recuperação do NAD^+ e a funcionalidade da SIRT-1 (DANG, 2014). Em contraste, a oferta energética excessiva e a obesidade, demonstram diminuição na expressão da SIRT-1, tanto em camundongos quanto em humanos (GUARENTE, 2013; NOGUEIRAS et al., 2012)

A expressão da SIRT-1 é associada à regulação de uma variedade de processos celulares como a resposta ao estresse, sobrevivência celular, biogênese mitocondrial, sensibilidade à insulina, estado energético da célula bem como ao estado redox (BAUR, 2010; KITADA et al., 2013; NOGUEIRAS et al., 2012; QUINONES et al., 2014). Essa proteína aumenta a sensibilidade à insulina no fígado, músculo e TAB. O mecanismo proposto é que a SIRT-1 inibe a expressão de genes gliconeogênicos e aumenta a expressão da AKT e do fator de transcrição “*forkhead*” 1 da família da FoxO (FoxO-1) (QUINONES et al., 2014). Banks et al. (2008), observaram que ratos com a SIRT-1 superexpressa, apresentaram melhor sensibilidade à insulina e melhor tolerância à glicose.

Como pode ser observado, a SIRT-1 age como um regulador adaptativo da privação de energia, ativando e/ou inibindo genes que participam no metabolismo glicídico e lipídico. No metabolismo da glicose, a SIRT-1 regula os genes envolvidos na gliconeogênese através da desacetilação de fatores de transcrição e coativadores importantes como o FoxO1. No metabolismo lipídico a SIRT-1 ativa genes envolvidos na oxidação ao passo que inibe genes lipogênicos. Como exemplo, há ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- α) e inibição da proteína 1c ligadora ao elemento regulado por esteróis (SREBP-1c), da ácido graxo sintetase (FASn) e da acetil-CoA carboxilase (ACC), sendo o primeiro gene oxidativo e os demais genes lipogênicos (PURUSHOTHAM; SCHUG e LI, 2009).

A FoxO1 possui uma estreita relação com a SIRT-1 por ativar diretamente a sua transcrição. A SIRT-1 desacetila a FoxO1, retendo-a no núcleo e conseqüentemente melhorando a sua própria transcrição (MATSUMOTO et al., 2006; WANG R. H. et al., 2011). A atividade da FoxO1 é importante na manutenção da gliconeogênese e inibição da lipogênese. Zhang et al. (2006), demonstraram que a FoxO1 estimula a expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) ao mesmo tempo que inibi a expressão do SREBP1c, FASn e ACC em hepatócitos isolados. A FoxO-1 também contribui para a melhora da sensibilidade à insulina por promover a fosforilação da AKT em resíduos de tirosina. Vale ressaltar, que embora a AKT

atue inibindo a FoxO-1 ao translocá-la para o citoplasma, essa inibição não é total, o que permite a FoxO1 continuar ativa, porém em menor intensidade (MATSUMOTO et al., 2006).

O PPAR- α é expresso no fígado, rins, músculo, coração, tecido adiposo e em outros órgãos. Ele regula a expressão de genes envolvidos na β -oxidação e na via de sinalização da insulina no fígado e no músculo esquelético (GIBY et al, 2014; HUI et al, 2013). A relação da SIRT-1 com o PPAR- α a torna importante na manutenção da secreção e sensibilidade à insulina, uma vez que a deleção hepática dessa proteína demonstrou prejudicar a ativação do PPAR- α diminuindo a oxidação de ácidos graxos e proporcionando o desenvolvimento de esteatose hepática, inflamação e estresse do retículo em indivíduos com uma dieta hiperlipídica (IMAI; YOSHINO, 2013). Além da influência da SIRT-1, a adiponectina também estimula a síntese de ácidos graxos via PPAR- α , reduzindo os depósitos de triglicerídeos e aumentando a sensibilidade à insulina no fígado e no músculo esquelético (CASELLI, 2014).

O SREBP-1c é um fator de transcrição presente na membrana que regula a expressão de genes envolvidos na codificação de enzimas lipogênicas, incluindo ACC e FAS. Esse fator tem sua atividade aumentada na alimentação e reduzida em momentos de privação alimentar (PONUGOTI et al. 2010). Alguns autores atribuem essa diminuição do SREBP-1c durante o jejum à ativação da SIRT-1, que por sua vez, desacetila o SREBP-1c impedindo a sua atividade (HORTON; GOLDSTEIN e BROWN, 2002; KOHJIMA et al., 2008). Porém esse gene não deve ser visto apenas como responsável pela síntese de triglicerídeos no fígado Horton, Goldstein e Brown (2002), contemplaram que o SREBP-1c demonstra associação com a absorção e síntese de glicose. Segundo eles, o SREBP-1c induz a expressão da glicoquinase, ao passo que suprime a PEPCCK, enzimas chaves dos processos de captação e síntese de glicose, respectivamente.

Assim como a SIRT-1, a AMPK é um sensor energético que tem a sua atividade aumentada durante situações de estresse, como o treinamento físico ou a restrição calórica (KAUPPINEN et al., 2013). A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ (PÁDUA et al., 2009). A atividade da AMPK é regulada pelo aumento intracelular da razão AMP/ATP, embora também possa ser modulada por hormônios e citocinas, que regulam o balanço energético, como adiponectina, leptina e IL-6 (HARDIE, 2007). Mediante a sua ativação, a AMPK aciona vias (catabólicas) que geram ATP normalizando as concentrações desse subproduto. A curto prazo, esse processo ocorre através da promoção e/ou estimulação da glicólise e oxidação de ácidos graxos e, em longo prazo, através do aumento da capacidade mitocondrial e do uso dos seus substratos como

fonte energética. Além disso, ocorre a inibição de processos anabólicos que consomem ATP, e que não são necessários para a sobrevivência imediata da célula (CANTÓ; AUWERX, 2013).

A AMPK está relacionada com a oxidação de ácidos graxos por inibir a atividade da ACC. Em geral, a ACC na sua atividade normal converte o acetil-CoA em malonil-CoA o qual é um inibidor da carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), que por sua vez é responsável pelo transporte dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria para os mesmos serem oxidados (SPEAKMAN; MITCHELL, 2011). Visto isso, quando a AMPK é ativada a CPT-1 tem a sua função ativada e a oxidação dos ácidos graxos pode acontecer. Adicionado a isso, a AMPK pode atuar em logo prazo diminuindo a expressão de genes lipogênicos como a FAS e SREBP-1c, e neoglicogênicos como o PEPCK (PÁDUA et al., 2009; SANTOMAURO JR. et al., 2008). Desse modo, a AMPK atua no fígado diminuindo a síntese de lipídios e estimulando a β -oxidação de gordura, além de bloquear a produção hepática de glicose.

A SIRT-1 e a AMPK possuem uma relação de retroalimentação, uma vez que a SIRT-1 ativa a AMPK via desacetilação da LKB1 que, posteriormente, desencadeia a ativação da AMPK. Em contrapartida, a AMPK promove a síntese de celular de NAD⁺ necessário para ativação da SIRT-1. Como consequência desse *feedback* positivo, a SIRT-1 e a AMPK possuem em comum algumas funções na regulação do metabolismo energético e da inflamação. Nesse sentido, é possível citar a relação dessas duas proteínas com o NF-kB. Basicamente, a SIRT-1 consegue interromper a sinalização do NF-kB de forma direta desacetilando a unidade relA/p65 em lisina₃₁₀ ou indiretamente, ativando a AMPK que exibe o mesmo mecanismo de desacetilação (KAUPPINEN et al., 2013). Todavia, quando o NF-kB está ativado, ele pode inibir a SIRT-1, assim como ativar outros agentes inflamatórios, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina em indivíduos obesos (GILLUM; ERION e SHULMAN, 2011).

Como demonstrando até o presente momento, a restrição calórica é uma intervenção com elevado potencial para reduzir as alterações metabólicas observadas na obesidade e portanto, uma alternativa a ser utilizada em pessoas na condição de destreinamento físico.

2.4. Leucina e seus efeitos no fígado

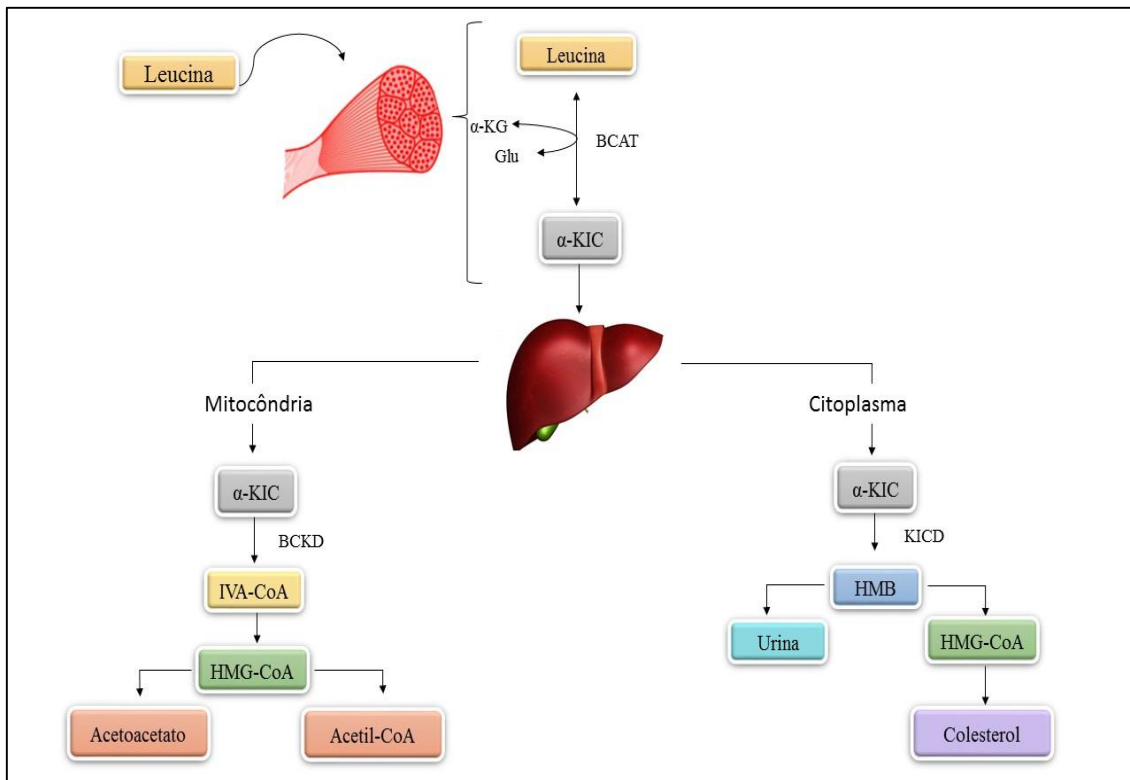
Diversos estudos associam as dietas hiperproteicas com a perda de peso corporal e melhora dos marcadores de risco associados à obesidade (COCATE, 2015; CLIFTON; SILVA, K.G

BASTIAANS e KEOGH, 2009; LAYMAN, 2003; PETZKE; KLAUS, 2014; PIATTI, 1994; QIN et al, 2011). A suplementação com BCAA é uma das alternativas para aumentar o aporte proteico da dieta e está associada ao aumento da síntese proteica, regulação do peso corporal, homeostase glicêmica e maior oxidação de ácidos graxos (CARABALLO et al, 2014; KAINULAINEN; HULMI e KUJALA, 2013; LYNCH; ADAMS, 2014).

Apesar desses efeitos benéficos, estudos colocaram em evidência que as concentrações elevadas de BCAA na circulação estão relacionadas com a resistência à insulina tanto em humanos quanto em roedores, porém ainda não é conclusivo se o aumento de BCAA circulante provoca a resistência à insulina ou seria um biomarcador do comprometimento da via de sinalização desse hormônio (BURRIL et al, 2015; LYNCH; ADAMS, 2014; NEWGARD et al., 2009). Garcia-Caraballo et al (2013), observaram que o consumo durante 3 semanas de uma dieta hiperproteica (35% de proteína) não resultou em maior circulação de aminoácidos, entretanto os BCAA exibiram maiores concentrações.

Dentre os BCAA, a leucina é o aminoácido presente em maior proporção nas dietas hiperproteicas (DUAN et al., 2015). A leucina, assim como a isoleucina e a valina, tem o seu metabolismo iniciado principalmente no músculo esquelético, onde é transaminada a α -cetoisocaproato (α -KIC) pela ação da enzima aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada (BCAT) (SHIMOMURA; MURAKAMI NAGASAKI et al 2004). Em seguida o α -KIC é transportado para o fígado onde sofre oxidação tanto na mitocôndria quanto no citoplasma. Na mitocôndria o complexo enzimático desidrogenase de cadeia ramificada (BCKD) converte o α -KIC em isovaleril-CoA (IVA-CoA) o qual é posteriormente oxidado em β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA), tendo como produtos finais o acetoacetato e o acetil-CoA (DUAN et al., 2015; VIANNA et al., 2010). No citoplasma o α -KIC é oxidado a β -hidroxi- β -metilbutirato-CoA (HMB) pela enzima dioxigenase de α -CIC (KICD), podendo ser eliminado pelos rins ou ser convertido a HMG-CoA para ser utilizado na síntese de colesterol (VIANNA et al., 2010; DUAN et al, 2015; SHIMOMURA; MURAKANI, NAKAI, et al., 2004) (FIGURA 03).

Figura 3: Vias de metabolismo da leucina em animais.



Fonte: Adaptado de Duan et al (2015).

O metabolismo da leucina pode ser dividido em duas etapas. A primeira etapa é reversível, ocorre principalmente nos tecidos extra-hepáticos e consiste na transaminação da leucina para a forma α -KIC com produção concomitante de glutamina a partir de α -cetoglutarato (α -KG). A segunda etapa acontece no fígado, é irreversível e consiste na reação de descarboxilação oxidativa do α -KIC mediada pelo complexo BCKD na mitocôndria e pelo KICD no citosol. Na mitocôndria, aproximadamente 90% do α -KIC é oxidado em IVA-CoA, levando à formação de HMG-CoA, cujo metabólitos finais são o acetato e o acetil-CoA. No citosol aproximadamente 5% do α -KIC é oxidado em HMB, podendo ser eliminado na urina ou originando HMG-CoA para ser utilizado na formação de colesterol.

A suplementação com leucina exige um cuidado importante ao que diz respeito a dose, uma vez que pode acarretar em efeitos adversos como o “paradoxo da leucina” e toxicidade. O paradoxo da leucina determina que a ingestão elevada de leucina compromete a concentração de isoleucina e valina, devido os três aminoácidos serem oxidados pelo mesmo complexo enzimático (BCKD) (SHIMOMURA; HARRIS, 2006). Em relação à dose recomendada de leucina, o 8º *Workshop* de Avaliação de Aminoácidos demonstrou que o limite máximo tolerável de leucina é aproximadamente $500 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para humanos e que esse valor não deve ser generalizado para toda a população pois em casos como o de idosos com sarcopenia e atletas de alto rendimento a dose pode ultrapassar esse valor sem causar efeitos adversos. Também foi relatado que embora o consumo de leucina combinado com isoleucina e valina tenha maior

tolerância do que quando administrada apenas leucina, a tolerância a esse aminoácido pode aumentar conforme ocorre a adaptação do processo de oxidação do mesmo (KIMURA; BIER e TAYLOR, 2012). Já em relação à dose recomendada para animais, o estudo realizado por Tsubuku et al (2004), demonstrou que a suplementação com até 5% de leucina não resulta em quaisquer efeitos adversos em ratos de ambos os sexos, tornando-se uma referência para a realização de estudos utilizando a suplementação desse aminoácido em modelo animal (TORRES-LEAL et al. 2011; VIANNA et al. 2010).

Estudos tem demonstrado que a suplementação de leucina proporciona benefícios ao organismo como mudanças na composição corporal, no metabolismo da glicose e dos lipídios (BINDER et al., 2013; DUAN et al., 2015; PETZ; KLAUS, 2014; MACOTELA et al., 2011). Sobre esse aspecto, alguns benefícios promovidos pela leucina puderam ser observados em trabalhos realizados em nosso laboratório. Torres-Leal et al. (2011), verificaram que apesar da suplementação com leucina não exercer efeito benéfico sobre a sensibilidade à insulina, a suplementação foi eficaz em reduzir as concentrações circulantes de colesterol e aumentar a concentração sérica de adiponectina em animais previamente obesos. Vianna et al. (2012), demonstraram que a suplementação com 4% de leucina durante 40 semanas em ratos machos e idosos, proporcionou ao grupo suplementado menor peso corporal e percentual de gordura quando comparado ao grupo controle.

Como observado, a suplementação com leucina em médio e longo prazo pode reduzir a gordura corporal desempenhando um papel importante na regulação do metabolismo e equilíbrio de energia, afetando tecidos como o TAB, músculos e fígado. No entanto, o efeito direto da leucina na sinalização hepática e os mecanismos associados ainda não são totalmente compreendidos (BINDER et al., 2013; LU J, et al., 2013; PÁDUA et al., 2009; PEDROSA et al., 2010; YASARI et al, 2007). O estudo realizado por Macotela et al. (2011), demonstrou que o acréscimo desse aminoácido à uma dieta hiperlipídica promoveu melhoras em vários aspectos, como a redução da inflamação no tecido adiposo, a melhora na sinalização da insulina e a redução da deposição ectópica de lipídios no fígado.

Garcia-Caraballo et al (2013), embora não tenham realizado a suplementação apenas com leucina, observaram que 3 semanas de dieta hiperproteica foram mais efetivas do que a restrição calórica de 20%, em reduzir a concentração de lipídios no fígado em camundongos com ou sem esteatose hepática pré-existente, além de apresentarem correlação inversa com as concentrações de triglicerídeos no fígado.

Ademais Donato JR, et al. (2007), investigaram a suplementação apenas com leucina associada à restrição calórica e observaram que os animais suplementados com 5,91 g de leucina/kg de peso e submetidos a 50% de restrição calórica, apresentaram redução de 25% na quantidade de massa gorda e aumento na concentração de proteína no fígado. Embora a associação da suplementação com restrição calórica seja pouco estudada, trabalhos tem demonstrado que a leucina, bem como seus metabólitos, pode aumentar a expressão da SIRT-1, demonstrando um papel em comum entre essas duas intervenções (BRUCKBAUER; ZEMEL, 2011; 2014; PETZ; KLAUS, 2014). Considerando essa relação, Li H, et al. (2012), ofertaram 1,5g de leucina/100 ml a camundongos obesos e verificaram que a leucina apresentou correlação com o aumento da expressão da SIRT-1, com a melhora da sensibilidade à insulina e a redução do estresse oxidativo nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, o ganho de peso observado nos animais que receberam a suplementação não foi associado ao acúmulo de gordura ectópica no fígado e nos músculos.

Baseado em evidências de que a restrição calórica e a suplementação com leucina influenciam vários aspectos no metabolismo da glicose, dos lipídios e de vias inflamatórias, tem havido crescente interesse da comunidade científica em elucidar os efeitos associados de ambas as intervenções, no intuito de encontrar estratégias eficazes no controle desses distúrbios metabólicos. Nesse sentido, devido aos estudos envolvendo a restrição calórica e a suplementação com leucina ainda serem controversos, viu-se a necessidade de explorar os efeitos da ação conjunta dessas intervenções sobre as alterações hepáticas decorrentes da interrupção do treinamento físico.

3. JUSTIFICATIVA

O destreinamento físico afeta vários órgãos e os efeitos dessa interrupção no treinamento sobre o fígado tem sido pouco explorado. Estudos apontam alterações metabólicas nesse órgão, como o comprometimento da via de sinalização da insulina, inflamação e deposição ectópica de gordura (BOWMAN et al., 2010; GÓMEZ-AMBROSI; RODRÍGUEZ, 2008; STIENSTRA et al., 2007; YASARI et al., 2007).

Intervenções nutricionais como a restrição calórica apresentam resultados positivos sobre a redução da gordura corporal, redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias, melhora da sensibilidade à insulina hepática bem como da deposição ectópica de gordura no fígado (BOWMAN et al., 2010; DING, 2012; RAVUSSIN, 2015; SOARE; WEISS e POZZILLI, 2014). Além da restrição calórica, estudos apontam que a suplementação com BCAA pode vir a ser uma intervenção nutricional não apenas para estimular a síntese proteica, como também para reduzir a gordura corporal, aumentar oxidação de ácidos graxos e melhorar a homeostase glicêmica (CARABALLO et al., 2014; KAINULAINEN; HULMI e KUJALA, 2013). Além do mais, estudos que avaliaram os efeitos da suplementação com leucina demonstraram que essa intervenção nutricional pode ser efetiva na redução do risco de obesidade, no controle glicêmico e no perfil lipídico (BINDER et al., 2013; BURRIL et al., 2015; DONATO JR, et al. 2006; DONATO JR, et al., 2007; GARCIA-CARABALLO et al., 2013; KAINULAINEN, HULMI, KUJALA, 2013; LAYMAN, 2003; LYNCH; ADAMS, 2014; TORRES-LEAL, 2011).

Tomando por base as pesquisas que observaram as consequências do destreinamento físico e os benefícios da restrição calórica e do uso de leucina, sugere-se que essas duas intervenções associadas possam atenuar os efeitos deletérios da interrupção do treinamento físico. Nesta visão, tal estudo permitiu investigar os possíveis mecanismos de ação da leucina e da restrição calórica sobre a etiologia de algumas dessas consequências.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina sobre o perfil lipídico e a sensibilidade à insulina no fígado de animais destreinados.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o impacto da restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina sobre:

- Composição corporal dos animais;
- Concentrações séricas e hepáticas de citocinas;
- Expressão de genes e proteínas envolvidas no metabolismo lipídico;
- Expressão de genes e proteínas envolvidos na via de sinalização da insulina e na homeostase glicêmica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Modelo experimental

Para a realização deste trabalho foram utilizados 64 ratos *Sprague-Dawley* machos, com 6 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-FCF/USP). Os animais foram mantidos em gaiolas, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$, com 15 a 20 trocas de ar por hora, e com ciclo biológico invertido de 12h claro/12h escuro.

Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). É importante lembrar que o projeto para a elaboração desse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), Protocolo CEUA/FCF/311.

5.2 Rações

As rações utilizadas no estudo foram preparadas nas dependências do IQ-FCF/USP seguindo como base as recomendações do *America of Nutrition*, para manutenção de roedores AIN-93M (REEVES; NIELSEN e FAHEY, 1993).

5.2.1 Ração controle (R-CON)

Com o intuito de manter o mesmo teor de nitrogênio, quando comparada à ração suplementada com leucina, a ração AIN-93M foi adaptada e houve acréscimo dos aminoácidos não essenciais: alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina (APÊNDICE A).

