

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

**Suplementação aguda com leucina reduz marcador de lesão
muscular em ratos não treinados submetidos a uma sessão aguda
de exercício físico até a exaustão**

Tatyana Dias de Paula

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2011

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

Paula, Tatyana Dias de
P324s Suplementação aguda com leucina reduz marcador de lesão
muscular em ratos não treinados submetidos a uma sessão aguda
de exercício físico até a exaustão / Tatyana Dias de Paula. --
São Paulo, 2011.
52p.

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

Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando

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

641.1 CDD

Tatyana Dias de Paula

**Suplementação aguda com leucina reduz marcador de lesão
muscular em ratos não treinados submetidos a uma sessão aguda
de exercício físico até a exaustão**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha irmã Cinthia que viveu tudo isso comigo desde o início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu força, saúde e me fez acreditar ser capaz de chegar até aqui.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Julio Tirapegui pela oportunidade de me deixar fazer parte de uma equipe como esta.

Aos Lucas da minha vida...

Ao meu marido, Lucas Cunha agradeço a compreensão de minha ausência, o amor e o carinho que me dá todos os dias; ao meu grande amigo Lucas Pantaleão, pela sincera amizade já de uma década e pelo apoio incondicional.

À minha família agradeço por me apoiarem nesse desejo de seguir em frente com os estudos.

O meu MUITO OBRIGADA aos amigos que me ajudaram na execução direta desse trabalho, ou indiretamente, com uma palavra, um gesto e ainda mais aqueles que não me deixaram desistir!

Esta longa jornada ainda está longe de acabar e espero sempre poder contar com TODOS vocês, que estiveram ao meu lado nessa caminhada!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

PAULA, T.D. **Suplementação aguda com leucina reduz marcador de lesão muscular em ratos não treinados submetidos a uma sessão aguda de exercício físico até a exaustão.** São Paulo, 2011. [Defesa de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

RESUMO

SUPLEMENTAÇÃO AGUDA COM LEUCINA REDUZ MARCADOR DE LESÃO MUSCULAR EM RATOS NÃO TREINADOS SUBMETIDOS A UMA SESSÃO AGUDA DE EXERCÍCIO FÍSICO ATÉ A EXAUSTÃO

Estudos recentes têm associado à prática de exercício físico de alta intensidade e de forma inabitual a alterações musculares que incluem lesões estruturais das miofibras. Nessa perspectiva, a suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) destaca-se como uma estratégia eficaz no controle do dano celular e na promoção da recuperação muscular. Uma vez que, dentre os BCAA, a leucina é o que apresenta maior influência sobre a regulação de mecanismos anabólicos que incluem o estímulo ao aumento da taxa de tradução de RNAm mediado pela proteína quinase mTOR, se especula quais os possíveis efeitos da sua suplementação isolada em um modelo de exercício físico extenuante e inabitual. Buscamos então, com o presente estudo, avaliar o efeito da suplementação com leucina sobre as concentrações séricas de creatina quinase – marcadores de lesão muscular – e sobre a expressão e fosforilação das proteínas mTOR, 4E-BP1, S6K1, IKK, I κ B- α , NF- κ B – componentes de vias envolvidas na síntese de proteínas e da inflamação – no músculo esquelético de ratos adultos não treinados, submetidos a uma sessão de exercício até a exaustão. Para tanto, 48 ratos machos adultos da linhagem *Sprague-Dawley* foram distribuídos em 10 grupos, sendo que T3L, T48L e T72L receberam suplementação com leucina [leucina (135 mg/100 g) e T3A, T48A e T72A receberam uma mistura de aminoácidos não essenciais (135 mg/100 g)] ao final de uma sessão de exercício físico agudo até a exaustão; T3E, T48E e T72E – não receberam suplementação e foram submetidos ao protocolo de exercício; o grupo controle não recebeu suplementação e não foi submetido ao protocolo de exercício. Em seguida os animais foram eutanasiados 3, 48 e 72 horas após o término do exercício para análise dos marcadores investigados. Entre os parâmetros avaliados houve diferença significativa na atividade da creatina quinase entre os grupos TL3 e TL4. No entanto os marcadores biomoleculares não apontaram diferenças entre os grupos. No entanto a fosforilação do NF- κ B da fração nuclear demonstrou uma tendência a ser menor nos grupos suplementados com leucina e o mesmo acontece com a MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos). Visto isso, podemos concluir que, em nossas condições experimentais, as vias de sinalização estudadas estavam envolvidas na diminuição da atividade da creatina quinase, porém, nossos resultados apontam que a suplementação com leucina pode estar envolvida em mecanismos que atenuem o dano celular após o exercício agudo em ratos não treinados.

Palavras chave: Leucina; exercício agudo; creatina quinase.

PAULA, T.D. **Acute supplementation with leucine lowers marker of muscle damage in untrained rats after a single acute bout of exercise to exhaustion.** São Paulo, 2011. [Master's degree dissertation - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo].

