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

Efeito da suplementação crônica de leucina nas vias de sinalização da síntese e degradação proteica no tecido muscular de ratos destreinados submetidos à restrição calórica

Luciana Sigueta Nishimura

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR
Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2014

Luciana Sigueta Nishimura

Efeito da suplementação crônica de leucina nas vias de sinalização da síntese e degradação proteica no tecido muscular de ratos destreinados submetidos à restrição calórica

Versão corrigida.

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

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR
Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2014

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

Nishimura, Luciana Sigueta
N724e Efeito da suplementação crônica de leucina nas vias de sinalização da síntese e degradação proteica no tecido muscular de ratos destreinados submetidos à restrição calórica / Luciana Sigueta Nishimura. -- São Paulo, 2014.
120p.

Tese (doutorado) - 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, Julio Orlando, orientador.

641.1 CDD

Luciana Sigueta Nishimura

Efeito da suplementação crônica de leucina nas vias de sinalização da síntese e degradação proteica no tecido muscular de ratos destreinados submetidos à restrição calórica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
Orientador/Presidene

_____

1º. examinador

_____

2°. examinador

_____

3°. examinador

_____

4°. examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2014.

Nossas dúvidas são traidoras
e nos fazem perder o que, com frequência,
poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.

Willian Shakespeare

DEDICATÓRIA

Ao grande amor da minha vida... Daniel

Que me faz ser uma pessoa melhor

Meu porto seguro!

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me incentivaram,

que sempre acreditaram em mim...

Que são meus exemplos!

DEDICATÓRIA

Ao meu irmão que sempre esteve torcendo por mim

Aquele que me inspira!

AGRADECIMENTOS

À ***Deus*** por ter me dado essa oportunidade, e ter me abençoado desde o início da minha vida. Obrigada pela vida que tenho.

Ao ***meu marido Daniel***, pela atenção, pelas palavras carinhosas nos momentos mais difíceis, pela paciência, por me entender minha ausência, por ser quem você é, e assim me fazer ver a vida de uma forma diferente, e me fazer ser uma pessoa melhor. Não teria conseguido se não tivesse você ao meu lado. Te amo!

Obrigada ***Mãe e Pai***! Nada teria conquistado sem o esforço de vocês! Mais que isso, obrigada por todo carinho e amor que me deram. Obrigada pelo exemplo de família, e pelos pais maravilhosos que vocês são. Amo vocês!

Ao ***meu irmão Rei***, que sempre me incentivou, e que sempre estava pronto para me ajudar! Obrigada pela ajuda, paciência e conversas. Você sempre me inspirou a ser uma profissional melhor.

À ***minha Cunha irmã***, simplesmente por ter se tornado a minha irmã mais velha. Sempre pronta a me ajudar, pensando sempre no melhor para mim. Obrigada pelas conversas, pelas dicas, pelas broncas!

À ***minha sogrinha e sogrinho*** que sempre estiveram do meu lado, e que sempre compreenderam minha ausência em algumas situações por conta do doutorado. Amo vocês.

Aos meus cunhadinhos ***Lari e Romeu***, por sempre me apoiarem e por todo o carinho e torcida de sempre.

Ao ***Prof. Julio*** muito obrigada pela oportunidade em fazer doutorado na área que mais me identifico, por toda orientação, por toda conversa e pela confiança. Aprendi muito com o senhor.

Ao amigo ***João Alfredo*** que foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho. Sem você seria impossível a realização dele. Você tornou esse trabalho muito mais fácil e divertido. Obrigada por toda ajuda, pelas conversas, pelo incentivo, pela confiança. Mais que isso, obrigada pela sua amizade. Você foi um dos meus melhores presentes que tive na USP.

Ao amigo ***Emidio***, obrigada por toda ajuda desde o início desse trabalho. Obrigada por sempre estar disposto a nos ajudar, e principalmente pela sua amizade. É sempre muito bom estar ao seu lado, a diversão é sempre garantida.

Aos alunos de iniciação científica ***Laís, Daniel, Rodrigo*** por toda a ajuda, principalmente no biotério, com horas e horas de treinamento dos animais. Cada um com suas características que me conquistaram cada dia. Sem vocês tudo seria muito difícil, e menos divertido. Vocês foram inesquecíveis.

Ao aluno de iniciação científica ***Christian***, que apareceu no final do doutorado, e que eu não pude dizer não, pois sempre me lembro dessa oportunidade que tive e que pretendo sempre passar a todos os alunos de graduação. Hoje fico feliz em ter conhecido esse menino que além de muito responsável, inteligente e prestativo, tornou-se um grande amigo. Obrigada por fazer esses últimos momentos de análises mais divertidos.

À amiga ***Ivanir***, que desde que eu estava em outro laboratório até a minha última análise de doutorado, me ajudou. Muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, mas principalmente pelo seu carinho e amizade.

À amiga ***Kelcylene*** por toda ajuda, mas principalmente pelas risadas e conversas. Foi muito bom a sua entrada no nosso projeto e na minha vida.

Às amigas "Glutaminas" do laboratório***, Jaque, Thais, Raquel***. Cada uma com suas características, que me conquistaram cada dia mais. Fico muito feliz em ter conhecido e convivido com vocês. Espero continuarmos unidas, e sempre poder contar com todas vocês.

Aos alunos de IC do laboratório ***Bonequinha, Audrey e Joãozinho***, muito obrigada pela convivência e principalmente pelas risadas.

Aos Colegas do laboratório ***Vanessa, Kadu, Henrique, Daiana*** pela colaboração.

Às minhas amigas ***Tati e Moniquinha***. Obrigada pela nossa amizade. Obrigada por toda ajuda durante o doutorado, pelas conversas, pelos sorrisos, cuidados e por vocês terem entrado na minha vida. Tenho um carinho e admiração muito grande por vocês.

Aos ex-alunos do laboratório ***Leonardo e Lucas*** pela ajuda desde o início. Apesar da pouca convivência, tenho um carinho e admiração muito grande por vocês.

Às ex-alunas do laboratório ***Mariana Resende, Andrea, Mariana Lindenberg, Michele e Luciana Rossi*** por toda ajuda e amizade durante o doutorado.

À minha amiga madrinha irmã ***Liliane***, que sempre me incentivou a fazer o que faço. Obrigada por fazer parte da minha vida. Mesmo longe sinto sua vibração sempre positiva. À você só tenho que agradecer e dizer que foi um dos meus melhores presentes que tive na USP.

Sua amizade, sua palavra amiga, sua confiança, sua honestidade, sua força, a pessoa que você é, e a pessoa que você me fez ser.

À minha amiga mãe ***Soraya***. Foi assim que entrei na usp, e não poderia ser melhor. Sou uma pessoa muito abençoada por ter te conhecido, por ter trabalhado com você, por ter aprendido muito coisa, principalmente como ser um exemplo de pessoa, profissional e de família. Te admiro muito.

Aos meus amigos ***Barbara, Rafa, Fê, Camila, Ariana***. Amigos que fiz na IC e que tenho até hoje. Obrigada por sempre estar do meu lado e me ajudar. Vocês fizeram parte da minha vida e nunca serão esquecidos.

Às amigas ***Luciane, Verônica e Leilinha*** que me conquistaram com seus jeitinhos meigos e carinhosos. Obrigada pelos sorrisos sempre que nos encontramos e pelas conversas.

À querida ***Profa. Silvia***, que me aceitou para fazer IC, me co-orientou no mestrado, sempre muito atenciosa e sempre disposta a me ajudar. A minha admiração por você sempre aumenta, tanto como profissional, quanto como pessoa. Nunca vou me esquecer das conversas que tivemos e dos conselhos que você me deu. Obrigada por ter tido a oportunidade de ter trabalhado com você.

Ao querido ***Prof. Thomas*** pela amizade. Obrigada por ter me ajudado muito no mestrado, e principalmente pelas conversas e conselhos. Aprendi muito com você.

Às amigas do Lab. de Lípides ***Shina***, ***Ilana, Lu, Lucilia e Ana Mara*** pela ajuda, e principalmente pelo carinho.

Aos amigos do Lab. de minerais ***Alê, Jana, Grazi, Bruna, Kaluce*** pela ajuda, carinho e amizade.

Aos ***colegas do Lab. de Dieta, Nutrição e Câncer*** por toda colaboração durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao ***Prof. Fernando Moreno*** pelos ensinamentos na área profissional, e principalmente pessoal.

Ao ***Prof. Marcelo Rogero*** por toda ajuda, atenção e exemplo de profissional.

Aos ***Prof. Ursula, Neusa e João***, pelos ensinamentos durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À ***Tia Lurdinha*** por todo carinho e atenção, pelo sorriso de todo dia, e por estar sempre pronta a ajudar no que for preciso. Muito obrigada!

À ***Mônica, Edilson, Roberta, Cleo*** por sempre me ajudarem no que for preciso. Obrigada por toda atenção e principalmente pelo carinho.

À ***Elaine e Majô*** por toda atenção, carinho e ajuda desde o início.

Ao ***Jorge*** por toda ajuda, carinho e paciência.

Aos ***funcionários da portaria da FCF/USP***, em especial ao ***João Felix*** pelo carinho e cuidado durante toda minha jornada na USP.

Aos ***funcionários do biotério*** (Sivana, Flávia, Renata), pelo auxílio durante o período em que os animais do presente trabalho foram mantidos no biotério.

Aos funcionários do financeiro ***Alan, Adalto, Vanessa e Silvia*** por toda ajuda com o auxílio FAPESP.

À ***toda minha família*** pelo apoio e incentivo.

Aos ***docentes e funcionários do departamento*** de alimentos e nutrição experimental da FCF/USP, pela atenção e apoio.

A ***empresa Ajinomoto*** pela doação dos aminoácidos utilizados na execução do presente trabalho.

Ao ***CNPq*** pela bolsa para realização do doutorado.

A ***FAPESP*** pelo apoio financeiro para execução do presente trabalho (Processo FAPESP n°: **2011/11792-0**)

RESUMO

Nishimura, Luciana Sigueta. **Efeito da suplementação crônica de leucina nas vias de sinalização da síntese e degradação proteica no tecido muscular de ratos destreinados submetidos à restrição calórica.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

INTRODUÇÃO: O destreinamento físico está relacionado com alterações moleculares associadas à perda de massa muscular, rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à insulina. Estudos apontam que a restrição calórica reduz a gordura corporal, contudo, associada com a inatividade física, altera o metabolismo proteico acelerando o catabolismo muscular. Nesse sentido, estudos com suplementação de aminoácidos essenciais, em especial a leucina, observam aumento na síntese proteica e redução da degradação proteica em situações de restrição ou recuperação nutricional. Dessa forma sugere-se que a restrição calórica associada à suplementação com leucina poderia atenuar os efeitos desencadeados pelo destreinamento físico. **OBJETIVO:** Investigar a influência da suplementação crônica de leucina na via de sinalização da síntese proteica e degradação proteica no tecido muscular a partir de parâmetros moleculares em ratos destreinados, submetidos à restrição calórica. **MÉTODOS:** Foram utilizados 64 ratos *Sprague-Dawley* machos e adultos, inicialmente distribuídos em 2 grupos: Controle (CON) (n = 16) representados pelos animais sedentários, e Treinamento (TREIN) (n = 48) que foram submetidos ao treinamento em esteira ergométrica durante oito semanas. Após esse período, os animais foram redistribuído em 6 grupos: Sedentário (SED), Treinamento (TREIN), Destreinamento (DT), Destreinamento + Leucina (LEU), Destreinamento + Restrição Calórica (DTRC) e Destreinamento + Restrição Calórica + Leucina (DTRC + LEU). Foram analisados massa corporal, consumo da ração, composição corporal, sensibilidade a insulina bem como os marcadores de inflamação (IL-6; IL-10; MCP-1; TNF-α; 1L-1α; PAI-1; leptina; adponectina) e parâmetros moleculares como genes e proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese protéica (mTOR, P-4EBP1, P-s6K1 e eIF4E); degradação proteica (MAFBx e MURF) além de transportadores de aminoácidos (LAT-1 e SNAT 2 e CD98). **ESTATÍSTICA:** Os valores foram expressos em média e desvio padrão. As comparações entre os grupos após o período de destreinamento físico foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada no *software* SPSS versão 17.0. **RESULTADOS**: Em relação à composição corporal, foi observada diferença estatisticamente significativa na gordura corporal e massa livre de gordura entre os grupos DTRC e DTRC+LEU, em relação aos demais grupos experimentais. Porém não houve diferença estatística entre o DTRC e DTRC+LEU. No entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa quando avaliado a proteína da carcaça. Em relação aos parâmetros moleculares, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando avaliada a expressão de proteínas relacionadas com a via de sinalização de síntese proteica (mTOR, P-4EBP1, P-s6K1 e eIF4E) e transportadores de leucina (LAT-1;SNAT-2;CD(98). Quanto avaliada a expressão gênica da via de degradação, foi observada uma menor expressão do gene MURF quando suplementado com leucina, porém sem diferença estatisticamente significativa. **CONCLUSÃO**: A restrição calórica associada com a suplementação com leucina foi efetiva na redução da gordura corporal, e aumento da massa

livre de gordura, porém não houve diferença estatisticamente significante entre os dois grupos DTRC e DTRC+LEU, tampouco quando avaliada a proteína da carcaça desses animais. Dessa forma, pode-se concluir que a suplementação crônica com leucina não reverteu os efeitos desencadeados pelo destreinamento físico, e, além disso, não foi suficiente para alterar os parâmetros moleculares envolvidos na via de sinalização de síntese e degradação proteica desses animais.

Palavras-chave: Aminoácidos de cadeia ramificada; Composição corporal; Destreinamento físico

ABSTRACT

Nishimura, Luciana Sigueta. **Effect of chronic supplementation of leucine in signaling pathways of protein synthesis and degradation in muscle tissue of detrained rats subjected to caloric restriction.** Doctoral Dissertation. Graduate Program in Food Sciences – Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2014.

INTRODUCTION: Physical detraining is related to molecular changes associated with loss of muscle mass, rapid increase in fat mass, weight gain and insulin resistance. Studies show that caloric restriction reduces body fat; however, associated with physical inactivity, it alters protein metabolism accelerating muscle catabolism. Accordingly, studies with supplementation of essential amino acids, particularly leucine, observed increase in protein synthesis and reduced protein degradation in situation of nutritional restriction or recovery. Thus, it is suggested that caloric restriction associated with leucine supplementation could attenuate the effects triggered by physical detraining. **OBJECTIVE:** To investigate the influence of chronic leucine supplementation in the signaling pathway of protein synthesis and degradation in muscle tissue from molecular parameters in detrained rats, subjected to caloric restriction. **METHODS:** Sixty-four adult male and female Sprague-Dawley rats were used, initially divided into 2 groups: Control (CON) (n = 16) represented by sedentary animals, and Trained (TRAIN) (n = 48) who underwent treadmill training for eight weeks. After this period, the animals were re-distributed into 6 groups: Sedentary (SED), Trained (TRAIN), Detrained (DT), Detrained + Leucine (LEU), Detrained + Caloric Restriction (DTRC) and Detrained + Caloric Restriction + Leucine (DTRC + LEU). Body mass, food consumption, body composition, insulin sensitivity were analyzed, as well as inflammation markers (IL-6; IL-10; MCP-1; TNF-α; 1L-1α; PAI-1; leptin; adiponectin) and molecular parameters, such as genes and proteins involved in signaling pathways of protein synthesis (mTOR, P-4EBP1, P-s6K1 and eIF4E); protein degradation (MAFBx and MURF) and also amino acid transporters (LAT-1, SNAT 2 and CD98). **STATISTICAL ANALYSIS:** Values were expressed as mean and standard deviation. Analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons between groups after physical detraining, followed by Tukey's test. A 5% significance level was considered in all analyses. Statistical analysis was performed using SPSS software, version 17.0. **RESULTS**: In relation to body composition, a statistically significant difference was observed in body fat and fat free mass between groups DTRC and DTRC+LEU, compared with other experimental groups. However, there was no statistical difference between groups DTRC and DTRC+LEU. Nevertheless, no statistically significant difference was found when carcass protein was assessed. In relation to molecular parameters, no statistically significant difference was observed between groups, when protein expression related to the signaling pathway of protein synthesis (mTOR, P-4EBP1, P-s6K1 and eIF4E) and leucine transporters (LAT-1;SNAT-2;CD(98) was assessed. When gene expression of the degradation pathway was investigated, a lower expression of gene MURF was found with leucine supplementation; however, this was not statistically different. **CONCLUSION**: Caloric restriction associated with leucine supplementation was effective in reducing body fat, and increasing fat free mass; however, no statistically significant difference was found between groups DTRC and DTRC+LEU, nor when carcass protein of these animals was assessed. Therefore, it was concluded that chronic leucine supplementation did not reverse the effects triggered by physical detraining and, in addition, it was not sufficient to change the

molecular parameters involved in the signaling pathway of protein synthesis and degradation of these animals.

Keywords: Branched-chain amino acids; Body composition; Physical detraining

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Vias de sinalização da síntese proteica e inflamação no músculo..... **27**

Figura 2 Interação entre mTOR e outras vias relacionadas a longevidade..... **29**

Figura 3 Esquema representativo da via de síntese proteica no músculo esquelético envolvendo a proteína mTOR1..... **34**

Figura 4 Transporte intracelular de leucina..... **36**

Figura 5 Regulação de diferentes processos pela mTOR..... **37**

Figura 6 Vias de sinalização de síntese e degradação muscular..... **38**

Figura 7 Diagrama resumindo as vias de sinalização intracelular durante desuso muscular..... **40**

Figura 8 Desenho experimental..... **45**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Estudos que avaliaram o efeito da suplementação com leucina na síntese proteica muscular..... **35**

Quadro 2 Identificação dos genes para reação de q-RT-PCR disponibilizados pela Apllied Biosystems..... **57**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição das rações utilizadas no estudo..... **47**

Tabela 2 Concentração de aminoácidos no sangue dos animais..... **63**

Tabela 3 Concentração sérica dos aminoácidos de cadeia ramificada dos grupos experimentais..... **64**

Tabela 4 Concentração de aminoácidos das rações ofertadas aos animais..... **64**

Tabela 5 Peso dos coxins adiposos, tecido muscular e fígado dos grupos experimentais..... **65**

Tabela 6 Área sob a curva (ASC) e constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (kITT) dos grupos experimentais..... **70**

Tabela 7 Concentrações séricas de adiponectina**,** TNF-α, PAI-1, Leptina, MCP-1..... **71**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Teste de esforço máximo dos grupos experimentais..... **59**

Gráfico 2 Massa corporal inicial (g)..... **60**

Gráfico 3 Massa corporal final (g). **60**

Gráfico 4 Variação da massa corporal (%)..... **61**

Gráfico 5 Consumo de ração semanal durante a 9ª e 14ª semana.... ..... **62**

Gráfico 6 Peso (g) da umidade dos animais dos grupos experimentais. **66**

Gráfico 7 Percentual de umidade dos grupos experimentais..... **66**

Gráfico 8 Peso gordura corporal (g) dos animais dos grupos experimentais..... **67**

Gráfico 9 Percentual da gordura corporal dos grupos experimentais..... **67**

Gráfico 10 Peso MLG (g) dos animais dos animais dos grupos experimentais..... **68**

Gráfico 11 Percentual da massa magra dos grupos experimentais..... **68**

Gráfico 12 Peso da proteína da carcaça (g) dos animais dos grupos experimentais..... **69**

Gráfico 13 Percentual da proteína da carcaça dos grupos experimentais..... **69**

Gráfico 14 Quantificação da proteína MyHC-7 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **72**

Gráfico 15 Quantificação da proteína P-mTOR (ser^{2448}) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **73**

Gráfico 16 Quantificação da proteína mTOR total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **73**

Gráfico 17 Quantificação da proteína P-p70S6k (Thr^{389}) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **74**

Gráfico 18 Quantificação da proteína p70S6k total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **74**

Gráfico 19 Quantificação da proteína P-4EBP1(Thr^{70}) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **75**

Gráfico 20 Quantificação da proteína 4EBP1 total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **75**

Gráfico 21 Quantificação da proteína P-EiF4-E (ser 209) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **76**

Gráfico 22 Quantificação da proteína EiF4-E total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **76**

Gráfico 23 Relação da quantificação de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteíca mTOR (A), P-s6K1(B), P-4EBP1(C) e eIF4E (D) fosforilada em relação à total..... **77**

Gráfico 24 Expressão do mRNA de mTOR (A), p70S6K1(B), 4E-BP1 (C) e eIF4E (D) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **78**

Gráfico 25 Expressão do mRNA do transportador LAT1 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **79**

Gráfico 26 Expressão do mRNA do transportador SNAT2 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **79**

Gráfico 27 Expressão do mRNA do transportador CD98 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **80**

Gráfico 28 Expressão do mRNA da MURF1 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **81**

Gráfico 29 Expressão do mRNA da Atrogin-1 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais..... **81**

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1	Proteína ligante do fator de iniciação eucariótico 4E-1
ACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
AIN-93M	American Institute of Nutrition – 1993
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
CHO	Carboidrato
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CON	Ração controle
CON + LEU	Ração suplementada com leucina
Ct	Cycle threshold
DEST	Destreinado
DF	Destreinamento físico
DT	Destreinado
DT+LEU	Destreinado Leucina
DTRC	Destreinado restrição calórica
DTRC+LEU	Destreinado restrição calórica e leucina
EDL	Músculo extensor longo
EiF4-E	Fator de iniciação eucariótico 4E
EPI	Epididimal
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FoxO	Fatores de transcrição “Forkhead” da família da FoxO
GASTRO	Gastrocnêmio
GLUT-4	Transportador de glicose 4
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato de receptor de insulina 1
ITT	Teste de tolerância a insulina
JNK	C-jun-N-terminal quinase
Kitt	Constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática
LAT-1	Transportadores de aminoácidos do sistema L
LEU	Leucina
MAFBx	Muscle atrophy F-box
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MLG	Massa livre de gordura
mRNA	Ácido riblonucleico mensageiro

mTOR	Alvo da Rapamicina em Mamíferos
MuRF-1	Muscle RING-finger protein-1 ou atrogina;
MyHC7	Proteína miofibrilar de cadeia pesada
NF-κB	Fator de transcrição nuclear
OGTT	Teste oral de tolerância à glicose
P70S6k	Quinase da proteína ribossomal S6
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PI(3)K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PTN	Proteína
RC	Restrição Calórica
RC+LEU	Ração Restrição Calórica com Leucina
RET	Retroperitoneal
RNA	Ácido riblonucleico
rRNA	Ácido riblonucleico ribossomal
S6K1	Proteína Quinase da proteína ribossomal S6
SED	Sedentário
SIRT-1	Sirtuína 1
SNAT-2	Transportadores de aminoácidos do sistema A
SUB	Subcutâneo
TEM	Teste de esforço máximo
TEMED	Tetrametiletilenediamina
TF	Treinamento Físico
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TREIN	Treinamento
ULK	Unc 51 like kinase (homólogo ATG-1)
VO2máx	Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**24**
2	**JUSTIFICATIVA**	**42**
3	**OBJETIVOS**	**43**
3.1	OBJETIVO GERAL	**43**
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	**43**
4	MATERIAL E MÉTODOS	**44**
4.1	Animais	**44**
4.2	Desenho experimental	**44**
4.3	Ração	**45**
4.3.1	Ração Controle	**45**
4.3.2	Ração Suplementada com Leucina	**46**
4.3.3	Ração Restrição Calórica (RC) e Restrição Calórica Suplementada	**46**
4.4	Protocolo de Restrição Calórica	**48**
4.5	Protocolo de treinamento	**48**
4.6	Teste de Esforço Máximo	**48**
4.7	Eutanásia dos animais e coleta das amostras	**48**
4.8	Parêmtros Analisados	**49**
4.8.1	Parâmetros avaliados ao longo do período do treinamento e Destreinamento	**49**
4.8.2	Composição química da carcaça	**49**
4.8.3	Parâmetros teciduais	**49**
4.8.4	Parâmetros séricos	**49**
4.8.5	Parâmetros moleculares no tecido muscular	**50**
4.8.5.1	Expressão de proteínas totais e fosforiladas	**50**
4.8.5.2	Expressão gênica de proteínas da via de síntese proteica	**50**
4.8.5.3	Expressão gênica de proteínas da via de degradação proteica	**50**
4.8.5.4	Expressão gênica de transportadores de leucina	**50**
4.9	Determinação da composição corporal	**51**
4.9.1	Umidade	**51**
4.9.2	Lipidios	**51**
4.9.3	Proteína da carcaça	**51**
4.9.4	Massa livre de gordura	**52**
4.10	Determinações bioquímicas	**53**
4.10.1	Parâmetros séricos	**53**
4.10.2	Teste oral de tolerância à glicose	**53**
4.10.3	Teste de tolerância à insulina	**53**
4.10.4	Aminograma	**54**
4.11	Parâmetros biomoleculares	**54**

4.11.1 Western Blotting..... **54**
4.11.1.1 Preparo do gel de poliacrilamida..... **54**
4.11.1.2 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e “Western Blotting”..... **54**
4.11.1.3 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose) **55**
4.11.1.4 Sondagens das proteínas com anticorpos **55**
4.11.1.5 Revelação com sistema quimioluminescente **55**
4.11.2 Expressão gênica de proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica e de transportadores de leucina..... **56**
4.12 Análise Estatística **58**
5 **RESULTADOS** **59**
6 **DISCUSSÃO** **82**
7 **CONCLUSÃO**..... **92**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **93**
ANEXO..... **110**

1 INTRODUÇÃO

O treinamento físico (TF) é considerado uma importante intervenção na melhoria de qualidade de vida da população em geral (HASKELL, 2007), utilizada como tratamento ou diminuição de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, diabetes *mellitus* tipo II, e doenças relacionadas ao aumento da resistência à insulina (PERES et al., 2005). Está bem estabelecido na literatura que o TF melhora a sensibilidade periférica à insulina nos músculos e no tecido adiposo, além de diminuir o depósito de gordura visceral e subcutâneo (ARNER, 1995; LUCIANO et al., 2002).

Nesse sentido, o exercício físico está relacionado com a melhora de algumas funções metabólicas e hormonais em diversos tecidos (PERES et al., 2005). O tecido muscular, por exemplo, é responsivo à ação da insulina (LUCIANO et al., 2002), e a prática regular de exercício físico aumenta a captação de glicose por este tecido (FROSIG, 2007). Além disso, estudos apontam que o exercício físico pode estimular vias que regulam o equilíbrio energético celular, a biogênese mitocondrial, a transcrição gênica e a síntese proteica (BODINE et al., 2001).

Mais especificamente, o TF de força promove aumento na força, na área seccional da fibra muscular (HASTEN et al., 2000; BALAGOPAL et al., 2001) e nas quantidades de proteínas miofibrilares, como miosina e actina. Já o TF de *endurance* é caracterizado pela resistência à fadiga, devido, em parte, ao aumento da capacidade oxidativa resultante do aumento de proteínas mitocondriais (MORGAN et al., 1971; FINK et al., 1977). Estudos apontam que tanto o exercício físico de força (MORGAN et al., 1971; FINK et al. 1977), quanto o de *endurance* (CARRARO et al., 1990; SHEFFIELD-MOORE et al., 2004), estimulam a síntese proteica muscular.

Em estudo realizado em humanos, utilizando cicloergômetro com membro inferior, a 67% do VO_2máx., foi observada estimulação de síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas (MILLER et al., 2005). No trabalho de Sheffield-Moore et al. (2004), foi observado que o exercício aeróbio, a 40% do VO_2máx., resultou em aumento da síntese proteica muscular em indivíduos adultos e idosos.

Além de suas características eminentemente oxidativas, os exercícios de *endurance* podem ser considerados como exercícios de força de baixa intensidade, visto que, nesta modalidade, o indivíduo, ao se exercitar, utiliza seu próprio peso, sendo, assim, efetivo na

melhora da força. Mudanças na síntese proteica muscular no exercício de *endurance* são relevantes também para a reparação do tecido e para a remodelação, assim como para mudanças na síntese de proteínas mitocondriais (BURD, 2009).

Em relação aos parâmetros moleculares, Mascher et al. (2007) verificaram aumento da fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica no músculo de humanos submetidos a exercício de *endurance*, com 75% VO_2máx.

Por vezes, e por diversas razões, o TF é cessado e inicia-se um período de destreinamento físico (DF), isto é, a inatividade física ocasionada pelo repouso e/ou pela imobilização, que também pode ser definido como perda parcial ou completa das adaptações anatômicas, fisiológicas e de desempenho induzida pelo TF (MUJIKA & PADILLA, 2000). A interrupção repentina do TF pode ser causada por lesões (ou algum outro tipo de injúria), período de férias, transição da fase do ciclo de treinamento ou, até mesmo, término da carreira esportiva (MUJIKA & PADILLA, 2000).