5.2.2 Ração suplementada com leucina (R-LEU)

A ração teve sua formulação adaptada da ração AIN-93M, com adição de 4,45 g/100 g do aminoácido L-leucina, 0,98 g/100 g de isoleucina e 0,57 g/100 g de valina (4,45 g/100 g),

sendo que a dose de L-leucina se encontrou dentro do limite máximo tolerável para a ingestão sem causar qualquer efeito adverso (TSUBUKU et al., 2004). Dessa forma, 60 g de amido foram substituídos por L-leucina (44,5g) isoleucina (9,8g) e valina (5,7g), para cada quilograma de ração preparada (APÊNDICE A).

5.2.3 Rações restrição calórica (R-RC) e restrição calórica suplementada com leucina (R-RC+LEU)

A fim de evitar que os animais dos grupos submetidos ao protocolo de restrição calórica apresentassem uma ingestão de nutrientes inferior às recomendações do *American Institute of Nutrition*, as rações R-RC e R-RC+LEU tiveram seus ingredientes ajustados conforme o experimento de Pugh et al. (1999) (APÊNDICE A).

5.3 Protocolo de restrição calórica

O acompanhamento do consumo alimentar foi realizado 3 vezes por semana, em balança semianalítica com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Os animais dos grupos RC e LEU+RC foram submetidos à RC de 30% em relação ao consumo do grupo DT. A quantidade de ração foi ofertada de acordo com consumo *ad libitum* do grupo DT, ajustada pelo peso corporal do animal (grama de ração/ 100g massa corporal). A ração foi ofertada diariamente entre os horários 12:00 e 14:00hrs.

5.4 Protocolo de treinamento físico

O protocolo de treinamento utilizado consistiu em corrida em esteira ergométrica programável (Softmove, Implemed, São Paulo-SP), adaptada para treinar 8 animais simultaneamente no ciclo escuro. A intensidade do treinamento aeróbio utilizado foi baseada no teste de esforço máximo (TEM) a fim de assegurar que o treino se mantivesse entre uma intensidade baixa a moderada (50 a 70% da velocidade alcançada pelo TEM). O treino foi realizado 5 vezes por semana, com duração de 1 hora, durante 8 semanas para os animais que foram submetidos ao destreinamento, e 14 semanas para o grupo TR (RODRIGUES et al., 2007; LEHNEN et al., 2010).

5.5 Teste de esforço máximo (TEM)

Foram realizados 5 TEM durante o experimento para garantir o ajuste da carga de treinamento e o teste foi realizado conforme descrito na literatura (RODRIGUES et al., 2007; LEHNEN et al., 2010). Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de adaptação na esteira em uma velocidade de 0,3 km/h durante 15 minutos por 3 dias consecutivos. Após esse período, o teste foi realizado em uma velocidade inicial de 0,3 km/h, aumentando progressivamente 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão dos animais.

5.6 Delineamento do experimento

O experimento foi dividido em duas fases: a primeira para determinação do *baseline* e a segunda para caracterização do modelo experimental e execução da proposta de intervenção com restrição calórica e suplementação com leucina em condição de destreinamento físico. Na primeira fase, os animais foram mantidos durante uma semana em gaiolas coletivas (2 animais por caixa) visando à adaptação dos mesmos à ração controle, às condições da sala e à manipulação. Na semana seguinte, os animais foram distribuídos de acordo com o a média do peso corporal, em dois grupos:

- **Grupo sedentário (SED, n=16):** animais não-treinados com acesso *ad libitum* a ração AIN-93M.
- **Grupo treinado (TR, n=48):** animais treinados durante 8 semanas em esteira ergométrica (Softmove, Implemed, São Paulo, SP) e com acesso *ad libitum* a ração AIN-93M.

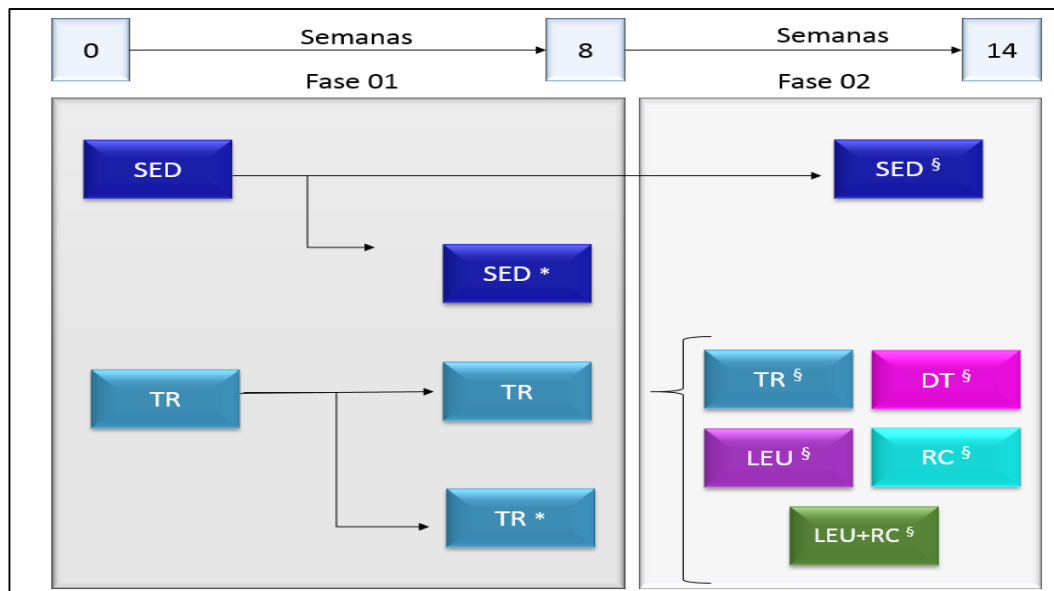
Todos os animais tiveram livre acesso à ração AIN-93M e água nesse período. Para a determinação do *baseline*, 8 animais de cada grupo foram eutanasiados após essa etapa do experimento. Na segunda fase, os demais animais do grupo TR foram redistribuídos em 5 grupos de acordo com os valores da massa corporal, área sob a curva (AUC) e o TEM:

- **Grupo treinado (TR, n=48):** animais treinados durante 8 semanas em esteira ergométrica (Softmove, Implemed, São Paulo, SP) e com acesso *ad libitum* a ração AIN-93M.
- **Grupo destreinado (DT, n=8):** animais que cessaram o treinamento após 8 semanas e tiveram acesso *ad libitum* a ração AIN-93M.

- **Grupo destreinado e suplementado com leucina (LEU, n=8):** animais que interromperam o treinamento após 8 semanas e receberam a ração suplementada com leucina.
- **Grupo destreinado e com restrição calórica (RC, n=8):** animais que interromperam o treinamento após 8 semanas e receberam 30% a menos da quantidade de ração consumida *ad libitum* pelo grupo DT.
- **Grupo destreinado suplementado com leucina e com restrição calórica (LEU+RC, n=8):** animais que interromperam o treinamento após 8 semanas e receberam 30% a menos da ração suplementada com leucina consumida *ad libitum* pelo grupo DT.

Todos os grupos apresentaram livre acesso à água durante o experimento e, a partir dessa etapa do experimento todos os animais foram alocados em gaiolas individuais, para que o consumo alimentar fosse adequadamente controlado. No final da 14ª semana todos os animais foram eutanasiados. Na Figura 4 é possível visualizar o desenho experimental deste estudo.

Figura 4: Delineamento experimental do estudo.



*animais eutanasiados na 8ª semana § animais eutanasiados na 14ª semana.

5.7 Eutanásia e análises

Durante o experimento foram realizadas avaliações *in vivo*, como a evolução do peso corporal, os testes de tolerância à glicose e à insulina. As análises da composição corporal, parâmetros séricos e teciduais foram avaliados após a eutanásia.

5.7.1 Análises *in vivo*

5.7.1.1 *Peso corporal*

A avaliação do peso corporal foi realizada 3 vezes por semana, em balança semianalítica com precisão de 0,1 g (Marte AL 5000). Os animais foram manipulados no ciclo escuro, em horário fixo (14h às 15h).

5.7.1.2 *Teste de tolerância à glicose (OGTT)*

O teste de tolerância oral à glicose foi realizado na 8ª e na 13ª semana. Após 8 horas de jejum, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), e na sequência receberam via gavagem a solução de glicose na concentração de 2 g/kg de peso. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos e a dosagem glicêmica foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Check Performa (Roche®).

5.7.1.3 *Teste de tolerância à insulina (ITT)*

Para a avaliação da sensibilidade à insulina, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à insulina *in vivo* em 3 momentos diferentes, sendo estes no início do experimento, na 8ª e 13ª semanas. Nesse teste, para a determinação da curva glicêmica após administração de insulina, foi injetado via intraperitoneal uma dose de 0,75 U/kg de peso corporal de insulina regular humana (Novolin R, Novo Nordisk, Araucária, P.R., Brasil) nos animais em jejum de 4 a 8 horas. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro (Accu-Check Performa, Roche®) em amostras de sangue retiradas da veia caudal nos tempos zero (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos após a administração de insulina.

Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (KITT), mediante análise da curva de decaimento de acordo com o método proposto por Bonora et al. (1989).

5.7.2 Eutanásia e coleta de amostras

No dia precedente à eutanásia, os animais foram privados de ração por período equivalente a 4 horas. Após esse período, os animais voltaram a ter acesso à alimentação por igual tempo de jejum na quantidade equivalente ao consumo médio/hora do dia anterior. Após esse período, a ração foi totalmente retirada 8 horas antes do início da eutanásia, estabelecendo assim um estado metabólico semelhante para todos. Com o intuito de evitar o efeito agudo do exercício, os animais do grupo TR interromperam o treinamento 72 horas antes do início da eutanásia.

Para minimizar possíveis interferências do tempo de jejum e do horário da eutanásia, a ordem dos animais eutanasiados foi rotativa, ou seja, um animal de cada grupo foi eutanasiado até que se repetisse o mesmo grupo. Os ratos foram eutanasiados no período da manhã, entre 09:00 e 12:00 horas por venosecção sob anestesia com 0,2 ml/kg de peso corporal com uma solução de Ketamina e cloridato Xilazina (Sepso Indústria e Comércio Ltda., Paulínia, SP, Brasil) na proporção 2:1.

O sangue foi coletado, centrifugado a 4 °C, 3.000 rpm, por 15 minutos; e as respectivas porções séricas foram separadas. O soro foi armazenado em microtubos, em *freezer* (-80°C). Tecidos adiposos brancos (retroperitoneal, epididimal e subcutâneo) e o fígado foram retirados, pesados e armazenados em *freezer* (-80°C). Os tecidos utilizados nos outros experimentos foram submetidos ao mesmo protocolo de retirada e armazenamento.

No intuito de preparar a carcaça para a composição corporal, todo o trato gastrointestinal foi retirado e higienizado com solução salina, antes de ser devolvido à carcaça. Nesse momento, a carcaça foi pesada em balança analítica com precisão de 0,0001 g (Ohaus) e, posteriormente, levada à estufa a 70 °C para determinação da umidade. A carcaça foi armazenada em *freezer* a -20°C até a determinação da composição corporal.

5.7.3 Análises após a eutanásia

5.7.3.1 *Composição química da carcaça*

Avaliação da composição corporal dos animais foi realizada por meio de análise química da carcaça. Para determinação do conteúdo de lipídios, proteína, umidade e cinzas, foi utilizada metodologia conforme descrito por Donato Jr, et al. (2006). A carcaça consistiu de todo o corpo do animal, incluindo a cabeça, com exceção da amostra de sangue, fígado, tecidos adiposos brancos (retroperitoneal, epididimal e subcutâneo) e músculos (gastrocnêmios e sóleos) que foram removidos para análises. Como já mencionado, o conteúdo gastrintestinal foi retirado e lavado em solução salina, antes de ser devolvido à carcaça.

5.7.3.2 *Parâmetros séricos*

A concentração de glicose sérica foi determinada pelo método de Bergmeyer (1973). As dosagens de citocinas foram realizadas pelo método imunoensaio multiplex, utilizando *kit rat serum adipokine panel 7 LINCOplex*, para dosagem simultânea de IL-6, IL-10 e leptina, e *kit rat adiponectin Single-plex*, para a determinação da concentração sérica de adiponectina. Ambos os *kits* são produzidos pela LINCO Research (EUA) e as determinações foram feitas em equipamento automático Lincoplex 200.

A insulina sérica foi dosada por meio do kit *Insulin EZRMI-13K* (Merck Millipore) utilizando método colorimétrico em leitor de microplaca conforme as recomendações do fabricante.

5.7.3.3 *Parâmetros teciduais*

5.7.3.3.1 Dosagem de citocinas

Para a análise das citocinas IL-6 e IL-10 no fígado dos animais foi utilizado o kit *MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Bead Panel* (MerckMillipore). Para a extração do tecido utilizou-se tampão PBS (pH=7,4) com inibidores de protease e fosfatase. As determinações foram feitas em equipamento automático MAGPIX® seguindo-se as instruções do fabricante.

5.7.3.3.2 Ensaio de ligação da unidade p65 do NF-kB

Para avaliar a ligação das subunidades p50 e p65 do NF-kB à região promotora do DNA foi utilizado o *kit NF-kB p50/p65 transcription*® (Abcam). O kit utiliza placa contendo 96 poços onde a sequência alvo do NF-kB está imobilizada. O ensaio consiste na incubação da fração proteica total ou nuclear das amostras na placa, possibilitando que as moléculas de NF-kB presentes no extrato reconheçam a sequência-alvo imobilizada e se liguem. Em seguida, os anticorpos primários específicos marcam as proteínas ligadas por meio da adição de anticorpos secundários conjugados a HRP (*Horseadish Peroxidase*) e uma leitura colorimétrica sensível a 450 nm torna possível a quantificação da absorbância e da ligação.

5.7.3.3.3 Concentrações de colesterol e triglicérides

A extração de lipídeos para a determinação das concentrações de colesterol e triglicérides foi realizada pelo método de Hara e Radin, 1978 e Asadi et al. 2010. Nesse método, 1,125 mL de hexano isopropanol foram adicionados à 62,5 mg de fígado e mantidos *overnight* sob agitação para desnaturação do tecido. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo e adicionado de 1,5 mL de solução de sulfato de sódio (6,6%), agitado e colocado em repouso durante 15 minutos para decantar. Após as amostras decantarem, retirou-se 200 µL do sobrenadante e utilizou-se gás nitrogênio para secar. As amostras foram ressuspensas em 0,4 mL de isopropanol. O colesterol total e os triglicérides teciduais foram determinados através de método enzimático colorimétrico utilizando os kits comerciais Colesterol liquiform Labtest® e Triglicérides liquiform Labtest®.

5.7.3.3.4 Expressão gênica

A expressão gênica da proteína reguladora de ligação de esteróis (SREBP-1c), ácido graxo sintetase (FAS), acetil-CoA carboxilase (ACC), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR α) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), no fígado, foi realizada pela técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), conforme descrito a seguir.

Para extração de RNA, amostras de fígados (25mg) foram homogeneizadas com polytron (IKA) e isolados utilizando-se o reagente trizol (Invitrogen, Carlsbad, California), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram dissolvidas em água ultrapura e suas concentrações foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro (Nanodrop) nos comprimentos de onda de 260nm (RNA) e 280nm (proteína). O grau de pureza da amostra foi avaliado através da relação das leituras 260 e 280nm, sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0. Uma alíquota do RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para visualização da integridade da amostra observando as subunidades do RNA ribossômico, 18S e 28S, e também possíveis contaminações com DNA.

A transcrição reversa do RNA total para cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os primers que foram utilizados nas reações de qRT-PCR foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Quadro 1). As reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas em triplicata, em placas específicas de 96 poços no equipamento StepOne System, usando o sistema para detecção de produtos de amplificação SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

O sinal de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de DNA-alvo, gerou o parâmetro ciclo, denominado “*Cycle threshold*” (Ct). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene foi registrado e comparado com o gene constitutivo GAPDH.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na reação de PCR em tempo real (qRT-PCR)

Gene	Sequência	
	<i>Sense</i>	<i>Anti sense</i>
PEPCK	CTGGCGTTGAATGCTTTCTC	ACTGTTGGCTGGCTCTCACT
SREBP-1c	CTCCGGCTTCTCAGGAAC	AGTGTGGCTGCAGTACAACG
ACC	GCTCTGCCTGCACTTTCTCT	CAAATATGGTGGTGGCATTG
FAZ	CAGGACAGCCTGCAACAGT	CTGGCTCAGCACCTCTATCC
PPAR- α	ACTATGGAGTCCACGCATGTGA	TTGTTCGTACGCCAGCTTTAGC
GAPDH	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT	AGACAGCCGCATCTTCTTGT

5.7.3.3.5 Quantificação protéica

A quantificação das proteínas sirtuína 1 total (SIRT-1), phospho fator de transcrição “*Forkhead*” da família da FoxO (pFOXO1_{Ser256}), phospho proteína quinase ativada pelo AMP (p-AMPK), proteína quinase B total (AKT) e phospho proteína quinase B (AKT₃₀₈) foram realizadas pela técnica de quimioluminescência, western blotting.

- **Quantificação de proteínas**

Para quantificar a concentração da proteína no homogenato foi utilizado o kit comercial BCA Protein Assay Reagent (Termo Scientific), onde o princípio da técnica é a Proteína BCA, que combina a redução conhecida de Cu^{2+} para Cu^{+1} por proteínas em meio alcalino, com a detecção colorimétrica altamente sensível e seletivo do cátion de cobre (Cu^{+1}) por ácido bicinconínico.

Para o ensaio, os homogenatos de fígado foram diluídos em água deionizada 40x. Os padrões de albumina foram diluídos em diluição seriada 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 e 0. Os reagentes de detecção foram misturados em proporção 1:50. Na microplaca foi adicionado 10 μl de amostra diluída e padrões e, após, adiciona-se 200 μl do reagente de detecção e é realizada a leitura no leitor de microplaca à 562 nm (Synergy H1/ Biotek). As leituras foram plotadas a partir da curva de albumina.

- **Preparo do gel de poliacrilamida**

O gel de poliacrilamida foi preparado conforme protocolo de Sambrook *et al.* (1989), descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empilhamento) constituída de poliacrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (separação) foi preparado com 10 a 12% de poliacrilamida, 380 mM Tris. HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

- **Preparo do lisado de proteínas para SDS-PAGE e *Western blotting***

As amostras foram fervidas a 100 °C, por 5 minutos, em tampão de amostra contendo 125 mM Tris, pH 6,8, 25% glicerol, 2,5% SDS, 2,5% beta-mercaptoetanol e 0,002% de azul de
SILVA, K.G

bromofenol. O sobrenadante foi então combinado com o tampão acima descrito. Amostras contendo 50 µg por “poço”, foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida por 3 horas a 100 V.

- Transferência do gel para a membrana

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose (*Amersham Hybond ECL Nitrocellulose*) foi hidratada e então, um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm (Whatman), gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, pH 8,3), sob corrente de 120V por 90 minutos.

- Sondagem das proteínas com anticorpo

Os sítios sem proteína das membranas foram bloqueados com albumina de soro bovino (A7030 Sigma) a 7%, em tampão PBST, por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, as membranas foram colocadas nos cacetes do aparelho SNAPid e lavadas três vezes com tampão PBST. O anticorpo específico primário de cada proteína foi diluído em tampão PBST (1:500) com 2 % de albumina e utilizado para incubação das membranas durante 20 minutos. Posteriormente, as membranas foram novamente colocadas no SNAPid para serem lavadas três vezes com PBST. A proteína foi então marcada nas membranas com anticorpo secundário IgG para camundongo (SIRT-1) ou IgG para coelho, para as demais proteínas, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em PBST por 20 minutos, com agitação e repetiu-se o procedimento de lavagem das membranas.

- Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes A e B do *kit* ECL (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio) e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. As bandas (proteínas) foram então visualizadas pelo sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE) e analisados pelo *software* ImageQuant TL (GE Healthcare).

5.8 Análise estatística

Os parâmetros foram apresentados segundo os objetivos citados na presente pesquisa. A normalidade foi previamente analisada pelo teste Shapiro-Wilk. Nas variáveis nas quais a normalidade não foi confirmada, procedimentos não paramétricos foram utilizados. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. O Teste T de *Student* foi utilizado para amostras independentes. As comparações entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey*, para identificação dos contrastes significantes. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%, para rejeitar a hipótese de nulidade e a elaboração dos cálculos e gráficos foi realizada através do pacote Graphic pad prisma 5.

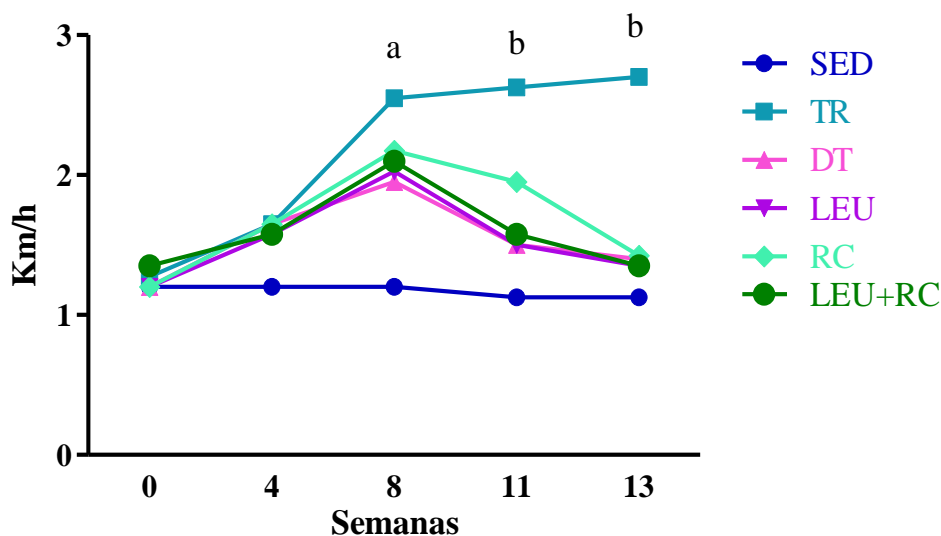
6.0 RESULTADOS

Nesse trabalho serão apresentados os resultados de peso, consumo e teste de esforço máximo referente a todos os grupos. Os demais resultados, como composição da carcaça, parâmetros séricos e teciduais serão apresentados apenas dos grupos submetidos ao destreino físico.