ABSTRACT

ACUTE SUPPLEMENTATION WITH LEUCINE LOWERS MARKER OF MUSCLE DAMAGE IN UNTRAINED RATS AFTER A SINGLE ACUTE BOUT OF EXERCISE TO EXHAUSTION

Recent studies have associated infrequent exercise of high intensity to muscle changes that include structural lesions in myofibres. The supplementation of branched chain aminoacids (BCAA) stands out as an effective strategy in controlling the cell damage and promoting muscle recovery. As leucine is the BCAA exerting more influence on the regulation of anabolic mechanisms that include stimulating the increase of mRNA translation rate mediated by the protein kinase mTOR, it is speculated the potential effects of leucine supplementation alone in a model of strenuous and infrequent exercise. In the present study, we evaluate the effect of leucine supplementation on serum levels of creatine kinase – marker of muscle damage – and on the expression and phosphorylation of proteins mTOR, 4E-BP1, S6K1, IKK, I κ B- α , NF- κ B – components of pathways involved in protein synthesis and inflammation – in the skeletal muscle of untrained adult rats, after a single acute bout of exercise to exhaustion. Forty eight adult male *Sprague-Dawley* rats were divided into 10 groups: T3L, T48L and T72L groups were given leucine supplementation [leucine (135 mg/100 g), and T3A, T48A and T72A groups were given a mix of non-essential aminoacids (135 mg/100 g)] at the end of the acute bout of exercise to exhaustion; T3E, T48E and T72E groups did not receive supplementation and underwent the exercise protocol; control group was not given supplementation nor exercise protocol. The animals were killed 3, 48 and 72 hours after the end of exercise to analyze the markers under study. Among the parameters assessed, there was a significant difference in the activity of creatine kinase between groups TL3 and TL4. However, no differences were seen in the biomolecular markers between groups. Nevertheless, the nuclear fraction of NF- κ B phosphorylation tended to be lower in the groups supplemented with leucine and the same was seen with MCP-1 (monocyte chemoattractant protein). Taken together, we conclude that the signalling pathways studied, in our experimental condition, do not seem to be involved in the reduced activity of creatine kinase; conversely, our results indicate that leucine supplementation may be involved in mechanisms attenuating cellular damage after a single acute bout of exercise in untrained rats.

Keywords: Leucine; acute exercise; creatine kinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo da leucina, cetoisocaproato e HMB.....	16
Figura 2: Alvos da leucina na via da mTOR.....	17
Figura 3: Desenho experimental.....	27
Figura 4: Atividade de creatina kinase no soro dos animais experimentais.....	37
Figura 5: Concentração sérica de IL-6 dos animais experimentais...	41
Figura 6: Concentração sérica de MCP-1 dos animais experimentais.....	42
Figura 7: Fosforilação do NF-kB da fração nuclear do músculo sóleo.....	43
Figura 8: Blotting representatido da fosforilação do NF-kB da fração nuclear do músculo sóleo.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da ração fornecida aos animais durante o experimento.....	24
Tabela 2: Composição de aminoácidos da gavagem isonitrogenada	26
Tabela 3. Massa corporal dos animais	36
Tabela 4: Tempo de exaustão dos animais exercitados.....	37
Tabela 5: Consumo de ração dos animais dos grupos que receberam gavagem.....	37
Tabela6: Comparação entre tempo e suplementação.....	39
Tabela 7: Expressão das proteínas avaliadas nos grupos T3A e T3L.....	44
Tabela 8: Expressão das proteínas avaliadas nos grupos T48A e T48L.....	45
Tabela 9. Expressão das proteínas avaliadas nos grupos T72A e T72L.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
4E-BP1	Proteína ligadora 1 do fator de iniciação eucariótico
eIF4E	Fator de iniciação eucariótico 4E
eIF4F	Fatores de iniciação eucarióticos 4F
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
S6K1	Proteína ribossomal S6 quinase-1 de 70 kDa
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Revisão bibliográfica.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MÉTODOS.....	21
4.1 Condições experimentais.....	21
4.1.1 Animais.....	21
4.1.2 Grupos experimentais.....	21
4.1.3 Ração.....	23
4.1.4 Suplementação.....	25
4.1.5 Protocolo de exercício.....	26
4.1.6 Desenho experimental.....	27
4.1.7 Eutanásia.....	28
4.2 ANÁLISES.....	29
4.2.1 Marcadores séricos.....	29
4.2.1.1 Creatina quinase.....	29
4.2.1.2 Citocinas.....	30
4.2.1 Parâmetros teciduais.....	31
4.2.1.1 Determinação da concentração de proteínas teciduais no músculo esquelético.....	31
4.2.2 <i>Western Blotting</i>	31
4.2.2.1 Extração de proteínas.....	31
4.2.2.2 Preparo do gel de poliacrilamida.....	32
4.2.2.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e “ <i>Western blotting</i> ”	33

4.2.2.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)	33
4.2.2.5 Sondagens das proteínas com anticorpos.....	33
4.2.2.6 Revelação com sistema Quimioluminescente.....	34
4.2.2.7 Quantificação do blotting.....	34
4.3 ESTATÍSTICA.....	35
5. RESULTADOS.....	36
6.1 Parâmetros biométricos.....	36
6.1.1 Massa corporal dos animais.....	36
6.1.2 Tempo de exaustão.....	37
6.1.3 Consumo de ração.....	37
6.2 Marcadores fisiológicos.....	38
6.2.1 Atividade da creatina quinase.....	38
6.2.2 Concentração sérica de IL-6.....	41
6.2.3 Concentração sérica de IL-10 e TNF- α	42
6.2.4 Concentração sérica de MCP-1.....	43
6.3 Parâmetros teciduais.....	44
6.3.1 <i>Western Blotting</i>	45
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A prática regular de atividade física está intimamente ligada com a menor morbidade e mortalidade. No entanto, o exercício inabitual pode trazer alterações fisiológicas indesejáveis, tais como, lesões de pequenas áreas de fibras musculares, que podem ser observadas imediatamente após o exercício. Essa lesão se torna mais extensiva durante as primeiras 48-72 horas pós-exercício e, decorrentes desse processo, as citocinas inflamatórias podem ser detectadas a partir de 3 horas.