Mujika & Padilla (2000) classificam o DF de curto prazo como aquele de até 4 semanas, já o DF de longo prazo é aquele com mais do que 4 semanas de destreinamento. Algumas características do DF não são necessariamente as mesmas encontradas em indivíduos já treinados ou que estejam iniciando o TF. Assim, em indivíduos altamente treinados podem ser observados redução da atividade da lipase lipoproteica, aumento do lactato sanguíneo e consequente redução do seu desempenho devido ao DF de curto prazo.

O DF em longo prazo pode representar aumento das fibras oxidativas em detrimento das fibras rápidas (tipo II), em atletas de força e *bodybuilding*, diminuição das fibras tipo I, em remadores, e nenhuma mudança nas fibras de dançarinos e jogadores de futebol. Grande mudança nas fibras tipo II “a” e “b” foi observada em ciclistas e corredores (LARSSON & ANSVED, 1985; AMIGÓ et al., 1998). Já em indivíduos que iniciaram o TF, a mudança nas fibras tipos I e II, a redução da área sobre a curva e a perda de massa magra têm sido observadas com o DF de longo prazo (KLAUSEN, ANDERSEN, PELLE, 1981).

Ouro estudo demonstrou que os efeitos do DF ou da imobilização são observados 7 a 14 dias após o exercício de *endurance*. Malek et al. (2010) observaram que 7 dias de destreinamento do treinamento de *endurance* ocasionam redução na capilarização no músculo sóleo de ratos, relacionada com a produção de energia mitocondrial.

De forma geral, o DF pode resultar em considerável perda de massa muscular (BOOTH, 1982; BOOTH 1983), rápido acréscimo da massa adiposa, ganho de peso e resistência à

insulina, tanto em humanos, quanto em animais (YASARI et al., 2007; YASARI et al., 2006; KUMP & BOOTH,2005; PETIBOIS et al., 2004).

Nesse sentido, consequências funcionais e morfológicas incluem diminuição da área seccional de fibras e do teor de proteínas, redução de força e potência e aumento da fatigabilidade e da resistência à insulina (BOOTH, 1982; BOOTH, 1983). Além disso, o DF é capaz de reduzir a força muscular, a agilidade, a flexibilidade e o balanço estático, resultando no comprometimento da qualidade de vida dos indivíduos (BOCALINI et al., 2010).

A perda de massa muscular ocorre devido ao desbalanço entre a síntese e a degradação proteicas. Esse desequilíbrio pode ocorrer devido à diminuição da síntese, ao aumento da degradação ou pela combinação de ambos (LITTLE, 2009). Grande parte dos estudos destaca a proteólise como o fator principal relacionado à perda muscular. Porém, Little (2009) relata que a diminuição da massa magra muscular está mais relacionada com a diminuição da síntese proteica, em relação ao aumento da degradação, e, além disso, aponta a síntese proteica mais responsiva a intervenções externas como alimentação e exercício físico.

Estudo desenvolvido com o objetivo de descrever os efeitos da interrupção do treinamento sobre o perfil lipídico e o comportamento morfológico em atletas de *endurance* mostrou que, após 52 semanas da cessação do exercício físico, os sujeitos aumentaram em 70% a quantidade de gordura corporal inicial – que foi acompanhada do aumento significativo do índice de massa corporal (IMC) e da redução na massa corporal magra. Mostrou, também, que o DF foi capaz de reverter todos os benefícios causados pelo TF sobre o perfil lipídico (PETIBOIS et al., 2004).

Ainda sobre a composição corporal, Woo et al. (2011) verificaram que 12 semanas de DF ocasionaram aumento do IMC e do percentual de gordura em meninas coreanas com sobrepesos. Entretanto, esses resultados não foram observados no grupo que continuou o programa de TF. Liu et al (2008) verificaram, em atletas de caiaque, que 4 semanas após a interrupção do TF, houve aumento da circunferência abdominal associado com a redução da massa corporal e do IMC. Nesse sentido, os autores especulam que o aumento da circunferência abdominal, sem a elevação da massa corporal, ocorreu devido à redução de massa muscular.

Chen et al. (2006) verificaram que, após 2 meses de DF, foi observado aumento da concentração plasmática de insulina em dançarinas, apesar de não apresentar mudanças significativas na massa corporal. Ainda, Lo et al. (2011) avaliaram a mudança na composição corporal de indivíduos homens jovens, após o destreinamento de exercícios de força e

endurance, e verificaram que, com o exercício de *endurance*, houve diminuição da massa magra, retornando aos valores de *baseline*, após o período de destreinamento.

Além disso, estudos verificaram relação com a adiposidade e o aumento da degradação proteica. Os estudos apontam aumento do *turnover* proteico e, portanto, balanço proteico negativo em pacientes obesos comparados aos eutróficos (CHEVALIER et al., 2005; MARCHESINI et al., 2000). Isso sugere prejuízo no metabolismo proteico durante a obesidade, ocasionando diminuição na massa magra, devido ao aumento da degradação proteica. Estudo de Marchesini et al. (2000) verificou aumento na concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), em pacientes obesos. Essa hiperaminoacidemia é observada devido ao aumento do catabolismo proteico, que pode ser explicado pela redução de atividade ou concentração de enzimas envolvidas no metabolismo desses aminoácidos (SHE et al., 2007).

Nesse sentido, o aumento do tecido adiposo, observado após período de DF, pode induzir a produção de citocinas inflamatórias e estas, por sua vez, podem aumentar a degradação proteica (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Consequentemente, ocorre aumento da degradação em relação à síntese, diminuindo, assim, a massa muscular (Figura 1).

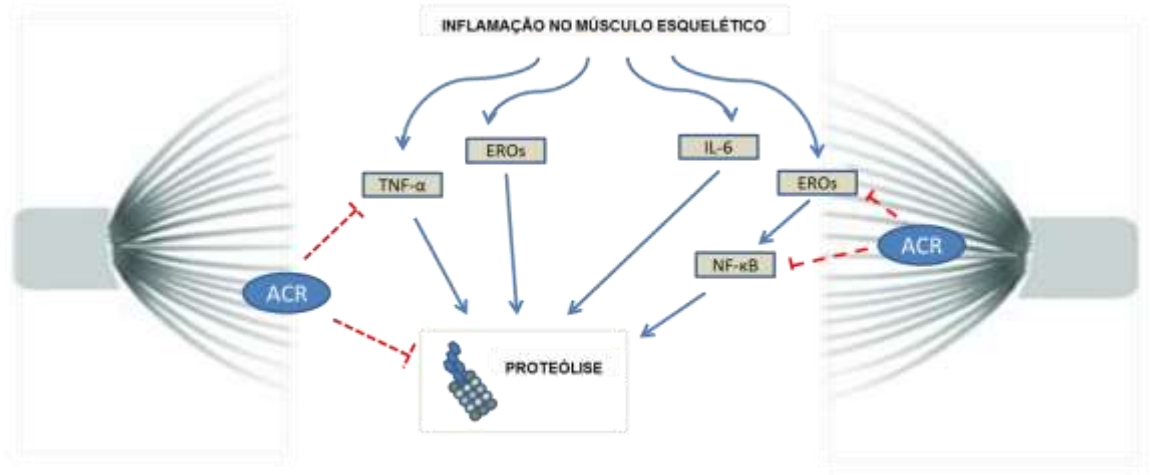

Figura 1. Vias de sinalização da síntese proteica e inflamação no músculo. Adaptado de Nicastro et al. (2012).
A inflamação no músculo esquelético pode aumentar a expressão e a atividade do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), espécies reativas de oxigênio (ERO), interleucina 6 (IL-6), e do fator de transcrição nuclear (NF-κB), que, por sua vez, podem contribuir para a degradação proteica.

Em relação aos parâmetros moleculares, estudo em ratos aponta que o DF é acompanhado por diminuição na expressão do receptor de insulina (IR), da fosforilação em tirosina do IR, da fosforilação da Akt e da concentração de GLUT-4, após estímulo com insulina em músculo esquelético, apontando relação entre as alterações intracelulares e a redução à sensibilidade à insulina com o DF (KUMP & BOOTH, 2005). Bajollo et al. (2010) verificaram, em ratos submetidos à suspensão do membro posterior, perda significante de proteínas miofibrilares, RNA total e rRNA, atrofia no músculo sóleo e diminuição de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica, como proteína quinase ribossomal de 70 Kd (p70S6k) e proteína alvo da *rapamicina* em mamíferos-1 (mTOR).

A partir dos estudos apontados, observou-se que o DF está relacionado com alterações moleculares associadas ao ganho de massa corporal, ao aumento do tecido adiposo e da resistência periférica à insulina e à diminuição da massa magra. Dessa forma, medidas preventivas devem ser adotadas para minimizar essas alterações, como a alimentação e a manutenção parcial do exercício físico (LIU et al., 2008; YASARY et al., 2007; SHEPARD et al., 2001).

Neste sentido, estratégias nutricionais, como restrição calórica (RC) – ingestão de calorias abaixo do *ad libitum*, sem desnutrição – têm sido indicadas para minimizar efeitos do DF. Os efeitos benéficos da RC estão relacionados com a redução da massa adiposa, a melhora da sensibilidade à insulina em diversos tecidos e à redução do risco de inflamações crônicas do organismo (GENARO et al., 2009; YE & KELLER, 2010).

Apesar dos benefícios observados com RC, fatores, como o tempo de intervenção e o percentual de restrição podem levar a resultados distintos. Em grande parte dos estudos, foi realizada a RC de 20 a 45% de restrição, e em período que variou de 20 semanas a 12 meses. Em estudos realizados em animais idosos, com 40% RC durante 2 meses, foi observada redução da massa adiposa e da razão gordura/massa magra (YOU et al., 2007). Em ratos magros com a RC de 40 a 45%, durante 20 dias, 12 semanas ou 4 meses, foi observada redução da massa adiposa (DING ET AL.; DAVIDSON ET AL., 2002; CHEN et al., 2010). Yamashita et al. (2010) também observaram o mesmo resultado, quando restringiram a alimentação em 20% durante 10 semanas.

Em humanos obesos, Ahmadi et al. (2011) observaram que a RC de 30%, durante 7 meses, reduziu a massa adiposa dos indivíduos. Em humanos magros e com sobrepeso e com RC de 25%, durante 4 ou 6 meses de intervenção, também foi observada redução do tecido

adiposo; no entanto, com intervenção mais longa, verificou-se redução da massa magra desses indivíduos (LARSON-MEYER ET AL., 2006; REDMAN et al., 2010). Em termos calóricos, a redução de 700 kcal a 1.000 kcal diárias, durante 4 meses de intervenção, resultou em redução da massa muscular em humanos (JANSSEN, 1999).

Em relação aos parâmetros moleculares, a falta de nutrientes, em casos de RC, por exemplo, pode ativar adenosina monofosfato (AMP) quinase-activated (AMPK) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD+) dependentes de desacetilases, tal como o Sirtuina 1 (SIRT1), que, por sua vez, inibe a via da proteína alvo de rapamicina (mTOR), podendo levar à diminuição da síntese proteica (INOKI, 2008).

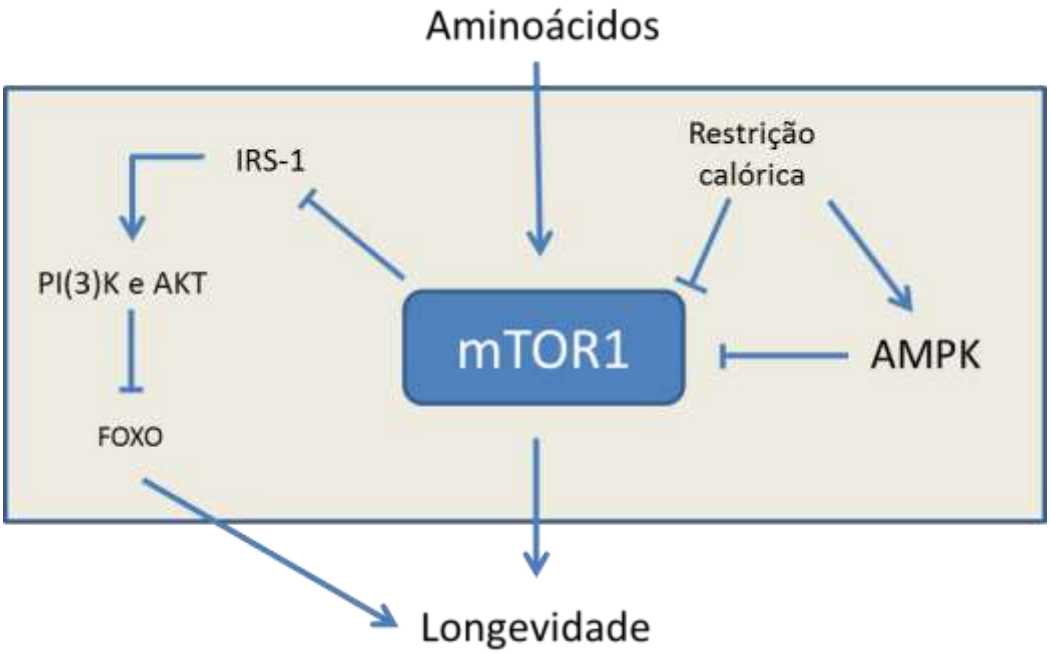

Figura 2. Interação entre mTOR e outras vias relacionadas a longevidade. Adaptado de Johnson (2013).

No entanto, dados epidemiológicos e experimentais indicam que a dieta desempenha papel central no desenvolvimento de doenças crônicas associadas à idade e ao envelhecimento. Estudos realizados em animais sugerem que o grau e o tempo de restrição calórica (RC), bem como a composição da dieta, desempenham papel importante na promoção da saúde e da longevidade – e que não apenas a ingestão de calorias é importante na longevidade. Os dados de estudos em humanos indicam que RC em longo prazo, com ingestão adequada de nutrientes, resulta em diversas adaptações metabólicas que reduzem o

risco de desenvolver diabetes tipo 2, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e câncer. No entanto, é possível que alguns dos efeitos benéficos para a saúde metabólica não sejam inteiramente devido à RC, mas decorrentes de dietas de alta qualidade consumidas pelos praticantes de RC (RIZZA, 2013).

Estudo de Mattos-Neto (2011), realizado em nosso laboratório, observou que o DF promoveu aumento da ingestão de ração, quando comparado aos grupos sedentário e treinado, porém foi observado consumo alimentar menor, quando comparado ao grupo destreinado suplementado com leucina. Este aumento do consumo, observado principalmente nas três primeiras semanas de cessação de TF, favoreceu o rápido ganho de massa corporal e de tecido adiposo nesses animais. Além disso, observou-se que o DF promoveu diminuição de adipocinas anti-inflamatória, representando uma condição pró-inflamatória.

Em paralelo ao presente estudo, foi realizado outro, com os mesmos animais e modelo experimental do presente trabalho, no qual se avaliou o coeficiente de eficiência metabólica, que indica quantos gramas de ração ingeridos pelo animal foram necessários para cada grama de peso aumentado. Foi observado que o grupo submetido ao DF apresentou coeficiente de eficiência menor em comparação aos grupos SED e TREIN, indicando que o animal ingeriu menor quantidade para ganhar peso equivalente, em relação aos demais grupos (PEDROSO, 2013). Além disso, nesse trabalho, verificou-se que a RC de 30% foi capaz de minimizar os efeitos deletérios ocasionados pela interrupção do TF, evitando o ganho de peso e de gordura corporal, aumentando a sensibilidade à insulina e reduzindo marcadores inflamatórios.

Por outro lado, estudos apontam que a RC, associada com o sedentarismo, altera o metabolismo proteico, acelerando o catabolismo muscular (BIOLO et al., 2007). A redução de massa magra, observada na RC implica, em balanço proteico negativo. Existem mecanismos que provocam esse balanço negativo, e, destes, alguns são mediados pela proteína dietética. Os mecanismos envolvidos são: o elevado catabolismo, devido à RC a partir do *up-regulation* de enzimas catabólicas (GARLICK et al., 1991; VILLAREAL et al., 2011); a quantidade inadequada de proteína na dieta e, consequentemente, a redução da síntese proteica (CUTHBERTSON et al., 2005; GLYNN et al., 2010); a redução do número de ingestões de refeições com proteínas no dia e, portanto, a redução do número de picos de síntese proteica (SLATER & PHILLIPS, 2011); e a redução da síntese proteica devido à qualidade da proteína ingerida na refeição (TANG et al., 2009; TANG & PHILLIPS, 2009).

Dietas com maior proporção de proteína ingerida, acima da ingestão dietética recomendada (RDA) ($0{,}8 g.kg^{-1}.d^{-1}$) promovem maior perda de peso, redução de gordura

corporal e redução da perda de massa magra durante a RC, quando comparadas a dietas com menor ingestão de proteínas.

Uma dieta com alta concentração de proteína é considerada com 30% da energia total diária de proteína, 40% de carboidratos e 30% de gordura, com ingestão calórica de 1.400 kcal/dia para mulheres e 1.600 kcal/dia para os homens. Vale ressaltar que uma dieta padrão é composta por 15% da energia total diária de proteína, 55% de carboidratos e 30% de gordura.

Em mulheres obesas saudáveis, após 12 semanas de RC, foi observada redução da massa livre de gordura (FARNSWORTH et al., 2003). Nesse sentido, a mesma intervenção, em período de 21 dias, também em mulheres obesas saudáveis, permitiu observar o mesmo resultado na composição corporal (PIATTI et al. 1994).

Donato et al. (2006) verificaram que o aumento de ingestão de leucina em 50% resultou em menor teor de gordura corporal e maior concentração de RNA proteína no músculo em ratos.

Em estudo piloto, realizado inicialmente para determinação de alguns parâmetros do presente trabalho, verificou-se que a suplementação de leucina resultou na melhora do estado nutricional de proteínas, além de aumentar os níveis de IL-6 na circulação e regular o metabolismo hepático de ratos *sprague-dawley*, submetidos à RC de 30% durante 6 semanas (PEDROSO et al., 2014).

Vale ressaltar que o excesso de ingestão de aminoácidos e glicose, além da necessidade de manter a homeostase e a produção de energia, pode causar resistência à insulina no músculo esquelético, pela desregulação da via de sinalização de insulina, promovendo, assim, o catabolismo proteico (LAPLANTE & SABATINI, 2012; SAHA et al., 2011).

Nesse sentido, adicionalmente à RC, a qual seria uma importante intervenção nutricional, para diminuir o ganho de massa corporal e tecido adiposo, a utilização de suplementos proteicos, em quantidades adequadas, poderia minimizar a perda ou atuar na manutenção da massa corporal e da massa magra ocasionadas pelo DF e pela RC.

Estudos apontam que a ingestão de proteínas e de aminoácidos essenciais estaria relacionada à melhora do crescimento do tecido muscular (YOSHIZAWA et al., 1999; SMITH et al., 1998). Dentre os aminoácidos essenciais, destacam-se os ACR, que correspondem a cerca de 35% em proteínas musculares (MARCHINI et al., 1998; WAGENMAKERS, 1998).

Durante o exercício físico, os ACR são os preferencialmente oxidados (WAGENMAKERS, 1998). Especificamente no exercício físico prolongado, verifica-se liberação de ACR pelo tecido hepático, aliada à diminuição da concentração plasmática de ACR, sendo que a concentração plasmática de leucina diminui entre 11 e 33% (MERO, 1999). Decombaz et al. (1979) verificaram, em 11 homens treinados, submetidos a uma corrida com percurso de 100 km, que houve diminuição significativa (35-85%) da concentração sérica de ACR em relação aos valores pré-exercício. No estudo de Rennie et al. (1981), verificou-se, no ciclismo, a diminuição significativa da concentração plasmática de ACR ao final do exercício físico.

Estudos apontam que os ACR, em especial a leucina, estimulam a síntese e minimizam a degradação proteica no músculo esquelético, mantendo, assim, a massa magra (BUSE & REID, 1975; CROZIER et al., 2005; PHILIPS, 2009).

A leucina corresponde a cerca de 20% da ingestão dietética, ao passo que os aminoácidos de cadeia ramificada correspondem a 1/3 da proteína muscular (LAYMAN et al., 2006). Em animais, no estudo de Tsubuku (2004), não foi observado efeito adverso (NOAEL) com a suplementação oral de 2,5% de isoleucina para ambos os sexos, 5% de valina para homens e 2,5% de valina para mulheres, e 5% de leucina para ambos os sexos, que corresponde a 3,3-3,8g Leu/kg/dia, durante 13 semanas de suplementação.

O aumento da ingestão de leucina pode levar à competição com a valina e a isoleucina e estimular o catabolismo dos três aminoácidos de cadeia ramificada. A primeira reação de catabolismo dos ACR é a transaminação reversível pelo ACR aminotransferase. O ACR formado é descarboxilado pelo ACR desidrogenase, diminuindo a concentração plasmática de valina e isoleucina. O excesso de leucina ativa as duas enzimas relacionadas à fosforilação dos três aminoácidos de cadeia ramificada, metabolizando todos os aminoácidos ao mesmo tempo (RIEL, 2003).

Vale ressaltar que o transporte intracelular de aminoácido no repouso apresenta saturação; assim, o aumento da concentração de leucina não resulta em aumento do transporte intracelular de aminoácidos, nem aumento na concentração de leucina muscular e tampouco em aumento da estimulação da síntese proteica muscular. Porém, o exercício de *endurance*, combinado com a administração de ACR, mostrou haver acelerado transporte de aminoácidos para dentro da célula, resultando em aumento intracelular de aminoácidos no pós-exercício (PASIAKOS et al., 2011).

Nagasawa et al. (2002) apontam a análise do conteúdo de proteínas miofibrilares como recurso a ser utilizado para análise dos efeitos da suplementação de aminoácidos sobre o balanço proteico. Neste estudo, foi observada supressão da degradação proteica miofibrilar após 2 a 4h da administração isolada de leucina. Alguns estudos sugerem que, em comparação aos níveis de proteína citoplasmáticos, os níveis de proteínas miofibrilares são mais responsivos à ingestão de aminoácidos (MITTENDORFER et al., 2005; BATES & MILLWARD, 1983).

Heagens et al. (2012) apontam que a suplementação de leucina induz especificamente o incremento nas proteínas miofibrilares, independentemente do balanço proteico total. Desta maneira, a análise do conteúdo de proteínas miofibrilares apresenta-se de extrema relevância, principalmente em situações nas quais o balanço proteico total não sinaliza diferenças significativas.

No músculo esquelético, a leucina exerce os seus efeitos em nível pós-transcricional e durante a fase de iniciação da tradução do RNA-mensageiro em proteína (ANTHONY et al., 2001; ANTHONY et al., 2000). O mecanismo envolvido se dá pelo aumento desse aminoácido, que promove a ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Esta proteína, por sua vez, estimula a fosforilação de duas proteínas regulatórias: a proteína quinase ribossomal S6 de 70kDA (p70S6k) e a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4EBP1) (ANTHONY et al., 2002), levando, dessa forma, ao aumento na síntese proteica.

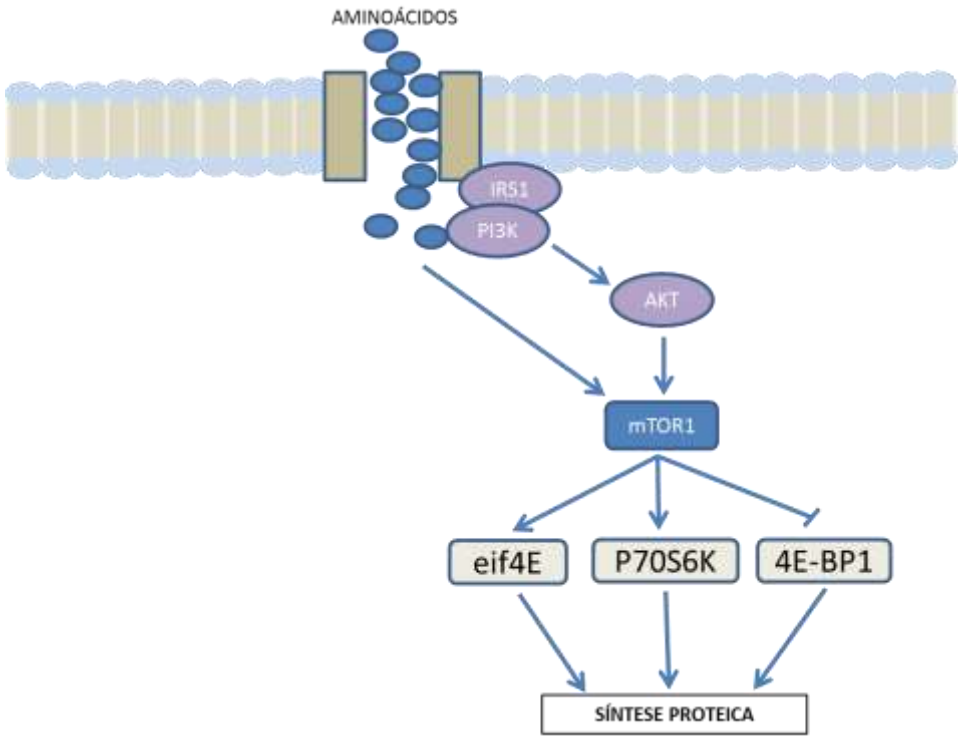

Figura 3. Esquema representativo da via de síntese proteica no músculo esquelético envolvendo a proteína mTOR1. Adaptado de Carbone et al. (2012).

Blomstrand (2006) aponta que a ingestão de aminoácidos, após o exercício físico de força, estimula a razão da síntese proteica no tecido muscular humano, com consequente balanço proteico positivo.

Bajotto et al. (2011) verificaram, em animais submetidos à suspensão do membro posterior, que a suplementação com leucina não foi suficiente para reduzir a perda de massa muscular, porém atenuou a diminuição da quantidade de proteínas musculares e de RNA total, preservando, assim, as proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica. Contudo, estudos verificaram que a suplementação com ACR reverteu a perda de massa magra em 6 (STEIN et al., 1999) e 28 dias de repouso (PADDON-JONES et al., 2004a).

Estudo do nosso laboratório avaliou o efeito da suplementação com leucina e fenilalanina na composição corporal de ratos submetidos a períodos de restrição alimentar intercalados por recuperação nutricional. Foi encontrado aumento significativo no conteúdo de proteína corporal e de massa magra na carcaça dos animais suplementados (DONATO et al., 2007).

Outros estudos similares, que avaliaram a suplementação de leucina *in vitro* e *in vivo*, podem ser observados resumidamente no Quadro 1:

Referência	**Metodologia da síntese proteica muscular**	**Conclusão**
Li et al. (1978)	^{14}C-fenilalanina - Gastrocnêmio	Leucina aumentou a síntese proteica muscular
Hong et al. (1984)	^{14}C-tirosina – Sóleo e EDL	Leucina aumentou a síntese proteica muscular
Buse et al. (1975)	^{14}C-lisina – diafragma	Leucina aumentou a síntese proteica muscular
Buse et al. (1977)	^{3}H-tirosina – diafragma	Leucina aumentou a síntese proteica muscular em ratos saudáveis e diabéticos
Anthony et al. (1999)	^{3}H-isoleucina – gastrocnêmio e plantar	Leucina isolada ou com carboidrato recuperou a síntese proteica muscular após o exercício
Anthony et al. (2000)	^{3}H-fenilalanina – gastrocnêmio e plantar	Leucina isolada ou com carboidrato estimulou a síntese proteica muscular com aumento da via de sinalização da mTOR1
Bolster et al. (2004)	^{3}H-fenilalanina – gastrocnêmio e sóleo	Leucina estimulou a síntese proteica muscular e a via de sinalização da mTOR1
Crozier et al. (2005)	^{3}H-fenilalanina – gastrocnêmio e plantar	Aumento da dose de leucina estimulou a síntese proteica muscular e a via de sinalização da mTOR1

Quadro 1. Estudos que avaliaram o efeito da suplementação com leucina na síntese proteica muscular. Adaptado de Pasiakos et al.(2011).

Em suma, a hipertrofia muscular, a partir do aumento da síntese proteica, requer a ativação das vias de sinalização da mTOR, porém os mecanismos moleculares ainda não estão bem elucidados.

Há evidências que a leucina inibe a degradação proteica, bem como promove a sinalização mTORC1 para promover o crescimento. Porém, ainda não está bem estabelecido como ocorre a transmissão de sinal do aminoácido para a ativação da proteína mTOR.

A quantidade intracelular de aminoácidos pode ser determinada pela quantidade ingerida pela dieta, pela captação celular e pela sua utilização (DOOD, 2012). No músculo, é necessária quantidade alta de aminoácidos para maximizar o crescimento muscular. A quantidade intramuscular será mantida pela ingestão de aminoácidos pela dieta e pela taxa de absorção de aminoácidos pelo sangue, que ocorre a partir de transportadores de membranas. Os principais transportadores que influenciam a sinalização da mTOR 1 são os dos sistemas A e L (DRUMMOND et al., 2010).

Os transportadores do sistema L são responsáveis pela troca de aminoácidos de cadeia ramificada por outros aminoácidos intracelulares; mais, especificamente, o LAT 1 é acoplado à glicoproteína CD98, a qual apresenta sua expressão aumentada, com a atividade da mTOR (DODD & TEE, 2012).