6.1 Teste de esforço máximo

Foram realizados 5 testes de esforço máximo (TEM) durante o experimento no intuito de comprovar a efetividade do treino, bem como distribuir os animais nos grupos ao término do período de treinamento. Conforme é possível observar na Figura 5, a partir da 8ª semana o desempenho do grupo SED foi significativamente menor em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). No teste realizado na 11ª semana o grupo TR apresentou desempenho significativamente maior aos demais grupos, aumentando progressivamente, em especial na 13ª semana ($p < 0,05$). Considerando a definição de destreino físico, é possível certificar que em relação ao TEM, a interrupção do treinamento por 6 semanas foi efetiva para alterar as adaptações no desempenho adquiridas pelos animais durante as 8 semanas de treino.

Figura 5: Teste de esforço máximo dos grupos experimentais.



Legenda: **a.** SED vs (TR, DT, LEU, RC e LEU+RC) ($p < 0,05$); **b.** TR vs (SED, DT, LEU, RC e LEU+RC) $p < 0,05$. Dados expressos em média±desvio-padrão.

6.2 Caracterização dos grupos após oito semanas de treinamento (*baseline*).

Na oitava semana do experimento, 32 animais do grupo TR interromperam o treinamento e foram redistribuídos para formar os grupos DT, LEU, RC e LEU+RC. Para tanto, houve o cuidado de avaliar a massa corporal e a área sob a curva (AUC) referente ao teste de tolerância à glicose (OGTT) nesse período. Como pode ser observado na Tabela 2 não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, tanto para a massa corporal quanto para a AUC.

Tabela 2: Caracterização dos grupos a partir do peso corporal para distribuição na 8ª semana (*baseline*)

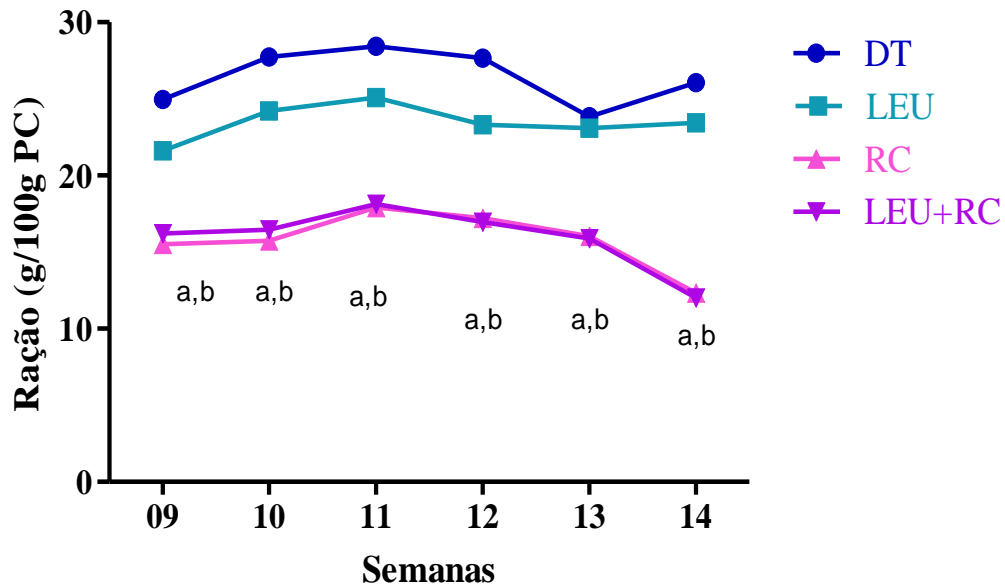
Grupos	Peso (g)	AUC
SED	503,1 ± 9,69	4113,75 ± 457
TR	504,45 ± 28,74	4226,25 ± 1047,09
DT	506,2 ± 41,68	4102,5 ± 1892,79
LEU	503,47 ± 10,04	4121,50 ± 755,75
RC	505,17 ± 42,22	4290 ± 1165,63
LEU+RC	506,5 ± 43,64	4237,5 ± 918,92

Dados expressos em média±desvio-padrão

6.3 Consumo de ração

O consumo médio de ração dos grupos submetidos à restrição calórica (RC e LEU+RC) foi significativamente menor ($p < 0,0001$) quando comparado aos demais grupos, não sendo observada diferença significativa entre o consumo de ração dos animais dos grupos DT e LEU (FIGURA 6).

Figura 6: Consumo de ração durante o destreino físico.



Legenda: **a.** RC vs (DT e LEU; $p < 0,0001$) **b.** LEU+RC vs (DT e LEU; $p < 0,0001$). Dados expressos em média±desvio+padrão.

6.4 Aminograma

Conforme pode ser visualizado na Tabela 3 não houve diferença significativa nas concentrações de aminoácidos no sangue entre os animais que receberam ou não a suplementação com leucina.

Tabela 3: Concentração de aminoácidos no sangue dos animais.

Aminoácidos (mg/kg)	DT	LEU	RC	LEU+RC
asparagina	8,0	7,4	7,8	9,5
Glutamina	95,2	97,9	94,9	110,6
Alanina	43,0	41,2	50,3	52,1
Arginina	20,3	27,5	22,1	29,1
Ác. aspártico	4,0	3,7	4,7	5,5
Glicina	30,4	24,7	36,8	30,3
Ác. glutâmico	28,1	22,5	24,2	24,6
Lisina	63,4	70,6	63,1	69,1
Cistina	14,2	14,3	11,5	12,4
Metionina	7,6	7,9	8,2	8,7
Fenilalanina	10,6	10,8	10,7	11,3
Tirosina	9,7	10,1	11,0	10,6
Treonina	22,0	22,9	23,5	22,1
Prolina	16,7	17,2	25,8	24,1
Histidina	6,8	7,0	8,4	8,2
Serina	27,0	23,0	35,0	28,7
Taurina	39,2	41,0	42,5	46,5
Aminoácidos de cadeia ramificada				
Isoleucina	9,2	9,9	8,9	8,9
Leucina	15,8	17,5	16,2	19,5
Valina	15,74	17,34	15,65	15,31

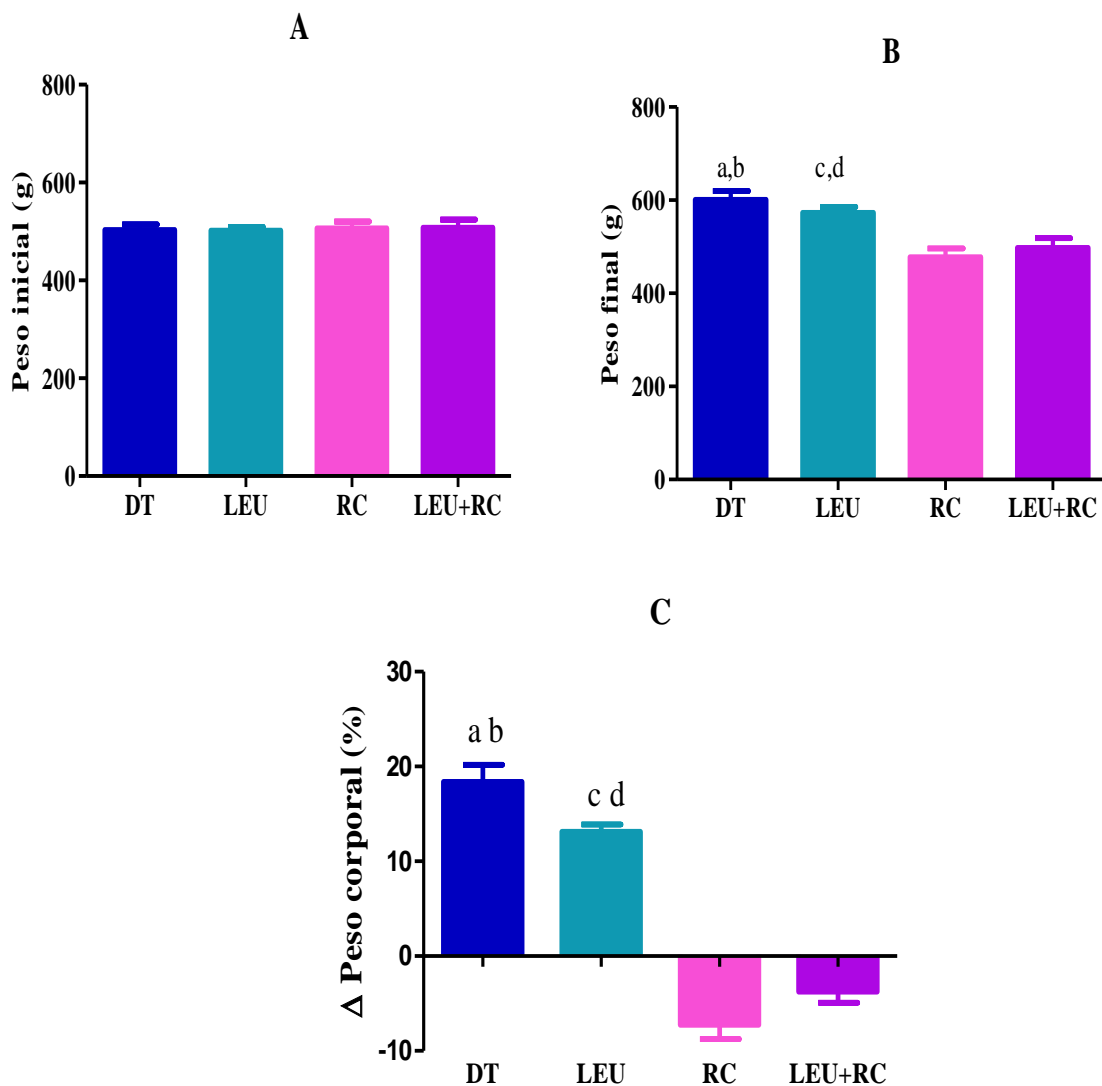
6.5 Pesos dos animais

Na Figura 7 consta o peso corporal inicial, final e a variação de peso dos animais durante o experimento, respectivamente. O peso inicial não apresentou diferença significativa entre os grupos. Por outro lado, o peso final do grupo RC foi significativamente menor

($p < 0,0001$) quando comparado aos grupos DT e LEU. Semelhantemente, o grupo LEU+RC também apresentou menor peso quando comparado ao grupo DT.

Na variação da massa corporal final em relação à massa corporal inicial $\{\Delta = [(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{peso inicial}] \times 100\}$, a restrição calórica foi eficaz em atenuar o ganho ponderal decorrente do destreino físico (DT vs RC; LEU+RC e LEU vs RC; LEU+RC. $p < 0,0001$). Além disso, constatou-se que os ratos do grupo RC e LEU+RC apresentaram perda de peso no decorrer das últimas 6 semanas do experimento.

Figura 7: Peso inicial, final e variação do peso corporal dos animais.

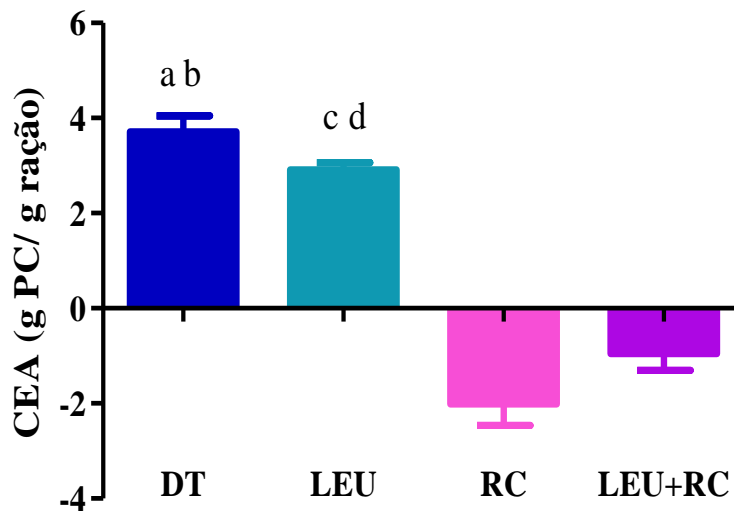


Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC; **c.** LEU vs RC; **d.** LEU vs LEU+RC. $p < 0,0001$. Dados expressos em média±desvio-padrão. **A.** Peso inicial **B.** Peso final **C.** Δ peso corporal

6.6 Coeficiente de eficácia alimentar

Na Figura 8 é representado o CEA dos grupos experimentais durante o período de destreino físico. Os grupos submetidos à restrição calórica associada ou não a suplementação com leucina, apresentaram CEA significativamente menor ($p < 0,0001$) do que os grupos DT e LEU, refletindo a perda de peso observada nesses animais.

Figura 8: Coeficiente de eficácia alimentar.



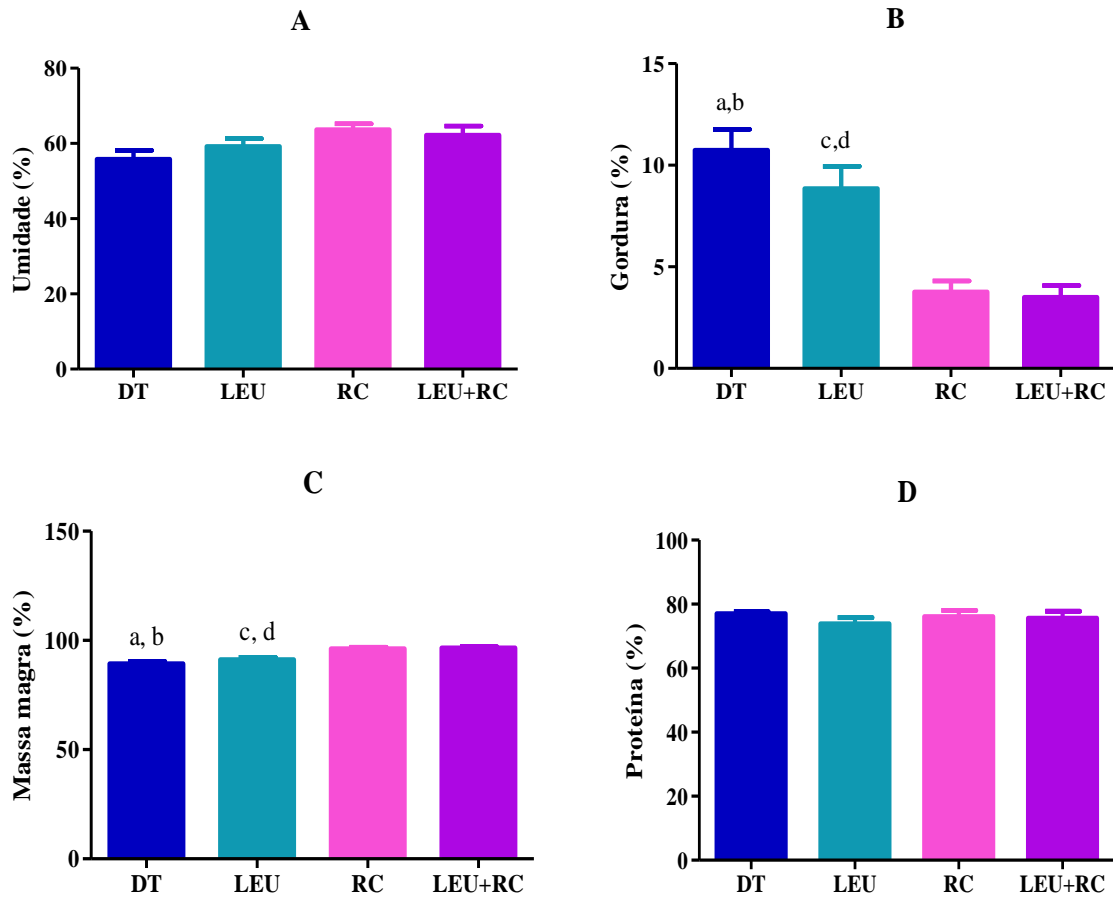
Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC ($p < 0,0001$); **c.** LEU vs LEU+RC; **d.** LEU vs LEU+RC ($p < 0,0001$). CEA: Coeficiente de eficácia alimentar. Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

6.7 Composição corporal

Na Figura 9 estão representados os valores de umidade (A), gordura (B), massa magra (C) e proteína (D) presentes na carcaça dos animais. Conforme pode ser observado, não houve diferença significativa em relação à umidade e a quantidade de proteína na carcaça dos animais, essa última indica que os animais não apresentaram desnutrição durante a restrição calórica. Em contrapartida, os grupos submetidos à restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina (RC e LEU+RC) apresentaram percentual de gordura significativamente menor ($p < 0,05$) do que os grupos DT e LEU. Por último, ao que condiz a massa magra desses animais,

os grupos RC e LEU+RC apresentaram percentual significativamente maior do que os grupos DT e LEU ($p<0,05$).

Figura 9: Composição das carcaças dos animais ao final do experimento.



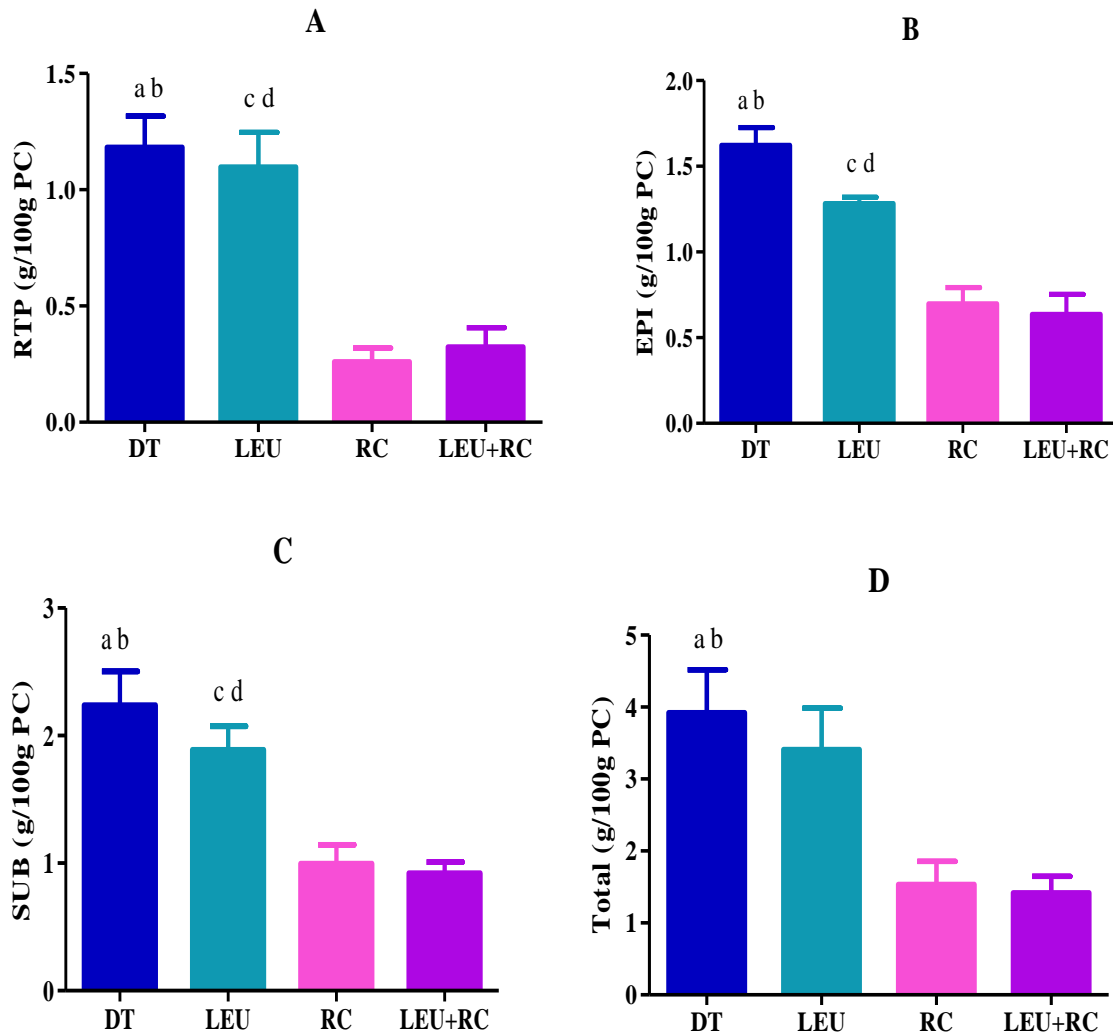
Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC; **c.** LEU vs RC; **d.** LEU vs LEU+RC ($p<0,05$). **A.** Umidade; **B.** Gordura **C.** Massa magra; **D.** Proteína. Dados expressos em média±desvio-padrão.

6.8 Peso relativo dos fígados e coxins adiposos

O peso relativo dos coxins adiposos epididimal (EPI) ($p<0,05$), subcutâneo (SUB) ($p<0,05$) e retroperitoneal (RTP) ($P<0,0001$) foi significativamente maior no grupo DT e LEU quando comparados aos grupos RC e LEU+RC. Quando realizado o somatório dos coxins adiposos o grupo DT exibiu quantidade de tecido adiposo significativamente maior ($p=0,0014$)

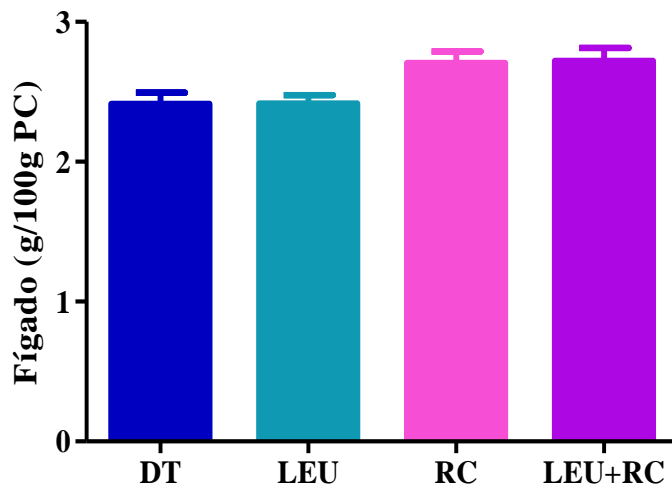
do que os grupos RC e LEU+RC (FIGURA 10). Em relação ao peso relativo dos fígados não foi observada diferença significativa entre os grupos (FIGURA 11).

Figura 10: Peso relativo dos coxins adiposos dos animais ao final do experimento.



Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC; **c.** LEU vs RC; **d.** LEU vs LEU+RC. **A.** Tecido adiposo retroperitoneal: ($p < 0,0001$); **B.** Tecido adiposo epididimal ($p < 0,05$); **C.** Tecido adiposo subcutâneo ($p < 0,05$); **D.** Somatório dos coxins adiposos ($p = 0,0014$). Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

Figura 11: Peso relativo dos fígados dos animais ao final do experimento.