De maneira indireta, o dano muscular pode ser investigado através de proteínas musculares mensuradas no sangue, dentre as quais, se destaca a atividade da enzima creatina quinase, frequentemente utilizada como um marcador de lesão celular (Marqueste *et al.*, 2008).

O exercício é responsável pela síntese e a secreção de diversas citocinas pelo músculo esquelético, cuja expressão e secreção são estimuladas especialmente no exercício intenso. Além disso, já foi demonstrado que a contração muscular é responsável pela ativação e regulação de alguns alvos moleculares que serão estudados no presente trabalho (Ji *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Glass, 2003).

Nesse contexto a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada tem se mostrado uma estratégia eficiente em diminuir os marcadores de lesão muscular (Greer *et al.*, 2007; Mero *et al.*, 2009). E com este intuito o presente estudo pretende avaliar o efeito da suplementação com leucina em marcadores de lesão muscular.

1.1 Revisão Bibliográfica

O exercício físico, quando praticado de forma regular, é determinante para a aquisição de um estilo de vida saudável, se comportando como um agente terapêutico e/ou de prevenção para numerosas situações de morbidade, com a

consequente diminuição da mortalidade que lhes está associada (Aldana *et al.*, 2005; Donnelly *et al.*, 2009; Hawley e Holloszy, 2009; Roumen *et al.*, 2009). No entanto, em oposição aos seus potenciais efeitos benéficos, o exercício físico agudo pode também induzir alterações fisiológicas indesejáveis se praticado de forma não habitual e exaustiva. Tais alterações ocorrem especialmente quando os diferentes tecidos, órgãos ou sistemas não se encontram suficientemente adaptados para suportar, sem grandes alterações homeostáticas, os diferentes tipos de sobrecarga que lhes são exigidos (Booth *et al.*, 2008; Rogero *et al.*, 2005).

Recentemente, estudos experimentais envolvendo seres humanos e modelos animais têm associado à prática de exercício físico de alta intensidade às alterações musculares posteriores (Marqueste *et al.*, 2008; Uchida *et al.*, 2009). Nessa perspectiva, a lesão muscular esquelética promovida pelo exercício físico pode variar de uma lesão ultraestrutural de fibras musculares, até traumas envolvendo a completa ruptura do músculo, possivelmente decorrente da ruptura de tecidos conectivos ligados a miofibrilas adjacentes à própria célula muscular, da lâmina basal adjacente à membrana plasmática, da membrana plasmática da célula muscular, do sarcômero, do retículo sarcoplasmático, ou ainda de uma combinação desses componentes (Cruzat *et al.*, 2007).

Lesões de pequenas áreas de fibras musculares podem ser observadas imediatamente após o exercício; no entanto, a lesão se torna mais extensiva durante as primeiras 48-72 horas pós-exercício, já os mediadores inflamatórios podem ser detectados em 3 horas após o exercício (Marqueste *et al.*, 2008). Indiretamente, evidências podem ser obtidas por meio de proteínas musculares mensuradas no sangue, dentre as quais destacamos as concentrações sanguíneas de mioglobina e as das enzimas lactato desidrogenase e creatina quinase que, normalmente, são incapazes de atravessar a membrana plasmática (Fell e Williams, 2008). O aumento na concentração dessas proteínas pode ser um marcador de necrose celular e de danos teciduais seguidos de lesões musculares agudas e crônicas (Brancaccio *et al.*, 2008; Rogero e Tirapegui, 2008).

A contração muscular provoca aumento transitório de RNAm de genes específicos induzidos pelo exercício dentro de 3 a 12 horas pós-exercício e retorna ao basal em 24 h (Psilander *et al.*, 2003; Bickel *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Contudo, além das alterações acima descritas, uma única sessão de exercício intenso e/ou prolongado pode promover a síntese e a secreção de diversas proteínas pelo músculo esquelético. Dentre essas proteínas, destacamos a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), cuja expressão e secreção são estimuladas no exercício intenso (Pedersen e Pedersen, 2005; Gleeson, 2007; Pedersen *et al.*, 2007; Rosa Neto *et al.*, 2009).

Parte desses efeitos pode ser atribuída à ativação de um fator de transcrição conhecido como fator transcricional nuclear kappa B (NF- κ B), que estimula a síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), de interleucina 6 (IL-6) e de proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) pelos miócitos, provocando a inflamação associada ao exercício agudo. Assim, o NF- κ B pode ser considerado potente estimulador da inflamação e do metabolismo de proteínas no músculo esquelético (Kramer e Goodyear, 2007; Mourkioti e Rosenthal, 2008; Chiang *et al.*, 2009). Nesse sentido, alguns autores verificaram que a contração muscular é responsável pela ativação e regulação do NF- κ B no tecido muscular, além de induzir a síntese de proteínas de fase aguda (Ji *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005).

A família do NF- κ B é constituída por cinco membros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) e p52/p100 (NF- κ B2). No citoplasma de células musculares o NF- κ B está na forma inativa, pois se encontra ligado ao I- κ B α . As citocinas pró-inflamatórias ou o estresse oxidativo estimulam a fosforilação do I- κ B α e, posteriormente, sua degradação pelo proteassoma 26S (Li e Verma, 2002). Na ausência do I- κ B α , o NF- κ B se torna ativo e é translocado para o núcleo da célula, onde inicia o processo de transcrição de genes envolvidos com a regulação de resposta imune, crescimento e morte celular (Cai *et al.*, 2004; Hayden e Ghosh, 2004).