Outro transportador do sistema A, SNAT 2 (SLC1A5), regula o nível de glutamina no músculo esquelético. Esse transportador, em conjunto com a LAT1 (SLC7A5/SLC3A2), tem função de exportar a glutamina e absorver a leucina para o interior da célula (Figura 4).

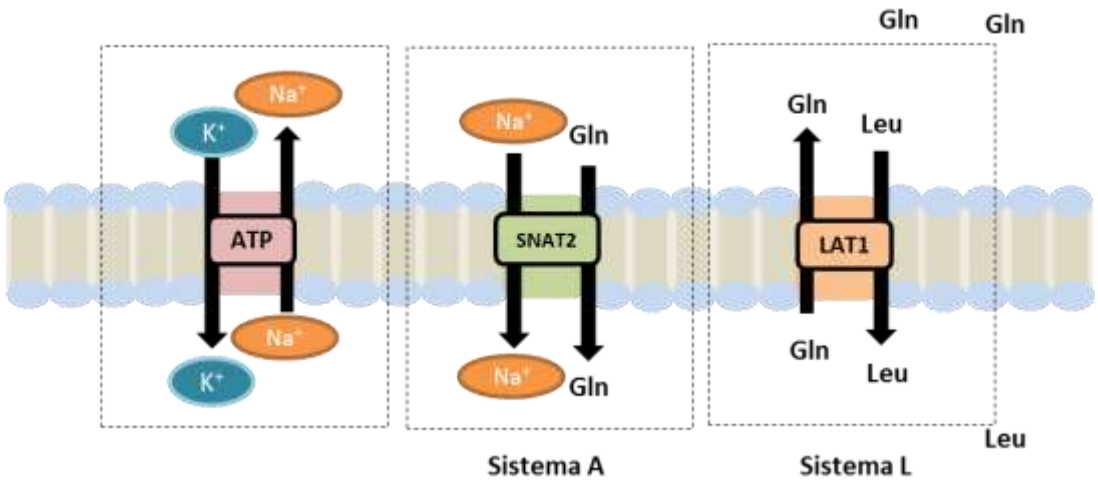

Figura 4. Transporte intracelular de leucina. Adaptado de Dodd & Tee (2012).

Nicklin et al. (2009) demonstraram, em linhagem de células HeLa, que SLC1A5, altamente expressa nestas células, era necessária para a atividade da mTORC1 em conjunto com o LAT1-CD98. Neste estudo, a inativação do sistema (SLC1A5) ou LAT1/CD98

(SLC7A5/SLC3A2) foi suficiente para suprimir mTORC1 e ativar a autofagia através da redução da absorção de glutamina.

Vale ressaltar que TORC1 também regula a autofagia em resposta à variedade de sinais, incluindo disponibilidade de nutrientes, níveis de energia celular e fatores de crescimento (DODD & TEE, 2012). A função primária da autofagia é permitir que a célula sobreviva sob condições de estresse, em vez de funcionar como um mecanismo de morte celular (KROEMER & LEVINE 2008). Um exemplo clássico é a homeostase de aminoácidos, a partir da gliconeogênese hepática durante a redução da ingestão alimentar (UENO et al. 2012).

A via da mTORC1 está intimamente ligada à energia celular através da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e ULK1 (também conhecido como ATG1). Para manter a homeostase da energia e de aminoácidos, as células utilizam uma série de mecanismos de *feedback* negativo, conforme a Figura 5 (JOHNSON et al., 2013).

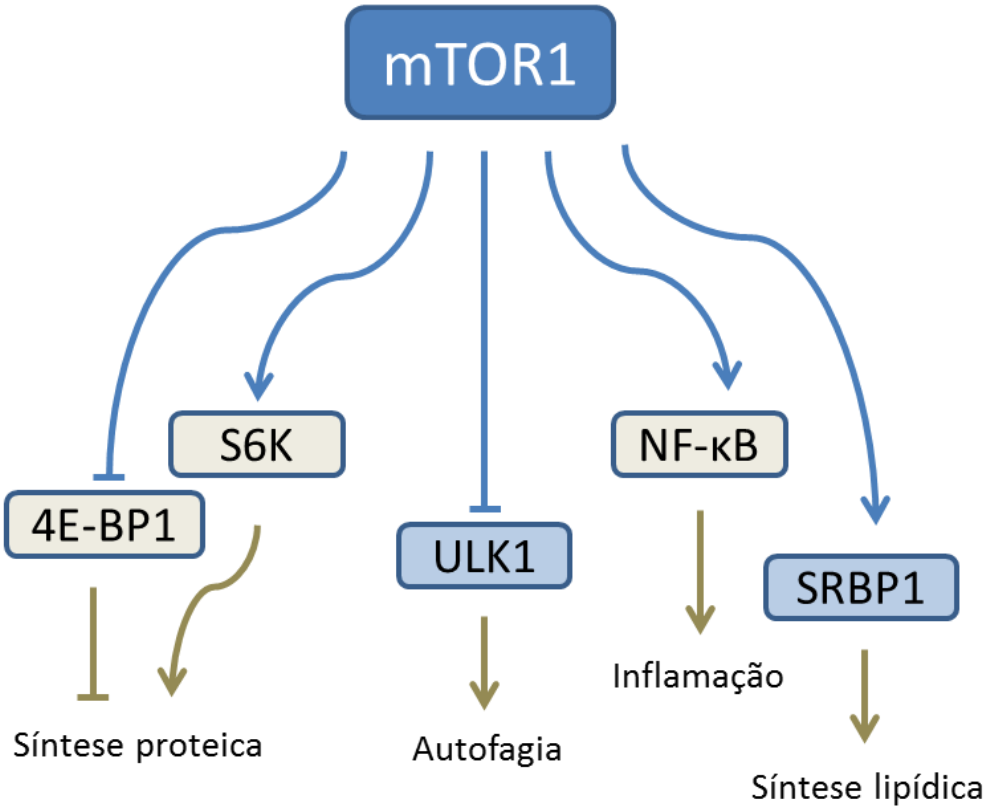

Figura 5. Regulação de diferentes processos pela mTOR. Adaptado de Johnson (2013).

A leucina, além de atuar na via de sinalização de síntese proteica, também atua inibindo a degradação proteica e atrofia muscular, a partir das vias proteolíticas. Dentre elas, destaca-

se a via proteolítica da ubiquitina-proteassoma. O proteassoma 26S é um complexo multiproteico que consiste no centro proteolítico 20S e dois “anéis” o 19S, os quais regulam a ligação e a degradação das proteínas ubiquitinadas (JACKMAN et al., 2004). A degradação da maioria das proteínas miofibrilares, decorrente da atrofia, ocorre no proteassoma, enquanto o processo de ubiquitinação, ou seja, a regulação transcricional das ubiquitinas ligases, ocorre via FoxO, fator de transcrição envolvido na atrofia muscular (LÉGER et al., 2006) (Figura 6).

Na sua forma hipofosforilada, a FoxO transloca para o núcleo e aumenta a expressão de genes da atrofia, como as proteínas ubiquitinas ligases atrogin-1 e a RING-finger protein 1 (MuRF1) (BODINE et al., 2001a; GLASS, 2003). As proteínas MuRFs (-1, -2, -3) interagem com o domínio quinase da titina, proteína que mantém o alinhamento do sarcômero, em um músculo ativo e, assim, mantém-se fortemente ligada à titina. Porém, quando a ligação é quebrada, tal como pela inatividade, a MuRF é liberada e lançada para o núcleo, aumentando a expressão de genes da degradação proteica (BAAR, 2006).

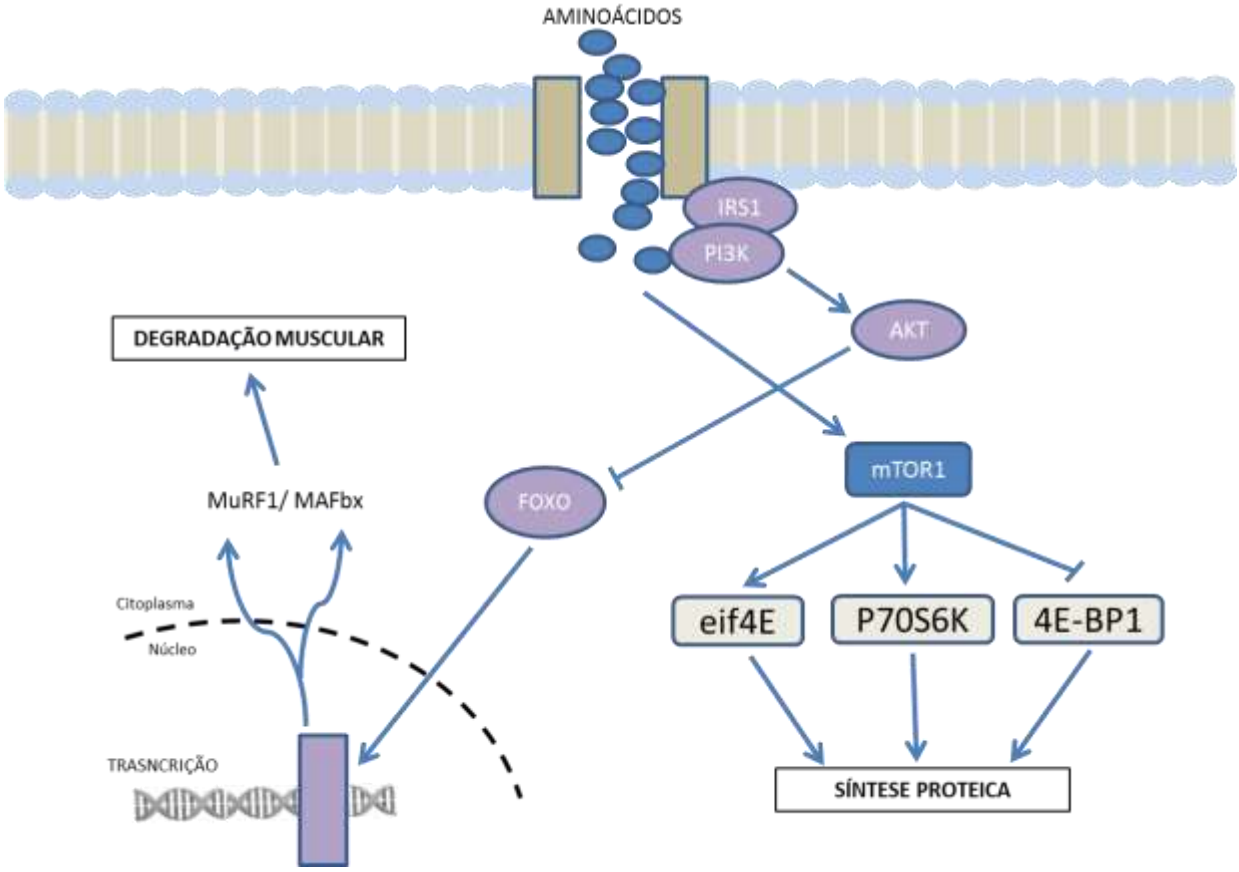

Figura 6. Vias de sinalização de síntese e degradação muscular. Adaptado de Carbone et al. (2012).

O desuso do músculo esquelético pode ser definido pela falta de movimento e/ou de sobrecarga de um membro específico, podendo provocar um *turnover* proteico negativo, não apenas pelo aumento da degradação, mas também pela diminuição da síntese proteica muscular (PHILLIPS et al., 2009). Em humanos, os modelos mais utilizados para simular o desuso são a falta de gravidade, a suspensão, o repouso e a imobilização.

Glover et al. (2010) observaram aumento nas proteínas ubiquitinas-conjugadas, após 2 dias de imobilização. Boer et al. (2007) observaram elevação na expressão gênica da MURF-1 e da Atrogin-1 após 10 dias de suspensão unilateral do membro inferior.

Estudo verificou que a suplementação de leucina em longo prazo suprime a taxa de degradação de proteínas miofibrilares e diminui a perda de peso muscular em ratos alimentados com dieta deficiente em proteínas durante 7 dias (SUGAWARA et al., 2007). Combaret et al., (2005) verificaram que a suplementação com leucina reduziu a degradação proteica pela inibição da via proteolítica da ubiquitina-proteassoma em ratos.

Mais especificamente em ratos imobilizados, foi observado que a suplementação com leucina atenuou a perda de massa muscular, pela redução da degradação proteica decorrente da inibição da via proteolítica da ubiquitina-proteassoma (BAPTISTA et al., 2010).

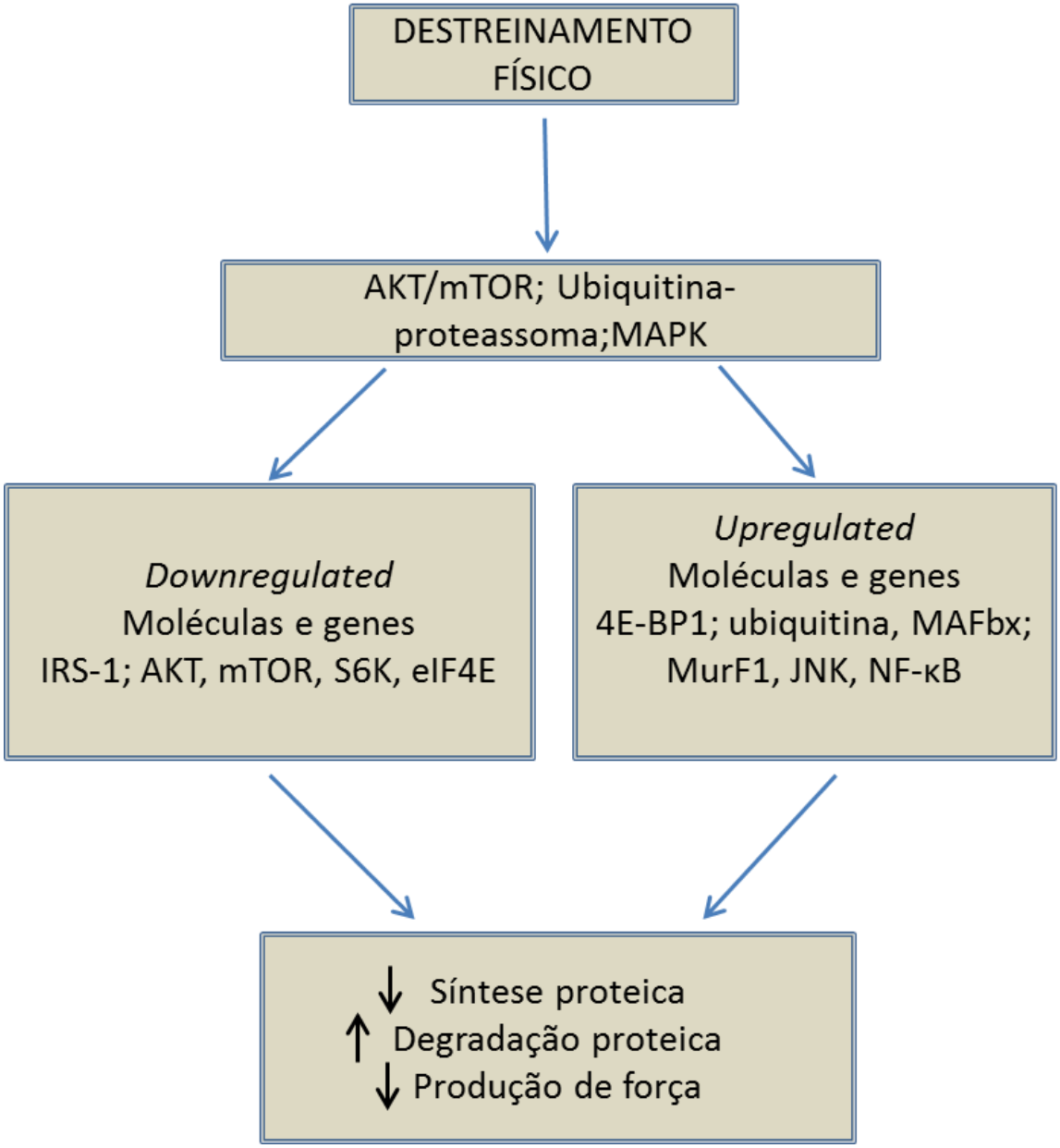

Figura 7. Diagrama resumindo as vias de sinalização intracelular durante desuso muscular. Adaptado de Bajotto & Shimomura (2006).

Vale ressaltar que grande parte dos estudos é realizada utilizando a suplementação de forma aguda. No entanto, a suplementação de forma crônica, em condições de catabolismo proteico, pode ser observada no estudo de Mourier et al., (1997), que verificaram que a suplementação crônica de leucina em lutadores submetidos à RC durante 19 dias, resultou em diminuição da massa corporal e do percentual de tecido adiposo dos indivíduos.

Além disso, estudos que avaliaram a suplementação crônica de leucina em situações de catabolismo, como no caso do presente estudo, com DF e RC, são poucos e conflitantes.

2 JUSTIFICATIVA

O DF está relacionado a modificações metabólicas, como o ganho de massa corporal, aumento da resistência à insulina (YASARI et al., 2007; YASARI et al., 2006; KUMP & BOOTH,2005; PETIBOIS et al., 2004) e perda de massa magra corporal (BOOTH, 1982; BOOTH, 1983). Nesse sentido, estratégias nutricionais, como RC, têm sido indicadas com a finalidade de reverter os efeitos desencadeados pela inatividade física, como, por exemplo, aumento da massa e da gordura corporal.

Em contrapartida, a RC, associada à inatividade física, potencializa o metabolismo proteico, acelerando o catabolismo de massa muscular (BIOLO, 2007) e, portanto, reduzindo a massa magra corporal.

Dessa forma, para atenuar essa perda de massa magra, observada nessas situações, a utilização de suplementos proteicos, em especial, os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), poderia favorecer a manutenção do estado proteico nutricional e/ou levar a balanço proteico positivo no músculo esquelético, pela ativação da via de síntese proteica e pela redução da degradação proteica muscular (ANTHONY et al., 2002).

Assim, aventa-se a hipótese de que a suplementação com ACR, em especial a leucina, ativa uma cascata de fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica, aumentando a síntese proteica muscular, e inibe a via de degradação proteica muscular, reduzindo a perda de massa magra observada nos animais destreinados submetidos à RC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da suplementação crônica de leucina sobre as vias de sinalização da síntese e degradação proteica no músculo esquelético de ratos destreinados, submetidos à RC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o consumo e massa corporal dos animais durante todo o experimento;
- ✓ Avaliar a composição corporal dos animais;
- ✓ Avaliar as concentrações séricas de citocinas;
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica;
- ✓ Avaliar a expressão e fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica no músculo esquelético;
- ✓ Avaliar a expressão e fosforilação de proteínas miofibrilares do músculo esquelético;
- ✓ Avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas na via de síntese proteica;
- ✓ Avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas na via de degradação proteica;
- ✓ Avaliar a expressão gênica de transportadores de aminoácidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

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 (FCF/IQ/USP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado a 22 ± 2 ºC, com umidade relativa do ar de 55 ± 10%, com 15 a 20 trocas de ar por hora, e com ciclo biológico invertido de 12h claro/12h escuro. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA/FCF/311).

4.2 Desenho Experimental

Inicialmente, os animais foram distribuídos em 2 grupos: Controle (CON) (n = 16) representados pelos animais sedentários, e Treinamento (TREIN) (n = 48) que foram submetidos ao TF em esteira ergométrica durante oito semanas. Para a determinação do *baseline*, 8 animais de cada grupo foram eutanasiados após esta etapa do experimento. Todos os animais tiveram livre acesso à ração AIN-93M e água neste período. Em seguida, os demais animais do grupo treinamento foram redistribuídos em 5 grupos com a média da massa corporal média estatisticamente semelhante: Grupo Treinamento (TREIN) (n = 8), que continuaram seguindo o protocolo de TF em esteira ergométrica por mais 6 semanas; Grupo Destreinamento (DT) (n = 8) constituídos por animais que cessaram o protocolo de treino; Grupo Destreinamento + Suplementação com Leucina (DT + LEU) (n =8), animais que cessaram o TF e receberam ração suplementada com Leucina; Grupo Destreinamento + RC 30% (DTRC) (n = 8), animais que cessaram o TF e foram submetidos a RC de 30%; Grupo Destreinamento + Restrição Calórica 30% + Suplementação de Leucina (DTRC + LEU) (n = 8), animais que cessaram o TF, que receberam ração suplementada com Leucina e foram submetidos a RC de 30%. Todos os grupos tiveram livre acesso à água durante o experimento. E por fim, os animais foram eutanasiados no final da décima quarta semana (Figura 8).

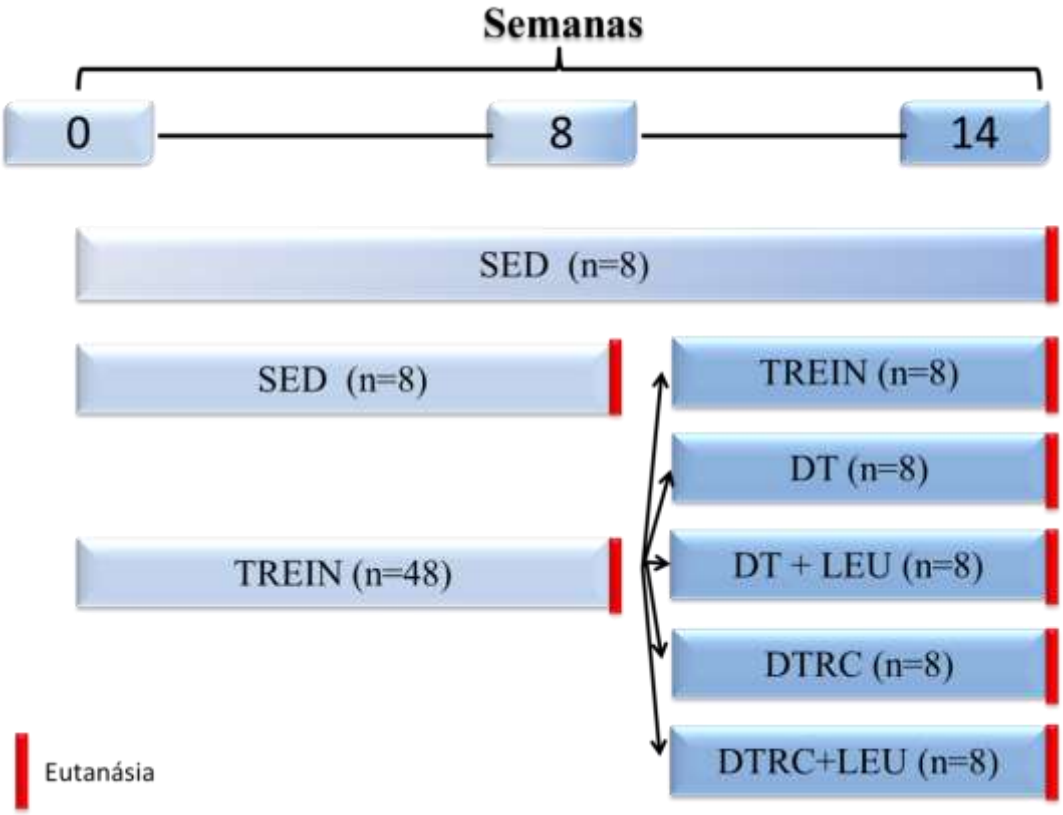

Figura 8 – Desenho experimental

4.3 Ração

No presente estudo foram utilizados 4 tipos diferentes de ração: Controle (CON); Ração suplementada com leucina (CON + LEU); Ração Restrição Calórica (RC); Ração Restrição Calórica com Leucina (RC+LEU) que foram preparadas nas dependências do Biotério de Produção e Experimentação da FCF/IQ/USP e baseadas nas recomendações do *American Institute of Nutrition*, formuladas para manutenção de roedores (AIN-93M) (REEVES et al., 1997).

4.3.1 Ração Controle

Com o intuito de manter o mesmo teor de nitrogênio, quando comparada à ração suplementada com LEU, a ração AIN-93M foi adaptada e houve acréscimo de uma mistura de aminoácidos não essenciais, sendo eles: alanina, ácido aspártico, glicina, prolina e serina.

4.3.2 Ração Suplementada com Leucina

A ração suplementada com leucina também teve sua formulação adaptada da ração AIN-93M, com adição de 4,5 % do aminoácido L-leucina (4,45g/100 g), sendo que esta dose encontra-se dentro do maior nível de ingestão que não resultou qualquer efeito adverso (TSUBUKU et al., 2004). Vale ressaltar que os aminoácidos isoleucina e valina foram adicionados à ração (0,98g/100g e 0,57g/100g, respectivamente), a fim de evitar a redução na concentração plasmática ACR induzida pela suplementação de leucina isolada (BALAGE, 2010). Essa redução ocorre devido à ativação de enzimas relacionadas à oxidação dos outros dois aminoácidos de cadeia ramificada, isoleucina e valina, e, portanto, são metabolizadas no mesmo momento (RIEU, 2003). Além disso, com a suplementação isolada de leucina, é observada uma rápida absorção de LEU, aumentando sua concentração no plasma antes dos outros aminoácidos. Assim, ocorre a ativação da via de sinalização da síntese proteica, porém não há substrato suficiente para ocorrer o aumento da síntese (BALAGE & DARDEVET, 2010). Dessa forma, no presente estudo, 60 g de amido foram substituídos por L-leucina (44,5g) isoleucina (9,8g) e valina (5,7g), para cada quilograma de ração preparada.

4.3.3 Ração Restrição Calórica (RC) e Restrição Calórica suplementada com Leucina (RC + LEU)

A fim de evitar que os animais dos grupos submetidos ao protocolo de RC apresentassem uma ingestão de nutrientes inferior às recomendações do *American Institute of Nutrition*, as rações RC e RC + LEU tiveram seus ingredientes ajustados conforme o experimento de Pugh et al. (1999) (Tabela 1).

Tabela 2. Composição das rações utilizadas no estudo

	CON		RC		CON + LEU		RC + LEU	
INGREDIENTES	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	14,00	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

	CON		RC		CON + LEU		RC + LEU	
	kcal/kg	kcal/100g	kcal/kg	kcal/70g	kcal/kg	kcal/100g	kcal/kg	kcal/70g
Carboidrato	2642,80	264,28	2061,12	144,28	2691,32	269,13	2131,43	149,20
Proteina	567,20	56,72	810,29	56,72	567,20	56,72	810,29	56,72
Lipidio	360,00	36,00	514,29	36,00	360,00	36,00	514,29	36,00
TOTAL	3570,0	357,00	3385,70	237,00	3618,52	361,85	3456,00	241,92

4.4 Protocolo de restrição calórica

Os animais dos grupos RC e RC+LEU 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 pela massa corporal do animal (g ração/ 100g massa corporal). Para tanto, semanalmente os animais foram pesados e foi averiguado o consumo alimentar. A ração foi ofertada diariamente entre os horários 12:00 e 14:00hrs.

4.5 Protocolo de Treinamento Físico

O protocolo de TF utilizado foi corrida em esteira ergométrica programável (Softmove, Implemed, São Paulo, SP), adaptada para treinar 8 ratos simultaneamente, no ciclo escuro, para que os animais realizassem o exercício físico em horário mais adequado ao padrão da espécie.

O TF aeróbio prescrito foi baseado a partir do teste de esforço máximo (TEM), a fim de garantir que o treinamento fosse realizado em 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 DF, e 14 semanas para o grupo TREIN (LEHNEN et al., 2010).

4.6 Teste de esforço máximo

O TEM foi realizado conforme descrito na literatura (RODRIGUES et al., 2007; LEHNEN et al., 2010)**.** Primeiramente, os animais foram submetidos a um período de adaptação na esteira ergométrica em uma velocidade de 0,3km/h durante 15min por 3 dias consecutivos. Após esse período, o teste foi realizado em uma velocidade inicial de 0,3km/h com um aumento de 0,3km/h a cada 3 minutos até a exaustão dos animais. Vale ressaltar que o TEM foi realizado a cada 4 semanas, com intuito de ajustar a carga de TF.

4.7 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Os ratos foram eutanasiados por veno-secção sob anestesia (Ketamina e Xilazina), no período da manhã, entre 9:00 e 12:00hrs. O intervalo entre a última sessão de TF e a eutanásia foi de 48 horas. Os animais foram privados de ração por um período equivalente a 8 horas,

estabelecendo assim um estado metabólico semelhante para todos. Vale ressaltar que durante a eutanásia, houve um rodízio entre os animais dos diferentes grupos para que o tempo médio de jejum fosse semelhante entre todos os grupos. O sangue foi coletado, centrifugado e o soro armazenado em *freezer* (-80°C). O trato gastrointestinal foi totalmente esvaziado e lavado com soro fisiológico. Tecidos musculares gastrocnêmios e sóleos foram retirados, pesados e rapidamente acondicionados em nitrogênio liquido e, posteriormente, armazenados em *freezer* (- 80°C). A carcaça dos animais foi pesada e armazenada para avaliação da composição corporal.