Dados expressos em média±desvio-padrão

6.9 Teste de tolerância à glicose, à insulina e dosagem de insulina sérica.

No teste oral de tolerância à glicose (OGTT) realizado na 8ª semana não houve diferença significativa ($p=0,6350$) entre os grupos, porém no teste realizado na 13ª semana o grupo DT apresentou tolerância à glicose significativamente maior do que os grupos RC e LEU+RC ($p<0,05$) (TABELA 4). Quando comparado os resultados das duas semanas (FIGURA 12), observa-se que o grupo DT apresentou aumento significativo de 56,75% nas concentrações circulantes de glicose na 13ª semana, enquanto que os grupos RC e LEU+RC tiveram redução significativa de 15,50% e 19,13%, respectivamente ($p=0,0032$). Esses resultados demonstram que a interrupção do treinamento por 6 semanas foi suficiente para comprometer a captação de glicose nesses animais e que a restrição calórica associada ou não à suplementação com LEU durante esse período permitiu uma condição de homeostase glicêmica.

Se por um lado o destreinamento físico influenciou a homeostase glicêmica, o resultado não se repetiu no teste de tolerância à insulina (ITT) realizados nas respectivas semanas (TABELA 5). Todos os grupos submetidos ao destreinamento físico com ou sem intervenção nutricional não obtiveram diferença significativa entre os grupos ou entre as

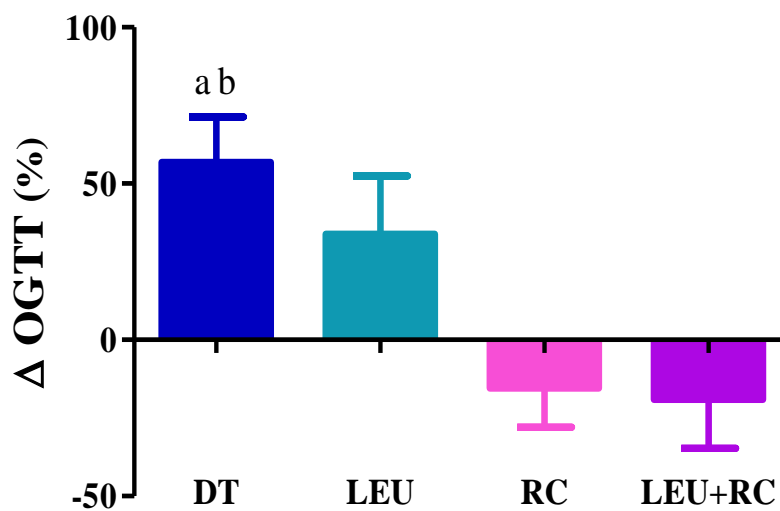
semanas, sugerindo que, as intervenções não influenciaram na melhora da sensibilidade à insulina.

Tabela 4: Teste de tolerância à glicose (mg/dl/120min) dos grupos experimentais nas semanas 8 e 13.

	Semana 8	Semana 13
DT	3120±901,1	5476±2209 ^{a,b,c}
LEU	3682±889,9	4800±614,6
RC	3686±1301	2963±1261
LEU+RC	3736±962,8	2762±1421

Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC da 13ª semana, $p < 0,05$. **c.** DT 13ª semana vs DT da 8ª semana. Dados expressos em média±desvio-padrão.

Figura 12: Δ OGTT dos grupos entre as semanas 8 e 13 do experimento.



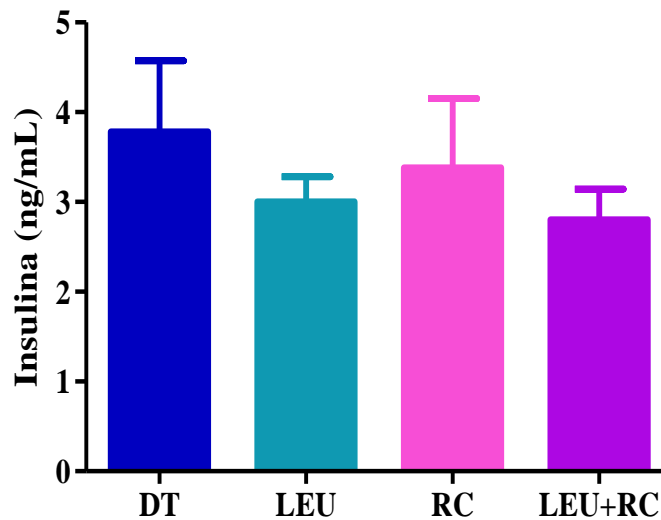
Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC ($p=0,0032$). Dados expressos em média±desvio-padrão.

Tabela 5: Teste de tolerância à insulina ($\mu\text{U/ml}$) nas semanas 8 e 13 dos grupos experimentais

	Semana 8	Semana 13
DT	1,49 \pm 0,19	0,98 \pm 0,78
LEU	1,59 \pm 0,25	0,93 \pm 0,72
RC	1,58 \pm 0,30	0,79 \pm 0,56
LEU+RC	1,53 \pm 0,36	0,96 \pm 0,65

Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

As concentrações séricas de insulina não apresentaram diferença significativa ($p=0,9654$) entre os grupos. Assim como no ITT, também não houve diferença nas concentrações de insulina sérica entre os grupos, sugerindo que o período de destreinamento não foi suficiente para ocasionar alterações significativas na sensibilidade da insulina.

Figura 13: Dosagem de insulina sérica dos grupos ao final do experimento.

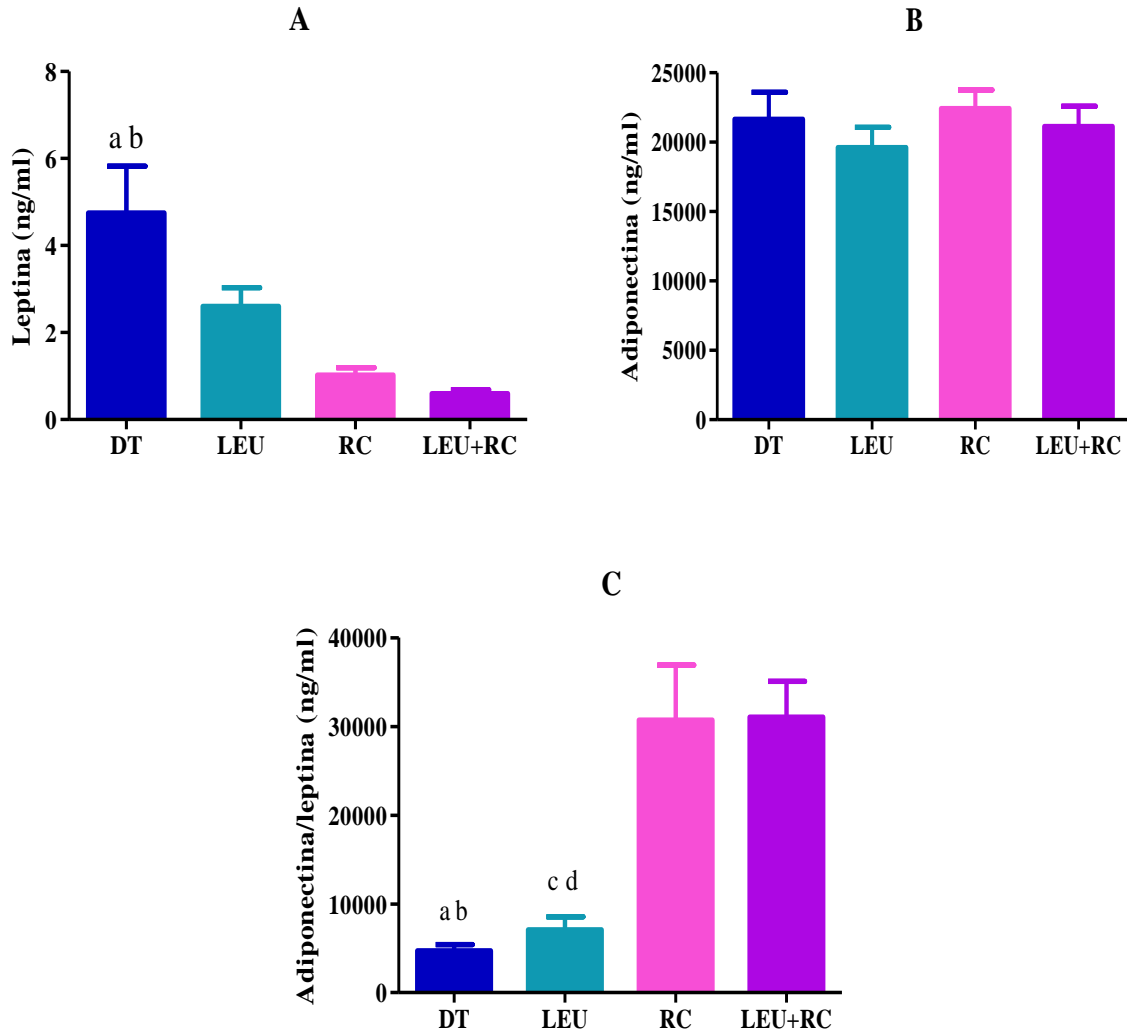
Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

6.10 Dosagem de citocinas no soro

Foram analisadas as concentrações séricas de adiponectina, leptina, IL-10 e IL-6. A restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina (grupos RC e LEU+RC) resultou em níveis circulantes de leptina significativamente menores em comparação ao grupo DT ($p < 0,0002$) (FIGURA 14). Além disso as concentrações séricas de leptina apresentaram relação significativamente positiva com a adiposidade ($p < 0,0001$) (FIGURA 15). Por outro lado, as concentrações séricas de adiponectina não apresentaram correlação significativa com a adiposidade (FIGURA 15), bem como não foi observada diferença entre as concentrações de adiponectina entre os grupos (FIGURA 14). Quando observada a razão adiponectina/leptina (FIGURA 14), os grupos submetidos a restrição calórica associada ou não com a suplementação com leucina, apresentaram razões significativamente maiores em relação aos grupos DT e LEU ($p < 0,0001$).

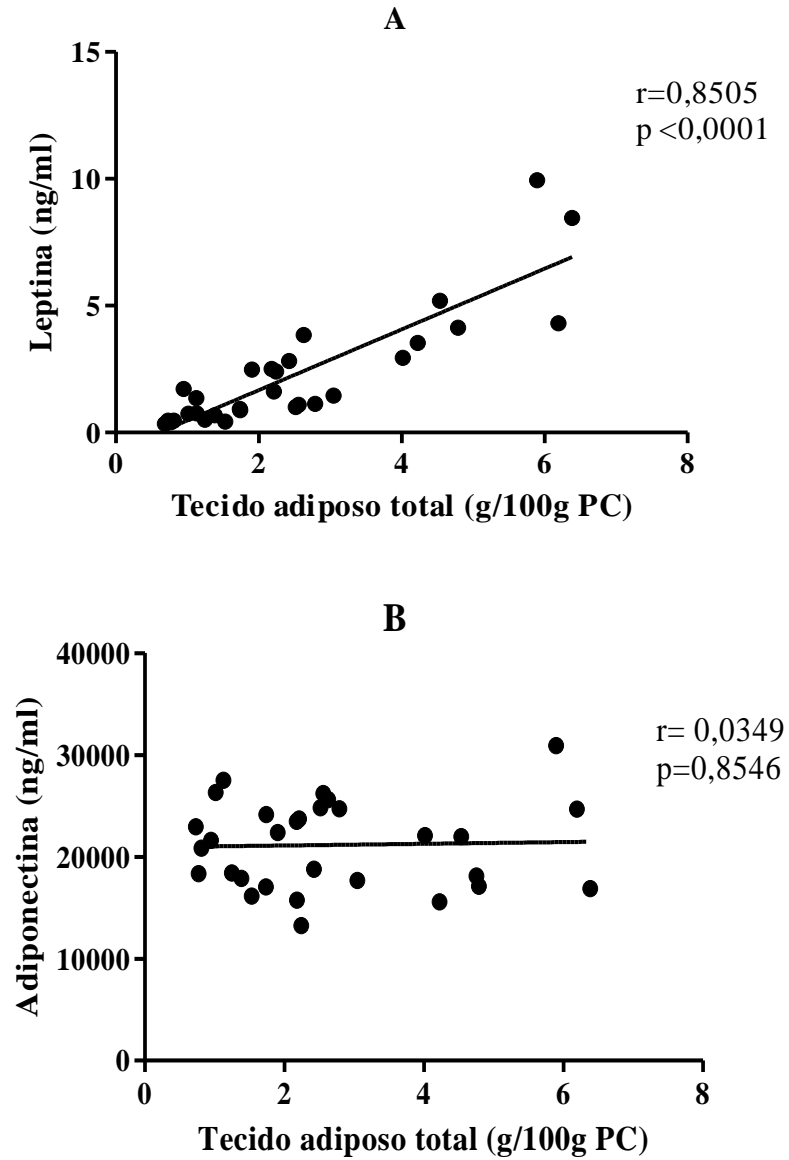
Ao que condiz as citocinas IL-6, IL-10 e a razão entre as mesmas, foi observada diferença significativa apenas nos valores de IL-6 no grupo LEU em comparação ao grupo LEU+RC ($p = 0,0064$) (FIGURA 16).

Figura 14: Concentrações séricas de adiponectina, leptina e razão adiponectina/leptina.



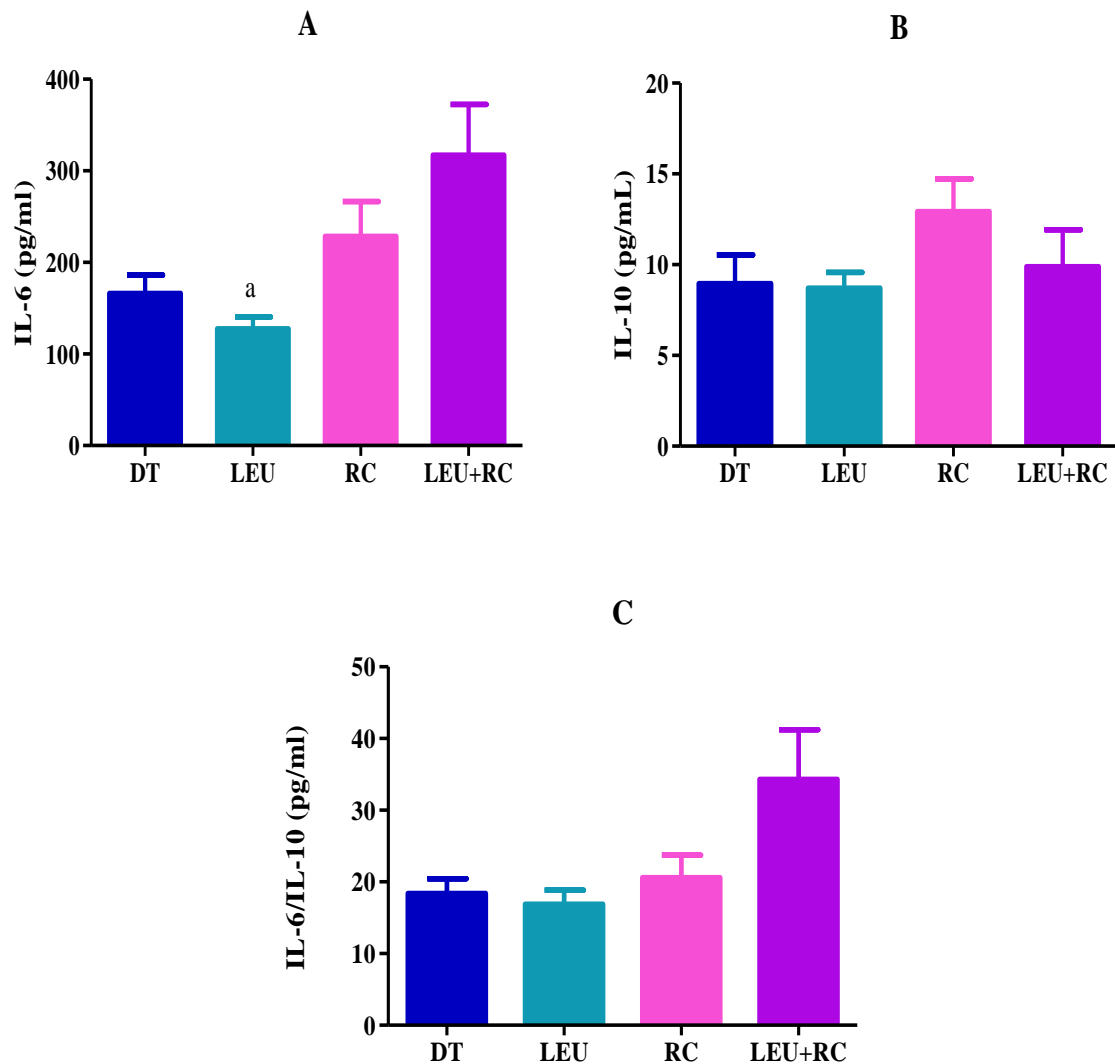
Legenda: **a.** DT vs RC; **b.** DT vs LEU+RC; **c.** LEU vs RC; **d.** LEU vs LEU+RC. Leptina: $p=0,0002$; Adiponectina/leptina: $p<0,0001$. **A.** Leptina; **B.** Adiponectina. **C.** Adiponectina/leptina. Dados expressos em média±desvio-padrão.

Figura 15: Correlação do tecido adiposo total com as concentrações séricas de leptina e adiponectina.



Legenda: A. Correlação leptina e tecido adiposo B. Correlação adiponectina e tecido adiposo

Figura 16: Concentrações séricas e razão das citocinas IL-6 e IL-10.



Legenda: a. LEU vs LEU+RC ($p=0,0064$). A. IL-6; B. IL-10; C. IL-6/IL-10. Dados expressos em média±desvio-padrão.

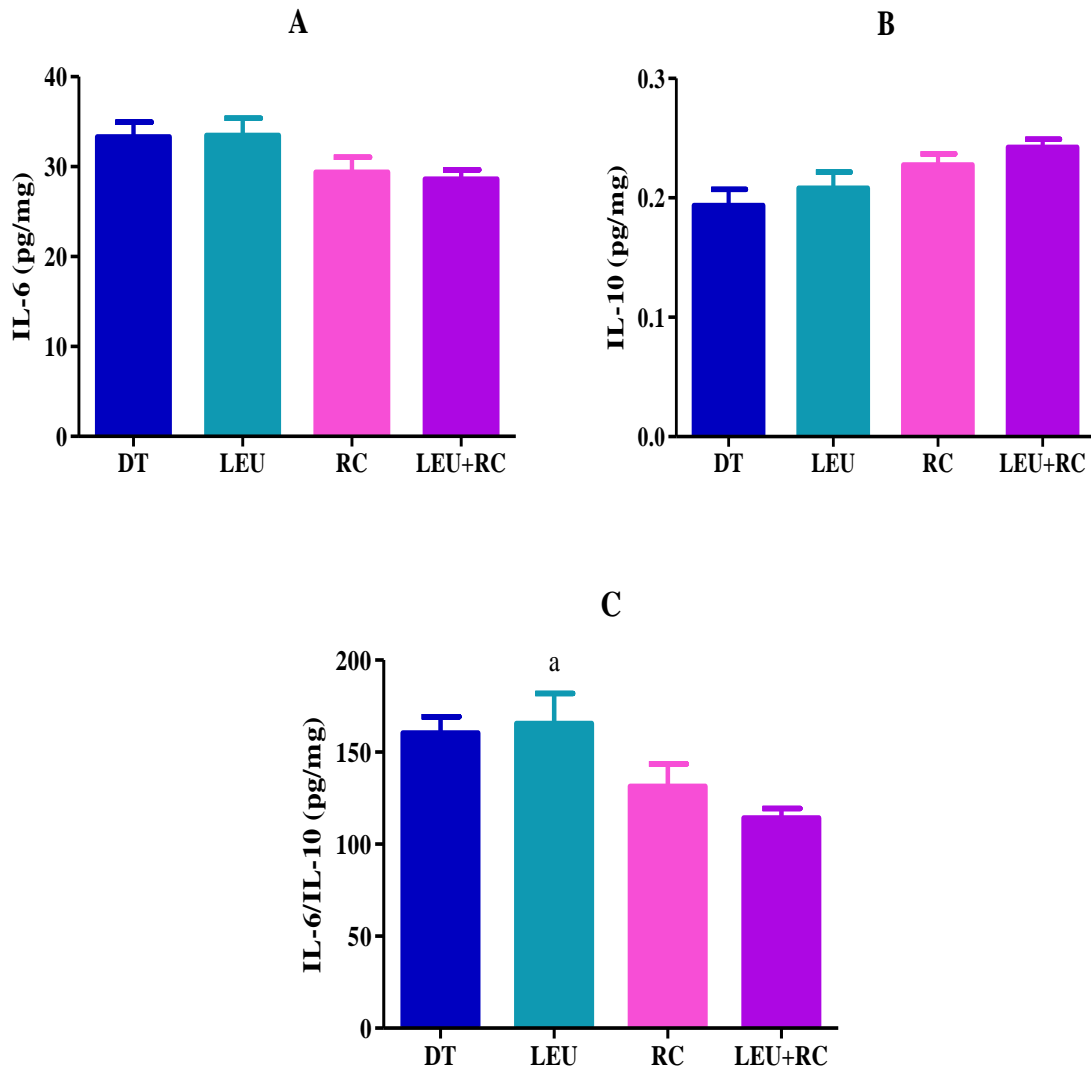
6.11 Dosagem de citocinas no fígado

Na Figura 17 encontram-se as dosagens das citocinas IL-6 e IL-10 no fígado, bem como a razão IL-6/IL-10. A dosagem das citocinas IL-6 e IL-10 não apresentaram diferença significativa entre os grupos, porém quando realizada a razão IL-6/IL-10 o grupo LEU apresentou a razão significativamente maior em comparação ao grupo LEU+RC ($p=0,0214$). Na correlação das citocinas com o peso relativo do tecido adiposo (FIGURA 18) verificou-se

SILVA, K.G

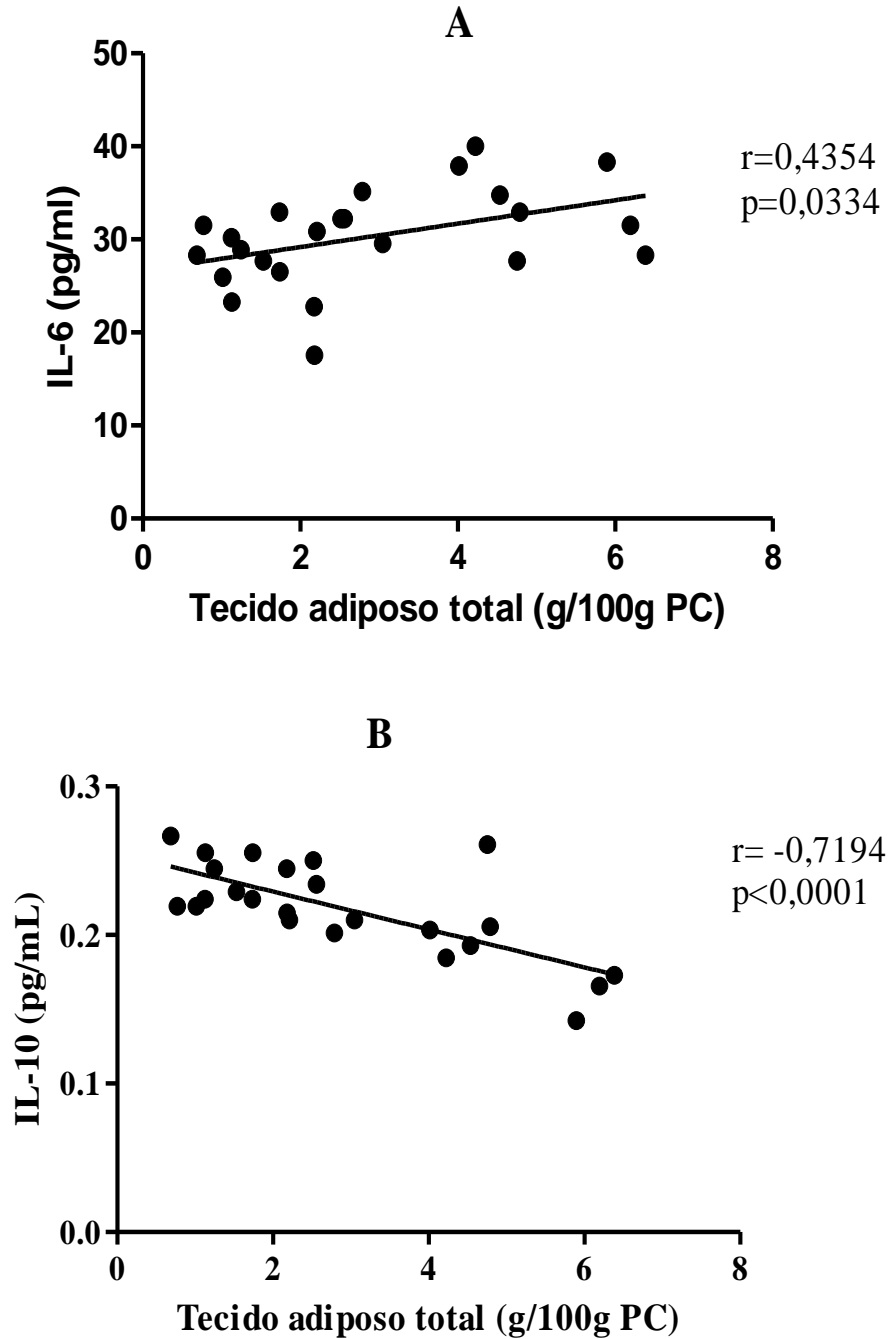
correlação significativamente positiva com a IL-6 ($p=0,0334$) enquanto a citocina IL-10 apresentou correlação negativa ($p<0,0001$).