O controle desse fator de transcrição é frequentemente realizado pela IK-quinase (IKK) através da fosforilação da I κ B, com subsequente ubiquitinação e degradação, promovendo translocação e acúmulo nuclear de dímeros de NF- κ B (Hayden e Ghosh 2004).

No período de recuperação pós-exercício há o retorno dos sistemas corporais à sua condição basal, determinando a homeostase; portanto, a negligência ao tempo necessário para restauração de substratos utilizados durante o esforço –

antes da submissão a um novo estímulo – caracteriza uma condição inadequada, pois impede que o organismo se mantenha em estado ótimo para realização da prática atlética, limitando o desempenho e aumentando os riscos de lesões (Cheung *et al.*, 2003; Barnett, 2006; Pastre *et al.*, 2009).

Algumas estratégias têm sido utilizadas com o intuito de reduzir os danos musculares e as concentrações de enzimas, tais como a creatina quinase, resultantes do exercício. Nessa perspectiva, a suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (*Branched-Chain Amino Acids* – BCAA), entre outros usados no esporte (BRANCACCIO *et al.*, 2008), tem se destacado como uma estratégia para reduzir os danos celulares causados pelo exercício. A suplementação de BCAA reduz a extensão do dano muscular, medido através da concentração de hormônios catabólicos no plasma, como cortisol, e inibe a proteólise (Greer *et al.*, 2007; Mero *et al.*, 2009), além de favorecer a recuperação muscular e minimizar a dor tardia provocada pelo exercício (Shimomura *et al.*, 2006).

Dentre os BCAA, a leucina é o mais estudado nesse contexto, assim como seus metabólitos (figura 1) – dentre eles o β -metil β -hidroxibutirato (HMB), devido à sua importância na recuperação muscular (Norton & Layman, 2006) e aos seus efeitos anabólicos no tecido muscular esquelético (figura 2). No estudo de Anthony *et al.*, (1999), os pesquisadores verificaram aumento na capacidade de recuperação muscular em ratos submetidos a treinamento físico quando suplementados apenas com esse aminoácido. Estudos *in vitro* utilizando miócitos dos músculos esquelético e cardíaco mostraram ainda que os efeitos no estímulo da síntese e na inibição da degradação protéica observados nestes tecidos foram também obtidos com o

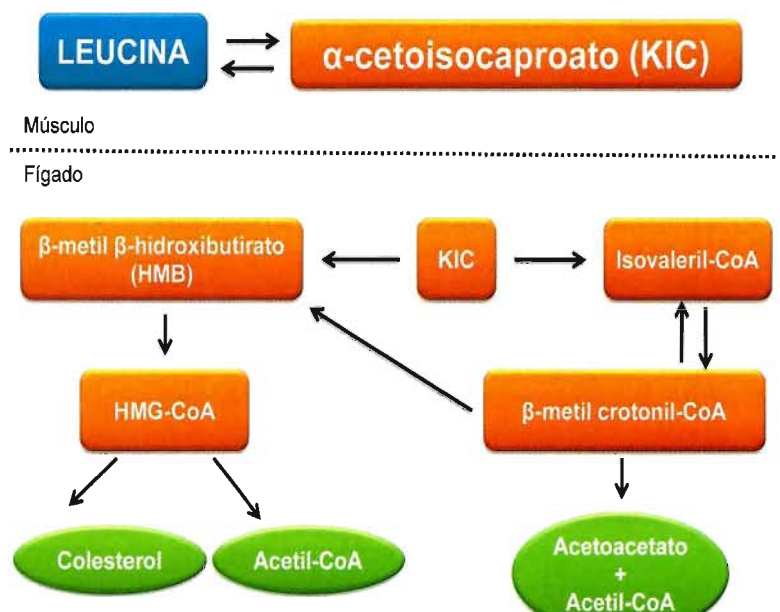


Figura 1: Metabolismo da leucina, cetoisocaproato e HMB. Adaptado de Mendes e Tirapegui, 2005

uso dos BCAA ou da leucina administrados isoladamente (Rossi e Tirapegui, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006).