4.8 Parâmetros Analisados

4.8.1 Parâmetros avaliados ao longo do período do treinamento e destreinamento

- ✓ Progressão da massa corporal
- ✓ Consumo de ração

4.8.2 Composição química da carcaça

- ✓ Umidade
- ✓ Lipídeos
- ✓ Proteínas
- ✓ Massa livre de gordura

4.8.3 Parâmetros Teciduais

Peso de músculos e depósitos de tecidos adiposos: subcutâneo, retroperitoneal e epididimal**.**

4.8.4 Parâmetros séricos

- ✓ PAI-1
- ✓ MCP-1
- ✓ Fator de necrose tumoral-alfa (TNF)-α
- ✓ Adiponectina

- ✓ Leptina
- ✓ ITT e OGTT
- ✓ Aminograma

4.8.5 Parâmetros moleculares no tecido muscular

4.8.5.1 Expressão de proteínas totais e fosforiladas

- ✓ p70S6k; phospho-p70S6K (Thr^{389})
- ✓ 4-EBP1; phospho-4EBP1 (Thr^{70})
- ✓ mTOR; phospho-mTOR (ser^{2448})
- ✓ eif4E; phospho eif4E (ser^{209})
- ✓ MyHC7

4.8.5.2 Expressão gênica de proteínas da via de síntese proteica

- ✓ p70S6k
- ✓ 4-EBP1
- ✓ mTOR
- ✓ eif4E

4.8.5.3 Expressão gênica de proteínas da via de degradação proteica

- ✓ MAFbx/Atrogin
- ✓ MURF

4.8.5.4 Expressão gênica de transportadores de leucina

- ✓ LAT 1
- ✓ SNAT 1
- ✓ CD98

4.9 Determinação da composição corporal

A avaliação da composição corporal dos animais foi realizada por meio de análise química da carcaça, para a determinação da umidade, do conteúdo de lipídios e proteína.

4.9.1 Umidade

A determinação da umidade foi realizada pela secagem da carcaça do animal em estufa ventilada durante 7 dias, a aproximadamente 70°C. O valor absoluto (g) da umidade foi determinado pela diferença de peso antes e após a secagem da carcaça do animal. O percentual de umidade foi calculado conforme a fórmula a seguir:

% umidade corporal = umidade absoluta (g) / peso corporal final (g) x 100

4.9.2 Lipídios

O teor lipídio foi determinado pela técnica de extração, utilizando éter etílico, como solvente. A carcaça seca de cada animal foi envolvida em papel filtro, e então colocada no extrator *Soxhlet*. Ao condensar, o éter lava a amostra, extrai o lipídio que se acumula em um balão coletor. A diferença de peso (g) deste balão coletor, antes e após a análise, resulta na quantidade absoluta de gordura presente na carcaça do animal. A porcentagem de gordura corporal foi determinada pela divisão entre a quantidade de gordura da carcaça, pela massa corporal final e multiplicando esse valor por 100, conforme a fórmula a seguir:

% G = gordura absoluta (g) / peso corporal final x 100

4.9.3 Proteína da carcaça

A proteína da carcaça foi determinada pelo método de *Kjeldahl* (CECCHI,1999). Após a análise de determinação de lipídio, o restante da carcaça foi moído, e a partir desse conteúdo homogêneo, foi determinado o teor de nitrogênio de cada amostra.

O percentual de nitrogênio encontrado foi multiplicado pelo valor arbitrário 6,25, para obter o percentual de proteína nas amostras, uma vez que o teor de nitrogênio é aproximadamente 16% do conteúdo proteico total, conforme as fórmulas a seguir:

% N= [(mL HCL amostra – mL HCL branco) x N x FC x 14,007] + MG amostra

- %N: percentual de nitrogênio da amostra
- mL HCL: volume gasto de ácido clorídrico
- N: normalidade do HCL
- FC: fator de correção do ácido
- 14,007: peso equivalente do nitrogênio

% Proteína= %N x 6,25

O valor absoluto de proteína na carcaça foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

Proteína absoluta (g) = [carcaça seca (g) – lipídio total (g)] x % proteína

O percentual de proteína corporal foi calculado a partir da massa de proteína absoluta (g) dividida pelo peso corporal final (g).

% proteína corporal = proteína absoluta (g) + peso corporal final (g)

4.9.4 Massa livre de gordura (MLG)

A massa livre de gordura foi determinada pela diferença da massa corporal total do animal (g) e o valor absoluto de lipídio, conforme as fórmulas apresentadas a seguir:

MLG = massa corporal final (g) – gordura total (g)

%MLG = massa corporal final (g)/ gordura total (g) x 100

4.10 Determinações bioquímicas

4.10.1 Parâmetros séricos

As concentrações de citocinas séricas foram realizadas pelo método imunoensaio multiplex, utilizando o kit rat serum adipokine panel 7 LINCOplex, para dosagem simultânea de TNF-α, PAI-1, MCP-1 e leptina, e o kit Rat Adiponectin Silgle-plex, para a dosagem de adiponectina. As determinações foram realizadas em equipamento automático Lincoplex 200, nas dependências do Instituto Gênese de Análises Científicas, da empresa Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda (São Paulo, SP).

4.10.2 Teste oral de tolerância à glicose

No inicio do experimento, 7 e 13 semanas após o inicio da intervenção, o teste oral de tolerância à glicose foi realizado em todos os grupos. Após 8 horas de jejum, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), que na sequência recebeu, via gavagem, uma solução de glicose 50% na concentração de 150µL de glicose por 100g de peso corporal. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. A dosagem glicêmica foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®).

4.10.3 Teste de tolerância à insulina

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-Chek Performa, Roche) em amostras de sangue retiradas da veia caudal nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 min após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30min foram utilizados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (K_{ITT}), mediante análise da curva de decaimento de acordo com o método proposto por Bonora et al. (1989). Este teste foi realizado no início, sétima e décima terceira semana.

4.10.4 Aminograma

O aminograma das rações e do soro dos animais foi realizado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Este consiste em um método de separação físico-químico, no qual os constituintes da amostra são separados entre duas fases (líquidas), sendo uma estacionária e uma móvel. Este ensaio foi realizado pela empresa CBO – Análises Laboratoriais (Campinas - SP).

4.11 Parâmetros biomoleculares

4.11.1. Western Blotting

Foi realizada a expressão das proteínas mTOR; phospho-mTOR, eif4E; phospho eif4E, P70S6K1, phospho-p70S6K, 4-EBP1, phospho-4EBP1e proteínas miofibrilares no tecido muscular esquelético (sóleo).

4.11.1. 1 Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado conforme protocolo de Sambrook et al (1989) e Harlow & Lane (1988), descrito a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 7,5 a 15% de poliacrilamida, 380 mM Tris. HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

4.11.1.2 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e “Western blotting”

Alíquotas de homogenados foram fervidas a 100 ºC por 3 minutos em tampão de amostra contendo 125 mM Tris, pH 6.8, 25% glicerol, 2.5% SDS, 2.5% beta-mercaptoetanol e 0.002% bromofenol blue. O sobrenadante foi combinado com o tampão acima descrito. Amostras contendo aproximadamente 10 μg por “poço” foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida por 60 minutos a 150 V.

4.11.1.3 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foram incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS , 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e, então, também incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas de 3 mm (Whatman) e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 50 V, por 30-90 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5-10 min, com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com água destilada ou TBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCI 0,9 %).

4.11.1.4 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 5 %, em tampão TBS, por 0,5-14 h, sob agitação. 0 anticorpo específico foi diluído [1:1500 para p70S6K; 1: 500 para phospho-p70S6K(Thr^{389}); 1:500 para 4-EBP1, 1:500 para phospho-4EBP1(Thr^{70}) em PBST, com 0,05% Tween 20 (PBST), e utilizado para a incubação com as membranas, por 2 -14 h, com agitação, à temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com PBST. As proteínas foram marcadas com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em TBST, por 2 h, com agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação.

4.11.1.5 Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do kit ECL (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio) e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. Os blots foram visualizados por um sistema de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE) e analisados por um software ImageQuant TL (GE Healthcare) e posteriormente quantificado pelo *software* Quantity One (Bio-Rad).

4.11.2 Expressão gênica de proteínas relacionadas a síntese e degradação proteica e de transportadores de leucina

A expressão gênica das proteínas envolvidas na via de sinalização de síntese e degradação proteíca do tecido muscular, mais especificamente o músculo sóleo, foi realizada pela técnica de RT-PCR, conforme descrito a seguir.

Após a coleta do músculo sóleo, ele foi imerso em uma solução de RNA *later*, para estabilização do RNA no músculo, e posteriormente armazenado no freezer -80ºC.

Para extração do RNA, amostras de músculos foram homogeneizadas com politron (Kinematica AG, Littau- Lucerne, Switzerland) e isolados utilizando-se o reagente trizol (Invitrogen, Carlsbad, California), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram dissolvidas em água DEPC 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.

A transcrição reversa do RNA total para cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa Super-script IITM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carllsbad, CA, USA).

Os primers que foram utilizados nas reações de qRT-PCR foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas em duplicata, em placas específicas de 96 poços no equipamento StepOne System, usando o sistema para detecção de produtos de amplificação “TaqManR Gene Expression Master Mix” (Applied Biosystems, USA).

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: iniciada a 50ºC durante 2 minutos, seguida de 95ºC durante 10 minutos e a amplificação foi realizada por 40 ciclos de 15 segundos a 95ºC (desnaturação) e 1 minuto a 60ºC (hibridização e extensão).

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 da β-actina, considerado o controle endógeno.

Os valores obtidos de Ct foram utilizados para determinar a expressão relativa de mRNA de cada gene em relação ao controle endógeno, a partir da reação Delta Ct (ΔCt).

$$\Delta Ct = (Ct\ gene\ alvo - Ct\ controle\ endógeno)$$

Quanto menor for o número inicial do Ct obtido do gene-alvo existente na amostra, comparativamente com outro gene, houve maior amplificação do gene-alvo, apresentando uma maior expressão gênica.

Identificação	**Gene**
Rn00693900_m1	mTOR
Rn00579546_m1	P70s6k1
Rn00587824_m1	4Ebp1
Rn00821567_g1	Eif4e
Rn00590197_m1	MURF1
Rn00591730_m1	Atrogin 1/MAFBx
Rn00569313_m1	LAT 1 (Slc7a5)
Rn00710421_m1	SNAT 2 (Slc38a2)
Rn01759899_g1	CD98 (Slc3a2)
Rn00667869_m1	Actb

Quadro 2. Identificação dos genes para reação de q-RT-PCR disponibilizados pela Apllied Biosystems.

4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SPSS versão 17.0. Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão. Inicialmente, foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*, para avaliar a normalidade dos dados. Nas variáveis nas quais a normalidade não foi confirmada, procedimentos não paramétricos foram utilizados, ou os dados foram transformados logaritmicamente. As comparações entre os grupos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, para identificação dos contrastes significantes. Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Durante todo o experimento, foram realizados 5 testes de esforço máximo, para adequar ao protocolo de treino e para a distribuição dos animais nos grupos após oito semanas de TF. Durante a redistribuição dos animais, para iniciar o DF na oitava semana, observou-se diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo SED em relação aos demais grupos. Após o DF, na semana 13, observou-se diferença estatisticamente significativa do grupo TREIN em relação aos demais grupos. Assim, pode-se concluir que o TF foi efetivo e que diferiu dos grupos que cessaram o treinamento (gráfico 1).

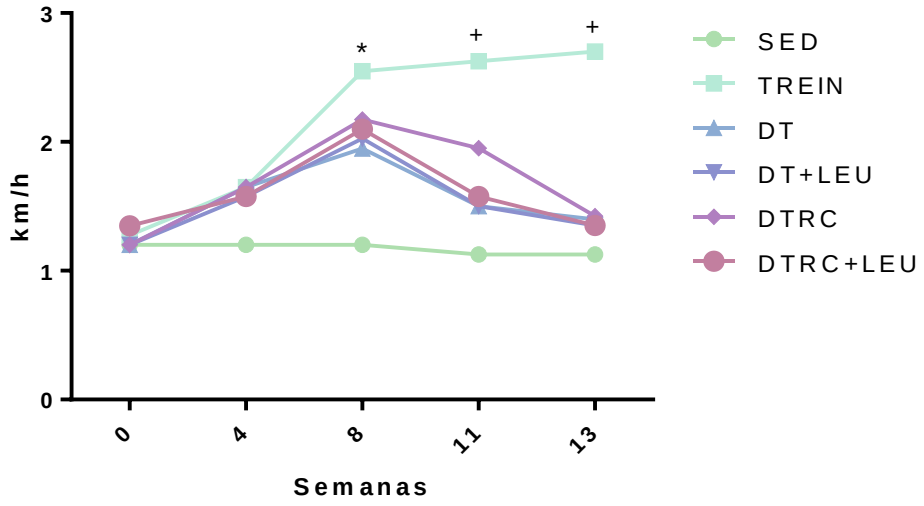

Gráfico 1. Teste de esforço máximo dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
* SED x TREIN; SED x DT; SED x DT+LEU; SED x DTRC; SED x DTRC+LEU, $p<0,05$
+ TREIN x SED; TREIN x DT; TREIN x DT+LEU; TREIN x DTRC; TREIN x DTRC+LEU, $p<0,05$

Os gráficos 2 e 3 apresentam a massa corporal inicial e final dos grupos experimentais, respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando avaliada a massa corporal inicial. Quando analisada a massa corporal final, após o período de DF, foi observado que os grupos DTRC e DTRC+LEU tiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos DT e DT + LEU. Os grupos DTRC e DTRC+LEU tiveram sua massa corporal final reduzida em comparação aos valores do grupo DT.

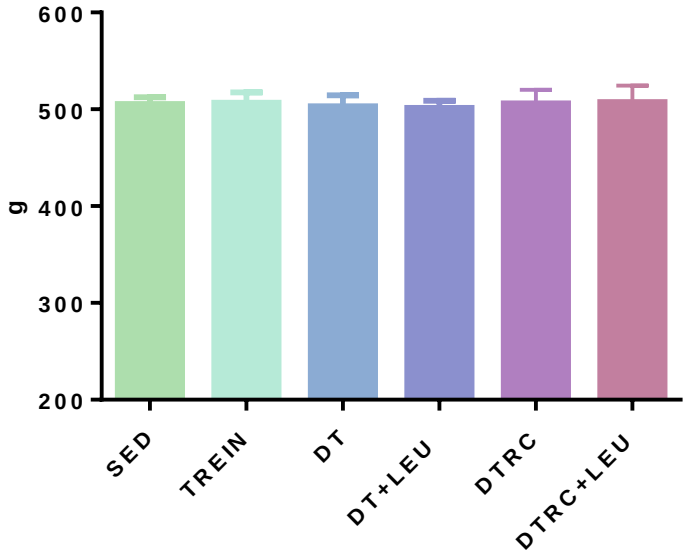

Gráfico 2. Massa corporal inicial (g) dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

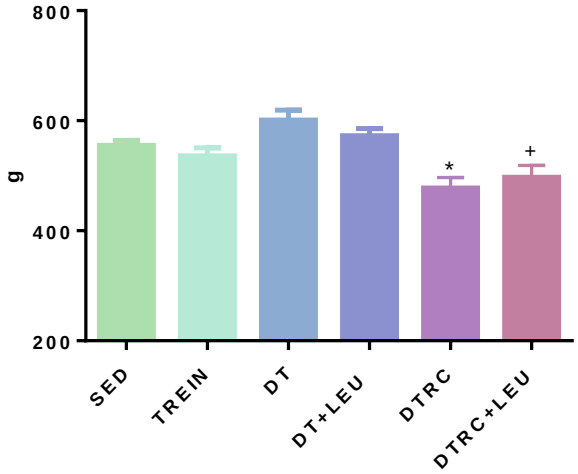

Gráfico 3. Massa corporal final (g) dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
* DTRC x SED; DTRC x DT; DTRC x DT+LEU, $p<0,05$
+ DTRC+LEU x DT; DTRC x DT+LEU, $p< 0,05$

O gráfico 4 apresenta a variação percentual de massa corporal, referente à massa corporal inicial da 1ª semana e a massa corporal final da 14ª semana de experimento. Pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos DT e DT+LEU, em relação aos grupos DTRC; DTRC+LEU. Observou-se maior ganho de peso dos grupos submetidos ao DF em relação aos grupos destreinados submetidos à RC. O grupo TREIN não foi diferente

estatisticamente do grupo SED, mas diferiu dos demais grupos, enquanto os grupos DT e DT+LEU tiveram diferença estatisticamente significante quando comparados aos grupos DTRC e DTRC+LEU.

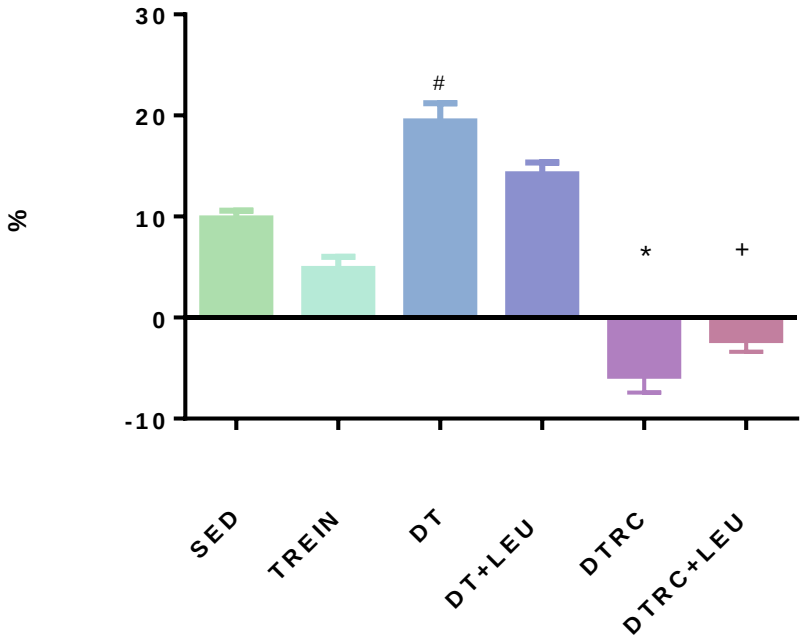

Gráfico 4. Variação da massa corporal (%)
Dados expressos em média ± desvio padrão.
[#] DT x SED; DT x TREIN, p<0,05
[*] DTRC x SED; DTRC x TREIN; DTRC x DT; DTRC x DT+LEU, p< 0,05
[+] DTRC+LEU x SED; DTRC +LEU x TREIN; DTRC +LEU x DT; DTRC + LEU x DT+LEU, p<0,05

O consumo de ração está apresentado no gráfico 5. Pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos DTRC e DTRC+LEU, em relação aos demais grupos. Dessa forma, pode-se concluir a efetividade da RC de 30%, em relação ao grupo DT.

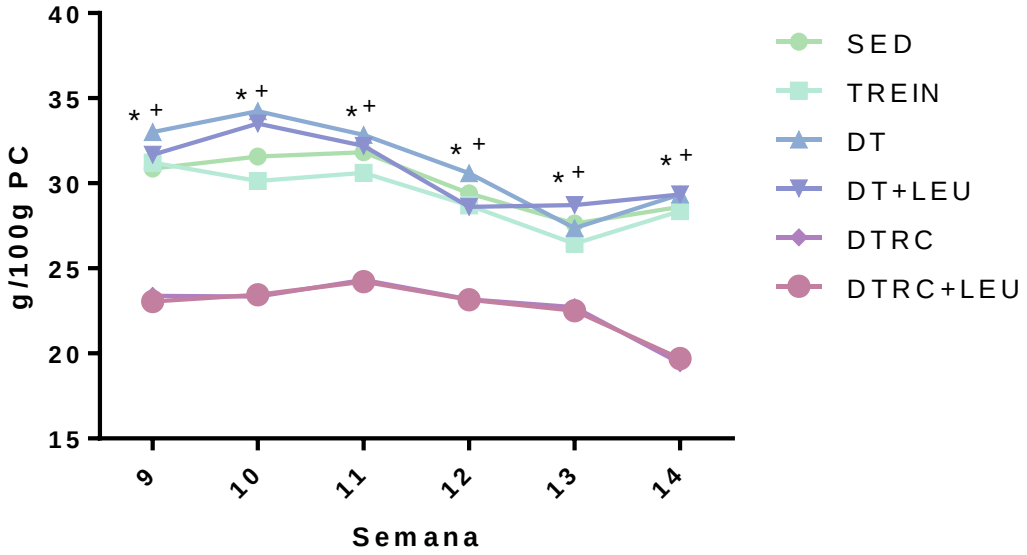

Gráfico 5. Consumo de ração semanal durante a 9ª e 14ª semana.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
* DTRC x SED; DTRC x TREIN; DTRC x DT; DTRC x DT + LEU, p<0,05
+ DTRC + LEU x SED; DTRC + LEU x TREIN; DTRC + LEU x DT, p<0,05

Em relação à quantidade média de leucina consumida pelos animais suplementados (DT+LEU e DTRC+LEU), a quantidade foi de 2g de leucina/kg/peso corporal/dia. Estudo de Crozier et al. (2004) apontou que pequena dose de leucina 0,060-1,35g/kg/peso corporal/dia foi suficiente para se verificar aumento da síntese proteica muscular, mostrando, assim, que a quantidade utilizada no presente estudo foi adequada para se observar estímulo na síntese proteica muscular dos animais. Além disso, este valor encontra-se dentro das quantidades recomendadas e não ultrapassa o limite superior de 5%, no qual pode ser observado efeito adverso (TSUBUKU et al., 2004).

Para confirmação das concentrações de leucina, tanto nos animais quanto na ração ofertada, foi realizada a análise de aminograma. A tabela 2 apresenta a análise da concentração de aminoácidos no soro dos animais dos grupos experimentais. Foi observada maior concentração do aminoácido leucina no sangue dos animais dos grupos que foram suplementados em relação aos demais, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2. Concentração de aminoácidos no sangue dos animais

AMINOÁCIDOS	SED	TREIN	DT	LEU	DTRC	DTRC+LEU
Asparagina (mg/kg)	7,4	8,0	8,0	7,4	7,8	9,5
Glutamina (mg/kg)	82,5	97,1	95,2	97,9	94,9	110,6
Alanina (mg/kg)	46,6	39,2	43,0	41,2	50,3	52,1
Arginina (mg/kg)	28,5	25,9	20,3	27,5	22,1	29,1
Ác. Aspartico (mg/kg)	5,8	4,1	4,0	3,7	4,7	5,5
Glicina (mg/kg)	26,2	33,9	30,4	24,7	36,8	30,3
Isoleucina (mg/kg)	9,1	9,6	9,2	9,9	8,9	8,9
Leucina (mg/kg)	17,0	15,4	15,8	17,5	16,2	19,5
Ác. Glutâmico (mg/kg)	36,6	32,1	28,1	22,5	24,2	24,6
Lisina (mg/kg)	60,7	61,4	63,4	70,6	63,1	69,1
Cistina (mg/kg)	9,9	16,5	14,2	14,3	11,5	12,4
Metionina (mg/kg)	7,7	7,7	7,6	7,9	8,2	8,7
Fenilalanina (mg/kg)	11,6	10,7	10,6	10,8	10,7	11,3
Tirosina (mg/kg)	11,5	11,0	9,7	10,1	11,0	10,6
Treonina (mg/kg)	25,4	25,5	22,0	22,9	23,5	22,1
Prolina (mg/kg)	17,2	16,9	16,7	17,2	25,8	24,1
Valina (mg/kg)	17,5	16,51	15,74	17,34	15,65	15,31
Histidina (mg/kg)	7,7	7,7	6,8	7,0	8,4	8,2
Serina (mg/kg)	26,8	29,5	27,0	23,0	35,0	28,7
Taurina (mg/kg)	35,5	39,4	39,2	41,0	42,5	46,5

Dados expressos como média dos animais dos grupos experimentais.

Na Tabela 3, estão apresentadas as concentrações séricas dos aminoácidos de cadeia ramificada e a sua somatória.

Tabela 3. Concentração sérica dos aminoácidos de cadeia ramificada dos grupos experimentais

ACR	SED	TREIN	DT	LEU	DTRC	DTRC+LEU
Leucina (mg/kg)	17,0	15,4	15,8	17,5	16,2	19,5
Valina (mg/kg)	17,5	16,51	15,74	17,34	15,65	15,31
Isoleucina (mg/kg)	9,1	9,6	9,2	9,9	8,9	8,9
Somatória dos ACR	43,5	41,5	40,7	44,8	40,7	43,7

Dados expressos como média dos animais dos grupos experimentais.

Além do aminograma realizado no sangue dos animais, foi realizado o aminograma das rações que foram ofertadas aos animais durante a 9ª e a 14ª semanas, conforme a tabela 4.

Tabela 4. Concentração de aminoácidos das rações ofertadas aos animais

Ração	Valina (%)	Isoleucina (%)	Leucina (%)
CON	0,72	0,53	1,11
LEU	0,75	0,59	1,25
RC	1,02	0,75	1,56
RC+LEU	2,14	2,42	8,76

Após a eutanásia dos animais, foram retirados e pesados os coxins adiposos, tecido muscular e fígado, conforme resultados apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Peso dos coxins adiposos, do tecido muscular e do fígado dos animais dos grupos experimentais.

	SED	TREIN	DT	DT+LEU	DTRC	DTRC+LEU
Peso final (g)	555,2 ± 25,88	536,2 ± 37,81	601,3 ± 51,19	572,8 ± 37,05	477,9 ± 53,01	497,4 ±59,81
EPI (g)	10,6 ± 4,36*	6,7 ± 3,76	9,9 ± 2,49+	7,8 ± 1,61#	3,4 ± 1,58	3,3 ± 1,96
SUB (g)	13,2 ± 1,98*	7,2 ± 2,34&	14,1 ± 4,02+	11,0 ± 2,22#	4,8 ± 1,43	4,6 ± 1,09
RET (g)	7,9 ± 2,61*	4,5 ± 2,33	7,3 ± 2,86+	6,3 ± 2,51#	1,7 ± 1,52	1,7 ± 1,39
GASTRO D (g)	2,9 ± 0,18	3,1 ± 0,31	3,3 ± 0,19%	3,2 ± 0,09	2,9 ± 0,37	3,0 ± 0,39
GASTRO E (g)	3,0 ± 0,14	2,9 ± 0,43	3,3 ± 0,32	3,1 ± 0,45	2,9 ± 0,39	3,1 ± 0,35
FÍGADO (g)	13,8 ± 1,69	13,3 ± 2,19	14,6 ± 2,17	13,8 ± 1,37	12,8 ± 1,37	13,5 ± 1,73

Dados expressos como média ± desvio padrão. Os coxins adiposos pesados foram o epididimal (EPI); o subcutâneo (SUB); e o retroperitoneal (RET). O músculo pesado foi o gastrocnêmio (GASTRO).
* SED x DTRC; SED x DTRC+LEU, $p<0,05$
+ DT x DTRC; DT x DTRC+LEU, $p<0,05$
# DT+LEU x DTRC; DT+LEU x DTRC+LEU, $p<0,05$
& TREIN x SED; TREIN x DT, $p<0,05$
% DT x DTRC, $p<0,05$

Foi observada diferença estatisticamente significativa, quando avaliados os coxins adiposos epididimal, subcutâneo e retroperitoneal entre os grupos SED, DT e DT+LEU em relação aos grupos submetidos a restrições calóricas (DTRC e DTRC + LEU). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo TREIN em relação aos grupos SED e DT, quando avaliado o tecido adiposo subcutâneo. Assim, observou-se aumento dos tecidos adiposos nos grupos que foram submetidos ao DF, em comparação aos que foram submetidos à RC. Além disso, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o DT e o DTRC, quando avaliado o músculo gastrocnêmio direito. O gastrocnêmio esquerdo e o fígado não tiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

Em relação às composições corporais dos animais, foram apresentados os resultados de umidade, gordura, massa livre de gordura e proteína da carcaça, de forma absoluta e relativa, conforme os gráficos a seguir. Não foi observada diferença estatisticamente significante quando foram avaliadas a umidade absoluta e a relativa entre os grupos experimentais no período pós-destreinamento (Gráficos 6 e 7).