Figura 17: Dosagem das citocinas IL-6 e IL-10 e razão IL-6/IL-10 no fígado.



Legenda: **a.** LEU vs LEU+RC ($p=0,0214$). **A.**IL-6. **B.** IL-10, **C.** IL-6/IL-10.Dados expressos em média±desvio-padrão.

Figura 18: Correlação das citocinas IL-6 e IL-10 no fígado com o peso relativo do tecido adiposo total.

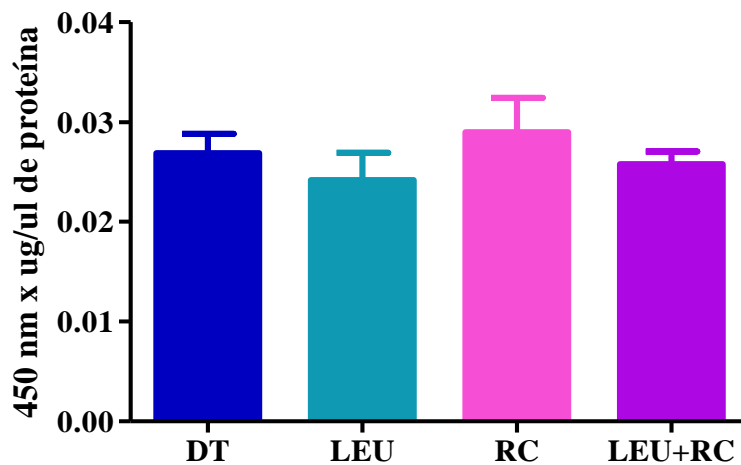


Legenda: **A.** Correlação IL-6 e tecido adiposo; **B.** Correlação IL-10 e tecido adiposo

6.12 Atividade de ligação do NF-kB no fígado.

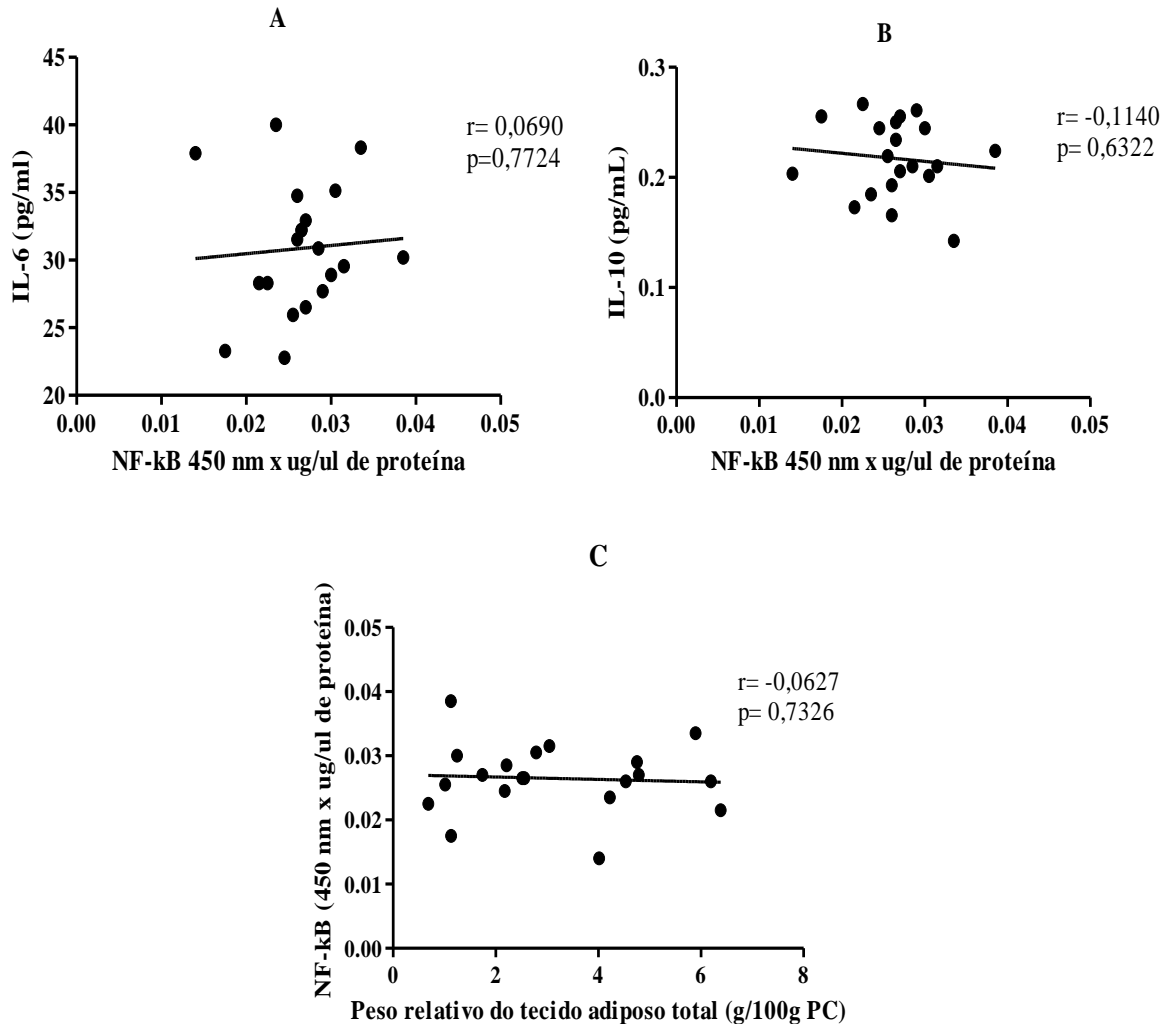
A Figura 19 apresenta o resultado do teste da atividade de ligação do NF-kB no fígado, e como pode ser observado não houve diferença significativa ($p=0,4595$) entre os grupos. Além disso, não foi observada correlação significativa entre valores de NF-kB com as citocinas IL-6 e IL-10 presentes no fígado dos animais, bem como não foi verificada influência da adiposidade sobre atividade do NF-kB (FIGURA 20).

Figura 19: Atividade de ligação do NF-kB no fígado.



Dados expressos em média±desvio-padrão.

Figura 20: Correlação da atividade de ligação do NF-kB com a concentração das citocinas IL-6 e IL-10 no fígado e com peso relativo do tecido adiposo total.

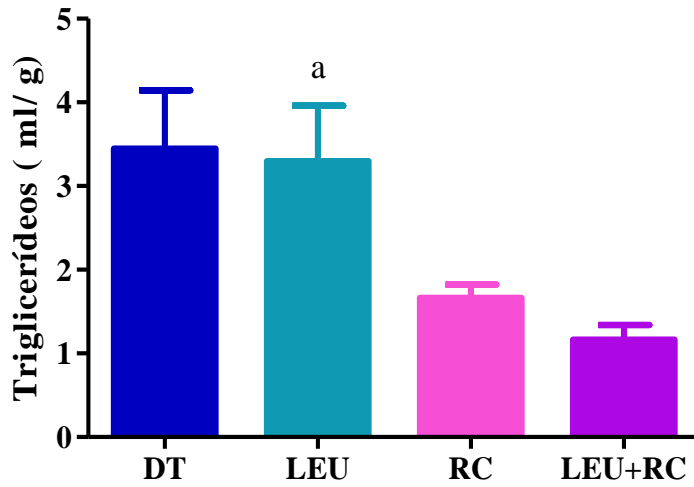


Legenda: A. Correlação IL-6 e NF-kB; B. Correlação IL-10 e NF-kB; C. Correlação NF-kB e tecido adiposo.

6.13 Dosagem de triglicerídeos e colesterol no fígado dos animais

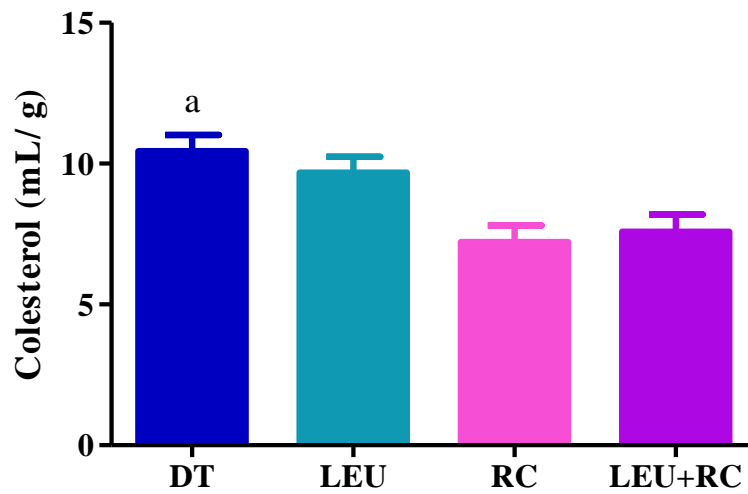
Na Figura 21 é possível observar o grupo LEU exibiu a concentração de triglicerídeos significativamente superior ao apresentado pelo grupo LEU+RC ($p=0,0127$). Por outro lado, o grupo DT apresentou a concentração de colesterol significativamente maior em relação ao grupo RC ($p=0,0115$) (FIGURA 22). Esses resultados demonstram que a restrição calórica associada ou não ao uso de leucina pode amenizar a deposição de triglicerídeos e/ou colesterol no fígado.

Figura 21: Concentração hepática de triglicerídeos.



Legenda: a. LEU vs LEU+RC ($p=0,0127$). Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

Figura 22: Concentração hepática de colesterol.

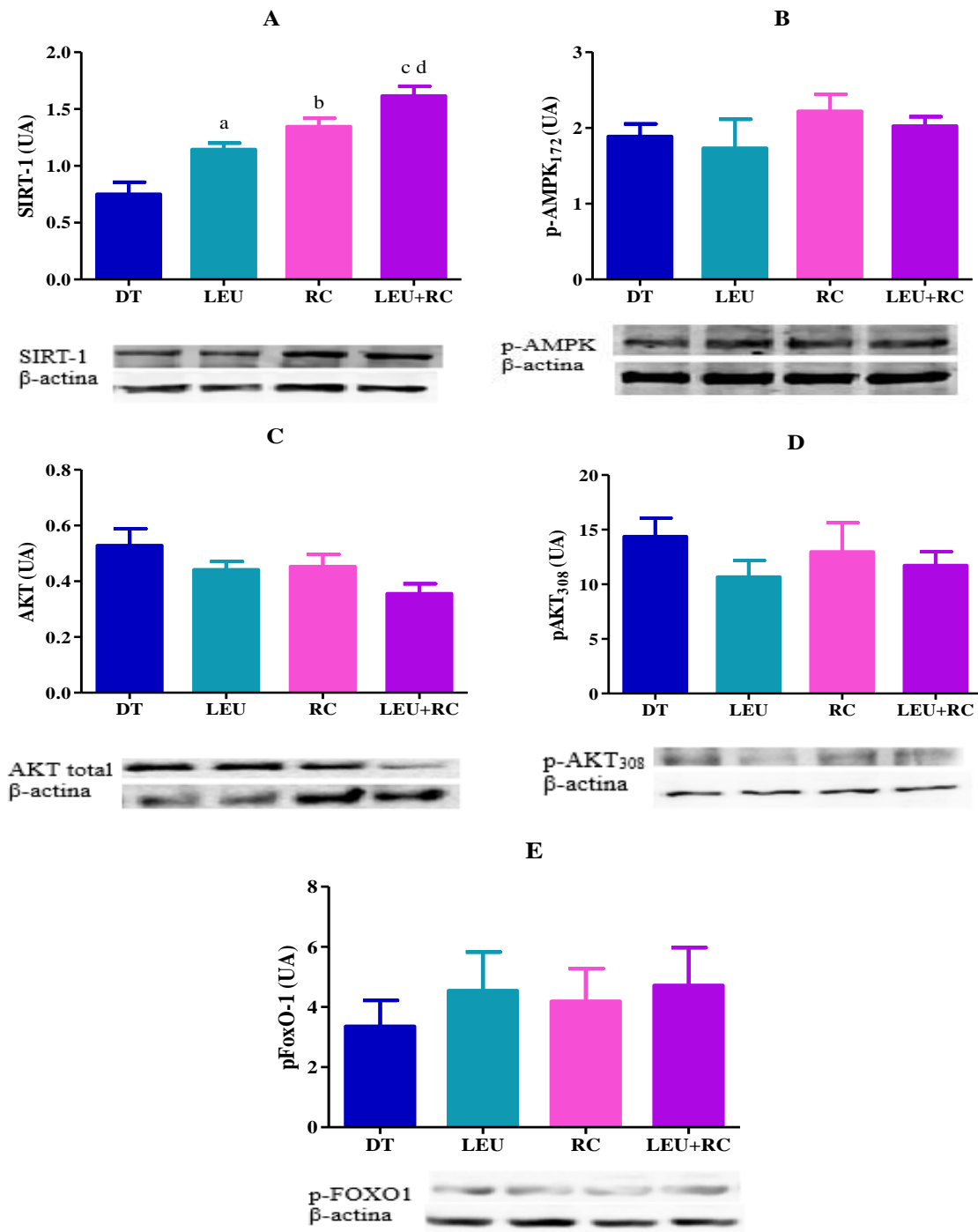


Legenda: a. DT vs RC ($p=0,0115$). Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

6.14 Quantificação de proteínas no fígado

Os gráficos seguintes apresentam a quantificação das proteínas SIRT-1, pAMPK₁₇₂, AKT total e fosforilada (Tir-308) e FoxO1 (Ser₂₅₆) no fígado dos animais após as semanas de experimento. A proteína SIRT-1 foi a única que exibiu comportamento hipotetizado em nossa pesquisa, isto é, os grupos submetidos à restrição calórica (RC e LEU+RC) apresentaram maior expressão em comparação ao grupo DT e LEU ($p < 0,05$), sugerindo que as intervenções propostas, seja na forma isolada ou em conjunto, influenciam positivamente o comportamento dessa proteína. Curiosamente as demais proteínas não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 23: Análises de *Western blot* das proteínas SIRT-1, p-AMPK, AKT total, p-AKT₃₀₈ e p-FOXO-1₂₅₆ no fígado.

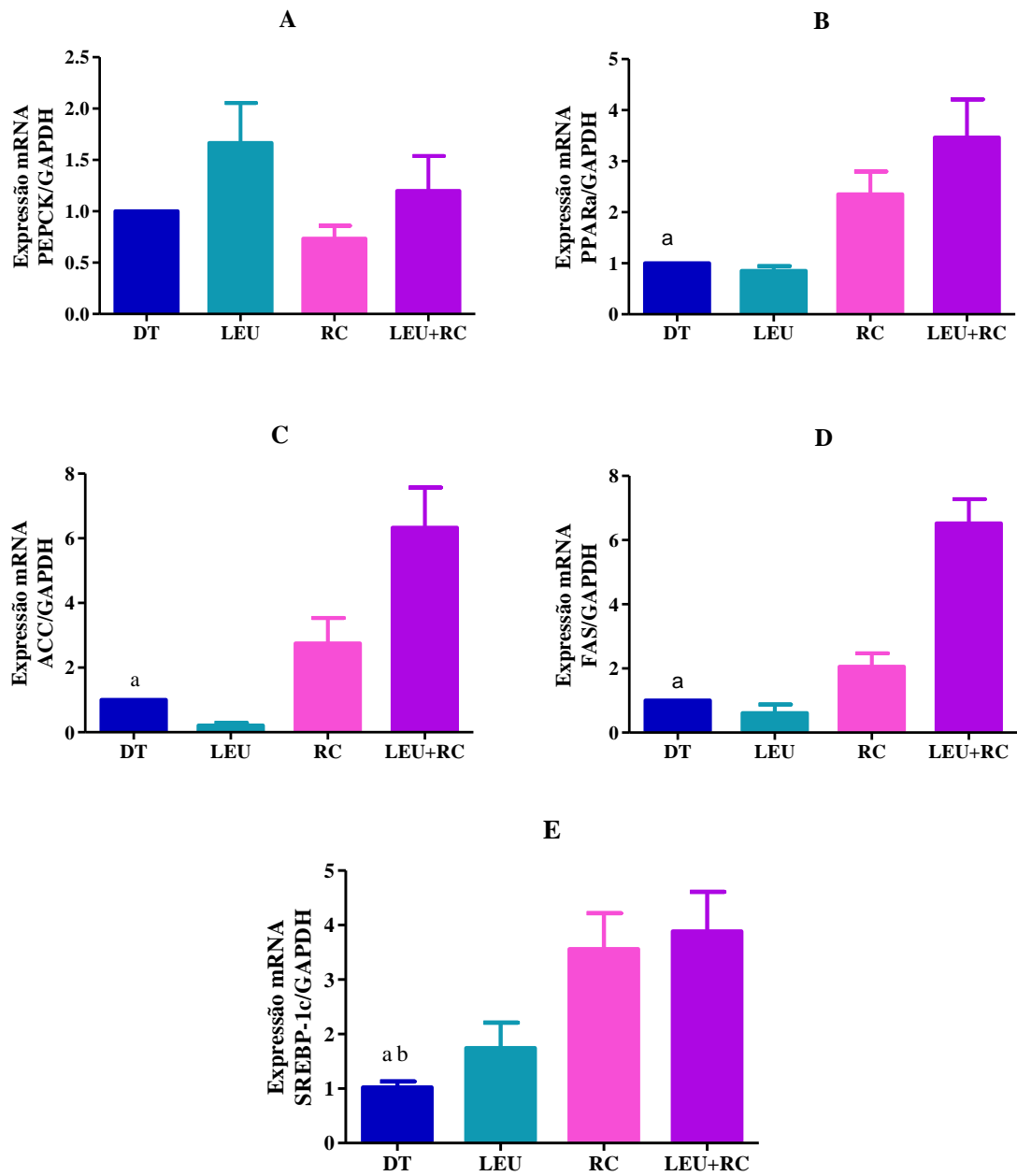


Legenda: Bandas quantificadas como densidade x área da banda e expressas em unidades arbitrárias (UA). **a.** DT vs LEU; **b.** DT vs RC; **c.** DT vs LEU+RC; **d.** LEU vs LEU+RC ($p < 0,05$). **A.** SIRT-1; **B.** pAMPK₁₇₂; **C.** AKT total; **D.** pAKT₃₀₈; **E.** pFoxO-1.

6.15 Expressão gênica

Na Figura 24 estão representadas as expressões dos genes PEPCK, PPAR- α , ACC, FAS e SREBP-1c. A expressão do gene PEPCK não apresentou diferença significativa entre os grupos. Por outro lado, o gene PPAR- α envolvido com a oxidação de ácidos graxos e na sensibilidade à insulina teve sua expressão aumentada de forma significativa apenas no grupo LEU+RC ($p=0,0034$). Quando observados os genes envolvidos na lipogênese, verificou-se que o grupo LEU+RC aumentou significativamente a expressão dos genes ACC ($p=0,0003$), FAS ($p<0,0001$) e SREBP-1c ($p=0,0032$) em comparação ao grupo DT. Além disso, o grupo RC também apresentou a expressão significativamente maior do gene SREBP-1c em relação ao grupo DT.

Figura 24: Expressão dos genes PEPCK, PPAR- α , ACC, FAS e SREBP-1c.



Legenda: a. DT vs LEU+RC; b. DT vs RC. A. PEPCK; B. PPAR- α ($p=0,0034$) C. ACC ($p=0,0003$) D. FAS ($p<0,0001$); E. SREBP-1c ($p=0,0032$). Dados expressos em média \pm desvio-padrão.

7.0 DISCUSSÃO

O destreinamento físico consiste na interrupção do treinamento, e no presente estudo o estabelecimento dessa condição foi confirmado por meio do teste de esforço máximo, em que os animais que tiveram o treinamento interrompido a partir da 8ª semana apresentaram desempenho físico significativamente menor do que os animais que continuaram o treinamento.