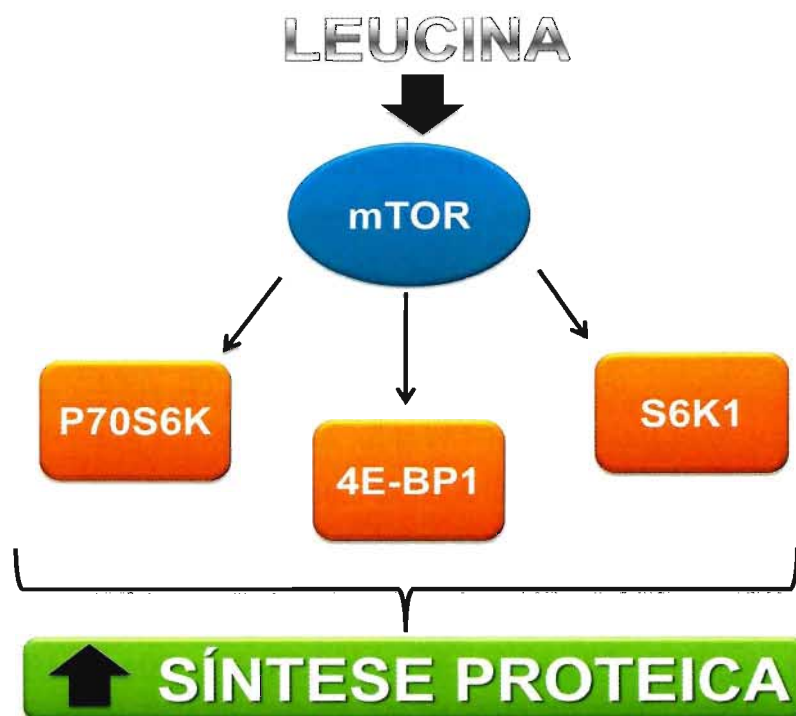


Figura 2: Alvos da leucina na via da mTOR

Recentemente, vários estudos têm sido realizados com o intuito de promover avanços no conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na regulação nutricional e da síntese protéica promovida pela leucina (Anthony *et al.*, 2000; 2001; Lynch *et al.*, 2002; Kimball e Jefferson, 2006). Estudos mostram aumento de síntese de proteína no músculo esquelético através da suplementação de leucina via oral (Kimball e Jefferson, 2002; Crozier *et al.*, 2005). Nesse sentido, Lynch (2002) realizou a suplementação de leucina adicionada em água (via oral) em ratos e verificou os efeitos dessa suplementação crônica após 12 dias na síntese protéica em vários tecidos, como músculo esquelético, coração, tecido adiposo e outros. No músculo esquelético, Lynch (2002) observou que a suplementação de leucina foi acompanhada pelo aumento da síntese protéica.

Outros trabalhos verificaram que os aminoácidos não aumentam a síntese protéica simplesmente pelo aumento da disponibilidade de substrato (Vary *et al.*, 2005). A relação entre leucina e manutenção do tecido muscular esquelético pode ser explicada por estudos que propuseram uma função regulatória na iniciação da tradução de RNAm na síntese protéica exercida por esse aminoácido (Anthony *et al.*, 2001; Bolster, 2004; Kimball e Jefferson, 2006). A leucina exerce os seus efeitos em nível pós-transcricional e, mais comumente, durante a fase de iniciação da tradução do RNA-mensageiro em proteína. O mecanismo pelo qual a leucina estimula a tradução de proteínas está relacionado ao fato do aumento da concentração intracelular desse aminoácido promover a ativação de uma proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos (Mammalian Target of Rapamycin – mTOR) que é estimulada na presença de mitógenos, como insulina e nutrientes, incluindo os aminoácidos, sobretudo a leucina (Dennis *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que a ingestão de misturas de aminoácidos essenciais ricos em leucina promove aumento na ativação da cascata de sinalização mediada pela mTOR na recuperação de ratos no período pós-exercício, demonstrando o importante papel deste aminoácido na recuperação das lesões do músculo esquelético após a atividade física (Dreyer *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Mero e colaboradores (2009), foi verificado que o pico da concentração plasmática de leucina, após suplementação de 50 mg/Kg de peso, ocorre em 90 minutos; esse mesmo tempo de pico foi encontrado por outros pesquisadores (NORTON *et al.*, 2009).

O mTOR ativado hiperfosforila a proteína ligadora 1 do fator de iniciação eucariótico E (4E-BP1) que libera o fator de iniciação eucariótico E (eIF4E), favorecendo a montagem do complexo ribossomal eIF4F, componente essencial na iniciação da tradução do mRNA. A ativação da mTOR também é responsável pela fosforilação da proteína ribossomal enzimática S6 quinase-1 (S6K1), a qual, por sua vez, fosforila a proteína ribossomal S6, que favorece a síntese de RNA de proteínas ribossomais e de fatores de alongação (Kimball e Jefferson, 2006).

Dessa forma, se torna necessário investigar o efeito da suplementação com leucina nos marcadores lesão muscular, de síntese protéica e de proteólise, induzidos pelo exercício agudo inabitual.

2. JUSTIFICATIVA

É fato conhecido que o exercício físico intenso e prolongado pode causar lesões musculares, as quais vêm acompanhadas de aumento do estresse oxidativo, diminuição da síntese proteica, aumento da proteólise, da concentração de citocinas inflamatórias e, principalmente, atividade da enzima creatina quinase, que é o marcador de lesão muscular mais usual.

Até o momento, quase não existem trabalhos que tenham avaliado o efeito da suplementação com leucina na atividade da creatina quinase após uma sessão de exercício agudo, inabitual e prolongada. No entanto, foram encontrados alguns artigos que avaliaram o efeito da suplementação com BCAA em alguns marcadores de lesão muscular como a creatina quinase demonstrando resultados satisfatórios.

Nesse contexto, a suplementação aguda com leucina poderia ser positiva não só na redução da atividade de creatina quinase, mas também na diminuição da proteólise e aumento da síntese proteica, visto que, já é bem estabelecido na literatura científica, que esse aminoácido estimula a via da mTOR, de forma dependente ou independente de insulina, aumentando a maquinaria de síntese proteica e conseqüentemente diminuindo a proteólise, aumentando a síntese de proteínas.

Contudo, ainda há indícios que a leucina é capaz de diminuir a fosforilação do NF- κ B nuclear, que pode estar relacionada com o aumento da proteólise e de citocinas como IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α , responsáveis pelo desencadeamento do processo inflamatório.