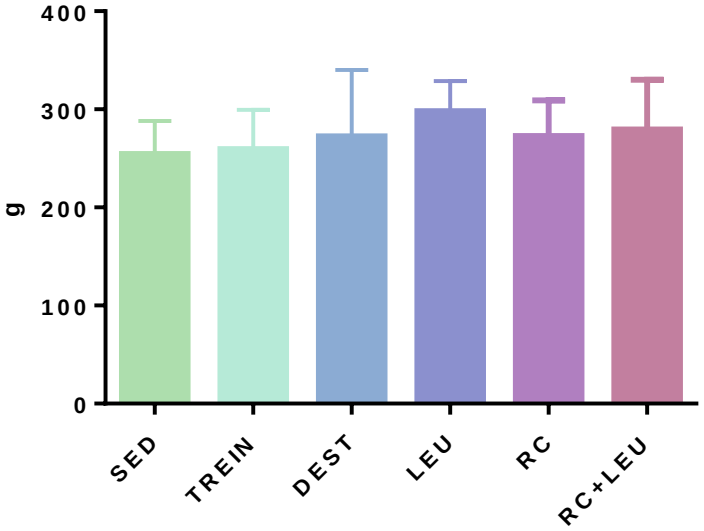

Gráfico 6. Peso (g) da umidade dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

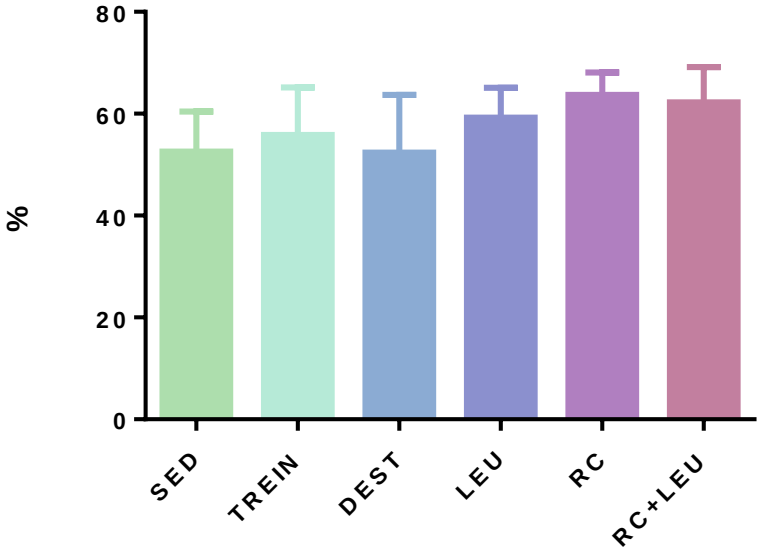

Gráfico 7. Percentual de umidade dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

Em relação ao percentual de gordura corporal e gordura absoluta, observou-se quantidade mais elevada nos grupos DEST e LEU, em relação aos grupos DTRC e DTRC+LEU (Gráficos 8 e 9).

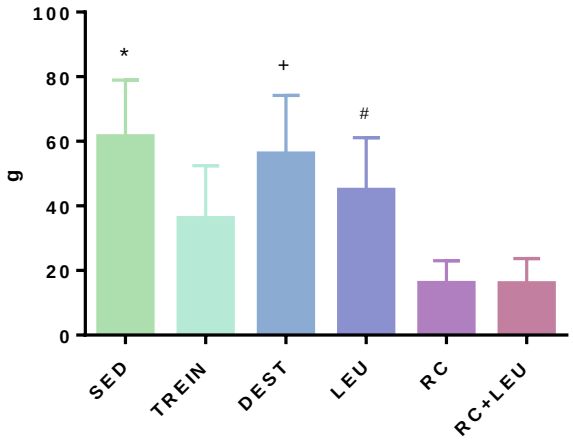

Gráfico 8. Peso gordura corporal (g) dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
*SED x TREIN; SED x DTRC; SED x DTRC+LEU, p<0,05
+DT x DTRC; DT x DTRC+LEU, p<0,05
#DT+LEU x DTRC; DT+LEU x DTRC+LEU, p<0,05

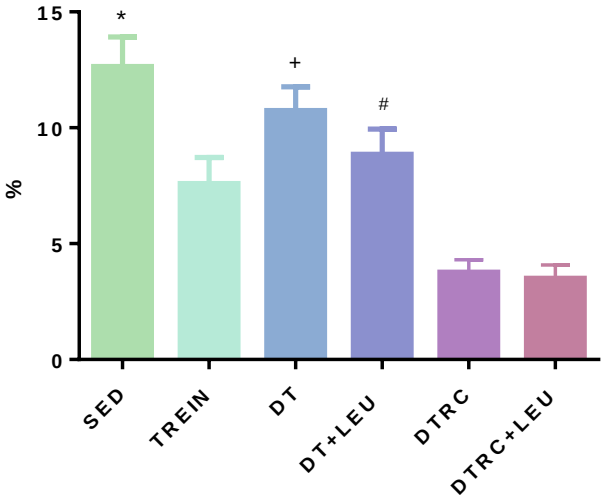

Gráfico 9. Percentual da gordura corporal dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
*SED x TREIN; SED x DTRC; SED x DTRC+LEU, p<0,05
+DT x DTRC; DT x DTRC+LEU, p<0,05
#DT+LEU x DTRC; DT+LEU x DTRC+LEU, p<0,05

Em relação à massa livre de gordura, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os animais dos grupos restrições (DTRC e DTRC+LEU) e os demais grupos. Observou-se aumento da massa livre de gordura nos animais submetidos à RC (Gráficos 10 e 11).

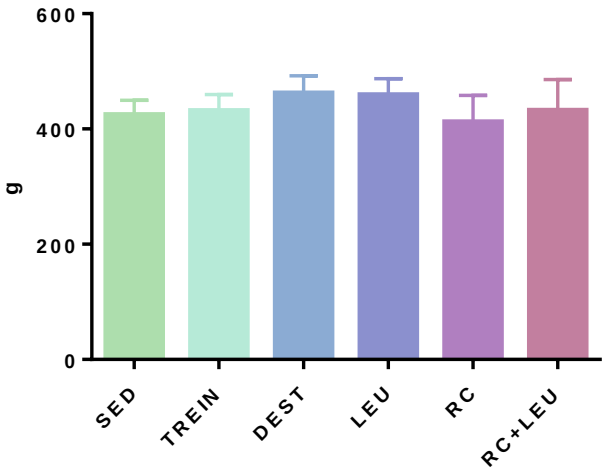

Gráfico 10. Peso MLG (g) dos animais dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

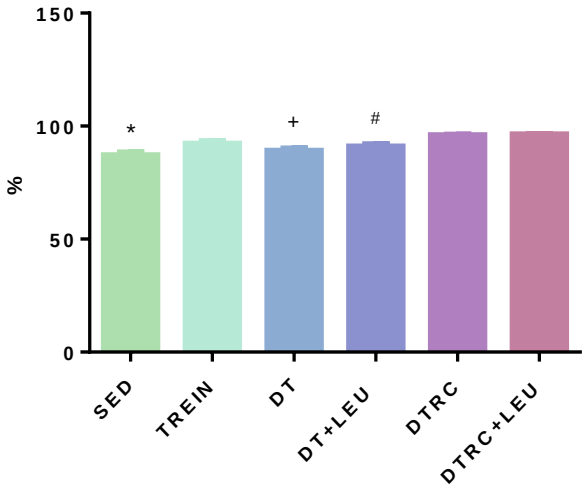

Gráfico 11. Percentual da massa livre de gordura dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
*SED x TREIN; SED x DTRC; SED x DTRC+LEU, p<0,05
+DT x DTRC; DT x DTRC+LEU, p<0,05
#DT+LEU x DTRC; DT+LEU x DTRC+LEU, p<0,05

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando avaliada a proteína da carcaça, de forma absoluta e relativa, conforme observado nos gráficos 13 e 14, respectivamente.

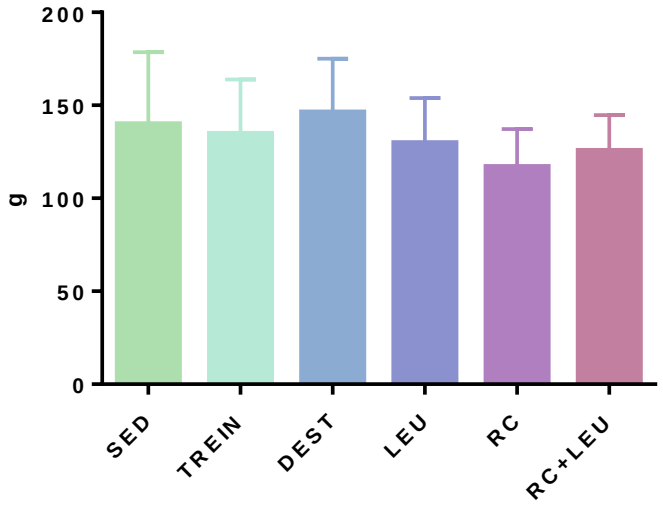

Gráfico 12. Peso da proteína da carcaça (g) dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em média ± desvio padrão.

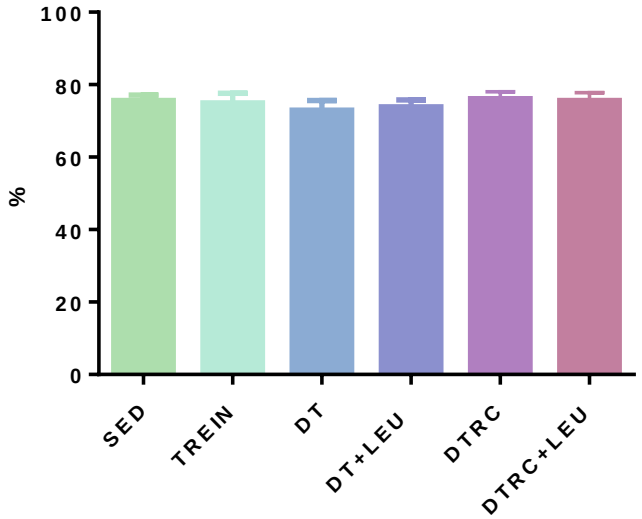

Gráfico 13. Percentual da proteína da carcaça dos animais dos grupos experimentais. Dados expressos em média ± desvio padrão.

A tabela 6 apresenta os valores do teste de tolerância à glicose (OGTT) e do teste de tolerância à insulina (ITT) nas semanas 9 e 13. No OGTT, houve diferença estatisticamente significante na 13ª semana, entre os grupos DTRC e DTRC+LEU, quando comparados aos grupos SED e DT. Para o teste ITT, não foi observada diferença entre os grupos nas duas semanas de teste.

Tabela 6. Área sob a curva (ASC) e constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (kITT) dos grupos experimentais

	OGTT		ITT	
	Semana 9	**Semana 13**	**Semana 9**	**Semana 13**
SED	3.619 ± 1.093	5.282 ± 2.012	2,081 ± 0,83	1,555 ± 0,7669
TREIN	3.686 ± 1.055	3.533 ± 1.466	1,826 ± 0,44	1,587 ± 0,2510
DT	3.593 ± 1.575	5.672 ± 1.909	1,677 ± 0,31	1,955 ± 0,5281
DT+LEU	3.682 ± 889,9	4.586 ± 830,3	1,783 ± 0,36	2,029 ± 0,6671
DTRC	3.686 ± 1.301	2.963 ± 1.261*	1,536 ± 0,3918	2,108 ± 0,6291
DTRC+LEU	3.736 ± 962,8	2.762 ± 1.421^{+}	1,969 ± 0,2685	2,087 ± 0,2734

Dados expressos como média ± desvio padrão.
* DTRC x SED; DTRC x DT, $p<0,05$
$^{+}$ DTRC + LEU x SED; DTRC + LEU x DT, $p<0,05$

A tabela 7 apresenta as concentrações séricas de adiponectina, TNF-α, PAI-1, Leptina e MCP-1 nos grupos experimentais. Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas na leptina, entre o grupo DT e os grupos submetidos à RC (DTRC e DTRC+LEU).

Tabela 7. Concentrações séricas de adiponectina, TNF-α, PAI-1, Leptina, MCP-1

	SED	TREIN	DT	DT+LEU	DTRC	DTRC+LEU
Adiponectina (pg/mL)	30965 ± 72	21378 ± 52	20338 ± 43	19610 ± 41	24103 ± 91	25048 ± 81
TNF-α (pg/ml)	24,85 ± 11,45	24,95 ± 12,31	25,24± 9,43	29,30± 6,43	29,46±6,84	25,59 ± 9,45
PAI-1 (pg/mL)	281,4 ± 152,2	224,3 ± 66,83	205,7 ± 97,13	190,9 ± 62,15	180,3 ± 46,82	144,2 ± 85,63
Leptina (pg/ml)	3,595 ± 2,83	2,392 ± 1,347	4,750 ± 3,03	3,113 ± 1,78	0,7637 ± 0,52*	1,021 ± 0,47+
MCP-1 (pg/ml)	332,7 ± 194,2	306,4 ± 211,5	307,9 ± 206,5	307,6 ± 214,3	263,1 ± 169,0	276,7 ± 202,1

Dados expressos como média ± desvio padrão.
* DTRC x SED; DTRC x DT, DTRC x DTRC+LEU, $p<0,05$
+ DTRC + LEU x DT, $p<0,05$

Para verificar se houve alteração na expressão de proteínas miofibriares, no período de RC, e suplementação com leucina em ratos destreinados, foi avaliada a expressão da proteína miofibrilar de cadeia pesada MyHC-7, no músculo, conforme o gráfico 14. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (AU) e a banda foi representada pelas melhores fotos correspondentes à proteína, com sua proteína constitutiva correspondente (β-actina).

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos SED e TREIN. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significante quando avaliada a expressão da proteína MyHC-7 nos grupos que foram submetidos ao destreinamento.

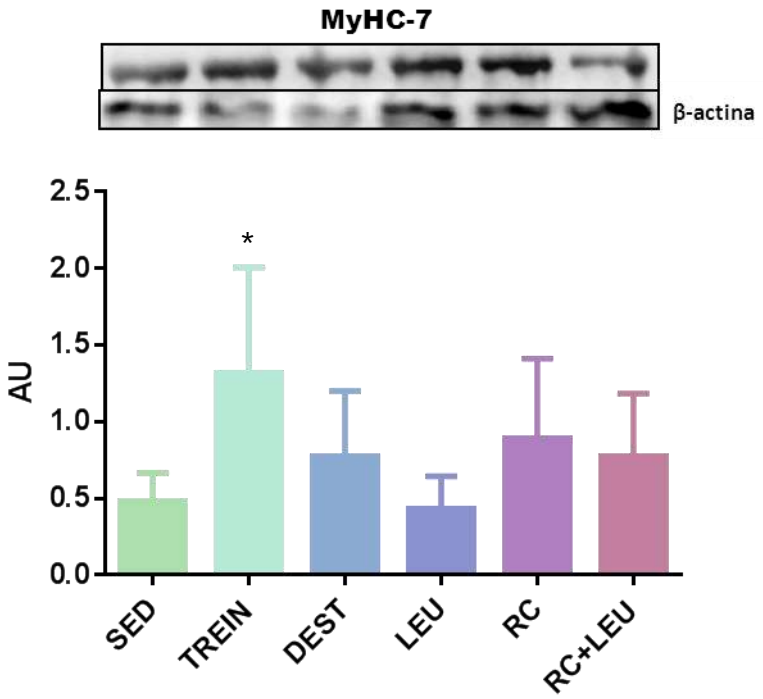

Gráfico 14. Quantificação da proteína MyHC-7 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.
* TREIN x SED; TREIN x LEU, p<0,05

A expressão das proteínas totais e fosforiladas envolvidas na via de sinalização de síntese proteica está apresentada nos gráficos a seguir, nos quais os valores estão expressos em unidades arbitrárias (AU) e as bandas são as melhores fotos correspondentes à proteína, com sua proteína constitutiva correspondente (β-actina).

Em relação aos resultados das expressões de proteínas, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para as proteínas fosforiladas e totais, envolvidas na via de sinalização da síntese proteica, no tecido muscular (Gráficos 15 ao 23).

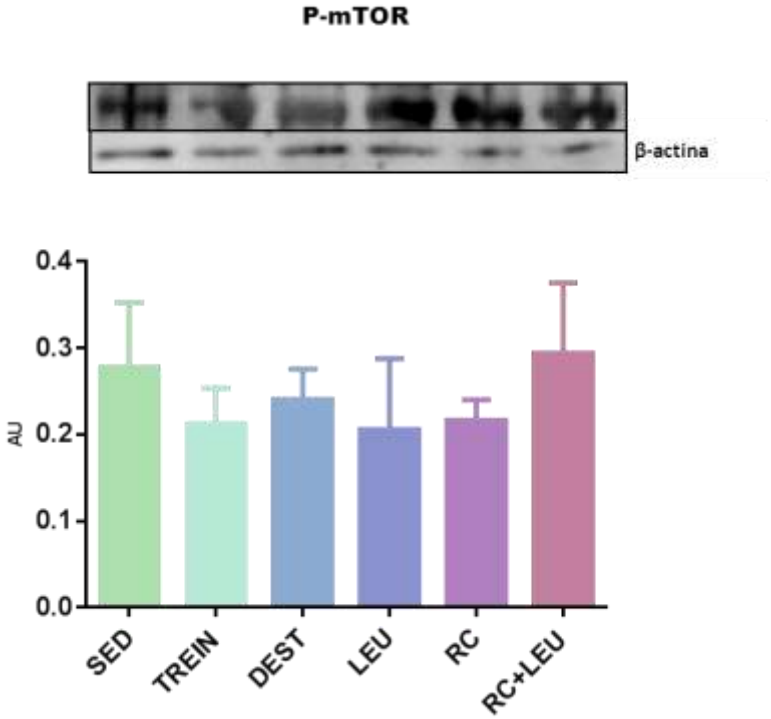

Gráfico 15. Quantificação da proteína P-mTOR (ser^{2448}) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

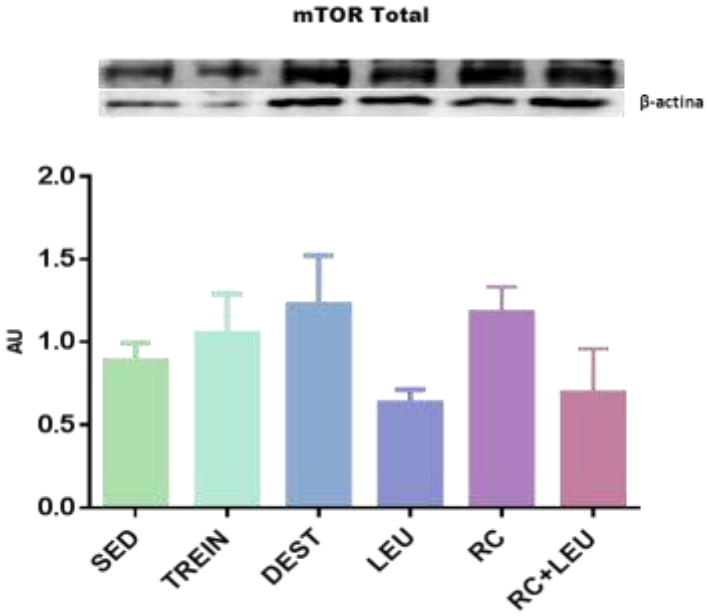

Gráfico 16. Quantificação da proteína mTOR total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

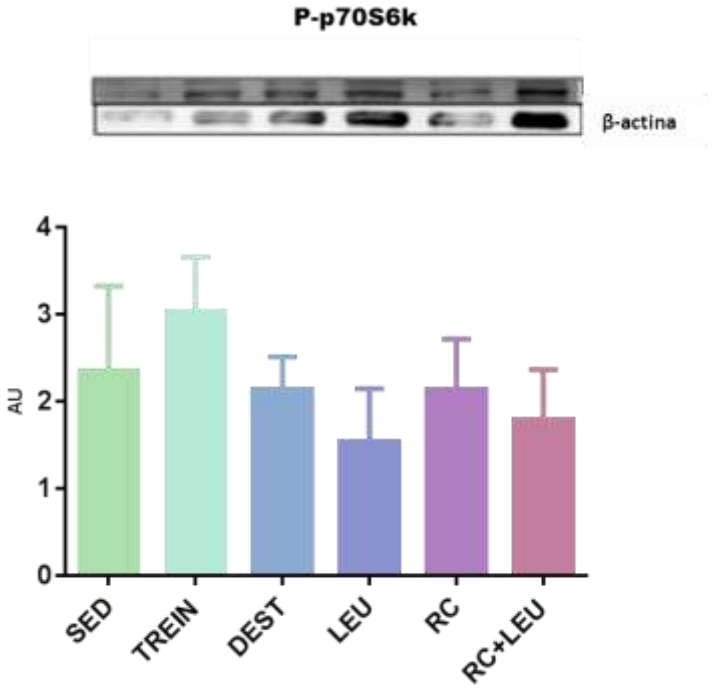

Gráfico 17. Quantificação da proteína P-p70S6k (Thr[389]) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

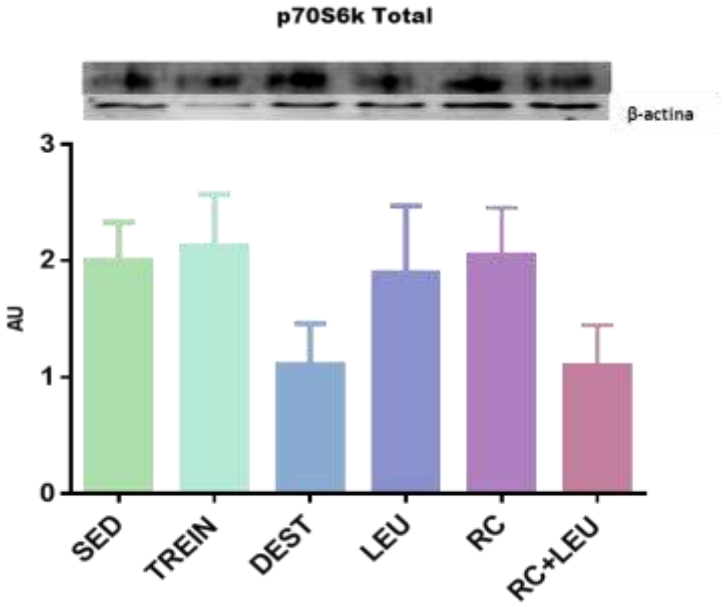

Gráfico 18. Quantificação da proteína p70S6k total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

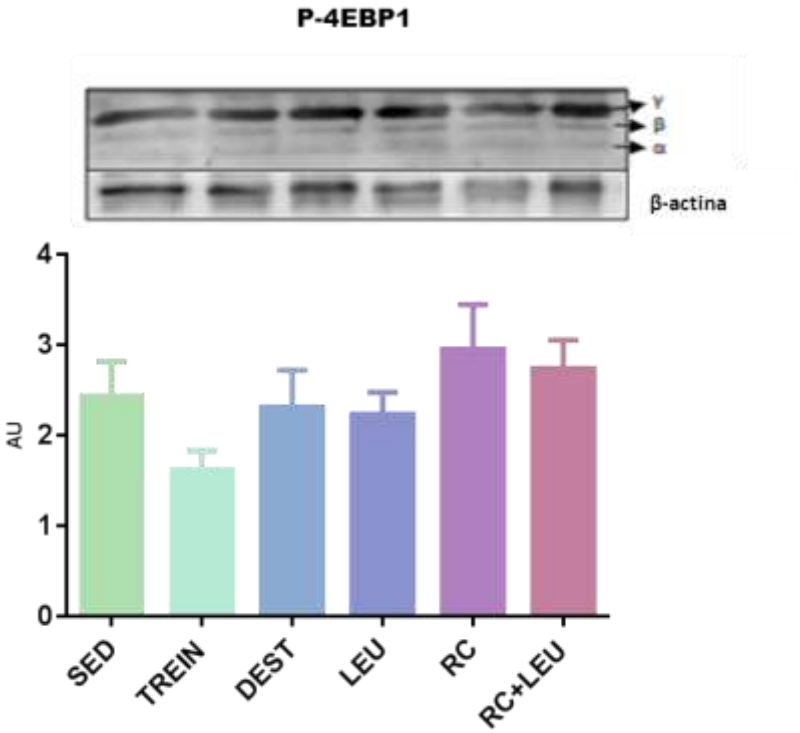

Gráfico 19. Quantificação da proteína P-4EBP1(Thr^{70}) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

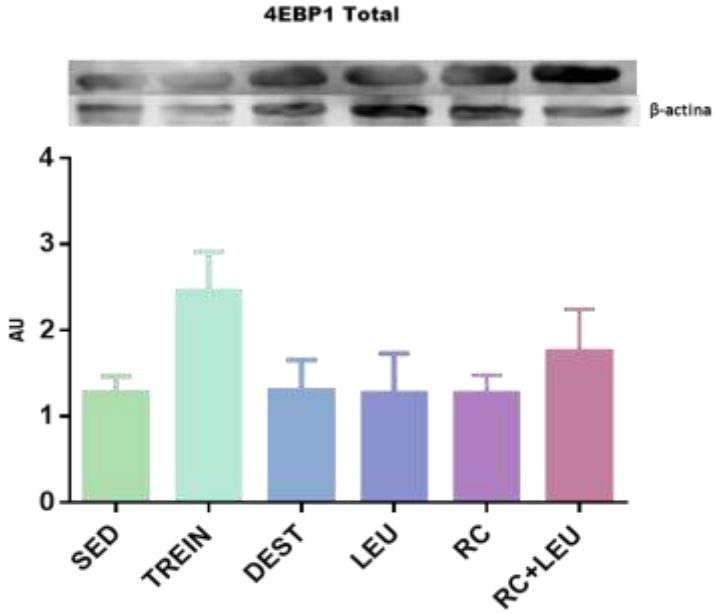

Gráfico 20. Quantificação da proteína 4EBP1 total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

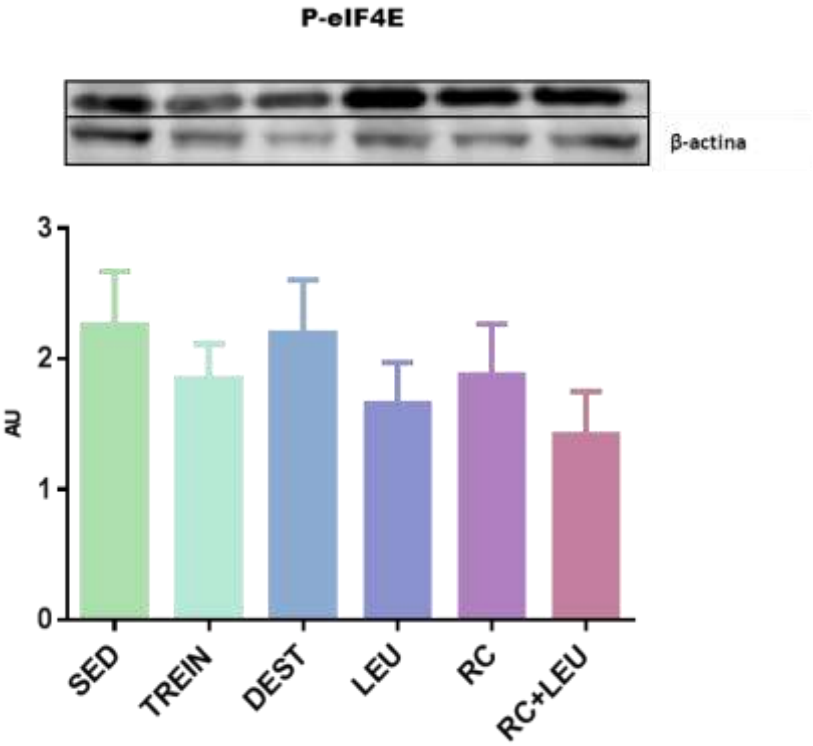

Gráfico 21. Quantificação da proteína P-EiF4-E (ser [209]) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.

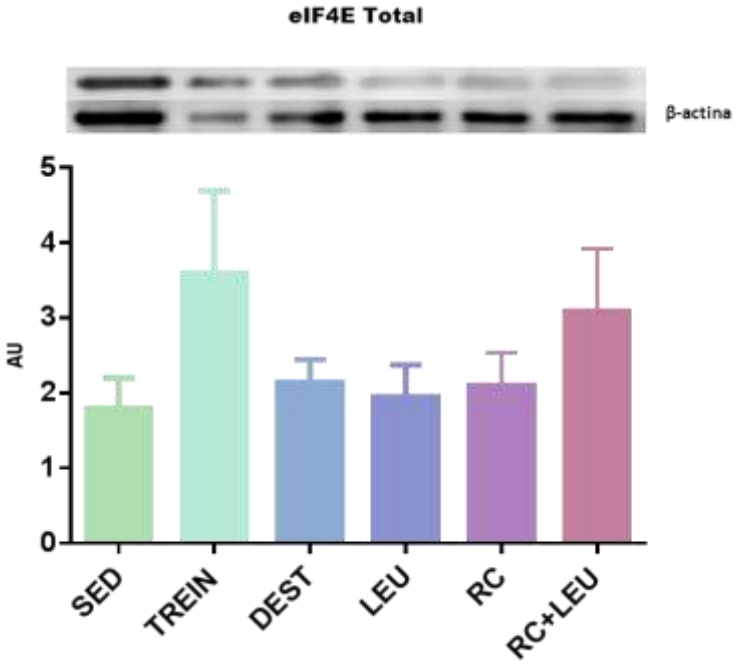

Gráfico 22. Quantificação da proteína EiF4-E total (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ±desvio padrão.

No gráfico 23 (A; B; C; D), são apresentadas as relações das proteínas fosforiladas em relação às proteínas totais da via de sinalização da síntese proteica.