O aumento do peso corporal, em especial do tecido adiposo, como consequência do destreinamento físico, é uma condição relatada em diversos trabalhos que abordam o tema (YASARI et al, 2007; MUJIKI e PADILLA, 2000; KOUNDORAKIS et al, 2014; SERTIE et al, 2013). No presente estudo esse resultado foi reproduzido, uma vez que, os animais submetidos apenas ao destreinamento físico, apresentaram maior peso corporal e adiposidade em relação aos grupos submetidos à restrição calórica associada ou não a suplementação com leucina. Além disso, os animais que receberam apenas leucina não apresentaram perda de peso significativa em relação ao grupo DT, bem como não foi observada diferença significativa no consumo de ração entre esses grupos. O fato da ração com leucina apresentar valor considerável desse aminoácido pode ser um dos motivos para tal resultado, uma vez que a leucina pode estimular a adipogênese (MELNIK, 2012) e lipogênese. Torres-Leal et al (2011), utilizando apenas a leucina como suplementação, observaram que animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica não apresentaram redução do peso corporal após 6 semanas de intervenção nutricional, além de exibirem aumento no tamanho dos adipócitos e da adiposidade.

A restrição calórica apresenta relação com o menor acúmulo de lipídios no fígado, assim como demonstrado por Yoshimura et al. (2014), os quais utilizando somente a restrição calórica como intervenção verificaram redução significativa no conteúdo de lipídios no fígado, como também na concentração de colesterol no sangue de indivíduos obesos. No presente estudo, no que concerne o acúmulo de triglicerídeos e colesterol no fígado, a restrição calórica isolada reduziu apenas as concentrações de colesterol sem alterar significativamente as concentrações de triglicerídeos. Esse resultado pode ser devido a degradação da leucina em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, um intermediário da via de síntese de colesterol (ORTIZ et al, 1994). Halama et al (2015), demonstraram em cultura de adipócitos, que a medida que ocorre a degradação da leucina, a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR) também aumenta, sinalizando uma relação positiva entre a degradação desse aminoácido e a síntese de colesterol em cultura de adipócitos.

Por outro lado, quando associada à suplementação com leucina, a restrição calórica conseguiu reduzir significativamente a deposição de triglicerídeos no fígado dos animais em comparação aos que receberam apenas leucina. O resultado no teor de triglicerídeos observado no presente estudo foi semelhante ao verificado no trabalho de Yasari et al (2007), que consistiu em verificar a relação do acúmulo de lipídios no fígado em consequência do destreino físico, submetendo animais sedentários, treinados e destreinados a dieta hiperlipídica. Como resultado, ao final do experimento, os 3 grupos apresentaram maior acúmulo de triglicerídeos no fígado em comparação a semana inicial. Entretanto, os animais destreinados apresentaram valores significativamente maiores em comparação aos demais grupos na 2ª e na 6ª semana de dieta hiperlipídica.

Noguchi et al (2010), utilizando a suplementação com BCAA, lisina e treonina, observaram que o conteúdo de triglicerídeos no fígado de ratos com esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica reduziu significativamente. No presente trabalho, assim como o de Mattos-Neto (2011), não houve diferença nas concentrações séricas de BCAA nos animais que receberam a suplementação. Nesse sentido, não é possível considerar as concentrações circulantes de BCAA como um biomarcador para justificar a diferença observada nas concentrações de triglicerídeos hepáticos entre os grupos LEU e LEU+RC. Além disso, considerando que apenas o grupo LEU+RC exibiu concentração significativamente menor no conteúdo de triglicerídeos hepáticos e que apenas o grupo RC apresentou menor concentração de colesterol, é possível inferir que a restrição calórica associada ou não com a suplementação com leucina possa ser uma intervenção a ser considerada para amenizar essa consequência do destreino físico.

Com base nos demais resultados apresentados, é possível especular algumas explicações para a menor deposição de colesterol no fígado dos animais dos grupos RC e de triglicerídeos nos animais do grupo LEU+RC. Dentre elas o paradoxo da resistência hepática seletiva à insulina, onde o aumento da síntese de triglicerídeos no fígado é mais uma consequência da oferta de lipídios, do que da resistência à insulina nesse órgão (ANDERWALD et al, 2002; BROWN, GOLDSTEIN, 2008; VATNER et al, 2015). Vatner et al (2015), demonstraram que a síntese de triglicerídeos no fígado ocorre por meio de um mecanismo independente da insulina, uma vez que o aumento de triglicerídios no fígado dos animais estudados não foi acompanhada pelo aumento da insulina circulante. Em nosso estudo, foi possível verificar comportamento semelhante, uma vez que houve redução nas concentrações de triglicerídeos, porém sem alteração nas concentrações de insulina sérica entre os grupos.

SILVA, K.G

Contudo, ainda não é possível afirmar que o panorama apresentado pelos triglicerídeos hepáticos seja consequência da ingestão calórica, uma vez que, apenas o grupo LEU+RC apresentou redução significativa desse biomarcador.

A expressão da proteína SIRT-1 no fígado em resposta às intervenções nutricionais propostas é outra hipótese a ser considerada, a fim de explicar o perfil lipídico no fígado dos animais. No presente estudo, a expressão da SIRT-1 no fígado aumentou nos grupos submetidos às intervenções nutricionais isoladas ou em conjunto, estando de acordo com a maioria dos trabalhos encontrados na literatura (KITADA 2013, NOGUEIRAS et al, 2012, QUINONES et al, 2014; CHUNG et al, 2010). Em contraposição, o trabalho de CHEN et al (2008), demonstrou que, em condição de restrição calórica, a expressão da SIRT-1 aumentou no músculo e TAB, porém reduziu no fígado. Outro resultado observado em nosso estudo foi que a restrição calórica e a leucina exibiram efeito sinérgico, o qual pode ser explicado pela capacidade da leucina de também estimular a expressão da SIRT-1 (MELLINI; VALENTE; MAI, 2015).

A SIRT-1, por sua vez, está relacionada com o aumento na expressão de genes envolvidos no mecanismo de oxidação dos ácidos graxos, dentre eles, o PPAR- α , bem como a inibição de genes lipogênicos como o SREBP-1c, ACC e FAS (PURUSHOTHAM; SCHUG; LI, 2009; IMAI e YOSHINO, 2013; HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002; KOHJIMA et al., 2008). Em relação ao PPAR α , no presente trabalho foram encontradas algumas semelhanças aos achados de estudos anteriores envolvendo a restrição calórica. Isso porque o PPAR- α , diretamente relacionado com a menor deposição de lipídios no fígado (STIENTRA et al, 2006) teve a expressão quase 4 vezes maior no grupo LEU+RC em relação ao grupo DT. A expressão significativa do PPAR- α no grupo LEU+RC pode ser outra possível explicação para o resultado obtido no perfil lipídico hepático, em que mesmo a maior expressão dos genes lipogênicos ACC, FAS e SREBP-1c nesse grupo, não foi suficiente para afetar negativamente o balanço lipídico hepático, bem como a concentração de colesterol no grupo RC e triglicerídeos no grupo LEU+RC.

A expressão do PPAR- α também pode ser uma justificativa para a melhor captação de glicose no grupo LEU+RC demonstrada pelo OGTT. Takemori et al. (2011), verificaram em ratos obesos e hipertensos, que a restrição calórica aumentou a expressão do PPAR- α via SIRT-1, resultando em melhora do perfil lipídico e da glicose, o que pode ter acontecido no presente trabalho.

Em relação aos genes envolvidos na síntese de colesterol e triglicerídeos, observou-se maior expressão do SREBP-1c nos animais dos grupos RC e LEU+RC, seguida da maior

expressão da ACC e FAS no grupo LEU+RC. Contraditoriamente, a maior expressão da SREBP-1c, ACC e FAS no grupo LEU+RC não repercutiram sobre as concentrações de triglicerídeos e colesterol no fígado dos animais desse grupo. Resultados semelhantes foram encontrados por SHIMANO et al, 1997 em que, a superexpressão do SREBP-1c na esteatose hepática não aumentou as concentrações de colesterol. A proteína AMPK, assim como a SIRT-1, atua como sensor energético e está relacionada com a atenuação da lipogênese por regular negativamente a expressão do SREBP-1c (KAUPPINEN et al., 2013; HARDIE, 2007). Neste estudo a expressão da AMPK na forma fosforilada (Thr₁₇₂) não apresentou diferença significativa entre os grupos, demonstrando que o resultado verificado na concentração de colesterol não pode ser atribuído à influência da AMPK sobre a capacidade lipogênica.

Embora a expressão desses genes tenha contrariado as expectativas quando considerada a expressão da SIRT-1 nos grupos estudados, a maior expressão desses genes no grupo LEU+RC pode demonstrar uma relação positiva com a sensibilidade à insulina hepática. Considerando que a insulina regula positivamente a atividade do SREBP-1c e conseqüentemente a atividade da ACC e FAS (SOYAL et al, 2015), quando esses genes estão expressos, assim como no estudo em questão, é possível deduzir que a via de sinalização da insulina está funcionando adequadamente.

Em relação aos resultados referentes às adipocinas, verificou-se que a concentração de leptina no grupo DT foi significativamente maior em comparação aos grupos RC e LEU+RC. A leptina é conhecida por favorecer a oxidação de ácidos graxos, diminuir a lipogênese e aumentar saciedade (GIBY et al, 2014). Entretanto, quando a sua produção é significativamente aumentada, há resistência, a qual é caracterizada pela dificuldade dos receptores em reconhecer sua sinalização, resultando na saturação dos receptores, o que favorece maior concentração de leptina sérica e conseqüente redução do gasto energético e hiperfagia (FASSHUER E BLUHER, 2015; DONATO JR; FRAZÃO e ELIAS, 2010; PEDROSO et al., 2014).

No presente estudo, a perda de peso e conseqüente menor quantidade de tecido adiposo nos grupos submetidos à restrição calórica associada ou não a suplementação com leucina, podem justificar a menor concentração de leptina observada, uma vez que houve correlação positiva entre a concentração de leptina e a quantidade relativa de tecido adiposo total. Nesse sentido, Sertie et al (2013) observaram que animais destreinados apresentaram valores significativamente maiores de leptina em comparação aos animais treinados, além da recuperação do tecido adiposo perdido durante o período de treinamento, acompanhado de hipertrofia dos adipócitos. Já em relação aos efeitos da restrição calórica sobre a secreção de

leptina Takemori et al (2011), demonstraram que a restrição calórica de 85% durante 2 semanas resultou na diminuição das concentrações de leptina e aumento nas concentrações de adiponectina.

No que diz respeito as concentrações de adiponectina sérica nos grupos estudados, não foi observada diferença significativa, contrapondo a literatura que menciona que as concentrações de adiponectina devem ser inversamente proporcionais às de leptina (FAZELIFAR; EBRAHIM e SARKISIAN, 2013). Por outro lado, Rossi et al (2012) notaram que humanos obesos submetidos à redução de 500 kcal/dia da dieta convencional durante 4 semanas, perderam peso e melhoraram a sensibilidade à insulina sem exibir mudança significativa nas concentrações de adiponectina.

A adiponectina influencia a expressão da proteína AMPK, que está relacionada à captação de glicose e β -oxidação de ácidos graxos. Todavia, assim como não foi observada diferença nas concentrações de adiponectina entre os grupos, também não houve diferença na expressão da AMPK, ao contrário do observado por Pires et al (2014), em que a restrição calórica de 40% a curto prazo resultou em maior expressão da AMPK e melhor sensibilidade à insulina. A concentração de adiponectina também é influenciada pela SIRT-1, como observado no trabalho de XU et al (2012), onde camundongos *knockout* para essa proteína demonstraram redução de 40% na concentração de adiponectina circulante, quando comparados aos animais do grupo controle. Embora em nosso trabalho a expressão de SIRT-1 tenha apresentado diferença significativa entre os grupos, o mesmo não foi observado nos valores de adiponectina.

Sob outra perspectiva, quando realizada a razão entre adiponectina e leptina, que pode ser compreendida como um indicador de saúde metabólica, em especial de sensibilidade à insulina, observa-se diferença significativa entre os grupos que não foram submetidos à restrição calórica com os que foram submetidos a tal intervenção. Esse resultado, permite deduzir que a restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina pode otimizar a homeostase glicêmica e a sensibilidade à insulina, como demonstrado no resultado do OGTT, em que os grupos RC e LEU+RC apresentaram captação significativamente maior da glicose do que os animais do grupo DT.

Referente às citocinas, no presente estudo o grupo LEU+RC apresentou aumento significativo da citocina IL-6, embora a razão IL-6/IL-10 não tenha demonstrado diferença significativa entre os grupos. Quando analisados esses parâmetros no fígado, o grupo LEU+RC apresentou a razão IL-6/IL-10 significativamente menor do que o grupo LEU. Associado a isso, a correlação positiva entre a IL-6 com o tecido adiposo total bem como a correlação negativa

da IL-10 com esse tecido permite supor que, a nível hepático, a associação das intervenções nutricionais propostas pelo presente estudo foi eficaz em amenizar a inflamação decorrente do destreinamento físico em relação às citocinas IL-6 e IL-10. Além disso, é possível descartar a influência da inflamação sobre a perda de peso observada nos animais dos grupos submetidos à restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina.

Quanto ao NF- κ B não foi observada mudança na sua atividade em decorrência da expansão do tecido adiposo ou às intervenções nutricionais propostas. Esse resultado contrariou as expectativas do presente estudo, pois considerando o comportamento da SIRT-1 e a sua relação antagônica com o NF- κ B, era esperado que esse fator apresentasse menor atividade nos grupos submetidos à restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina.

Em relação aos parâmetros analisados para verificar a influência das intervenções nutricionais sobre a sensibilidade à insulina, não foi observada diferença significativa entre os grupos nas concentrações de insulina sérica, teste de tolerância à insulina e expressão da proteína AKT total e fosforilada (Tir₃₀₈) no fígado desses animais. Por outro lado, no teste de tolerância à glicose o grupo DT apresentou piora significativa entre a última semana de treinamento e a última semana de destreinamento físico, provavelmente devido ao aumento de peso observado nesse período. Além disso, na 13^a semana os grupos submetidos à restrição calórica apresentaram redução significativa na taxa de tolerância à glicose em comparação ao grupo destreinamento. A ausência de diferença significativa entre as expressões das proteínas AKT, FoxO1 e PEPCCK entre os grupos demonstra mais uma vez que o período de destreinamento não acarretou no comprometimento na via de sinalização da insulina.

8.0 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a restrição calórica foi capaz de amenizar a concentração de colesterol no fígado embora quando associada a leucina, as concentrações de colesterol não apresentam redução significativa. Em contrapartida, foi observada redução nas concentrações de triglicerídeos quando utilizada a restrição calórica associada à suplementação com leucina.

A maior razão adiponectina/leptina e a melhor homeostase glicêmica nos grupos submetidos à restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina permite deduzir que o uso da restrição calórica concomitantemente à suplementação com leucina é uma intervenção capaz de melhorar a sensibilidade à insulina bem como a homeostase glicêmica na condição de destreinamento físico. Além disso, é possível deduzir melhor sensibilidade hepática à insulina nos animais submetidos à restrição calórica associada ou não à suplementação com leucina, por meio da expressão do SREBP-1c, PPAR- α e da SIRT-1.

A leucina exerceu um efeito sinérgico à restrição calórica na expressão na SIRT-1, confirmando a hipótese de que a utilização dessas duas intervenções nutricionais em conjunto otimiza a expressão dessa proteína. Por último, os demais resultados apresentados no presente estudo, demonstram a necessidade de mais pesquisas sobre o tema a fim de elucidar os resultados conflitantes observados em modelos de destreinamento físico.

9.0 REFERÊNCIAS

ADAMSON, S. et al. High Intensity Training Improves Health and Physical Function in Middle Aged Adults. **Biology**, v. 3, p. 333–344, 2014.

AHMADI, N. et al. Effects of Intense Exercise and Moderate Caloric Restriction on Cardiovascular Risk Factors and Inflammation. **The American Journal of Medicine**. v. 124, n. 10, p.978-982, 2011.

AL-HAMODI, Z. et al. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. **Diabetology and Metabolic Syndrome**. v. 6, n. 99, 2014.

ANDERWALD C, et al. Effects of insulin treatment in type 2 diabetic patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle. **Diabetes**. v. 51, n. 10, p. 3025–3032, 2002.

BANKS, A. S. et al. SirT1 gain-of-function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. **Cell Metabolism**. v. 8, n. 4, p. 333-341, 2008.

BAUR, J. A. Biochemical effects of SIRT1 activators. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1804, n. 8, p. 1626–1634, 2010.

BINDER, E. et al. Leucine supplementation protects from insulin resistance by regulating adiposity levels. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74705, 2013.

BORDONE, L.; GUARENTE, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 4, p. 298–305, abr. 2005.

BLOMSTRAND, E. et al. Branched-Chain Amino Acids Activate Key Enzymes in Protein Synthesis after Physical Exercise. **Journal of Nutrition**. v. 136 (1 Suppl): 269S-273S, 2006.

BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 68, n. 2, p. 374–378, 1989.

BROWN M.S.; GOLDSTEIN J. L. Selective versus total insulin resistance: A pathogenic paradox. **Cell Metabolism**. v. 7, n.2, p.95–96, 2008.

BOWMAN, T. A et al. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance and steatosis in rats with low aerobic capacity. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5157–5164, 2010.

BRUCKBAUER, A.; ZEMEL, M. B. Effects of dairy consumption on SIRT1 and mitochondrial biogenesis in adipocytes and muscle cells. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 91, 2011.

BRUCKBAUER, A; ZEMEL, M. B. Synergistic Effects of Polyphenols and Methylxanthines with Leucine on AMPK/Sirtuin-Mediated Metabolism in Muscle Cells and Adipocytes. **Plos One**. v. 9, n. 2: e89166, 2014.

BURRIL, J. S, et al. Inflammation and ER Stress Regulate Branched-Chain Amino Acid Uptake and Metabolism in Adipocytes. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)**. v. 29, n. 3, p.:411-420, 2015.

CALBET, J. A. L. et al. A time-efficient reduction of fat mass in 4 days with exercise and caloric restriction. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**. v.25, n.2, p.222-223, 2014.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. Europe PMC Funders Group PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. **Current opinion in lipidology**, v. 20, n. 2, p. 98–105, 2013.

CAPURSO, C; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**. v. 57, n. (2-4), p. 91-97, 2012.

CARABALLO, S. C. G. et al. High-protein diets prevent steatosis and induce hepatic accumulation of monomethyl branched-chain fatty acids. **Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 25, n. 12, p. 1263-1274, 2014.

CARVALHO, M.; COLAÇO, A.; FORTES, Z. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 304–312, 2006.

CARVALHO-FILHO, M. A. et al. Cross-Talk das Vias de Sinalização de Insulina e Angiotensina II: Implicações Com a Associação Entre Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial e Doença Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 195–203, 2007.

CASELLI, C. Role of adiponectin system in insulin resistance. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 113, n. 3, p. 155-160, 2014.

CASPERSEN, C. J. et al. Physical activity, exercise and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Reports**. v. 100, n.2, p.126-131, 1985

CAVA, E.; FONTANA, L. Will calorie restriction work in humans? **Aging (Albany NY)**, v. 5, n. 7, p. 507–514, 2013.

CHEN, S.-Y. et al. Effect of 2-month detraining on body composition and insulin sensitivity in young female dancers. **International journal of obesity (2005)**, v. 30, n. 1, p. 40–4, 2006.

CHEN, D. et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. **Genes & Development**. v. 22, n. 13, p.1753-1757, 2008.

CHUNG, S. et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 501, n. 1, p. 79-90, 2010.

CLARK, J. E. Diet, exercise or diet with exercise: comparing the effectiveness of treatment options for weight-loss and changes in fitness for adults (18–65 years old) who are overweight, or obese; systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**. v. 14, n.31, 2015.

CLIFTON, P. M; BASTIAANS, K; KEOGH, J. B. High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases: NMCD**. v.19, n. 8, p. 548-554, 2009.

COCATE, P. G. et al. Consumption of branched-chain amino acids is inversely associated with central obesity and cardiometabolic features in a population of Brazilian middle-aged men: potential role of leucine intake. **The Journal of Nutrition, Health and Aging**. v. 19, n. 7, p. 771-777, 2015.

CROZIER, S. J. et al. Oral Leucine Administration Stimulates Protein Synthesis in Rat Skeletal Muscle. **The Journal of Nutrition**. v. 135, n.3, p.376-382, 2005.

CUI, M. et al. Chronic caloric restriction and exercise improve metabolic conditions of dietary-induced obese mice in an autophagy correlated manner without involving AMPK. **Journal of diabetes research**, v. 2013, p. 852754, 2013.

DANG, W. The controversial world of sirtuins. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 12, e9- e17, 2014.

DEIGHTON, K; BATTERHAM, R; STENSEL, D. Appetite and gut peptide responses to exercise and calorie restriction. The effect of modest energy deficits. **Appetite**. v.81, p.52-59, 2014.

DING, Q. et al. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulating adiponectin in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 23, n. 8, p. 867-874, 2012.

DONATO JÚNIOR, J. et al. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 22, n. 5, p. 520–527, 2006.

DONATO JÚNIOR, J. et al. Effects of leucine and phenylalanine supplementation during intermittent periods of food restriction and refeeding in adult rats. **Life sciences**, v. 81, n. 1, p. 31–39, 2007.

DONATO JÚNIOR, J. et al. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 54, n. 7, p. 591-602, 2010.

DUAN, Y, et al. The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. **Amino Acids**. 2015. DOI 10.1007/s00726-015-2067-1.

ERIKSSON, J; TAIMELA, S; KOIVISTO, V.A. Exercise and the metabolic syndrome. **Diabetologia**. v. 40, p.125–135, 1997.

FARUP, J. et al. Whey protein hydrolysate augments tendon and muscle hypertrophy independent of resistance exercise contraction mode. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**. v. 24, n.5, p.788-798, 2014.

FASSHAUER, M; BLUHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 36, n. 7, p. 461-670, 2015.

FAZELIFAR, S.; EBRAHIN, K.; SARKISIAN, V. S. Efeito do treinamento concorrente e destreinamento sobre o biomarcador anti-inflamatório e níveis de condicionamento físico em crianças obesas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**.v. 19, n. 5, p. 349-354, 2013.

FERNANDEZ, A.; MELLO, M.; TUFIK, S. Influência do treinamento aeróbio e anaeróbio na massa de gordura corporal de adolescentes obesos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 3, p. 152–158, 2004.

GARCIA-CARABALLO, S. C. et al. Prevention and reversal of hepatic steatosis with a high-protein diet in mice. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1832, n.5, p.685-695, 2013.

GIBY, V. G; AJITH, T. A. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology**. v. 6, n. 8, p. 570-579, 2014.

GILLUM, M. P.; ERION, D. M.; SHULMAN, G. I. Sirtuin-1 regulation of mammalian metabolism. **Trends in Molecular Medicine**. v. 17, n. 1, p. 8-13, 2011.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607–15, set. 2011.