Isso posto, o presente trabalho vem investigar o efeito da suplementação com leucina em marcadores de lesão muscular induzida pelo exercício agudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação com leucina no mecanismo de lesão muscular de ratos após sessão aguda de exercício físico até a exaustão.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação com leucina sobre os seguintes parâmetros:

- Marcadores séricos: creatina quinase, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteína quimiotática de macrófagos MCP-1, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10).
- Marcadores biomoleculares, no músculo esquelético sóleo, nas primeiras 3, 48 e 72 horas após o exercício (sóleo): Expressão e fosforilação das proteínas, IKK β , IKB α , mTOR, S6k1, 4E-BP1 e fosforilação do NF- κ B da fração nuclear.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Condições experimentais

4.1.1 Animais

Para o presente estudo foram utilizados 48 ratos albinos da linhagem *Sprague-Dawley*, machos, com seis semanas de vida e peso de aproximadamente 300 g, obtidos do Biotério de Produção e Experimentação do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas de criação até o 45º dia de vida e, então, transferidos para caixas de polipropileno coletivas (dimensões de 30x18x13 cm) onde ficaram até o final do experimento, alocados três a três. Durante todo o período experimental, os animais foram submetidos a condições ambientais que incluíam: temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 55 ± 10 %, com 15 a 20 trocas de ar por hora e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro.

Todos os procedimentos realizados com os ratos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (protocolo nº 254).

4.1.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em seis grupos, inicialmente com dez animais cada, de massa corporal semelhante:

- CON: grupo de animais eutanasiados sem receber suplementação e não

exercitados;

- T3E: grupo de animais exercitados que não receberam suplementação (apenas gavagem de água) e foram eutanasiados 3 horas após o término do exercício;
- T3A: grupo de animais exercitados, suplementados com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e foram eutanasiados 3 horas após o término do exercício;
- T3L: grupo de animais exercitados, suplementados com solução de leucina e foram eutanasiados 3 horas após o término do exercício;
- T48E: grupo de animais exercitados que não receberam suplementação (apenas gavagem de água) e foram eutanasiados 48 horas após o término do exercício;
- T48A: grupo de animais exercitados, suplementados com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e foram eutanasiados 48 horas após o término do exercício;
- T48L: grupo de animais exercitados, suplementados com solução de leucina e foram eutanasiados 48 horas após o término do exercício;
- T72E: grupo de animais exercitados que não receberam suplementação (apenas gavagem de água) e foram eutanasiados 72 horas após o término do exercício;
- T72A: grupo de animais exercitados, suplementados com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e foram eutanasiados 72 horas após o término do exercício;
- T72L: grupo de animais exercitados, suplementados com solução de leucina e foram eutanasiados 72 horas após o término do exercício.

4.1.3 Ração

Todos os animais receberam água autoclavada *ad libitum* e ração comercial Nuvilab CR-1 irradiada, apropriada para roedores de laboratório, sob a forma de *pellet*, através de comedouros suspensos, também *ad libitum*.

Tabela 1: Composição da ração fornecida aos animais durante o experimento.

TABELA 1: Composição da ração fornecida aos animais durante o experimento.

Composição básica do produto	Níveis de garantia por Kg do produto		Enriquecimento por Kg do produto			
	Umidade	do produto (%)	Vitaminas:	Minerais:		
Milho integral moído	12,50					
Farelo de soja	Proteína Bruta	22,00	Vitamina A	13.000,00 UI	Cobre	10,00 mg
Farelo de trigo	Extrato Etéreo	5,00	Vitamina D3	2.000,00 UI	Cobalto	1,50 mg
Carbonato de cálcio	Matéria Mineral	10,00	Vitamina B1	5,00 mg	Ferro	50,00 mg
Fosfato bicálcico	Matéria Fibrosa	8,00	Vitamina B12	22,00 mcg	Iodo	2,00 mg
Cloreto de sódio	Cálcio	1,40	Vitamina B2	6,00 mg	Manganês	60,00 mg
Gordura vegetal	Fósforo	0,80	Vitamina B6	7,00 mg	Selênio	0,05 mg
Premix vitamínico			Vitamina E	34,00 mg	Zinco	60,00 mg
Premix mineral			Vitamina K3	3,00 mg		
Aminoácidos			Niacina	60,00 mg	Aminoácidos:	
			Biotina	0,05 mg	Lisina	100,00 mg
			Ácido fólico	1,00 mg	Metionina	300,00 mg
			Ácido pantotênico	21,00 mg		
			Collina	650,00 mg	Aditivos:	
					Antioxidante	100,00 mg

4.1.4 Suplementação

Após o exercício, os grupos T3L, T48L e T72L foram submetidos à gavagem oral com 2,5 mL solução de leucina (54 g de L-Leucina/L) para cada 100 g de peso corporal (Anthony *et al.*, 2000a; Anthony *et al.*, 2000b; Vary, Deiter e Lang, 2006; Vary *et al.*, 2007).

Os grupos T3A, T48A e T72A foram submetidos à gavagem oral com 2,5 mL de solução de aminoácidos não essenciais (tabela 2) para cada 100 g de peso corporal. A solução de aminoácidos não essenciais utilizada era isonitrogenada em relação à solução de L-Leucina. Dessa forma, garantimos que ambos os grupos receberam a mesma quantidade de nitrogênio através da gavagem oral. Tivemos o cuidado de incluir os grupos T3A, T48A e T72A, que receberam uma solução de aminoácidos não essenciais isonitrogenada em relação à solução de leucina, para comparar isoladamente o efeito da leucina sobre a expressão e fosforilação das proteínas NF- κ B, IKK β , IKB α , mTOR, S6k1, 4E-BP1. Segundo Borsheim e colaboradores (2002) a suplementação de aminoácidos não essenciais é incapaz de aumentar a síntese protéica muscular. Assim, se evitou a perspectiva de que a via pudesse estar mais ou menos ativada devido a maior balanço nitrogenado, pois, o intuito do trabalho é avaliar o efeito isolado da leucina.