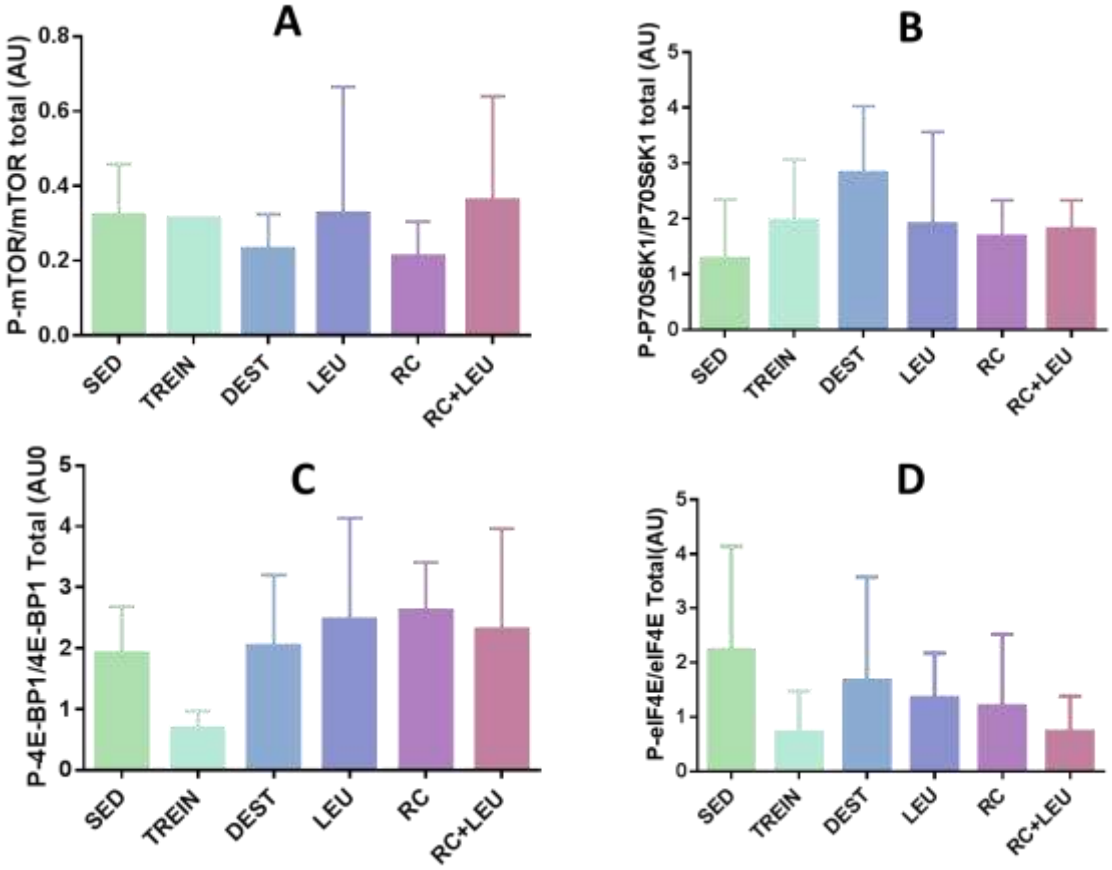

Gráfico 23. Relação da quantificação de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteíca mTOR (A), P-s6K1(B), P-4EBP1(C) e eIF4E (D) fosforilada em relação à total.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

Observou-se maior relação da proteína P-mTOR/mTOR total; contudo, sem diferença estatisticamente significativa. Nas demais proteínas, não foi observada diferença estatisticamente significativa, quando avaliada a relação das expressões de proteínas fosforiladas em relação às proteínas totais, envolvidas na via de sinalização da síntese proteica, no tecido muscular dos grupos experimentais.

Em relação às expressões de mRNA de proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteíca mTOR, P-4EBP1, P-s6K1 e eIF4E, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Gráfico 24 A; B; C; D).

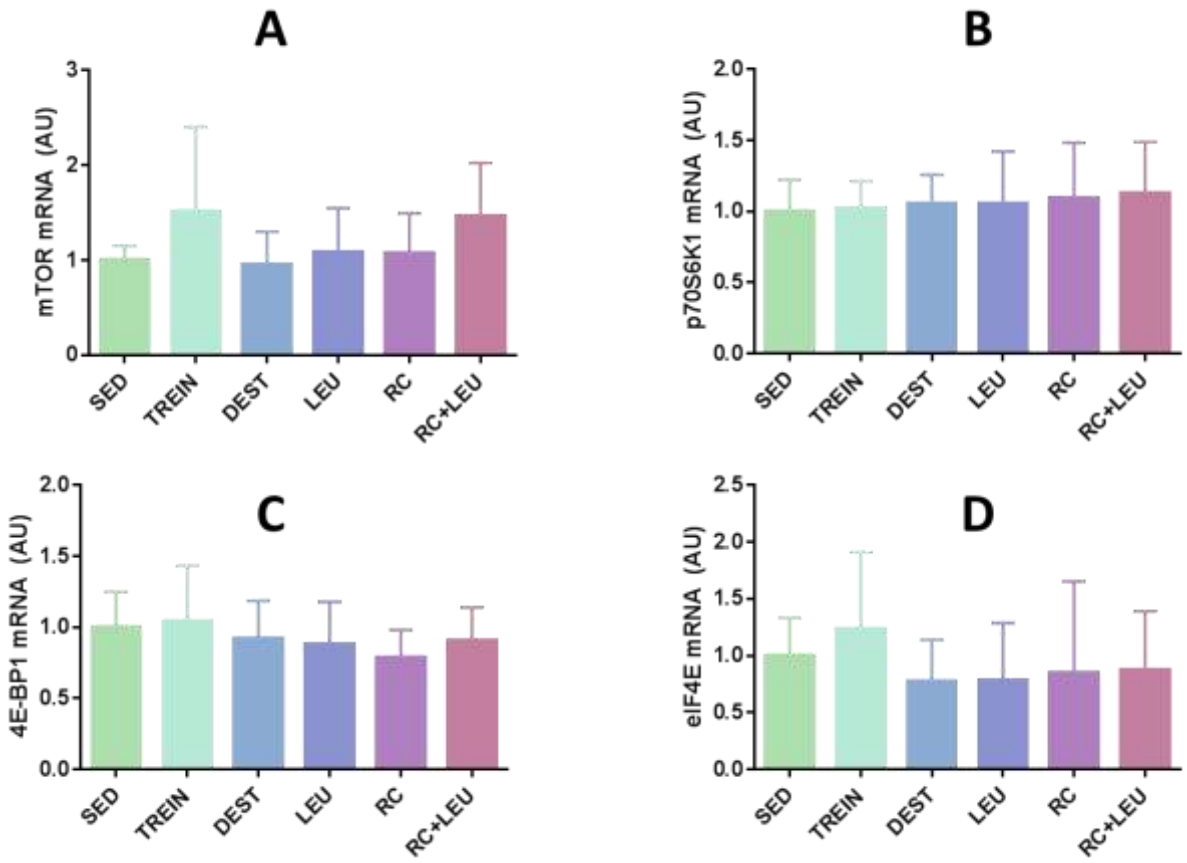

Gráfico 24. Expressão do mRNA de mTOR (A), p70S6K1(B), 4E-BP1 (C) e eIF4E (D) (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.

Considerando que não houve diferença estatisticamente significante, quando avaliadas as expressões das proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica, degradação e proteína miofibrilar, foi realizada a expressão gênica de transportadores de leucina, LAT-1, SNAT-2 e CD98 (Gráficos 25, 26 e 27).

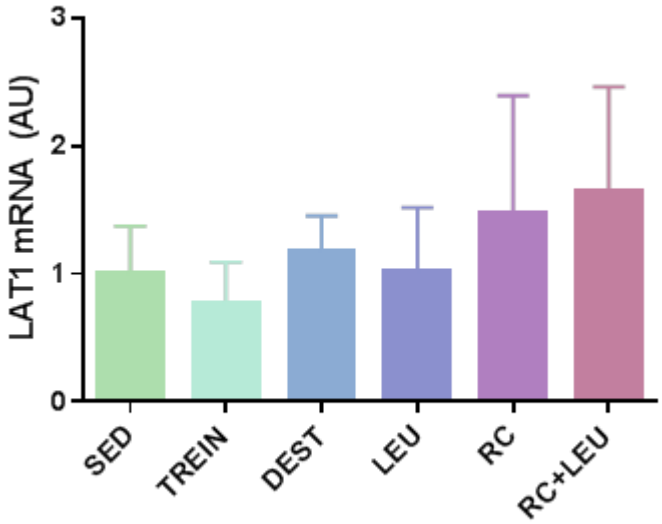

Gráfico 25. Expressão do mRNA do transportador LAT1 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

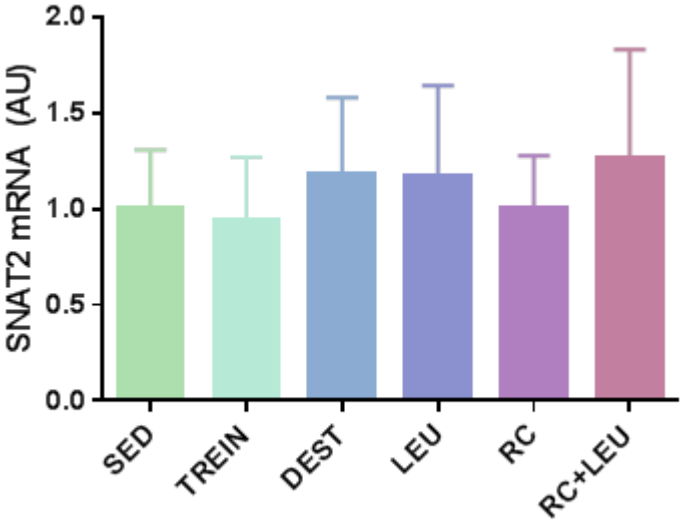

Gráfico 26. Expressão do mRNA do transportador SNAT2 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

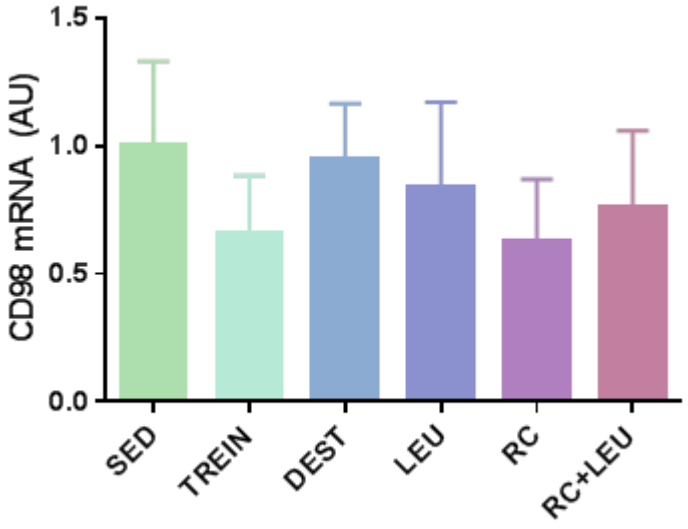

Gráfico 27. Expressão do mRNA do transportador CD98 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando avaliados os transportadores de leucina (LAT1; SNAT2; CD98).

Quando avaliada a expressão de mRNA de proteínas envolvidas na degração proteica (MuRF e Atrogin-1), foi observada menor expressão de mRNA da Atrogin-1, nos animais que foram suplementados com leucina, após o período de restrição; contudo, sem diferença estatística significante (Gráfico 29).

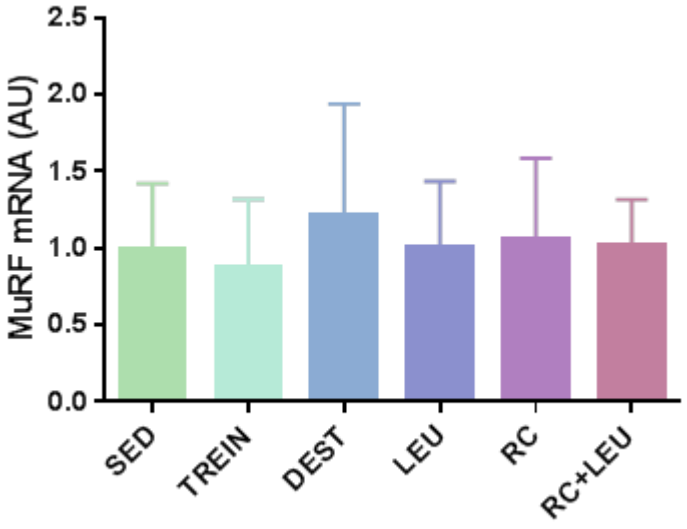

Gráfico 28. Expressão do mRNA da MURF1 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

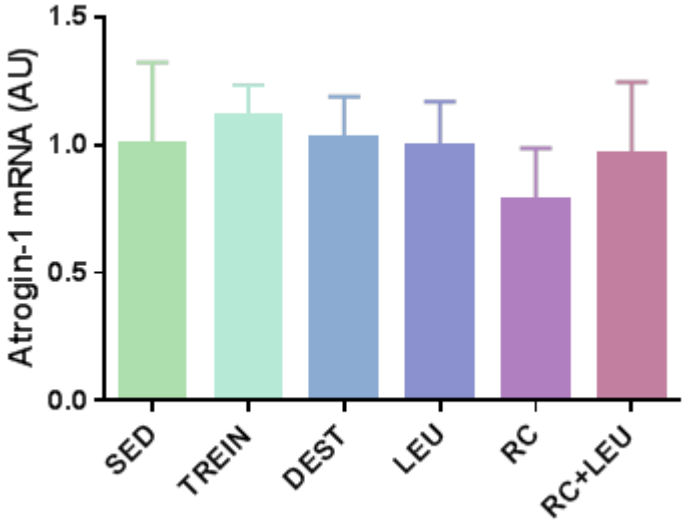

Gráfico 29. Expressão do mRNA da Atrogin-1 (unidades arbitrárias) no tecido muscular dos animais dos grupos experimentais.
Dados expressos em média ± desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a suplementação com leucina nos parâmetros moleculares envolvidos nas vias de sinalização de síntese e degradação proteica no músculo sóleo, em ratos destreinados submetidos à RC. Estudos realizados anteriormente, no nosso laboratório, avaliaram a suplementação da leucina em situação de DF físico, sem a intervenção de RC, no músculo e no tecido adiposo. Neste trabalho, observou-se aumento do consumo alimentar após o período de DF, principalmente nas primeiras semanas após a cessação do TF, ocasionando aumento do peso corporal dos animais (MATOS-NETO, 2011).

Nesse sentido, o presente trabalho diferenciou-se do trabalho de Matos-Neto (2011) por apresentar a intervenção da RC, considerada uma estratégia nutricional fundamental para o controle do peso corporal dos animais. Mais especificamente, o presente trabalho objetivou avaliar estratégias nutricionais para minimizar os efeitos do DF no músculo sóleo, como o ganho de massa gorda e a perda de massa muscular.

Como reportado anteriormente, o presente estudo foi realizado em dois momentos. No primeiro, todos os animais foram submetidos ao TF em esteira ergométrica, durante 8 semanas, exceto o grupo sedentário, que se manteve sem o TF em todo período do trabalho. Vale ressaltar que os animais foram distribuídos inicialmente em relação ao peso corporal e não foi observada diferença estatisticamente significativa, confirmando que todos se encontravam com o peso corporal semelhante no início do trabalho.

A partir da 8ª semana, os grupos foram redistribuídos em relação ao peso corporal, OGTT e TEM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nessas variáveis. Tal fato indica que todos os animais iniciaram o período de DF semelhantes quanto às variáveis peso corporal, e OGTT. Foi observada apenas diferença entre o TEM dos grupos submetidos ao TF, em relação ao grupo sedentário, o que comprova a efetividade do TF nesses animais.

Estudos apontam que uma das consequências do DF pode estar relacionada ao ganho de massa corporal (YASARI et al., 2007; PETIBOIS et al., 2004), visto que o DF reduz o gasto energético. Em animais, também se verificou que duas semanas de DF ocasionaram redução da ingestão dietética e da taxa metabólica basal após período de 4 semanas de natação (MAZZUCATTO et al., 2014).

No entanto, no estudo de Matos-Neto (2011), que avaliou o efeito da suplementação com leucina em animais submetidos ao DF, observou-se aumento do consumo alimentar após o período de DF, principalmente nas primeiras semanas após a cessação do treinamento, e, consequentemente, aumento do peso corporal dos animais.

Da mesma forma, no presente estudo, ao cessar o TF, observou-se aumento do peso corporal após o período de destreinamento (DT=601,26±47,88g) e redução após a RC (DTRC=447,92±49,58g; DTRC+LEU=497,36±55,94g). Assim, nos grupos submetidos às restrições calóricas, com a ingestão reduzida em 30%, esse aumento de peso corporal não foi observado, mostrando a eficiência da RC de 30% nos ratos submetidos ao DF.

Mais especificamente, quando avaliada a variação do peso corporal, o grupo DT apresentou o maior ganho de peso corporal (19,43±4,7%), enquanto os grupos submetidos à restrição calórica reduziram o peso corporal (DTRC=-5,75±4,44; DTRC+LEU=-2,21±3,09%), porém sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Entretanto, o percentual de RC de 30% adotado no presente estudo fez com que os animais perdessem muito peso corporal, podendo ser prejudicial a eles, uma vez que a redução do peso corporal pode contribuir para a diminuição da massa muscular esquelética.

O ganho de peso corporal tem sido relacionado com o aumento de volume celular e do número de tecidos adiposos. Esse aumento do número de adipócitos pode desencadear um processo inflamatório, com consequente aumento de proteínas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6, induzindo dano muscular, pela ativação da proteólise (ZEANANDIN, 2011; HOTAMISLIGIL, 2006). No trabalho de Torres-Leal et al. (2011), observou-se redução da proteína TNF-α no soro de animais submetidos ao treinamento de *endurance*, decorrente da redução do tecido adiposo após a realização do exercício. Ainda, estudos apontam que a inflamação pode desencadear um processo catabólico (CAI et al., 2004) e aumentar a perda de massa muscular já observada no DF (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

No presente trabalho, não foi observada mudança no quadro inflamatório dos animais, quando avaliadas as citocinas séricas. No entanto, no estudo de Pedroso (2013), trabalho desenvolvido em paralelo ao presente estudo com os mesmos animais, verificou-se aumento de expressão de proteínas inflamatórias (PKC) no tecido adiposo após o período de DF.

Uma das estratégias nutricionais que podem ser utilizadas para minimizar os efeitos do DF, é a RC, definida pela redução da ingestão de alimentos sem desnutrição. A RC apresenta efeitos benéficos, como a redução da massa adiposa, a melhora da sensibilidade à insulina em diversos tecidos, a redução do risco de inflamações crônicas do organismo (GENARO et al.,

2009; YE & KELLER, 2010) e o aumento da longevidade (MASORO, 2003). Em roedores, observa-se que a redução da ingestão de proteína ou de certos aminoácidos também pode aumentar a longevidade (ORENTREICH et al., 1993); no entanto, cada animal pode responder de forma diferente a essa situação catabólica.

Ainda nesse contexto, a RC pode estar relacionada a efeitos maléficos à saúde, como o desenvolvimento da desnutrição calórica, devido à diminuição de micronutrientes, algumas vezes não adicionados à ração dos animais (CERQUEIRA & KOWALTOWSKI, 2010). Nesse sentido, estudos realizados em animais sugerem que o grau e o tempo de RC, bem como a composição da dieta, desempenham papel importante na promoção da saúde e da longevidade (SOHAL & FORSTER, 2014).

Excesso de nutrientes, em especial, dietas ricas em gordura, podem reduzir a capacidade de leptina e insulina em promover o aumento da atividade da mTORC1 e reduzir a ingestão de alimentos (LAPLANTE & SABATINI, 2012). Logo, não apenas a ingestão de calorias é importante, no prolongamento de uma vida saudável, mas também a qualidade da dieta pode ser um fator determinante para manter a síntese de proteína e levar ao aumento da longevidade.

Diferentes protocolos de RC são utilizados, como protocolos de 8 a 60% de RC, sem a suplementação de vitaminas e minerais, e protocolos de RC entre 20 a 50%, com a suplementação de micronutrientes (CERQUEIRA & KOWALTOWSKI, 2010). Considerando que a adição de micronutrientes pode levar a respostas diferentes, o presente estudo se baseou no trabalho de Cerqueira & Kowaltowski (2010) para determinar o percentual de RC a ser utilizado, além da adição de micronutrientes na ração, para que o animal não sofresse desnutrição.

Assim, o presente estudo utilizou uma RC de 30%, durante 6 semanas, com ajuste em relação aos aminoácidos essenciais, para manter o mesmo teor de nitrogênio ofertado na ração suplementada. Ainda, foi adicionado um mix de minerais, calculado a partir do estudo de Pugh et al. (1999).

No presente estudo, a RC foi utilizada para minimizar o ganho de peso corporal observado após o período de cessação de TF. Os animais, após o período de DF, tiveram aumento do peso corporal e, particularmente, aumento da gordura corporal, em comparação aos grupos que foram submetidos à RC.

Nesse sentido, a RC foi eficiente em reduzir a quantidade de gordura corporal, além de melhorar parâmetros moleculares relacionados à inflamação, como JNK e PKC no tecido

adiposo (PEDROSO, 2013). Ressalta-se, novamente, que o estudo de Pedroso (2003) foi desenvolvido concomitantemente ao presente trabalho, que avaliou a influência da RC nos parâmetros inflamatórios nos ratos submetidos ao DF.

Em estudos realizados em animais (YOU et al., 2007; CHEN et al., 2010) e em humanos (AHMADI et al., 2011), observaram-se a melhora na composição corporal e a diminuição da gordura corporal após período de RC.

Como citado anteriormente, a RC é vista como uma situação catabólica, uma intervenção que ocasiona perda de massa muscular. Adicionalmente, o aumento da gordura corporal e o aumento da inflamação também podem levar a um quadro catabólico, podendo contribuir para a diminuição da massa livre de gordura dos animais. Estudos em humanos, em intervenção em longo prazo, verificaram redução da massa magra nesses indivíduos com aumento da inflamação (LARSON-MEYER, 2006; REDMAN et al., 2011).

Ressaltamos que o balanço energético e a ingestão de proteína da dieta são fatores críticos, que contribuem para a regulação da massa muscular esquelética, por influenciar o metabolismo das proteínas, principalmente no músculo esquelético (GORDON et al., 2008).

Segundo Weinheimer et al. (2010), observou-se, em mais da metade dos estudos avaliados, que a restrição de energia induziu a perda de peso de 5 a 10% da massa corporal inicial. Além disso, mais do que um quarto dessa mudança na massa corporal total foi resultado de decréscimos em massa livre de gordura.

De forma geral, o período agudo de balanço energético negativo associado ao jejum pode resultar no aumento da proteólise e na oxidação de aminoácido. Essa proteólise pode se tornar menos pronunciada por longo prazo, visto que o organismo se adapta e conserva as reservas de energia e proteína (KNAPIK et al., 1991; STEIN et al., 1991). No trabalho de Nair et al. (1987), os autores verificaram aumento da proteólise e da oxidação após 72h de jejum; porém, em adultos obesos, com balanço nitrogenado negativo, observou-se diminuição da síntese proteica de apenas 20% no período de 4 semanas. Uma vez que o presente estudo realizou RC pelo período de 6 semanas, a duração da intervenção pode ter ocasionado uma adaptação à essa situação e consequente conservação das reservas corporais dos animais.

Indivíduos saudáveis, com peso adequado, tais como atletas, também podem passar por períodos de saldo negativo de energia resultante da restrição energética na dieta, do aumento do gasto energético ou dos efeitos combinados de ambos (CARBONE et al., 2012).

Ressalta-se que dietas com elevada proporção de proteína ingerida podem ocasionar aumento da perda de peso e redução da gordura corporal, além de redução da perda de massa magra (FARNSWORTH et al., 2003).

Dessa forma, a RC e a suplementação com leucina, conjuntamente, representariam as principais estratégias para minimizar os efeitos desencadeados pela cessação do TF.

Considerando a importância da leucina na ativação da síntese proteica, e na diminuição da degradação proteica muscular (ANTHONY et al., 2002; ZANCHI et al., 2008), foi de suma importância a suplementação desse aminoácido, para minimizar o catabolismo proteico muscular, que pode ser observado em condições como o DF, a RC ou em ambas as situações.

Nesse sentido, estudos apontam que a suplementação com leucina parece atuar de forma eficiente no balanço proteico e na redução da gordura corporal, resultando em mudanças significativas na composição corporal (DONATO et al., 2006). Estudo realizado em nosso laboratório aponta a suplementação de leucina como potencial estímulo ao incremento no conteúdo de proteína corporal e massa magra em animais submetidos a períodos de restrição alimentar intercalados por recuperação nutricional (DONATO et al., 2006).

Ressaltamos, ainda, que realizamos um estudo piloto, no qual observamos que a suplementação com leucina, durante a RC, de 30% preservou a massa magra e melhorou marcadores de anabolismo proteico em ratos (PEDROSO et al., 2014).

A leucina, quando suplementada de forma isolada, pode alterar as concentrações plasmáticas dos demais aminoácidos de cadeia ramificada (RIEL et al., 2003). Assim, foram incluídos os aminoácidos isoleucina e valina nas rações oferecidas para os animais suplementados. A quantidade utilizada de ACR e sua proporção foram baseadas no artigo de Balage (2010), que apontou aumento na fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização de síntese proteica muscular. Vale ressaltar que os animais que não receberam suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada tiveram suas rações ajustadas, adicionadas de aminoácidos essenciais (serina, alanina, glicina, prolina e aspartato), para manter a mesma concentração de nitrogênio encontrada nas rações suplementadas com leucina, valina e isoleucina; possibilitando, assim, se verificar que o efeito encontrado foi referente à leucina – e não à quantidade de nitrogênio disponível nos aminoácidos.

Para confirmação das concentrações de aminoácidos oferecidas nas rações e nas concentrações séricas dos animais, foi realizada a análise de aminograma nos diferentes tipos de ração e no soro dos animais de cada grupo.

Dentre os processos que contribuem para o aumento da concentração sérica de ACR, incluem-se a ingestão alimentar e a degradação proteica tecidual. Já os principais processos que afetam o desaparecimento dos ACR séricos incluem a síntese proteica, a excreção e a oxidação de ACR (LYNCH & ADAMS, 2014).

Nesse sentido, verificou-se quantidade de ACR mais elevada nos grupos suplementados, porém sem diferença estatisticamente significativa. No entanto, vale ressaltar que após a ingestão crônica de leucina, parte dela, cerca de 35%, se encontra no músculo, sendo os principais aminoácidos oxidados nesse tecido. Dessa forma, a quantidade desses aminoácidos encontrados no plasma não aponta a eficiência da suplementação desses aminoácidos de cadeia ramificada.

Além disso, Miralles-Arnau et al. (2011) verificaram que a suplementação de leucina, em ratos Wistar, aumentou as concentrações deste aminoácido, mas, após o período de 8h de jejum, estes níveis retornaram aos valores basais.

Cabe ressaltar que, no presente trabalho, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas, antes da eutanásia. Acreditamos que esse período foi suficiente para ocasionar a diminuição sérica dos ACR desses animais.

No presente estudo, foi realizada a avaliação da composição corporal dos animais, pela análise de composição química da carcaça. Após o período de DF, foi observado aumento da gordura corporal dos animais (DT=10,73±2,91%). Ainda, os animais que foram submetidos à RC tiveram maior redução da gordura corporal (DTRC=3,76±1,52; DTRC+LEU=3,5±1,64) em comparação aos animais que não foram submetidos a essa intervenção.

Além disso, observou-se aumento da massa livre de gordura nos animais que foram submetidos à RC, em relação aos que não foram submetidos a essa intervenção. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando avaliada a proteína da carcaça desses animais, destacando que a massa livre de gordura corresponde aos valores de todos os tecidos e resíduos livres de lipídios, incluindo água, músculo, osso e tecido conjuntivo. Assim, adicionalmente, foi realizada a análise para se verificar a quantidade de proteína da carcaça, não sendo observada diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, não podemos atribuir, à leucina, a melhora da composição corporal, pela análise de massa livre de gordura, tampouco pela análise de proteína da carcaça.

Estudo aponta que a análise do conteúdo de proteínas miofibrilares é considerada um recurso a ser utilizado para análise dos efeitos da suplementação de aminoácidos sobre o balanço proteico. No estudo de Nagasawa et al. (2002), foi observada supressão da degradação proteica miofibrilar após 2 a 4 horas da administração isolada de leucina. Alguns estudos sugerem que, em comparação aos níveis de proteína citoplasmáticos, os níveis de proteínas miofibrilares são mais responsivos à ingestão de aminoácidos (MITTENDORFER et al., 2005; BATES & MILLWARD, 1983).

O complexo de proteínas miofibrilares é constituído de miosinas de cadeias leve e pesada. Dependendo das características contráteis e metabólicas das fibras musculares, diferentes isoformas de miosina são expressas. Considerando o exercício, de *endurance*, realizado pelos animais durante o experimento, procuramos estudar a expressão da miosina mais relacionada ao tipo de exercício, a expressão da isoforma 7 de miosina de cadeia pesada (MyHC-7), uma vez que esta apresenta maior associação com fibras musculares oxidativas (HAEGENS et al., 2012).