GÓMEZ-AMBROSI, J.; RODRÍGUEZ, A. Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. **Revista Española de Obesidad**, v. 6, n. 9, p. 264–279, 2008.

GUARENTE, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. **Genes & development**, v. 27, n. 19, p. 2072–85, 2013.

HALAMA, A. et al. Metabolic switch during adipogenesis: From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics** (2015), doi: 10.1016/j.abb.2015.09.013.

HARDIE, D. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 774–785, 2007.

HORTON, J.; GOLDSTEIN, J.; BROWN, M. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 2002.

HUI, E. et al. Obesity as the common soil of non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: Role of adipokines. **Journal of Diabetes Investigation**. v. 4, n. 5, p.413-425, 2013.

IMAI, S; YOSHINO, J. The importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v.15 (Suppl. 3), p. 26-33, 2013.

JITOMIR, J. et al. The acute effects of the thermogenic supplement Meltdown on energy expenditure, fat oxidation, and hemodynamic responses in young, healthy males. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 5, n.23, 2008.

JUGE-AUBRY, C.; HENRICHOT, E.; MEIER, C. Adipose tissue: a regulator of inflammation. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 547–66, 2005.

KAINULAINEN, H; HULMI, J. J; KUJALA, U. M. Potential Role of Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Regulating Fat Oxidation. **Exercise and Sport Science Reviews**. v.41, n.1, p.194-200, 2013.

KALAPOTHARAKOS, V.I; DIAMANTOPOULOS, K; TOKMAKIDIS, S.P. Effects of resistance training and detraining on muscle strength and functional performance of older adults aged 80 to 88 years. **Aging Clinical and Experimental Research**. v. 22, n.2, 2010.

KAUPPINEN, A. et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. **Cellular signalling**, v. 25, n. 10, p. 1939–48, 2013.

KITADA, M. et al. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 10, p. 4820–4827, 2013.

KOHJIMA, M. et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 21, n. 4, p. 507-511, 2008.

KOUNDOURAKIS, N. E. et al. Discrepancy between exercise performance, body composition, and sex steroid response after a six-week detraining period in professional soccer players. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87803, 2014.

KIMURA, T; BIER, D. M; TAYLOR, C. L. Summary of Workshop Discussions on Establishing Upper Limits for Amino Acids with Specific Attention to Available Data for the Essential Amino Acids Leucine and Tryptophan. **The Journal of Nutrition**. v. 142, n. 12, p. 2245S–2248S, 2012.

- KOBAYASHI, H. et al. Modulations of Muscle Protein Metabolism by Branched-Chain Amino Acids in Normal and Muscle-Atrophiying Rats. **The Journal of Nutrition**. v. 136(1 Suppl): 234S-236S, 2006.
- KOTAS, M. E.; GORECKI, M. C.; GILLUM, M. P. Sirtuin-1 is a nutrient-dependent modulator of inflammation. **Adipocyte**, v. 2, n. 2, p. 113–118, 2013.
- KULKARNI, S. R. et al. Effect of caloric restriction and AMPK activation on hepatic nuclear receptor, biotransformation enzyme, and transporter expression in lean and obese mice. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 9, p. 2232–47, 2013.
- LAYMAN D.K, et al. Increased dietary protein modifies glucose and insulin homeostasis in adult women during weight loss. **The Journal of Nutrition**. v. 133, n. 2, p. 405-410, 2003.
- LEE, SH; MIN, KJ. Caloric restriction and its mimetics. **BMB Reports**. v. 46, n. 4, p. 181-187, 2013.
- LEHNEN, A.M. et al. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovascular Diabetology**. v. 9, p. 1-8, 2010.
- LEVIN, B.E; DUNN-MEYNELL, A.A. Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and -resistant rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**. v. 278, n.1, p.231-237, 2000.
- LI, H. et al. Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 303, n. 10, p. E1234–1244, 2012.
- LIU, T.-C. et al. Effects of short-term detraining on measures of obesity and glucose tolerance in elite athletes. **Journal of sports sciences**, v. 26, n. 9, p. 919–25, 2008b.
- LOVELL, D. I; CUNEO, R; GASS, G. C. The effect of strength training and short-term detraining on maximum force and the rate of force development of older men. **European Journal of Applied Physiology**. v. 109, n. 3, p.429-435, 2010.
- LU, J. et al. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids. **Frontiers of medicine**, v. 7, n. 1, p. 53–59, 2013.

LUCA, C; OLEFSKY, J. M. Inflammation and Insulin Resistance. **FEBS Letters**. v. 582, n. 1, p. 97-105, 2008.

LYNCH, C; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nature Reviews: Endocrinology**. v. 10, n. 12, p. 723-733, 2014.

MA, L. et al. Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. **Brain Research Bulletin**. v. 116, p.67-72, 2015.

MACOTELO, Y. et al. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21187, 2011

MATSUMOTO, M. et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 9, p. 2464–2472, 2006.

MATTOS-NETO, E.M. Suplementação crônica de leucine não impede a condição próinflamatória do desentrenamento físico. São Paulo, 2011. 114p Dissertação de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MAZZUCATTO, F. et al. Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**. v. 7, n. 8, p. 2000-2008, 2014.

McELWEE, J. J. et al. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. **Genome Biology**. v. 8, n. 7, R.132, 2007.

MELNIK, B. C. Leucine signaling in the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity. **World Journal of Diabetes**. v.3, n.3, p.38-53, 2012.

MELLINI, P; VALENTE, S; MAI, A. Sirtuin modulators: an updated patent review (2012 - 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 25, n. 1, p. 5-15, 2015.

MERCKEN, E. et al. Of mice and men: the benefits of caloric restriction, exercise, and mimetics. **Ageing research Reviews**, v. 11, n. 3, p. 390–398, 2012.

MITSUHASHI, T. et al. Long-term detraining increases the risk of metabolic syndrome in Japanese men. **The Tokai journal of experimental and clinical medicine**, v. 36, n. 4, p. 95–99, 2011.

MOHAMMADI, M. et al. Caloric Restriction Prevents Lead-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver. **The Scientific World Journal**. v.2014, p.821524, 2014.

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: Loss of Training-Induced Physiological and Performance Adaptations. Part I. **Sports Medicine**, v. 30, n. 2, p. 79–87, 2000.

NEWGARD, C. B. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. **Cell Metabolism**. v. 5, n. 5, p. 606-614, 2009.

NICKLAS, B. J. et al. Effects of resistance training with and without caloric restriction on physical function and mobility in overweight and obese older adults: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.101, n.5, p.991-999, 2015.

NOGUEIRAS, R. et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. **Physiological reviews**, v. 92, n. 3, p. 1479–514, jul. 2012

NOGUCHI, Y. et al. Ketogenic essential amino acids modulate lipid synthetic pathways and prevent hepatic steatosis in mice. **Plos One**. v. 5, n. 8, e12057, 2010.

ORTIZ J. A. et al. Transfection of the ketogenic mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase cDNA into Mev-1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, n. 46, p. 28523-28526.

PÁDUA, M. F. et al. Exercício Físico Reduz a Hiperglicemia de Jejum em Camundongos Diabéticos Através da Ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 179–184, 2009.

PARK, SY; LEE, IH. Effects on training and detraining on physical function, control of diabetes and anthropometrics in type 2 diabetes; a randomized controlled trial. **Physiotherapy Theory and Practice**. v. 31, n. 2, p. 83-88, 2015.

PEDROSA, R. G. et al. Leucine supplementation favors liver protein status but does not reduce body fat in rats during 1 week of food restriction. **Applied physiology, nutrition and metabolism**, v. 35, n. 2, p. 180–3, 2010.

PEDROSO, J. A. et al. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. **Molecular Metabolism**. v. 3, n. 6, p.608-618, 2014.

PENCHARZ, P. B; ELANGO, R. E; BALLS, R. O. Determination of the Tolerable Upper Intake Level of Leucine in Adult Men. **The Journal of Nutrition**. v. 142(12S): 2220S-2224S, 2012.

PETIBOIS, C. et al. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 7, p. 3377–3384, 2004.

PETZKE, K.J; FREUDENBERG, A; KLAUS, S. Beyond the role of dietary protein and amino acids in the prevention of diet-induced obesity. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 15, n.1, p. 1374-1391, 2014.

PIATTI P. M, et al. Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 43, n. 12, p. 1481-1487, 1994.

PIRES, R. C. Short-term calorie restriction improves glucose homeostasis in old rats: involvement of AMPK. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**. v. 39, n. 8, p. 895-901, 2014.

PONUGOTI, B. et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33959–33970, 2010.

PRADO, W. L. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378–383, 2009.

PUGH, T.D.; KLOPP, R.G.; WEINDRUCH, R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. **Neurobiology of Aging**. v. 20, p. 157-165, 1999.

PURUSHOTHAM, A.; SCHUG, T. T.; LI, X. SIRT1 performs a balancing act on the tight-rope toward longevity. **Aging**, v. 1, n. 7, p. 669–73, 2009.

QIN, L.Q. et al. Higher branched-chain amino acid intake is associated with a lower prevalence of being overweight or obese in middle-aged East Asian and Western adults. **The Journal of Nutrition**. v. 141, n. 2, p. 249-254, 2011.

QUINONES, M. et al. Cross-talk between SIRT1 and endocrine factors: effects on energy Homeostasis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.397, n. (1-2), p.42-50, 2014.

RAVUSSIN, E. et al. 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity. **The Journal of Gerontology: Medical Sciences**. v. 70, n. 9, p. 1097-104, 2015.

REDMAN, L. M.; RAVUSSIN, E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological and behavioral outcomes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 2, p. 275–278, 2011.

REDMAN, L. M. et al. Metabolic and behavioral compensations in response to caloric restriction: implications for the maintenance of weight loss. **Plos One**. v. 4, n. 2, e4377, 2009.

REDMAN, L. M. et al. Effect of Caloric Restriction with and without Exercise on Metabolic Intermediates in Nonobese Men and Women. **The Journal of Clinical and Metabolism**. v. 96, n. 2, E312-323, 2011.

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. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–51, 1993.

RICHARDS, J.C. et al. Short-term sprint interval training increases insulin sensitivity in healthy adults but does not affect the thermogenic response to β -adrenergic stimulation. **The Journal of Physiology**. v.588, n.15, p.2961-2972, 2010.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**. v. 6, p. 1-7, 2007.

ROSSI, A. P. et al. Effect of moderate weight loss on hepatic, pancreatic and visceral lipids in obese subjects. **Nutrition and Diabetes**. v. 2, e32, 2012.

SANTOMAURO JR., A. C. et al. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, p. 120–125, 2008.

SERTIÉ, R. A. L. et al. Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. **Journal of Applied Physiology (1985)**. v.115, n.3, p.394-402, 2013.

SERTIÉ, R. A. L. et al. Fat gain with physical detraining is correlated with increased glucose transport and oxidation in periepididymal white adipose tissue in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 8, n. 7, p. 650-653, 2015.

SHEPARD, T. Y. et al. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 4, p. 703–708, 2001.

SHIMANO, H., et al. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. **The Journal of Clinical Investigation**.v. 99, n. 5, p. 846–854, 1997.

SHIMOMURA, Y; MURAKAMI, T; KAGASAKI, H. et al. Regulation of branched-chain amino acid metabolism and pharmacological effects of branched-chain amino acids. **Hepatology Research**. 30S: S3-S8, 2004.

SHIMOMURA, Y; MURAKANI, T; NAKAI, N. et al. Exercise Promotes BCAA Catabolism: Effects of BCAA Supplementation on Skeletal Muscle during Exercise. **The Journal of Nutrition**. v. 134(6 Suppl): 1583S-1587S, 2004.

SHIMOMURA, Y; HARRIS, R. A. Metabolism and Physiological Function of Branched-Chain Amino Acids: Discussion of Session. **The Journal of Nutrition**. v. 36 (1 Suppl): 232S-3S, 2006.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Review series Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793–1801, 2006.

SKRYPNIK, D. et al. Effects of Endurance and Endurance Strength Training on Body Composition and Physical Capacity in Women with Abdominal Obesity. **Obesity Facts**. v.1, n.8, p.175-187, 2015.

SPEAKMAN, J. R.; MITCHELL, S. E. Caloric restriction. **Molecular aspects of medicine**, v. 32, n. 3, p. 159–221, 2011.

SOARE, A.; WEISS, E. P.; POZZILLI, P. Benefits of caloric restriction for cardiometabolic health, including type 2 diabetes mellitus risk. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v. 30 (Suppl. 1): 41-47, 2014.

SOYAL, S. M. et al. Targeting SREBPs for treatment of the metabolic syndrome. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.36, n.6, p.406-416, 2015.

STIENSTRA, R. et al. PPARs, obesity, and inflammation. **PPAR Research**. v. 2007, p.95974, 2007.

TAKEMORI, K. et al. Food restriction improves glucose and lipid metabolism through Sirt1 expression: A study using a new rat model with obesity and severe hypertension. **Life Sciences**. v. 88, n. (25-26), p. 1088-1094, 2011.

TSUBUKU, S. et al. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats. **International Journal of Toxicology**. v. 23, n.2, p. 119-126, 2004.

TO, K. et al. Down-regulation of AMP-activated protein kinase by calorie restriction in rat liver. **Experimental Gerontology**. v. 42, n. 11, p. 1063-1071, 2007.

TORRES-LEAL, F. L.; CAPITANI, M. D; TIRAPEGUI, J. the effect of physical exercise and caloric restriction on the components of metabolic syndrome. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 45, n. 3, p. 379-399, 2009.

TORRES-LEAL, F. L. et al. The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 8, p. 623–631, 2010.

TORRES-LEAL, F. L. et al. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 62, 2011

VATNER, D.F. et al. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. **PNAS**. v.12, n.4, p. 1143-1148, 2015.

VATNER, D. F. et al. Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of American**. v. 12, n. 4, p. 1143-1148, 2015.

VIANNA, D. et al. Protein synthesis regulation by leucine. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 46, n. 1, p. 30-36, 2010.

VIANNA, D. et al. Long-term leucine supplementation reduces fat mass gain without changing body protein status of aging rats. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 28, n. 2, p. 182–9, 2012.

WANG, R. H. et al. Hepatic *Sirt1* deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 121, n. 11, p. 4477-4490, 2011.

WANG, H; YE, J. Regulation of energy balance by inflammation: Common theme in physiology and pathology. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**. v. 16, n. 1, p. 47-54, 2015.

WANG T.J. et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. **Nature Medicine**. v. 17, n. 4, p.:448–453, 2011.

XU, F. et al. Angiogenic Deficiency and Adipose Tissue Dysfunction Are Associated with Macrophage Malfunction in SIRT1^{-/-} Mice. **Endocrinology**. v. 153, n. 4, p. 1706-1716, 2012.

YASARI, S. et al. Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. **Physiology & behavior**, v. 91, n. 2-3, p. 281–289, 2007.

YASUDA, T. et al. Effects of detraining after blood flow-restricted low-intensity training on muscle size and strength in older adults. **Aging Clinical and Experimental Research**. v. 26, n. 5, p. 561-564, 2014.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of medicine**, v. 7, n. 1, p. 14–24, 2013.

YE, J; KELLER, J. Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction. **Aging (Albany NY)**. v. 2, n. 6, p. 361-368, 2010.

YE, J; McGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**. v. 304, n. 5, E466-477, 2013.

YOSHIMURA, E. et al. Lifestyle Intervention Involving Calorie Restriction with or without Aerobic Exercise Training Improves Liver Fat in Adults with Visceral Adiposity. **Journal of Obesity**. v. 2014: 197216, 2014.

YU, H; JIA, W; GUO, Z. Reducing Liver Fat by Low Carbohydrate Caloric Restriction Targets Hepatic Glucose Production in Non-Diabetic Obese Adults with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Clinical Medicine**. v. 3, n. 3, p. 1050-1063, 2014.

ZHANG, W. et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 15, p. 10105–10117, 2006.

APÊNDICE A

Composição das rações utilizadas no experimento.

Ingredientes	R-CON		R-RC		R+LEU		R-LEU+RC	
	g/kg	100g	g/kg	70g	g/kg	100g	g/kg	70g
Amido	572,83	57,28	432,86	30,30	560,70	56,07	415,28	29,07
Caseína	140,00	14,00	200,00	14,00	140,00	14,00	200,00	14,00
Sacarose	100,00	10,00	100,00	7,00	100,00	10,00	100,00	7,00
Óleo de soja	40,00	4,00	57,14	4,00	40,00	4,00	57,14	4,00
Celulose	50,00	5,00	71,43	5,00	50,00	5,00	71,43	5,00
Mistura salina	35,00	3,50	50,00	3,50	35,00	3,50	50,00	3,50
Mistura vitamínica	10,00	1,00	14,29	1,00	10,00	1,00	14,29	1,00
L-Cistina	1,80	0,18	2,57	0,18	1,80	0,18	2,57	0,18
Bitartarato de colina	2,50	0,25	3,57	0,25	2,50	0,25	3,57	0,25
Tetrabutil-hidroquinona	0,01	0,001	0,01	0,001	0,01	0,001	0,01	0,001
L-Leucina	-	-	-	-	44,50	4,45	63,57	4,45
Isoleucina	-	-	-	-	9,80	0,98	4,00	0,98
Valina	-	-	-	-	5,70	0,57	8,14	0,57
Alanina	8,24	0,82	11,71	0,82	-	-	-	-
Glicina	6,94	0,69	9,86	0,69	-	-	-	-
Prolina	10,65	1,06	15,14	1,06	-	-	-	-
Serina	9,72	0,97	13,86	0,97	-	-	-	-
Aspartato	12,31	1,23	17,57	1,23	-	-	-	-
TOTAL	1000,00	100,00	1000,00	70,00	1000,00	100,00	1000,00	70,00
			0		0		0	
	R-CON		R-RC		R-LEU		R-RC+LEU	
	Kcal/kg	Kcal/100g	Kcal/kg	Kcal/100g	Kcal/kg	Kcal/100g	Kcal/kg	Kcal/100g
Carboidrato	2642,80	264,28	2061,12	144,28	2691,32	269,13	2131,43	149,20
Proteína	567,20	56,72	810,29	56,72	567,20	56,72	810,29	56,72
Lipídio	36,00	36,00	514,9	36,00	360,00	36,00	514,29	36,00
TOTAL	3570,00	357,00	3385,70	237,00	3618,52	361,85	3456,00	241,92
			0		2		0	2

Legenda: R-CON: ração controle; R-RC: ração restrição calórica; R-LEU: ração suplementada com leucina; R-RC+LEU: ração restrição calórica suplementada com leucina.

ANEXOS

ANEXO A: Informações para os membros da banca julgadora.

ANEXO B: Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

ANEXO C: Ficha do aluno

ANEXO D: Currículo *Lattes*

ANEXO E: Artigos publicados

ANEXO A – INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA JULGADORA**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 arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir 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 arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição 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 arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

ANEXO B: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.



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

Ofício CEUA/FCF 26.2014-P455

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeitos da restrição calórica associada à suplementação com leucina sobre a resistência à insulina e inflamação hepática em ratos destreinados**" (Protocolo CEUA/FCF/455), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Kelcylene Gomes da Silva**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui de Toledo**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **14 de março de 2014**. *Este projeto de pesquisa vai utilizar material biológico oriundo do protocolo CEUA P311, aprovado em 04/04/2011.* Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 18 de março de 2014.