Já os grupos T3E, T48E e T72E receberam gavagem de água, com a finalidade de que o estresse da gavagem fosse igual para todos os grupos, exceto o controle.

Tabela 2: Composição de aminoácidos da gavagem de aminoácidos não essenciais.

Aminoácido	Peso Molecular (kDa)	Quantidade de aminoácido na solução controle	
		(g/L)	(%)
Alanina	89,9	3,11	1,68
Asparagina	132,12	4,24	2,29
Glutamina	146,4	3,83	2,07
Glicina	75,07	3,73	2,01
Prolina	115,13	2,43	1,31

Todos os aminoácidos foram fornecidos pela empresa Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, Brasil). O grau de pureza dos aminoácidos foi 100,0 % (98,5 % a 101,0 %) para a leucina, 100,6 % para alanina, 99,8 % para ácido aspártico e 100,1 % para glicina, para prolina e para glutamina, segundo certificado de análise de cada lote, o qual considera como limite inferior o valor de 98,5 % e 101,0 % como limite superior.

4.1.5 Protocolo de exercício

Os animais passaram por um período de adaptação ao exercício de duas semanas. A primeira semana foi um período de adaptação ao gaioleiro e ao biotério; na segunda semana, os animais foram submetidos a um programa de adaptação ao exercício físico: 10 minutos ao dia, por 4 dias à velocidade de 5 -10 m/minuto. No quinto dia, os animais correram à velocidade de 20 m/minuto por cerca de 50 minutos, a 70% do VO_2 máximo, como proposto por Rosa Neto e colaboradores (2009). Ao se completar os 50 minutos, houve o incremento de 1 m/minuto a cada

minuto até a exaustão, definida como o momento em que os animais foram incapazes de caminhar na esteira.

4.1.6 Desenho experimental

Depois de aplicado o protocolo de exercício, no tempo 0 (T0), os animais tiveram o período de uma hora e trinta minutos para alimentação, (dessa forma, diminuimos a chance dos aminoácidos serem oxidados em virtude do jejum noturno de 8 horas) recebendo ração e água *ad libitum* antes da gavagem oral e até o momento do sacrifício (T3, T48 e T72).

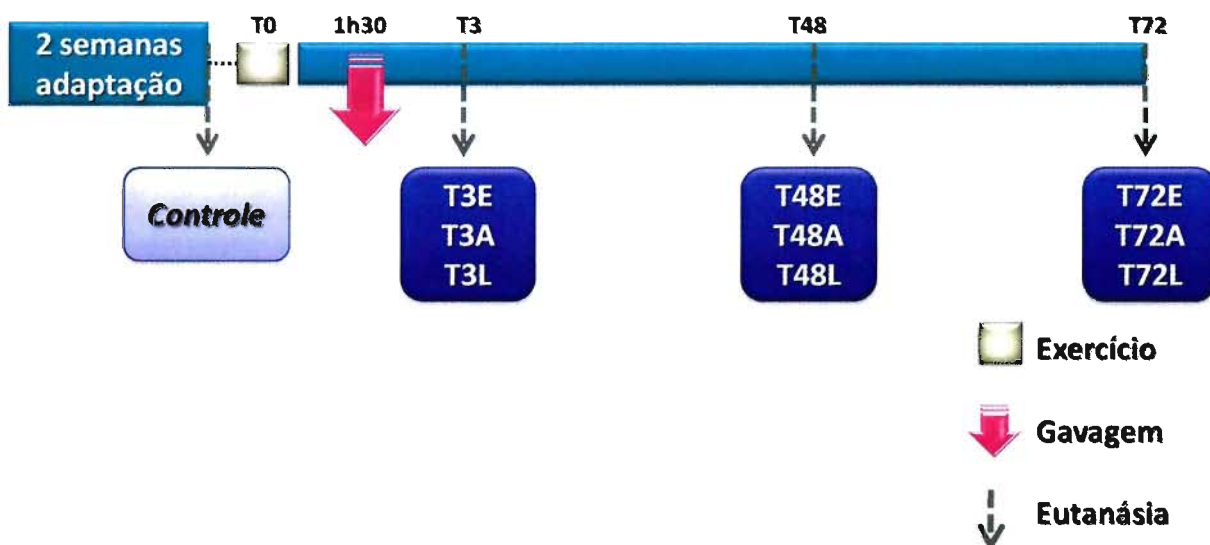


Figura 1. Desenho experimental

4.1.7 Eutanásia

Os animais foram anestesiadas com 1 mL de coquetel para roedores (via subcutânea) (1/1/0, 4/1, 6 v/v) de cloridrato de xilazina (20 mg/mL), cloridrato de quetamina (100 mg/mL), acepromazina (20 mg/mL) e água destilada, aplicado por meio de seringa com capacidade para 1 mL com agulha 20-G. Posteriormente, foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se guilhotina. Este procedimento foi realizado de forma muito rápida, visando minimizar qualquer tipo de sofrimento ou estresse dos animais.