No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos animais que receberam a suplementação com leucina em relação aos demais. Conclui-se que a leucina, mais uma vez, não foi capaz de melhorar o balanço proteico muscular nesse modelo experimental.

Estudos realizados em ratos submetidos ao exercício de força observaram aumento da fosforilação de proteínas envolvidas nas vias de sinalização da síntese proteica muscular, como mTOR, P70S6k, 4EBP1 e eif4-e (ANTHONY et al., 2000; BOLSTER et al., 2004; CROZIER et al., 2005). Em estudos com animais submetidos ao treinamento de *endurance*, foi observado esse mesmo aumento (PASIAKOS et al., 2011). No entanto, estudos apontam que, no exercício de força, observam-se maior síntese proteica e aumento da área seccional da fibra, enquanto, no exercício de *endurance*, observa-se aumento de proteínas mitocondriais (PHILIPS et al., 1996).

Segundo estudo conduzido por Lo (2011), tanto no treinamento de força, quanto no de *endurance*, observa-se aumento da síntese proteica muscular, na fase inicial do treinamento, isto é, em animais ou indivíduos que iniciaram o protocolo de TF (LOO, 2011). Nesse sentido, a suplementação de aminoácidos essenciais tem se mostrado eficiente para o aumento do ganho de massa muscular, devido ao aumento da síntese proteica e da diminuição da degradação proteica. Cabe ressaltar que não há estudos com suplementação de leucina em ratos destreinados e submetidos à RC.

Estudos apontam que tanto o exercício de *endurance* quanto o exercício de força são efetivos para melhora da força e que, após 24 semanas de destreinamento, o peso corporal e a aptidão cardiovascular voltam ao *baseline.* No estudo de Lo (2011), observou-se aumento de 11,3%, na força, em exercício de *endurance*, em indivíduos jovens adultos sedentários. Vale ressaltar que esse foi o primeiro trabalho que comparou os dois tipos de exercício em relação ao DF.

No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa, quando avaliada a expressão de proteínas envolvidas na via de síntese proteica muscular, como mTOR, P70S6k, 4EBP1 e EIF4-e, totais e fosforiladas, tampouco na relação proteína fosforilada pela total.

Destaque-se que estudos de *time-course* mostram que o efeito da leucina na ativação das moléculas reguladoras da tradução cessa dentro de 2 a 3 horas após a administração de aminoácido ou de refeição (BAJOTTO, 2011).

Outra explicação para não se ter observado esse aumento da fosforilação dessas proteínas seria pela falta de nutrientes em situações de RC, que pode ativar as proteínas AMPK e SIRT1, que, por sua vez, podem suprimir a via da mTOR, podendo prejudicar a síntese proteica (MCLVER, 2012).

Ainda, nesse contexto, existem diferentes sistemas de transporte que regulam o fornecimento de aminoácidos. Os sistemas principais que influenciam a sinalização da mTORC1 são os transportadores do sistema L e do sistema A. Uma vez que a fosforilação das proteínas envolvidas na via de sinalização da síntese proteica não teve alteração, e que transportadores de leucina são essenciais para a captação dela para ativação da mTOR e da cascata de sinalização de síntese proteica, foi de suma importância a avaliação desses transportadores no presente estudo. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando avaliados esses transportadores, após a suplementação com leucina. Da mesma maneira, no estudo de Pasiakos et al. (2013), não observou-se diferença estatisticamente significativa, quando avaliada a expressão gênica desses transportadores, em indivíduos submetidos à RC e com aumento da concentração de leucina na dieta.

No que concerne à via de degradação, estudos realizados em animais submetidos à imobilização apontam que a leucina pode minimizar o catabolismo e melhorar a atrofia muscular, pela redução da expressão gênica de ubiquitinas ligases, como a atrogin-1 e a

MURF. Essas duas ubiquitinas, em situações de atrofia, são as principais a sofrerem mudanças, sendo as mais estimuladas (BAPTISTA, 2009).

A falta de movimento e/ou de sobrecarga de um membro específico, ocasionada pelo desuso, pode provocar o *turnover* proteico negativo, não apenas pelo aumento da degradação, mas também pela diminuição da síntese proteica muscular (PHILLIPS et al., 2009). Em humanos, os modelos mais utilizados para simular o desuso são a falta de gravidade, a suspensão, o repouso e a imobilização. No presente estudo, realizado em animais, o modelo utilizado foi o DF, que pode ter ocasionado o *turnover* proteico negativo, devido principalmente ao aumento da degradação proteica, visto que a síntese proteica muscular não foi alterada.

Estudos apontam maior expressão gênica de proteínas de degradação, como Atrogin1 e MURF-1, após 2 e 10 dias de imobilização dos animais (GLOVER et al., 2010; BOER et al., 2007). Em estudos com animais, que realizaram a imobilização de patas posteriores dos modelos, testes esses chamados de *hindlimb*, verificou-se que a suplementação com leucina foi eficiente para minimizar os efeitos negativos obtidos pela imobilização, como a atrofia muscular (BAJOTTO, 2011; COMBARET et al., 2005).

No presente trabalho, as análises de expressão de proteínas e mRNA foram realizadas no músculo sóleo, que apresenta predominância de fibras lentas. Essas fibras são as mais recrutadas durante o exercício de *endurance*, tipo de exercício ao qual os animais foram submetidos no presente trabalho. Além disso, o músculo sóleo é o que sofre maior atrofia em situações de desuso, como o *hindlimb* (MOREY-HOLTON & GLOBUS, 2002).

No presente estudo, no qual os animais foram submetidos a duas situações catabólicas, RC e destreinamento, foi observada maior expressão gênica da atrogin-1, nos ratos que foram submetidos à RC, após o período de DF, apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa. Além disso, foi possível observar que, após a suplementação com leucina, nos animais submetidos ao DF e à RC, ela reduziu essa expressão, mostrando, assim, a atenuação da degradação proteica.

No presente estudo, não foi mensurada a síntese proteica muscular; contudo, é possível que, em longo prazo, o aumento da expressão de proteínas envolvidas na síntese de proteínas e/ou a diminuição da degradação proteica possa levar ao balanço energético positivo nos animais, minimizando a perda de massa muscular.

Propomos que a RC pode ter prejudicado a via da síntese proteica, pela ativação da via AMPK. Além disso, o tempo de jejum utilizado no experimento durante a eutanásia pode ter

influenciado na concentração plasmática desses aminoácidos nos animais. Nesse sentido, novos estudos devem ser utilizados, para verificar as concentrações da leucina sérica, além dos tecidos periféricos, principalmente no músculo.

Cabe registrar que estudos realizando suplementação com aminoácidos apresentam diferentes condições experimentais, como dose e aminoácidos utilizados, quantidade de aminoácidos essenciais consumidos e uso inapropriado de grupos controles (placebos e nitrogenados), duração e intensidade do exercício, dentre outros, redundando em diferentes resultados, tanto em animais, quanto em humanos. Vale ressaltar, também, que, até o momento, não foi realizado estudo com suplementação crônica de leucina em animais destreinados submetidos à RC.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que o DF, durante 6 semanas, promoveu aumento da massa corporal e dos coxins adiposos dos animais. Além disso, verificou-se aumento no percentual de gordura corporal e redução do percentual de massa livre de gordura nos dois grupos DT não submetidos à RC.

Nesse sentido, a estratégia nutricional utilizada, RC 30%, foi suficiente para melhorar a composição corporal, diminuindo o percentual de gordura corporal dos animais, e para aumentar a massa livre de gordura, apesar de não se observar diferença estatisticamente significativa na análise de proteína da carcaça.

No entanto, a suplementação com leucina não foi efetiva no aumento ou na manutenção da massa magra. Além disso, a suplementação não alterou parâmetros moleculares, como o aumento da expressão de proteínas envolvidas na síntese proteica muscular, tampouco o aumento da expressão de transportadores de leucina.

Porém, quando avaliadas as proteínas envolvidas na via de sinalização de degradação proteica, foi observada redução das proteínas envolvidas nessa via, com a suplementação de leucina, apesar de não se observar diferença estatisticamente significativa.

Contudo, a suplementação com leucina foi capaz de minimizar o aumento da expressão de proteínas envolvidas na via de degradação proteica, após a RC, mesmo não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa.

Entendemos que alterações na fosforilação de proteínas envolvidas na via de sinalização de síntese e degradação proteica não confirmarão o aumento da atividade dessas vias e, consequentemente, o aumento da síntese proteica e a redução da degradação no músculo, sendo necessárias mais análises para confirmação desses fatos. No entanto, nossos resultados contribuirão para novas pesquisas, em especial nesse modelo experimental, visto que, até o momento, poucos estudos foram realizados nessas condições – e os resultados desses estudos apresentam dados conflitantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADI, N.; ESHAGHIAN, S.; HUIZENGA, R.; SOSNIN, K.; EBRAHIMI, R.; SIEGEL, R. Effects of Intense Exercise and Moderate Caloric Restriction on Cardiovascular Risk Factors and Inflammation. **The American Journal of Medicine**. v. 124, p. 978–982, 2011.

AMIGÓ, N.; CADEFAU, J.A.; FERRER, I.; TARRADOS, N.; CUSSÓ, R. Effect of summer intermission on skeletal muscle of adolescent soccer players**. J Sports Med Phys Fitness.** v. 38, n. 4, p. 298-304, 1998.

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

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R.; VARY, T.C.; JEFERSON, L.S. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. **J Nutr**. v. 130, p. 139–145, 2000.

ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; LAYMAN, D.K. Leucine supplementa- tion enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. **J Nutr**. v.129, p. 1102–1106, 1999.

ANTHONY, J.C.; REITER, A.K.; ANTHONY, T.G.; CROZIER, S.J.; LANG, C.H.; MACLEAN, D.A.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Orally administered leucine enhances protein synthesis in skeletal muscle of diabetic rats in the absence of increases in 4E-BP1 or S6K1 phosphorylation. **Diabetes**. v. 51, p. 928-36, 2002.

ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. **Ann Med**. v. 27, p. 435-8, 1995.

BAAR, K.; NADER, G.; BODINE, S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. **Essays Biochem**. v. 42, p. 61-74, 2006.

BAJOTTO, G.; SATO, Y.; KITAURA, Y.; SHIMOMURA, Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. **Eur J Appl Physiol**. v. 111, p. 1815-1828, 2011.

BAJOTTO, G.; SHIMOMURA, Y. Determinants of disuse-induced skeletal muscle atrophy: exercise and nutrition countermeasures to prevent protein loss. **J Nutr Sci Vitaminol.** v. 52, n. 4, p. 233-47, 2006.

BALAGE, M.; DARDEVET, D. Long-term effects of leucine supplementation on body composition. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. v. 13, n. 3, p. 265-70, 2010.

BALAGE, M.; DUPONT, J.; MONTHE-SANTNEY, I. TESSERAUD, S.; MOSONI, L.; DARDEVET, D. Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle IR/PI13k signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 22, n. 3, p. 219-26, 2010.

BALAGOPAL, P.; SCHIMKE, J.C.; ADES, P.; ADEY, D.; NAIR, K.S. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 280, p. E203–E208, 2001.

BAPTISTA, I.L.; LEAL, M.L.; ARTIOLI, G.G.; AOKI, M.S.; FIAMONCINI, J.; TURRI, O.O.; CURI, R.; MIYABARA, E.H.; MORISCOT, A.S. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. **Muscle Nerve.** v. 41, p. 800–808, 2010.

BATES, P.C.; MILLWARD, D.J. Myofibrillar protein turnover. Synthesis rates of myofibrillar and sarcoplasmic protein fractions in differentmuscles and the changes observed during postnatal development and in response to feeding and starvation. **Biochem. J**. v. 214, p. 587–592, 1983.

BIOLO, G.; CIOCCHI, B.; STULLE, M.; BOSUTTI, A.; BARAZZONI, R.; ZANETTI, M.; ANTONIONE, R.; LEBENSTEDT, M., PLATEN, P.; MARTINA, H.; GUARNIERI, G. Calorie restriction accelerates the catabolism of lean body mass during 2wk of bed rest. **Am J Clin Nutr**. v. 86, p. 366-372, 2007.

BLOMSTRAND, E.; ELIASSON, J.; KARLSSON, H.K.R.; KOHNKE, R. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. **J.Nutr**. v. 136, p. 269S-273S, 2006.

BOCALINI, D.S., SERRA, A.J., RICA, R.L., L. Repercussions of training and detraining by water-based exercise on functional fitness and quality of life: a short term follow up in healthy older women. **Clinics** (Sao Paulo). v. 65, n. 12, p. 1305–1309, 2010.

BODINE, S.C.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W.O.; STOVER, G.L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J.C.; et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol**. v. 3, p. 1014–9, 2001.

BOLSTER, D.R.; VARY, T.C.; KIMBALL, S.R.; JEFERSON, L.S. Leucine regu- lates translation initiation in rat skeletalmuscle via enhanced eIF4G phosphorylation**. J Nutr**. v. 134, p. 1704–1710, 2004.

BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO, M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 68, p. 374–378, 1989.

BOOTH, F.W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **J Appl Physiol**. v. 52, p. 1113–1118, 1982.

BOOTH, F.W.; GOLLNICK, P.D. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. **Med Sci Sports Exerc**. v. 15, p. 415–420, 1983.

BURD, N. A.; TANG, J.E.; MOORE, D.R.; PHILLIPS, S.M. Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. **Journal of Applied Physiology**. v. 106, n. 5, p. 1692-1701, 2009.

BUSE, M.G.; REID, S.S. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle**. J Clin Invest.** v. 56, p. 1250–1261, 1975.

BUSE, M.G.; WEIGAND, D.A. Studies concerning the specificity of the effect of leucine on the turnover of proteins in muscles of control and diabetic rats. **Biochim Biophys Acta**. v. 475, p. 81–89, 1977.

CAI, D.; FRANTZ, J.D.; TAWA, N.E. JR.; MELENDEZ, P.A.; OH, B.C.; LIDOV, H.G.; HASSELGREN, P.O.; FRONTERA, W.R.; LEE, J.; GLASS, D.J.; SHOELSON, S.E.

IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell.** v. 15, n. 2, p. 285-98, 2004.

CARBONE, J.W.; MCCLUNG, J.P.; PASIAKOS, S.M. Skeletal Muscle Responses to Negative Energy Balance: Effects of Dietary Protein. American Society for Nutrition. **Adv. Nutr**. v. 3, p. 119–126, 2012.

CARRARO, F.; STUART, C.A.; HARTL, W.H.; ROSENBLATT, J.; WOLFE, R.R. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 259, p. E470–E476, 1990.

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

CERQUEIRA, F.M.; KOWALTOWSKI, A.J. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. **Ageing Research Reviews**. v. 9, p. 424–430, 2010.

CHEN, S.Y.; CHEN, S.M.; CHANG, W.H.; LAI, C.H.; CHEN, M.C.; CHOU, C.H.; KUO, C.H. Effect of 2-month detraining on body composition and insulin sensitivity in young female dancers. **Int J Obes**., v. 30, p. 40-4, 2006.

CHEN, Y.; FANG, S.; FU, Y.; ZHOU, X.; XU, M.; XU, W. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 88, n. 4, p. 715-722, 2010.

CHEVALIER, S.; MARLISS, E.B.; MORAIS, J.A.; Lamarche, M.; Gougeon, R. Whoe-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. **Am J Clin Nutr**. v. 82, p. 355-365, 2005.

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

CROZIER, S.J.; KIMBALL, S.R.; EMMERT, S.W.; ANTHONY, J.C.; JEFERSON, L.S. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle**. J Nutr**. v. 135, p. 376–382, 2005.

CUTHBERTSON, D.; SMITH, K.; BABRAJ, J.; LEESE, G.; WADDELL, T.; ATHERTON, P.; WACKERHAGE, H.; TAYLOR, P.M.; RENNIE, M.J. Anabolic signaling deficitsunderlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. **FASEB J**. v. 19, p. 422–424, 2005.

DAVIDSON, R.T.; ARIAS, E.B.; CARTEE, G.D. Calorie restriction increases muscle insulin action but not IRS-1-, IRS-2-, or phosphotyrosine-PI 3-kinase. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.** v. 282, n. 2, p. E270-E276, 2002.

DE BOER, M.D.; SELBY, A.; ATHERTON, P.; SMITH, K.; SEYNNES, O.R.; MAGANARIS, C.N.; MAFFULLI, N.; MOVIN, T.; NARICI, M.V.; RENNIE, M.J. The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. **J Physiol.** v. 15, n. 585, p. 241-51, 2007.

DECOMBAZ, J.; REINHARDT, P.; ANANTHARAMAN, K.; VON GLUTZ, G.; POORTMANS, J.R. Biochemical changes in a 100 km run: free amino acids, urea, andcreatinine. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol**. v. 41, n. 1, p. 61-72, 1979.

DING, Q.I.; CATHERINE, A.S.H.; MRACEK, T.; MERRY, B.; BING, C. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulating adiponectin in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 23, n. 8, p. 867–874, 2012.

DODD, K.M; TEE, A.R. Leucine and mTORC1: a complex relationship. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 302, p. E1329 –E1342, 2012.

DONATO, J.,JR.; PEDROSA, R.G.; CRUZAT, V.F.; PIRES, I.S.; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutrition,** v. 22, p. 520-7, 2006.

DONATO, J.,JR.; PEDROSA, R.G.; DE ARAUJO, J.A.,JR.; PIRES, I.S.; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine and phenylalanine supplementation during intermittent periods of food restriction and refeeding in adult rats. **Life Sci**. v. 81, p. 31-9, 2007.

DRUMMOND, M. J.; GLYNN, E.L.; FRY, C.S.; TIMMERMAN, K.L.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. An increase in essential amino acid availability upregulates amino acid transporter expression in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 298, p. E1011–E1018, 2010.

FARNSWORTH, E.; LUSCOMBE, N.D.; NOAKES, M.; WITTERT, G.; ARGYIOU, E.; CLIFTON, P.M. Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid oncentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women.**Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 31–39, 2003.

FINK, W.J.; COSTILL, D.L.; POLLOCK, M.L. Submaximal and maximal working capacity of elite distance runners. Part II. Muscle fiber composition and enzyme activities. **Ann N Y Acad Sci.** v. 301, p. 323–327, 1977.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. Adipose tissueas na endocrine organ: from theory to practice**. J Pediatr**. v. 83, p. S192-203, 2007.

FROSIG, C.; ROSE, A.J.; TREEBAK, J.T.; KIENS, B.; RICHTER, E.A.; WOJTASZEWSKI, J.F.P. Effects of Endurance Exercise Training on Insulin Signaling in Human Skeletal Muscle Interactions at the Level of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt, and AS160 **Diabetes August.** v. 56, n. 8, p. 2093-2102, 2007.

GARLICK, P.J.; MCNURLAN, M.A.; BALLMER, P.E. Influence of dietary protein intake on whole-body protein turnover in humans. **Diabetes Care**. v. 14, p. 1189–1198, 1991.

GENARO, P.S.; SARKIS, K.S.; MARTINI, L.A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arq Bras Endocrionol Metab**. v. 53, n. 5, p. 667-672, 2009.

GLASS, D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature Cell Biology**. v. 5, p. 87 – 90, 2003.

GLOVER, E.; YASUDA, N.; TARNOPOLSKY, M.; ABADI, A.; PHILLIPS, S. Little change in markers of protein breakdown and oxidative stress in humans in immobilization-induced skeletal muscle atrophy. Appl. Physiol. **Nutr. Metab**. v. 35, p. 125–133, 2010.

GLYNN, E.L.; FRY, C.S.; DRUMMOND, M.J.; TIMMERMAN, K.L.; DHANANI, S.; VOLPI, E.;RASMUSSEN, B.B. Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. **J Nutr.** v. 140, p. 1970–1976, 2010.

GORDON, M.M.; BOPP, M.J.; EASTER, L.; MILLER, G.D.; LYLES, M.F.; HOUSTON, D.K.; NICKLAS, B.J.; KRITCHEVSKY, S.B. Effects of dietary protein on the composi tion of weight loss in post-menopausal women**. J Nutr Health Aging**. v. 12, p. 505–9, 2008.

HAEGENS, A.; SCHOLS, A.M.; VAN ESSEN, A.L.; VAN LOON, L.J.; LANGEN, R.C. Leucine induces myofibrillar protein accretion in cultured skeletal muscle through mTOR dependent and -independent control of myosin heavy chain mRNA levels. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 56, p. 741–752, 2012.

HARLOW, M.B.; LANE, D. In Antibody. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726 p.

HASKELL, W.L.; LEE, I.M.; PATE, R.R.; POWELL, K.E.; BLAIR, S.N.; FRANKLIN, B.A.; MACERA, C.A.; HEATH, G. W.; THOMPSON, P. D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**. v. 116, p. 1081-93, 2007.

HASTEN, D.L.; PAK-LODUCA, J.; OBERT, K.A.; YARASHESKI, K.E. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78–84 and 23–32 yr olds. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 278, p. E620–E626, 2000.

HONG, S.O.; LAYMAN, D.K. Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. **J Nutr**. v.114, p.1204–1212, 1984.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature.** v. 444, p. 860-867, 2006.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell.** v. 115, p. 577–590, 2003.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. Am **J Physiol Cell Physiol.** v. 287, n. 4, p. C834-C843, 2004.

JANSSEN, I.; ROSS, R. Effects of sex on the change in visceral, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in response to weight loss. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 23, n. 10, p. 1035-46, 1999.

JOHNSON, S.C.; RABINOVITCH, P.S.; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature.** v. 17; n. 7432p. 338–345, 2013.

KLAUSEN, K.; ANDERSEN, L.S.; PELLE, I. Adaptive changes in work capacity, skeletal muscle capillarization and enzyme levels during training and detraining. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 113, p. 9–16, 1981.

KNAPIK, J.; MEREDITH, C.; JONES, B.; FIELDING, R.; YOUNG, V.; EVANS, W. Leucine metabolism during fasting and exercise. **J Appl Physiol**. v. 70, p. 43–7, 1991.

KROEMER, G.; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 9, p. 1004–1010, 2008.

KUMP, D.S.; BOOTH, F.W. Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **J Physiol.** v. 562, p. 829-38, 2005.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. mTOR signaling in growth control and disease**. Cell** v. 149, p. 274–293, 2012.

LARSON-MEYER, D.E.; HEILBRONN, L.K.; REDMAN, L.M.; NEWCOMER, B.R.; FRISARD, M.I.; ANTON, S.; SMITH, S.R.; MAPLSTAT, A.A.; RAVUSSIN, E.; and Pennington CALERIE Team. Effect of Calorie Restriction With or Without Exercise on Insulin Sensitivity, β-Cell Function, Fat Cell Size, and Ectopic Lipid in Overweight Subjects. **Diabetes Care.**v. 29, n. 6, p. 1337–1344, 2006.

LARSSON, L.; ANSVED, T. Effects of long-term physical training and detraining on enzyme histochemical and functional skeletal muscle characteristic in man. **Muscle Nerve**. v. 8, n. 8, p. 714-22, 1985.

LAYMAN, D.K.; WALKER, D.A. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. **J. Nutr**. v. 136, n. 1, p. 319S-23S, 2006.

LÉGER, B.; CARTONI, R.; PRAZ, M.; LAMON, S.; DÉRIAZ, O.; CRETTENAND, A.; et al. Akt signalling through GSK-3ß, mTOR and FoxO1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol**. v. 576, p. 923-33, 2006.

LEHNEN, A.M.; LEGUISAMO, N.M.; PINTO, G.H.; MARKOSKI, M.M.; DE-ANGELIS, K.; MACHADO, U.F.; SCHAAN, B. The beneficial effects of exercise in rodents are preserved after detraining: phenomenon unrelated to GLUT4 expression. **Cardiovascular Diabetology.** v. 9, p. 1-8, 2010.

LI, J.B.; JEFERSON, L.S. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**. v. 544, p. 351–359, 1978.

LITTLE, J.P.; PHILLIPS, S.M. Resistance exercise and nutrition to counteract muscle wasting. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**. v. 34, p. 817-828, 2009.

LIU, T.C.; LIU, Y.Y.; LEE, S.D.; HUANG, C.Y.; CHIEN, K.Y.; CHENG, I.S.; N, C.Y.; KUO, C.H. Effects of short-term detraining on measures of obesity and glucose tolerance in elite athletes. **J Sports Sci**. v. 26, p. 919-25, 2008.

LO, MS.; LIN, L.L.; YAO, W.J.; MA, M.C. Training and detraining effects of the resistance vs. endurance program on body composition, body size, and physical performance in young men**. J Strength Cond Res.** v. 25, n. 8, p. 2246-54, 2011.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; CARVALHO, C. R.; CARVALHEIRA, J. B.; PERES, S. B.; REIS, M. A.; SAAD, M. J.; BOSCHERO, A. C.; VELLOSO, L. A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**. v. 147, p. 149-57, 2002.

LYNCH, C. J.; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance **Nat. Rev. Endocrinol**. v.7, 2014.

MALEK, M.H.; OLFERT, I.M. ESPOSITO F. Detraining losses of skeletal muscle capillarization are associated with vascular endothelial growth factor protein expression in rats.Exp**. Physiol**. v. 95, p. 359–368, 2010.

MARCHESINI, G.; BIACHI, G.; ROSSI, B.; MUGGEO, M.; BONORA, E. Effects of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia on plasma amino acid levels in obese subjects with normal glucose tolerance. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 24, p. 552-558, 2000.

MARCHINI, J.S.; MORIGUTI, J.C.; PADOVAN, G.J.; NONINO, C.B.; VIANNA, S.M.L.; OLIVEIRA, J.E.D. Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: Aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. **Medicina**. v. 31, n. 1, p. 22-30, 1998.

MASCHER, H.; ANDERSSON, H.; NILSSON, P.A.; EKBLOM, B.; BLOMSTRAND, E. Changes in signalling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. **Acta Physiologica**. v. 191, p. 67–75, 2007.

MASORO, E.J. Subfield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life. Sci. SAGE KE. **Sci. Aging Knowl. Environ**., v. 2003, n. 8, p. re2, 2003.

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

MAZZUCATTO, F.; HIGA, T.S.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; EVANGELISTA, F.S. Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **Int J Clin Exp Med**. v. 7, n. 8, p. 2000-2008, 2014.

MCIVER, C.M.; WYCHERLEY, T.P.; CLIFTON, P.M. MTOR signaling and ubiquitin-proteosome gene expression in the preservation of fat free mass following high protein, calorie restricted weight loss. **Nutrition & Metabolism**. v. 9, p. 83, 2012.

MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. **Sports Med.** v. 27, n. 6, p. 347-358, 1999.

MILLER, B.F.; OLESEN, J.L.; HANSEN, M.; DOSSING, S.; CRAMERI, R.M.; WELLING, R.J.; LANGBERG, H.; FLYVBJERG, A.; KJAER, M.; BABRAJ, J.A.; SMITH, K.; RENNIE, M.J. Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. **J Physiol**. v. 567, p. 1021-1033, 2005.

MIRALLES-ARNAU, S.; NÁCHER, A.; JIMÉNEZ, A.; JIMÉNEZ-TORRES, V.N.; MERINO-SANJUÁN, M. Impact of nutritional status on the oral bioavailability of leucine administered to rats as part of a standard enteral diet. **Clinical Nutrition**. v. 30, p. 517–523, 2011.

MITTENDORFER, B.; ANDERSEN, J.L.; PLOMGAARD, P.; SALTIN, B.; BABRAJ, J.A.; SMITH, K.; RENNIE M.J. Protein synthesis rates in human muscles: neither anatomical location nor fibre-type composition are major determinants. **J Physiol**. v. 563, p. 203–211, 2005.

MOREY-HOLTON, E.R.; GLOBUS, R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. **J Appl Physiol** v. 92, p. 1367–1377, 2002.

MORGAN, T.E.; COBB, L.A.; SHORT, F.A.; ROSS, R.; GUNN, D.R. Effect of long-term exercise on human muscle mitochondria. In: Pernow B, editor. Muscle Metabolism During Exercise. New York: **Plenum.** p. 87–95, 1971.

MOURIER, A.;BIGARD, A.X.;DE KERVILER, E.;ROGER, B.;LEGRAND, H.;GUEZENNEC, C.Y. Int J Sports. Combined effects of caloric restriction and branched-chain amino acid supplementation on body composition and exercise performance in elite wrestlers. **Med**. v. 18, n. 1, p. 47-55, 1997.

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part II: Long term insufficient training stimulus. **Sports Med**. v. 30, n. 3, p. 145-54, 2000.

MUJIKA, I.; PADILLA, S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. **Sports Med**. v. 30, n. 2, p. 79-87, 2000.

NAGASAWA, T.; KIDO, T.; YOSHIZAWA, F.; ITO, Y.; NISHIZAWA, N. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. J **Nutr Biochem**. v. 13, n. 2, p. 121-127, 2002.