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

ANEXO C: FICHA DO ALUNO

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8697750/1 - Kelcyrene Gomes da Silva

Email: kelcylenegsilva@usp.br
Data de Nascimento: 03/05/1989
Cédula de Identidade: RG - 2.725.803 - PI
Local de Nascimento: Estado do Piauí
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil - 2012

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 04/06/2013
Início da Contagem de Prazo: 04/06/2013
Data Limite para o Depósito: 04/12/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 04/06/2013 até o presente.
 Email: tirapegu@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 04/06/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/07/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 04/06/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2015

Impresso em: 05/10/2015 20:37:11

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8697750/1 - Kelcylene Gomes da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
BMB5818-1/4	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/08/2013	04/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5102-3/5	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	20/08/2013	30/09/2013	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
HNT5709-5/1	Diets e Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	07/10/2013	17/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5711-2/2	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/10/2013	03/12/2013	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	8	83	A	N	Concluída
MCM5900-1/1	Interações entre Metabolismo e Inflamação (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/03/2014	30/03/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMB5760-5/1	Metabolismo Celular e sua Regulação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	17/03/2014	27/04/2014	60	4	93	A	N	Concluída
HNT5758-2/1	Doenças Crônicas não Transmissíveis do Espectro da Síndrome Metabólica: Fisiopatologia, Epidemiologia e Controle (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	18/03/2014	21/04/2014	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5748-4/1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	08/04/2014	19/05/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
EFB5760-1/1	Modelos Experimentais Aplicados à Nutrição e Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	13/10/2014	09/11/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
EFB5759-1/3	Suplementação Nutricional Aplicada à Atividade Motora (Escola de Educação Física e	05/11/2014	02/12/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada

about:blank

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
	Esporte - Universidade de São Paulo)								
FBA5899-2/4	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	02/03/2015	12/04/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5729-4/2	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	03/03/2015	06/04/2015	75	0	-	-	N	Turma cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0406 Fiscalização de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/05/2015	30/06/2015	-	3	-	-	-	-
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	0	-	-	S	Cursando

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 01/07/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2015

Impresso em: 05/10/2015 20:37:11

ANEXO D: CURRÍCULO *LATTES*


Imprimir currículo



Kelcylyne Gomes da Silva
 Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4047861960530995>
 Última atualização do currículo em 06/10/2015

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal do Piauí (2012). Atualmente é aluna de mestrado da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Análise Nutricional de População, atuando principalmente nos seguintes temas: malondialdeído, pré-eclâmpsia, rectocolitis, zinco e alzheimer.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Kelcylyne Gomes da Silva
Filiação	Moises Nonato da Silva e Leonor Costa Gomes da Silva
Nascimento	03/05/1989 - TERESINAPI - Brasil
Carteira de Identidade	2725803 SSP - PI - 31/03/2008
CPF	028.842.113-22

Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em Ciências dos Alimentos. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Restrição calórica e suplementação com leucina no destreinoamento físico: parâmetros lipídicos e de sensibilidade à insulina no fígado Orientador: Júlio Orlando Tirapegui Toledo  Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2008 - 2012	Graduação em Bacharel em Nutrição. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil Título: Concentração do malondialdeído como biomarcador do estresse oxidativo e consumo de antioxidantes em gestantes com pré-eclâmpsia Orientador: Nadir do Nascimento Nogueira

Formação complementar

2014 - 2014	Estratégias Nutricionais para Hipertrofia Muscular. Instituto de Pesquisas Ensino e Gestão em Saúde, IPGS, Brasil
2013 - 2013	Magpix Training. Merck Millipore International Sales, MERK, Brasil
2011 - 2011	Monitoria em Nutrição e Diet. no Ciclo de Vida I. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Curso métodos de investigação em nutrição. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Curso de Boas Práticas de Manipulação de Alimentos. SENAI - Departamento Regional do Piauí, SENAI/DRPI, Parnaíba, Brasil
2009 - 2009	Monitoria em Metod. do Trab. Cient. e da Pesquisa. Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Atuação profissional

- Universidade Federal do Piauí - UFPI

**Vínculo
Institucional**

- 2011 - 2012 Vínculo: Estágio extracurricular , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2011 - 2011 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador de extensão universitária, Regime: Parcial
- 2011 - 2011 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitora , Carga horária: 12, Regime: Parcial
- 2011 - 2012 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaboradora iniciação científica PIBIC/UFPI, Regime: Parcial
- 2010 - 2011 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de iniciação científica PIBIC/UFPI, Regime: Dedicção exclusiva
- 2009 - 2009 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitora , Carga horária: 12, Regime: Parcial
- 2009 - 2010 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de iniciação científica PIBIC/UFPI, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

07/2011 - 08/2012 Estágio, Hospital de Terapia Intensiva e Medicina Interna

Estágio:
Nutrição clínica

01/2011 - 12/2011 Extensão Universitária, Universidade Federal do Piauí

Especificação:
Atendimento ambulatorial de nutrição em gestantes

08/2009 - 08/2012 Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade Federal do Piauí

Linhas de pesquisa:
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Minerais e doenças crônicas não transmissíveis , Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Análise nutricional de população

2. Hospital de Terapia Intensiva e Medicina Interna - HTI**Vínculo
Institucional**

- 2011 - 2012 Vínculo: Estágio remunerado , Enquadramento funcional: Estagiária de nutrição , Carga horária: 20, Regime: Parcial

3. Universidade de São Paulo - USP**Vínculo
Institucional**

- 2013 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de mestrado, Regime: Dedicção exclusiva

Linhas de pesquisa

- Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Análise nutricional de população
- Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Minerais e doenças crônicas não transmissíveis

Projetos**Projetos de
pesquisa**

2011 - 2012 Relação entre a concentração plasmática de magnésio e resistência à insulina em pacientes diabéticos tipo 2

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva; Dilina Nascimento Marreiro (Responsável); Mayara Monte Feltosa; Nadir do Nascimento Nogueira; Fabiane Sampaio Araújo; Vanessa Batista de Sousa; Dália Leite Chaves Bezerra; José Maria Correia Lima e Silva; Francisco Erasmo Oliveira

2011 - 2012 Estado Nutricional Relativo ao Magnésio e Alterações no Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva; Dilina Nascimento Marreiro (Responsável); Mayara Monte Feltosa; Fabiane Sampaio Araújo; FRANCISCO ERASMO DE OLIVEIRA

2010 - 2011 Efeito da suplementação com zinco no estado nutricional relativo ao mineral em pacientes com doença inflamatória intestinal

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva (Responsável); Juliana Paz Matias; Dilina Nascimento Marreiro; Mayara Monte Feltosa; Nadir do Nascimento Nogueira

2009 - 2011 Efeito da suplementação com zinco na atividade da enzima superóxido dismutase em pacientes com doença inflamatória intestinal

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva; Juliana Paz Matias; Dilina Nascimento Marreiro (Responsável); Mayara Monte Feltosa; Nadir do Nascimento Nogueira

06/10/2015 05:00

- 2009 - 2010 Perfil nutricional relativo ao ferro, zinco e cobre e sua relação com a função cognitiva em pacientes com Doença de Alzheimer
- Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva (Responsável); Dilina Nascimento Marreiro; Gilmara Pères Rodrigues; Cecilia M. R. Gonçalves Carvalho, Nadir do Nascimento Nogueira
- 2008 - 2010 Perfil nutricional relativo ao cobre e zinco e sua relação com a atividade da enzima superóxido dismutase e a função cognitiva na Doença de Alzheimer
- Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva; Gilmara Pères Rodrigues; Daniele R. Carvalho Caldas; Cecilia M. R. Gonçalves Carvalho; Nadir do Nascimento Nogueira (Responsável)
- Projeto de extensão**
- 2011 - 2011 Consulta de nutrição em gestantes atendidas durante o pré-natal no ambulatório do Instituto de perinatologia do Piauí
- Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
Alunos envolvidos: Graduação (2);
Integrantes: Kelylene Gomes da Silva; Geania de Sousa Paz Lima (Responsável); Marcela Maria Lima Rodrigues

Áreas de atuação

1. Análise Nutricional de População
2. Micronutrientes e doenças crônicas não transmissíveis

Produção

Produção bibliográfica



Artigos completos publicados em periódicos


1. [DOI](#) MATIAS, J. P., SILVA, D. M. C., CRUZ, K. J. C., SILVA, K. G., FEITOSA, M. M., MEDEIROS, L. G. O., MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N. Effect of zinc supplementation on superoxide dismutase activity in patients with ulcerative colitis. *Nutricion Hospitalaria*. [DOI](#), v.31, p.1234 - 1437, 2015.
2. PINTO, D. P., ARAUJO, F. S., CRUZ, K. J. C., OLIVEIRA, A. R. S., SILVA, K. G., MARREIRO, D. N. Relação entre o ferro dietético e estresse oxidativo em diabéticos tipo 2. *Revista eletrônica - Nutrição em Pauta*, v.4, p.30 -, 2015.

Livros publicados

1. SILVA, K. G., GARCEZ, L. S., FEITOSA, M. M., NISHIMURA, L. S., AMARAL, A. T. 1.000 questões comentadas de provas e concursos. Salvador: Sanar, 2014 p.736.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1.  SILVA, K. G., CALDAS, D. R. C., RODRIGUES, G. P., FEITOSA, M. M., ALMEIDA, L. K. L., MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N. Anemia ferropriva em pacientes com Doença de Alzheimer In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.245 - 245
2. RODRIGUES, G. P., SILVA, K. G., CALDAS, D. R. C., CARVALHO, C. M. R. G., MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N. Caracterização Clínica e Social de Idosos com Doença de Alzheimer In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.356 - 356
3. SILVA, K. G., RODRIGUES, G. P., PAZ, K. F., MOURA, C. B., MACHADO, M. P. N., ALVES, J. S., DIAS, J. L. Consumo alimentar relativo a vitaminas antioxidantes de indivíduos com AIDS em tratamento antirretroviral In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.245 - 245
4.  FEITOSA, M. M., MATIAS, J. P., SILVA, K. G., SILVA, D. M. C., SILVA NETA, E. A., CAVALCANTE, R. M. S., MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N. Estado nutricional relativo ao zinco em pacientes com doença inflamatória intestinal In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.24 - 24
5. MEDEIROS, L. G. O., MATIAS, J. P., SALES, A. C. C., ALMEIDA, L. K. L., SILVA, K. G., FEITOSA, M. M., SILVA, D. M. C. Indicadores antropométricos e sua associação com o perfil lipídico de mulheres idosas In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.182 - 182
6. SILVA NETA, E. A., ALMEIDA, L. K. L., CAVALCANTE, R. M. S., SILVA, D. M. C., SILVA, K. G., MATIAS, J. P., MARREIRO, D. N., NOGUEIRA, N. N. Prevalência de anemia em mães de recém-nascidos de médio risco In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.245 - 245

7.  RODRIGUES, G. P.; CALDAS, D. R. C.; SILVA, K. G.; ALMONDES, K. G. S.; PIMENTEL, J. A. C.; MOITA NETO, J. M.; CARVALHO, C. M. R. G.; MARTINS, D. N.; NOGUEIRA, N. N. Zinco e cobre plasmático e sua relação com a função cognitiva na doença de Alzheimer In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011, Fortaleza, 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, São Paulo: Nutri: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, v.36, p.243 - 243

Demais produções bibliográficas

1. SILVA NETA, E. A., SILVA, K. G., NOGUEIRA, N. N. Concentração do malondialdeído como biomarcador do estresse oxidativo e consumo de antioxidantes em gestantes com pré-eclâmpsia, monografia, Teresina, 2011. (Outra produção bibliográfica)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. SILVA, K. G. Efeito da suplementação com zinco no estado nutricional relativo ao mineral em pacientes com doença inflamatória intestinal, 2011. (Relatório de pesquisa)
2. SILVA, K. G. Perfil nutricional relativo ao ferro e sua relação com a função cognitiva em pacientes com Doença de Alzheimer, 2010. (Relatório de pesquisa)

Demais trabalhos

1. SILVA, K. G., SILVA NETA, E. A., NOGUEIRA, N. N. Concentração do malondialdeído como biomarcador do estresse oxidativo e consumo de antioxidantes em gestantes com pré-eclâmpsia, 2011.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) ACSM Annual Meeting, 2015. (Congresso) Hepatic expression of sirtuin-1 in response to caloric restriction and leucine supplementation in detrained rats.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2013. (Congresso) Estado Nutricional Relativo ao Magnésio em Diabéticos Tipo 2.
3. XVII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2013. (Congresso)
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Anemia ferropriva em pacientes com Doença de Alzheimer.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Caracterização Clínica e Social de Idosos com Doença de Alzheimer.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Consumo alimentar relativo a vitaminas antioxidantes de indivíduos com AIDS em tratamento antiretroviral.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) XX Seminário de Iniciação científica e III Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2011. (Congresso) Efeito da suplementação com zinco no estado nutricional relativo ao mineral em pacientes com doença inflamatória intestinal.
8. 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Estado nutricional relativo ao zinco em pacientes com doença inflamatória intestinal.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Indicadores antropométricos e sua associação com o perfil lipídico de mulheres idosas.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Prevalência das intercorrências mamárias na lactação atendidas no banco de leite humano de uma maternidade pública, em Teresina-PI.
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN: Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso) Zinco e cobre plasmático e sua relação com a função cognitiva na doença de Alzheimer.
12. 11º Congresso Nacional de Nutrição Baseada em Evidência, 2011. (Congresso)
13. I SEMINÁRIO: SAÚDE DA MULHER NO CICLO VITAL, 2010. (Seminário) Consumo alimentar e estado nutricional de gestantes adolescentes em assistência nutricional pré-natal.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) Workshop Alimentos funcionais, compostos bioativos e doenças crônicas, 2010. (Outra) Minerais e doenças crônicas não transmissíveis.
15. I SEMINÁRIO: SAÚDE DA MULHER NO CICLO VITAL, 2010. (Seminário) Prevalência das intercorrências mamárias na lactação atendidas no banco de leite humano de uma maternidade pública, em Teresina-PI.
16. I SEMINÁRIO: SAÚDE DA MULHER NO CICLO VITAL, 2010. (Seminário)

06/10/2015

lo Lattes

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvcv.t

17. **Debate Acadêmico: "O combate à fome e o papel do Governo, da Academia e da Sociedade"**, 2010. (Outra)
18. **XII encontro regional dos estudantes de nutrição N/NE**, 2010. (Encontro)
19. **Apresentação de Poster / Painel no(a) XIX Seminário de Iniciação científica da UFPI**, 2009. (Seminário)
Perfil nutricional relativo ao ferro, zinco e cobre e sua relação com a função cognitiva em pacientes com Doença de Alzheimer.
20. **I Jornada Acadêmica de Nutrição Social**, 2009. (Outra)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 06/10/2015 às 05:14:12.

ANEXO E: ARTIGOS PUBLICADOS

Nutrición
Hospitalaria



Nutr Hosp. 2015;31(2):1434-1437
ISSN 0212-1411 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Original/ Otros

Effect of zinc supplementation on superoxide dismutase activity in patients with ulcerative rectocolitis

Juliana Paz Matias¹, Danilla Michelle Costa e Silva², Kyria Jayanne Clímaco Cruz¹, Kelcylene Gomes da Silva², Mayara Monte Feitosa⁴, Leydiara Gleici Oliveira Medeiros¹, Dilina do Nascimento Marreiro² and Nadir do Nascimento Nogueira²

¹Graduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil. ²Department of Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil. ³Department of Food and Experimental Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Graduate Program in Sciences and Health, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

Abstract

Introduction: Ulcerative rectocolitis is characterized by diffuse mucosal inflammation and oxidative stress. Thus, the organism activates the antioxidant defense system in an attempt to reduce the excessive production of reactive oxygen species or neutralize them.

Objective: This study evaluated the effect of zinc supplementation on the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) in patients with ulcerative rectocolitis.

Methods: The study included 24 patients, aged between 20 and 59 years and diagnosed with ulcerative rectocolitis, in the remission stage of the disease, who were divided into two groups: experimental - deficient in zinc (n=12) and control - normal or high zinc (n=12). Only the first group underwent supplement intervention, in the form of zinc gluconate (30 mg Zn/day), taken daily in the morning, fasted for 60 days. Plasma and erythrocyte zinc concentrations were determined by flame atomic absorption spectrophotometer. The erythrocyte SOD activity was determined *in vitro* according to the methodology recommended by the manufacturer Randox.

Results and Discussion: Zinc supplementation caused a significant increase in the plasma concentrations of the mineral, and showed a significant reduction in erythrocyte zinc, remaining within normal limits. The SOD activity was high in patients of both the experimental and control groups, with no difference after supplementation.

Conclusion: This study demonstrates that zinc supplementation improves the homeostatic condition of the mineral, with no change in SOD activity, as a marker of oxidative stress in patients with ulcerative rectocolitis.

(Nutr Hosp. 2015;31:1434-1437)

DOI: 10.3305/nh.2015.31.3.8402

Key words: Rectocolitis, Ulcerative, Zinc, Superoxide Dismutase.

Correspondence: Nadir do Nascimento Nogueira,
Rua São Pedro, 3274, Apartamento 704, Ilhotas,
CEP 64001-260, Teresina, Piauí, Brazil.
E-mail: nadir@uol.com.br

Recibido: 24-XI-2014.
Aceptado: 17-XII-2014.

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ZINC SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA

Resumen

Introducción: La colitis ulcerosa se caracteriza por la inflamación difusa de la mucosa y el estrés oxidativo. De esta forma, el cuerpo activa el sistema de defensa antioxidante en un intento de reducir la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, así como poder neutralizarlas.

Objetivo: Este estudio evaluó el efecto de la suplementación de zinc sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa en pacientes con colitis ulcerosa.

Métodos: El estudio incluyó 24 pacientes, con edades comprendidas entre 20 y 59 años y con diagnóstico de colitis ulcerosa en fase de remisión de la enfermedad. Los pacientes fueron divididos en dos grupos: experimental - deficiencia de zinc (n=12) y control - normales o con altos contenidos de zinc (n=12). El grupo experimental se sometió a tratamiento con suplemento de drogas, en forma de gluconato de zinc (30 mg Zn/día), administrada diariamente por la mañana en ayunas durante 60 días. Las concentraciones en plasma y los eritrocitos de zinc se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica de llama. La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó por el método de eritrocitos *in vitro* utilizando el kit de Randox.

Resultados y Discusión: La suplementación de zinc causó un aumento significativo en las concentraciones plasmáticas de mineral y mostró una reducción significativa en los eritrocitos, permaneciendo dentro de los límites normales. La actividad de SOD fue mayor en los pacientes de los grupos experimentales y de control, sin diferencias después de la suplementación.

Conclusión: El estudio evidenció que la administración de suplementos de zinc mejora la condición homeostática del mineral, sin ningún cambio en la actividad de SOD, como un marcador de estrés oxidativo en pacientes con colitis ulcerosa.

(Nutr Hosp. 2015;31:1434-1437)

DOI:10.3305/nh.2015.31.3.8402

Palabras clave: Colitis Ulcerosa, Zinc, Superoxido Dismutasa.

Relação entre o Ferro Dietético e Estresse Oxidativo em Diabéticos Tipo 2

RESUMO: O ESTUDO AVALIOU A INGESTÃO DIETÉTICA DE FERRO E SUA RELAÇÃO COM MARCADOR DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2. ESTUDO CASO-CONTROLE ENVOLVENDO 88 INDIVÍDUOS COM E SEM DIABETES MELLITUS TIPO 2, IDADE ENTRE 27 E 59 ANOS, DE AMBOS OS SEXOS. O CONSUMO ALIMENTAR FOI AVALIADO UTILIZANDO REGISTRO ALIMENTAR DE TRÊS DIAS. AVALIOU-SE PARÂMETROS GLICÊMICOS. ANALISOU-SE O MALONDIALDEÍDO (MDA) PLASMÁTICO POR MEIO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBÁRBITÚRICO. OS VALORES MÉDIOS DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL DOS PACIENTES COM DIABETES E CONTROLES FORAM RESPECTIVAMENTE, $28,62 \pm 4,59 \text{ kg/m}^2$ E $23,15 \pm 2,89 \text{ kg/m}^2$ ($p < 0,05$). NÃO HOUVE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA NA INGESTÃO DE FERRO ($p > 0,05$). HOUVE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$) NAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE MDA. A CORRELAÇÃO ENTRE O FERRO DIETÉTICO E O MDA NÃO MOSTROU RESULTADO SIGNIFICATIVO ($p > 0,05$). O CONSUMO DE FERRO PARECE NÃO INFLUENCIAR NA CONCENTRAÇÃO DO MDA.

Abstract: The study evaluated the dietary intake of iron and its relation marker of oxidative stress in type 2 diabetic patients. Case-control study involving subjects with and without type 2 diabetes mellitus, aged 27 to 59 years, of both sexes. Dietary intake was assessed using three-day food record. We evaluated the glycemic parameters. Analyzed for malondialdehyde (MDA) plasma through the production of thiobarbituric acid reactive substances. The mean values of body mass index of patients with diabetes and controls were, respectively, $28.62 \pm 4.59 \text{ kg/m}^2$ and $23.15 \pm 2.89 \text{ kg/m}^2$ ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in iron intake ($p > 0.05$). Was no statistically

significant difference between groups ($p < 0.05$) in plasma concentrations of MDA. The correlation between dietary iron and MDA showed no significant result ($p > 0.05$). The iron intake does not influence the concentrations of MDA.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 2 é uma doença crônica não transmissível que caracteriza-se pela intolerância à glicose e hiperglicemia. A principal alteração fisiopatológica desta doença é a resistência periférica à ação da insulina associada à deficiência relativa na secreção deste hormônio em resposta à glicose (RAMAKRISHNA; JAIL KHANI, 2008).

A hiperglicemia crônica presente no diabetes mellitus tipo 2 favorece a manifestação do estresse oxidativo, que contribui para danos no metabolismo de lipídios, proteínas e DNA, com alterações nas funções das células β. A patogênese dessa doença está diretamente associada ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e/ou redução da atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante (PAN et al., 2010).

Nesse sentido, vale ressaltar que o estado redox do organismo pode ser alterado por componentes da dieta, sendo um importante fator no controle do diabetes mellitus tipo 2 e de suas complicações. O ferro, em particular, possui habilidade de aumentar ou diminuir a capacidade redox, pois, esse mineral atua como cofator de enzimas antioxidantes essenciais no metabolismo e na respiração aeróbica. No entanto, concentrações plasmáticas elevadas de ferro podem favorecer a toxicidade celular e danos oxidativos em componentes celulares, pelo seu potencial em formar radicais livres, contribuindo para a manifestação do estresse oxidativo em pacientes diabéticos tipo 2 (CIRCUI; AVI, 2010).

Relationship between Dietary Iron and Oxidative Stress in Type 2 Diabetics

funcionais

decorrente de fatores envolvidos na fisiopatologia do diabetes, bem como pode estar relacionado ao estado nutricional desses pacientes, com a presença de excesso de peso e obesidade, e não resultante da sobrecarga do ferro dietético.

CONCLUSÃO

O consumo alimentar dos pacientes diabéticos tipo 2 se encontra superior à recomendação em relação ao teor de ferro e apresentaram ainda, concentrações plasmáticas de malondialdeído elevadas. Além disso, pode-se verificar que o ferro dietético não pareceu influenciar as concentrações plasmáticas de malondialdeído, não sendo assim evidenciada correlação significativa entre esses parâmetros.

SOBRE OS AUTORES

Denise Ferreira Pinto - Graduada em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.

Dra. Fabiane Araújo Sampaio - Nutricionista, Mestre em Ciências e Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.

Dra. Kyria Jayanne Glasmann Cruz - Nutricionista, Mestre em Alimentos e Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.

Dra. Ana Raquel Soares de Oliveira - Nutricionista, Mestranda em Alimentos e Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.

Dra. Kelylene Gomes da Silva - Nutricionista, Mestranda em Ciências dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo.

Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marinho - Nutricionista, Professora Doutora do Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí.

PALAVRAS-CHAVE: diabetes Mellitus tipo 2, ferro, malondialdeído.

KEYWORDS: diabetes Mellitus, type 2, iron, malondialdehyde.

RECEBIDO: 10/11/2014 - **APROVADO:** 15/11/2014

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, v.33, n.3, suppl.1, p.11S-61S, 2010.
- ANTUNES, M.V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Cienc Farm*, v.44, n.2, p.179-87, 2008.
- CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, v.48, n.6, p.549-62, 2010.
- FLEMING, D.J. et al. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly: Framingham Heart Study cohort. *Am J Clin Nutr*, v.76, n.6, p.1371-84, 2002.
- GROTTO, D. et al. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo - malondialdeído. *Quim Nova*, v.31, n.2, p.275-9, 2008.
- GUIDES, M.C. Química e bioquímica da peroxidação lipídica. *Rev Cienc IMAFES*, v.4, n.4, p.19, 2006.
- HUANG, H.Y. et al. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, v.76, n.3, p. 549-55, 2002.
- INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Iron, Vitamin B, and Folate*. Washington, DC: National Academies Press, 1997.
- INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington, DC: National Academies Press, 2005.
- JAY, D. et al. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*, v.40, n.2, p.183-92, 2006.
- PAN, H.Z. et al. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol*, v.47, suppl.1, p.718-65, 2010.
- RAJPAKSHAK, S. et al. Iron intake and the risk of type 2 diabetes in women: a prospective cohort study. *Diabetes Care*, v.29, n.6, p.1370-6, 2006.
- RAMAKRISHNA, V.; JALIKHANI, R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol*, v.45, n.1, p.41-8, 2008.
- SILVA, A.M.O.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. *Rev Nutr*, v.24, n.1, p.121-30, 2011.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - 4 ed. rev. ampl. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2011.
- VIANA, I.M.L. et al. Adequação do consumo de ferro por gestantes e mães em idade fértil atendidas em um serviço pré-natal. *Mundo Saúde*, v.23, n.3, p.296-93, 2009.
- VIOGHMAA, M. et al. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Biof Protoc*, v.19, n.3, p.184-68, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO expert consultation. Appropriate body - mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *The Lancet*, v.363, n.9412, p.137-63, 2004.