NAIR, K.S.; WOOLF, P.D.; WELLE, S.L.; MATTHEWS, D.E. Leucine, glucose, and energy metabolism after 3 days of fasting in healthy human subjects. **Am J Clin Nutr**. v. 46, p. 557–62, 1987.

NICASTRO,H., LUZ,C.R., CHAVES,D.F.S., BECHARA,L.R.G., VOLTARELLI,V.A., ROGERO,M.M., LANCHA JR., A.H. Branched-Chain Amino Acids Supplementation Modulate Skeletal Muscle Remodeling through Inflammation Modulation? Possible Mechanisms of Action. **Journal of Nutrition and Metabolism**. v. 2012, 2012.

NICKLIN, P.; BERGMAN, P.; ZHANG, B.; TRIANTAFELLOW, E.; WANG, H.; NYFELER, B.; YANG, H.; HILD, M.; KUNG, C.; WILSON, C.; MYER, V.E.; MACKEIGAN, J.P.; PORTER, J.A.; WANG, Y.K.; CANTLEY, L.C.; FINAN, P.M.; MURPHY, L.O. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and Autophagy.**Cell**. v. 136, p. 521–534, 2009.

ORENTREICH, N.; MATIAS, J.R.; DEFELICE, A.; ZIMMERMAN, J.A. Low methionine ingestion by rats extends life span. **J. Nutr**. v. 123, p. 269–274, 1993.

PADDON-JONES, D.; SHEFFIELD-MOORE, M.; ZHANG, X.J.; VOLPI, E.; WOLF, S.E.; AARSLAND, A.; FERRANDO, A.A.; WOLFE, R.R. Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. v. 286, p. E321–E328, 2004.

PASIAKOS, S.M., MCCLUNG, H.L.,MCCLUNG, J.P.,MARGOLIS, L.M.,ANDERSEN, N.E.,CLOUTIER, G.J.,PIKOSKY, M.A.,ROOD, J.C.,FIELDING, R.A.,YOUNG, A.J. Leucine-enriched essential amino acid supplementation during moderate steady state exercise enhances postexercise muscle protein synthesis. **Am J Clin Nut**r. v. 94, n. 3, p. 809-18, 2011.

PASIAKOS, S.M.; CAO, J.J.; MARGOLIS, L.M.; SAUTER, E.R.; WHIGHAM, L.D.; MCCLUNG, J.P.; ROOD, J.C.; CARBONE, J.W.; COMBS, G.F.JR.; YOUNG, A.J. Effects of high-protein diets on fat-free mass and muscle protein synthesis following weight loss: a randomized controlled trial **FASEB J.** v. 27, n. 9, p. 3837-47, 2013.

PEDROSO, J.A.B. Efeito da restrição calórica sobre marcadores de inflamação, homeostase glicêmica e proteínas envolvidas na sinalização da insulina em ratos destreinados. São Paulo, 2013. 80p Dissertação de mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PEDROSO, J.A.B.; NISHIMURA, L.S.; MATOS-NETO, E.M.; DONATO, J. JR.; TIRAPEGUI, J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. **Cell Biochem Funct**. v. 32, p. 326–332, 2014.

PERES, S. B.; DE MORAES, S. M.; COSTA, C. E.; BRITO, L. C.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M. A.; ALONSO-VALE, M. I.; BORGES-SILVA, C. N.; LIMA, F. B. Endurance exercise training increases insulin responsiveness in isolated adipocytes through IRS/PI3-kinase/Akt pathway. **J Appl Physiol**. v. 98, p. 1037-43, 2005.

PETIBOIS, C.; CASSAIGNE, A.; GIN, H.; DELERIS, G. Lipid profile disorders induced by long-term cessation of physical activity in previously highly endurance-trained subjects. J **Clin Endocrinol Metab**. v. 89, p. 3377-84, 2004.

PHILLIPS, S. M.; GLOVER, E. I.; RENNIE, M. J. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal Muscle. **J Appl Physiol**. v. 107, p. 645–654, 2009.

PHILLIPS, S.M. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). Appl **Physiol Nutr Metab**. v. 34, n. 3, p. 403-10, 2009.

PHILLIPS, S.M.; GREEN, H.J.; TARNOPOLSKY, M.A.; HEIGENHAUSER, G.J.; GRANT, S.M. .Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. **Am J hysiol**. v. 270, p. E265–72, 1996.

PIATTI, P.M.; MONTI, F.; FERMO, I.; BARUFFALDI, L.; NASSER, R.; SANTAMBROGIO, G.; LIBRENTI, M.C.; GALLI-KIENLE, M.; PONTIROLI, A.E.; POZZA, G. Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. **Metabolism.** v. 43, p. 1481–1487, 1994.

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.

REDMAN, L.M.; HUFFMAN, K.M.; LANDERMAN, L.R.; PIEPER, C.F.; BAIN, J.B.; MUEHLBAUER, M.J.; STEVENS, R.D.; WENNER, B.R.; KRAUS, V.B.; NEWGARD, C.B.; KRAUS, W.E.; RAVUSSIN, E. Effect of Caloric Restriction with and without Exercise on Metabolic Intermediates in Nonobese Men and Women The Journal of **Clinical Endocrinology & Metabolis**m. v. 96, n. 2, 2010.

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

RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.T.; KRYWAWYCH, S.; DAVIES, C.T.; HALLIDAY, D.; WATERLOW, J.C.; MILLWARD, D.J. Effect of exercise on protein turnover in man**. Clin. Sci**. v. 61, n. 5, p. 627-639, 1981.

RIEU, I.; SORNET, C.; BAYLE, G.; PRUGNAUD, J.; POUYET, C.; BALAGE, M.; PAPET, I.; GRIZARD, J.; DARDEVET, D. Leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats. **J Nutr**. v. 133, n. 4, p. 1198-205, 2003.

RIZZA W, VERONESE N, FONTANA L. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity? **Ageing Res Rev**. v. 13, p. 38-45, 2014.

RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D.M.; MOSTARDA, C.T.; HEEREN, M.V.; IRIGOYEN, M-C.; DE-ANGELIS, K. 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.

SAHA, A.K.; XU, X.J.; BALON, T.W.; BRANDON, A.; KRAEGEN, E.W.; RUDERMAN, N.B. Insulin resistance due to nutrient excess: Is it a consequence of AMPK downregulation? **Cell Cycle**. v. 10, p. 3447–3451, 2011.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: Molecular clonig. 2ed. New York: Cold **Spring Harbor**. p. 174-184, 1989.

SHE, P.; VAN HORN, C.; REID, T.; HUTSON, S.M.; COONEY, R.N.; LYNCH, C.J. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched chain amino acid (BCAA) metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 293, n. 6, p. E1552-63, 2007.

SHEFFIELD-MOORE, M.; YECKEL, C.W.; VOLPI, E.; WOLF, S.E.; MORIO, B.; CHINKES, D.L.; PADDON-JONES, D.; WOLFE, R.R. Postexercise protein metabolism in older and younger men following moderate-intensity aerobic exercise. **Am. J. Physiol. Endocrinol**. **Metab**. v. 287, p. E513–E522, 2004.

SHEPARD, T.Y.; WEIL, K.M.; SHARP, T.A.; GRUNWALD, G.K.; BELL, M.L.; HILL, J.O.; ECKEL, R.H. Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. **Am J Clin Nutr.** v. 73, p. 703-8, 2001.

SLATER, G.; PHILLIPS, S.M. Nutrition guidelines for strength sports: sprinting, weightlifting, throwing events, and bodybuilding. **J Sports Sci**. v. 29, p. S67–S77, 2011.

SMITH, K.; REYNOLDS, N.; DOWNIE, S.; et al. Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein. **Am J Physiol**. v. 275, p. E73–E78, 1998.

SOHAL, R.S.; FORSTER, M.J. Caloric restriction and the aging process: a critique. Free **Radical Biology and Medicine**. v. 73, p. 366–382, 2014.

STEIN, T.P.; RUMPLER, W.V.; LESKIW, M.J.; SCHLUTER, M.D.; STAPLES, R.; BODWELL, C.E. Effect of reduced dietary intake on energy expenditure, protein turnover, and glucose cycling in man. **Metabolism**. v. 40, p. 478–83, 1991.

STEIN, T.P.; SCHLUTER, M.D.; LESKIW, M.J.; BODEN, G. Attenuation of the protein wasting associated with bed rest by branched-chain amino acids. **Nutrition**. v.15, n.9, p.656-660, 1999.

SUGAWARA, T.; ITO, Y.; NISHIZAWA, N.; NAGASAWA, T. Supplementation with dietary leucine to a protein-deficient diet suppresses myofibrillar protein degradation in rats. **J Nutr Sci Vitaminol.** v. 53, n. 6, p. 552-5, 2007.

TANG, J.E.; MOORE, D.R.; KUJBIDA, G.W.; TARNOPOLSKY, M.A.; PHILLIPS, S.M. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. **J Appl Physiol**. v. 107, p. 987–992, 2009.

TANG, J.E.; PHILLIPS, S.M. Maximizing muscle protein anabolism: the role of protein quality. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v. 12, p. 66–71, 2009.

TORRES-LEAL, F. L.; FONSECA-ALANIZ, MH; TEODORO, GFR, CAPITANI, M; VIANNA, D.; PANTALEÃO, LC; MATOS-NETO, EM; ROGERO, MM; DONATO, JJ; TIRAPEGUI, J. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high‐fat diet. **Nutr. Metab**. v. 8, p. 62, 2011.

TSUBUKU, S.; HATAYAMA, K.; KATSUMATA, T.; NISHIMURA, N.; MAWATARI, K.; SMRIGA, M.; KIMURA, T. Thirteen-week oral toxicity study of branched-chain amino acids in rats**. Int J Toxicol.** v. 23, p. 119-26, 2004.

UENO, T.; EZAKI, J.; KOMINAMI, E. Metabolic contribution of hepatic autophagic proteolysis: old wine in new bottles. **Biochim Biophys Acta**. v. 1824, p. 51–58, 2012.

VILLAREAL, D.T.; SMITH, G.I.; SHAH, K.; MITTENDORFER, B. effect of weight loss on the rate of muscle protein synthesis during fasted and fed conditions in obese older adults. **Obesity**. v. 20, n. 9, p. 1780-6, 2011.

WAGENMAKERS, A.J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exerc. Sport Sci., Rev**. v. 26, p. 287-314, 1998.

WEINHEIMER, E.M.; SANDS, L.P.; CAMPBELL, W.W. A systematic review of the separate and combined effects of energy restriction and exercise on fat free mass in middle-aged and older adults: implications for sarcopenic obesity. **Nutr Rev**. v. 68, p. 375–88, 2010.

WOO, J.; SHIN, K.O.; YOO, J.; PARK, S.; KANG, S. The effects of detraining on blood adipokines and antioxidant enzyme in Korean overweight children. v. 171, p. 235-243, 2012.

YAMASHITA, A.S.; LIRA, F.S.; ROSA, J.C.; PAULINO, E.C.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; SANTOS, R.V.; BATISTA JR., M.L.; NASCIMENTO, C.O.; OYAMA, L.M.; SEELAENDER, M. Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: The effect of aerobic training and energy restriction. **Cytokine**. v. 52, n. 3, p. 168–174, 2010.

YASARI, S.; DUFRESNE, E.; PRUD'HOMME, D.; LAVOIE, J. M. Effect of the detraining status on high-fat diet induced fat accumulation in the adipose tissue and liver in female rats. **Physiol Behav**. v. 91, p. 281-9, 2007.

YASARI, S.; PAQUETTE, A.; CHARBONNEAU, A.; GAUTHIER, M.S.; SAVARD, R.; LAVOIE, J.M. Effects of ingesting a high-fat diet upon exercise-training cessation on fat accretion in the liver and adipose tissue of rats. **Appl Physiol Nutr Metab.** v. 31, n. 4, p. 367-75, 2006.

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

YOSHIZAWA, F.; KIMBALL, S.R.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab**. v. 38, p. E814–E820, 1998.

YOU, T.; SONNTAG, W.E.; LENG, X.; CARTER, C.S. Lifelong Caloric Restriction and Interleukin-6 Secretion From Adipose Tissue: Effects on Physical performance Decline in Aged Rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 62, n. 10, p. 1082-1087, 2007.

ZANCHI, N.E.; NICASTRO, H.; LANCHA, A.H. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations ofin vitro and in vivo studies. **Nutrition & Metabolism**. v. 5, p. 20, 2008.

ZEANANDIN G, BALAGE M, SCHNEIDER SM, DUPONT J, HÉBUTERNE X, MOTHE-SATNEY I, DARDEVET D. Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. **Age**. v. 34, n. 2, p. 371-87, 2012.

ANEXO

ANEXO 1: Informações para os Membros da Banca Julgadora

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

ANEXO 3: Ficha do Aluno

ANEXO 4: Currículo lattes

ANEXO 5: Artigo científico publicado

ANEXO 1: 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 argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

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

ANEXO 2: 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/38/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "**Efeito da suplementação com leucina sobre a expressão de genes e proteínas envolvidas na via da mTOR em ratos destreinados submetidos a restrição calórica**" (Protocolo CEUA/FCF/311), de responsabilidade dos pesquisadores **João Alfredo Bolivar Pedroso e Luciana Sigueta Nishimura** sob a orientação da Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de abril de 2011.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO 3: Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 5765531/1 - Luciana Sigueta Nishimura

Email:	lucianasn@usp.br
Data de Nascimento:	22/10/1983
Cédula de Identidade:	RG - 33.338.983-9 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Centro Universitário São Camilo - São Paulo - Brasil - 2007
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Nutrição Experimental
Data de Matrícula:	06/12/2010
Início da Contagem de Prazo:	06/12/2010
Data Limite para o Depósito:	08/12/2014
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 06/12/2010 até o presente. E.Mail: tirapegu@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/12/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 28/02/2013
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:	Ingressou no Doutorado em 06/12/2010 Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014
Impresso em: 11/11/14 11:33:25

ANEXO 3: Ficha do Aluno (continuação)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 5765531/1 - Luciana Sigueta Nishimura

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EFB5757-1/2	Fundamentos de Biologia Molecular (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	14/02/2011	27/02/2011	60	4	80	A	N	Concluída
FBA5729-3/2	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	01/03/2011	05/04/2011	75	5	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/2	Aprimoramento Didático	12/04/2011	09/05/2011	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	8	91,5	A	N	Concluída
EFB5759-1/1	Suplementação Nutricional Aplicada à Atividade Motora (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	28/09/2011	26/10/2011	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

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 de Acompanhamento em 17/07/2014

ANEXO 4: Currículo lattes

Luciana Sigueta Nishimura

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/5155272783739864
Última atualização do currículo em 23/11/2014

Possui graduação em Nutrição pelo Centro Universitário São Camilo. Especialista em Fisiologia do Exercício pela UNIFESP, mestre em Nutrição Humana Aplicada pela Universidade de São Paulo. Atualmente é doutoranda em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de nutrição, atuando principalmente nos temas: nutrigenômica e bioquímica de aminoácidos no exercício físico. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Luciana Sigueta Nishimura
Nome em citações bibliográficas	NISHIMURA, L.S;NISHIMURA, LUCIANA SIGUETA

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. Avenida Professor Lineu Prestes, 580 bloco 14 Cidade Universitária 05508900 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913309

Formação acadêmica/titulação

2010	Doutorado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeito da suplementação com leucina sobre a expressão de genes e proteínas envolvidas na via da mTOR em ratos destreinados, Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
2008 - 2010	Mestrado em Nutrição Humana Aplicada (Conceito CAPES 3). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Polimorfismo PRO198LEU no gene para a enzima antioxidante dependente de selênio glutationa peroxidase 1 e risco de câncer epidermóide da cavidade oral e orofaringe,Ano de Obtenção: 2010. Orientador: Thomas Prates Ong. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
2007 - 2009	Especialização em Fisiologia do Exercício. Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil. Título: Suplementação de vitamina C e vitamina E no combate do estresse oxidativo no exercício físico.
2003 - 2007	Graduação em Nutrição. Centro Universitário São Camilo - Campus Pompeia, SAO CAMILO, Brasil. Título: Avaliação antropométrica de gestantes fisicamente ativas 2007. Orientador: Luciana Rossi.

ANEXO 4: Currículo lattes (continuação)

Formação Complementar

2003 - 2003

Monitoria : Fundamentos de Química Orgânica. (Carga horária: 72h).
Centro Universitário São Camilo.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2007

Vínculo: livre, Enquadramento Funcional: pesquisa científica, Regime: Dedicação exclusiva.

Projetos de pesquisa

2010 - 2014

Efeito da suplementação com leucina sobre a expressão de genes e proteínas envolvidas na via da mTOR em ratos destreinados

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Luciana Sigueta Nishimura - Coordenador.

2008 - Atual

Polimorfismos em genes para enzimas antioxidantes dependentes de micronutrientes, estresse oxidativo e risco de câncer de cabeça e pescoço

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Luciana Sigueta Nishimura - Coordenador.

2006 - 2007

Ingestão alimentar de selênio por adultos com hipotiroidismo e hipertiroidismo no Estado de São Paulo

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Luciana Sigueta Nishimura - Integrante / Silvia Maria Franciscato Cozzolino - Coordenador / Carla Soraya Costa Maia - Integrante / Liliane Viana Pires - Integrante / José Alexandre Coelho Pimentel - Integrante.
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Outros Projetos

Estado nutricional relativo ao Selênio de pacientes com distúrbios da tireóide.

Situação: Desativado; Natureza: Outra.

Integrantes: Luciana Sigueta Nishimura - Integrante / Silvia Maria Franciscato Cozzolino - Integrante / Carla Soraya Costa Maia - Coordenador.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

Áreas de atuação

ANEXO 4: Currículo lattes (continuação)

1.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Análise Nutricional de População.

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.
Japonês	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Livros publicados/organizados ou edições

1. **NISHIMURA, LS** ; SILVA, KG ; GARCÊZ, LS ; FEITOSA, MM ; AMARAL, Ananda Teixeira do . 1000 Questões comentadas de provas e concursos em Nutrição. 1. ed. Salvador: Sanar, 2014. v. 1. 734p .

Capitulos de livros publicados

1. PEDROSO, J. A. B. ; **NISHIMURA, LS** ; CASTRO, I ; TIRAPEGUI, J. . Alimentos funcionais - considerações gerais. In: Julio Tirapegui. (Org.). Nutrição Fundamentos e Aspectos Atuais. 3ed.: , 2013, v. , p. 329-.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **NISHIMURA, LS** ; PEDROSO, J. A. B. ; MATOS-NETO, E. M. ; TRINDADE, M. ; TIRAPEGUI, J. . Chronic physical training modulates inflammatory response in healthy adults rats. In: ACSM 59th Annual Meeting, 2012, San Francisco. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2012. v. 44.

2. PEDROSO, J. A. B. ; **NISHIMURA, LS** ; MATOS-NETO, E. M. ; MOREIRA, R. L. L. ; AZEVEDO, L. B. ; PECCHIO, D. . Efeito da restrição caloric sobre variação do peso, composição corporal e sensibilidade à insulina em ratos destreinados. In: IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2012, Londrina. IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2012.

3. PEDROSO, J. A. B. ; **NISHIMURA, LS** ; MATOS-NETO, E. M. ; MOREIRA, R. L. L. ; AZEVEDO, L. B. ; PECCHIO, D. ; TIRAPEGUI, J. . Effect of 8 weeks of aerobic training on inflammation in sprague dawley rats. In: 17th annual Congress of the European College of Sports Science, 2012, Bruges. Congress of the European College of Sports Science, 2012.

4. **NISHIMURA, LS** ; PEDROSO, J. A. B. ; MATOS-NETO, E. M. ; MOREIRA, R. L. L. ; AZEVEDO, L. B. ; PECCHIO, D. ; TIRAPEGUI, J. . Effect of leucine supplementation on body composition in detrained rats. In: 1 Simpósio Brasileiro de Genômica Esporte, 2012. 1 Simpósio Brasileiro de Genômica Esporte, 2012.

5. PEDROSO, J. A. B. ; **NISHIMURA, LS** ; MATOS-NETO, E. M. ; MOREIRA, R. L. L. ; AZEVEDO, L. B. ; PECCHIO, D. ; TIRAPEGUI, J. . Effect of caloric restrinction in the body fat depots and inflammatory protein in detrained rats. In: 1 Simpósio Brasileiro de Genômica Esporte, 2012. 1 Simpósio Brasileiro de Genômica Esporte, 2012.

Artigos aceitos para publicação

1. PEDROSO, JOÃO ALFREDO B. ; **NISHIMURA, LUCIANA SIGUETA** ; DE MATOS-NETO, EMÍDIO MARQUES ; DONATO, JOSE ; TIRAPEGUI, JULIO . Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism

ANEXO 4: Currículo lattes (continuação)

Apresentações de Trabalho

1. ☆ **NISHIMURA, LS** . Beta-alanina, Glutamina, BCAA e Arginina Evidências Científicas . 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2. **NISHIMURA, LS** ; PEDROSO, J. A. B. ; MATOS-NETO, E. M. ; Cruz, CG ; PIRES, Ivanir Santana de Oliveira ; TIRAPEGUI, JULIO . Leucine supplementation does not change expression of proteins involved in the signaling pathways for protein synthesis in detrained rats under caloric restriction. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. ☆ **NISHIMURA, LS** ; MAJA, C. S. C. ; PIRES, L. V. ; PIMENTEL, J. A. C. ; COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato . Ingestão alimentar de selênio por adultos com hipotiroidismo e hipertiroidismo no Estado de São Paulo. 2007. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 19th annual Congress of the European College Of Sport Science. Leucine supplementation does not change expression of proteins involved in the signaling pathways for protein synthesis in detrained rats under caloric restriction. 2014. (Congresso).

2. III Meeting Brasileiro de Nutrição Esportiva. 2014. (Encontro).

3. XVII Congresso Brasileiro de nutrologia. 2013. (Congresso).

4. Congresso Brasileiro de nutrição e exercício. 2013. (Congresso).

5. 1 Simpósio Brasileiro de Genômica e Esporte.Effect of leucine supplementation on body composition in detrained rats. 2012. (Simpósio).

6. II Congresso Paulista de Nutrição Esportiva. 2010. (Congresso).

7. 7 Congresso Internacional GSSI - Nutrição e atividade física: A teoria que funciona na prática. 2010. (Congresso).

8. XIV COngresso Brasileiro de Nutrologia. 2010. (Congresso).

9. VII Congresso Paulista de Nutrição Clínica e VI Congresso Paulista de Nutrição humana e I Congresso Paulista de Nutrição Esportiva. 2009. (Congresso).

10. XII Congresso Brasileiro de Nutrologia, XIII COnferência sobre obesidade, V Conferência de Direito Humano à Alimentação Adequada, VI Annual Meeting International Colleges for Advancements of Nutrition. 2008. (Congresso).

11. 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals. Análise comparativa da determinação de selênio em dieta de pacientes com hipotiroidismo e hipertiroidismo do estado de São Paulo - Brasil. 2008. (Congresso).

12. 13th International Meeting on Trace Elements im Man and Animals. Estado nutricional relativo ao selênio em adultos saudáveis so estado de Sao Paulo - Brasil. 2008. (Congresso).

13. Boas Práticas de Laboratório. 2008. (Seminário).

ANEXO 4: Currículo lattes (continuação)

14. Espectrometria de Absorção Atômica da Alta Resolução. Fundamento e Aplicações. 2008. (Simpósio).

15. II Curso de Biologia Molecular. 2008. (Outra).

16. 9 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. 2007. (Congresso).

17. III Simpósio sobre Ácidos Graxos e Saúde. 2007. (Simpósio).

18. I Simpósio de Pesquisa e Ensino em Nutrigenômica. 2007. (Simpósio).

19. " O papel da nutrição no crescimento e desenvolvimento infantil". 2007. (Encontro).

20. Workshop Estilos de Vida Saudáveis - Dieta relacionada à prática de atividade física. 2007. (Outra).

21. XIX Congresso Brasileiro de Nutrição. 2006. (Congresso).

22. III Fórum de discussões "Consumo alimentar de micronutrientes". 2006. (Outra).

23. Curso Pré-Congresso 1 "Atualização em Nutrição Esportiva". 2006. (Outra).

24. II Congresso Paulista de Nutrição Humana. 2005. (Congresso).

25. III Congresso Paulista de Nutrição Clínica. 2005. (Congresso).

26. Palestra "Uma breve revisão sobre os alérgenos de origem alimentar". 2005. (Outra).

27. III Fórum Nacional Support de Atualização em Diabetes. 2005. (Outra).

28. Curso Nutrição e Esporte: uma abordagem bioquímica. 2005. (Outra).

29. II Curso Prático de Nutrição Esportiva RGnutri. 2005. (Outra).

30. Treinamento em Base de Dados. 2005. (Outra).

31. Módulo de Educação Continuada - Nutrição Clínica. 2005. (Outra).

32. Workshop: " Nutrição Esportiva: Hidratação e Suplementação na Atividade Física". 2004. (Outra).

33. VI SIMPONUTRI - A Sustentabilidade da Qualidade de Vida. 2003. (Simpósio).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 24/11/2014 às 16:06:28

Imprimir currículo

ANEXO 5: Artigo científico publicado

CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION
Cell Biochem Funct 2014; **32**: 326–332.
Published online 11 December 2013 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) **DOI**: 10.1002/cbf.3017

Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats

João Alfredo B. Pedroso[1,2], Luciana Sigueta Nishimura[1], Emídio Marques de Matos-Neto[3], Jose Donato Jr.[2] and Julio Tirapegui[1]*

[1]*Department of Food Science and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*
[2]*Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*
[3]*Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

Several studies have highlighted the potential of leucine supplementation for the treatment of metabolic diseases including type 2 diabetes and obesity. Caloric restriction is a common approach to improve the health in diabetic and obese subjects. However, very few studies assessed the effects of leucine supplementation in calorie-restricted animals. Rats were subjected to a 30% calorie-restricted diet for 6 weeks to study the effects of leucine supplementation on protein status markers and lipid metabolism. Caloric restriction reduced the body weight. However, increased leucine intake preserved body lean mass and protein mass and improved protein anabolism as indicated by the increased circulating levels of albumin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and the liver expression of albumin and IGF-1 messenger RNA. Leucine supplementation also increased the circulating levels of interleukin-6 and leptin but did not affect the tumour necrosis factor-α and monocyte chemotactic protein-1 concentrations. Ketone bodies were increased in rats consuming a leucine-rich diet, but we observed no changes in cholesterol or triglycerides concentrations. Caloric restriction reduced the liver expression of peroxisome proliferator activated receptor-α and glucose-6-phosphatase, whereas leucine supplementation increased the liver expression of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA) reductase and sterol regulatory element-binding transcription factor 1. A leucine-rich diet during caloric restriction preserved whole body protein mass and improved markers of protein anabolism. In addition, leucine modulated the hepatic lipid metabolism. These results indicate that increased leucine intake may be useful in preventing excessive protein waste in conditions of large weight loss. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS—branched-chain amino acids; interleukin-6; caloric restriction; IGF-1; albumin; supplementation

INTRODUCTION

Amino acids are essential nutrients that serve as substrates for the synthesis of proteins and many other molecules. In addition, the carbon skeletons of the amino acids can be important sources of energy and glucose. Some amino acids also possess ergogenic properties, which makes them possible therapeutic nutritional supplements. Among all amino acids, the branched-chain amino acid leucine has received special attention because of its ability to stimulate protein synthesis and to affect metabolism.[1,2] Cells have a leucine sensor that activates the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-signalling pathway as a function of leucine availability.[3] mTORC1 acts as a key regulator of protein translation.[4] Therefore, leucine represents an important nutritional signal to initiate protein synthesis through the activation of mTORC1 complex.[5] Several studies have investigated whether leucine supplementation is able to improve protein balance during catabolic conditions. For instance, a leucine-supplemented diet preserved total carcass nitrogen and increased protein synthesis in skeletal muscle of rats bearing Walker 256 tumours, which is a condition resembling cachexia.[6,7] In addition, postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats was restored with a leucine-supplemented meal,[8] suggesting that leucine-rich diets could be helpful in preventing muscle protein wasting during ageing.[9,10] Leucine supplementation also improves the nitrogen balance and markers of protein nutritional status during conditions of protein malnutrition[11,12] or food restriction[13–15] In addition, leucine supplementation improves glucose and cholesterol metabolism in animals consuming a high-fat diet.[16–19] Finally, several studies have highlighted the therapeutic potential of leucine supplementation for the prevention or treatment of metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus and obesity.[20,21] However, despite the fact that caloric restriction is the most widely used non-pharmacological method to improve health in diabetic and obese subjects, very few studies have evaluated the consequences of leucine supplementation in calorie-restricted animals. Thus, the objective of the present study was to determine whether increased leucine intake has a positive impact on protein status and lipid metabolism markers in rats subjected to a 30% calorie-restricted diet.

*Correspondence to: Julio Tirapegui, Department of Food Science and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580, bloco 14, São Paulo 05508-900, Brazil.
E-mail: tirapegu@usp.br

Received 6 June 2013
Revised 5 September 2013
Accepted 26 October 2013

Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.