O sangue foi, então, centrifugado [(Jouan BR4i) 4 °C, 3.000 rpm, 15 minutos], e o soro coletado foi mantido em microtubos no gelo até o final da eutanásia e, posteriormente, as amostras foram aliquotadas e acondicionadas em *freezer* (-80 °C) para as determinações séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase, IL-6, IL-10, MCP-1e TNF- α . As carcaças foram descartadas.

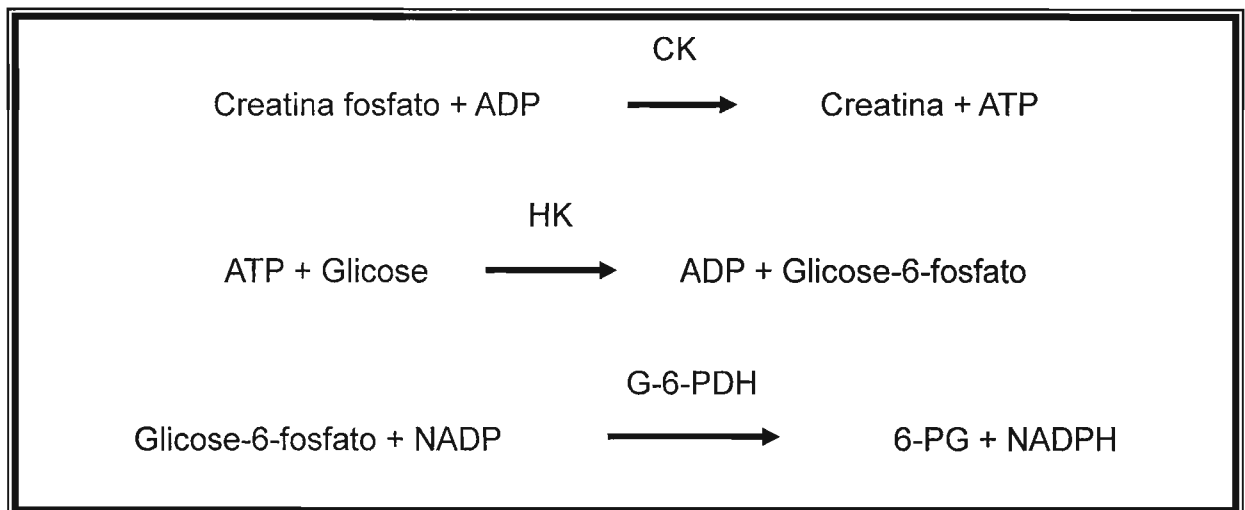
Em seguida, os animais tiveram os músculos sóleo e gastrocnêmio, de ambas as patas, rapidamente dissecados e pesados em balança analítica com precisão de 0,0001g (Ohaus). Sendo o gastrocnêmio um músculo misto, composto de fibras oxidativas e glicolíticas, as amostras do mesmo foram coletadas, arbitrariamente, de uma porção visualmente mais clara, para fins de padronização. As amostras de músculo da pata direita foram imersas em nitrogênio líquido e, posteriormente à eutanásia, homogeneizadas em tampão de extração de proteínas com o auxílio de um homogeneizador elétrico (Ika T10 basic), sendo o material solúvel aliquotado e armazenado em *freezer* (-80 °C) para a quantificação da expressão e da fosforilação das proteínas de interesse por *Western Blotting*. O músculo da pata esquerda e o fígado foram armazenados em tubos de criogenia e acondicionados em *freezer* (-80 °C) para futuras análises. Cabe ressaltar que, entre a eutanásia e o congelamento dos tecidos de cada animal, transcorreram-se cerca de 5 minutos.

4.2 ANÁLISES

4.2.1 Marcadores séricos

4.2.1.1 Creatina quinase

Para a determinação da concentração sérica da creatina quinase total, utilizou-se *kit* comercial (LabTest – CK-NAC Liqueform). A atividade da enzima foi determinada de acordo com a seguinte sequência de reações:



A creatina quinase catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato, na presença da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorvância em 340 nm é proporcional a atividade da CK na amostra.

O procedimento seguiu a indicação do fabricante e a leitura da absorvância do produto foi feita em espectrofotômetro [CB 1500 (Varian) - Water

Peltier System]. O aparelho foi previamente zerado com um branco e a concentração de creatina quinase foi calculada a partir dos resultados de absorbância dos testes e do padrão segundo a fórmula:

$$\Delta A/\text{minuto Teste} = (A_2 - A_1) / 2$$

$$\Delta A/\text{minuto Calibrador} = (A_2 - A_1) / 2$$

$$\text{Atividade da CK (U/L)} = (\Delta A/\text{minuto Teste} / \Delta A/\text{minuto Calibrador}) \times C_{\text{Cal}}$$

O fabricante recomenda que a medição seja linear até 2000 U/L, e que, para valores superiores, faz-se necessário diluir a amostra em NaCl 150 mmol (0,85%). Como os resultados obtidos na primeira leitura foram superiores ao valor acima recomendado, as amostras foram diluídas 50 vezes e, posteriormente, realizou-se uma segunda leitura e os resultados obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição: 50.

Os testes para determinação da creatina quinase foram realizados em quadruplicata.

4.2.1.2 Citocinas

As dosagens foram realizadas pelo método imunoensaio multiplex, utilizando *kit rat serum citokine panel RCYTO-80K*, para dosagem simultânea de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1. As determinações foram feitas em equipamento automático Merck-milipore 200.

Os *kits Merck-Millipore* utilizam a tecnologia *Multiplex Analyte Profiling (xMAP™)*, que compreende processo de coloração interna de microesferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção

precisa destes dois fluorocromos, foram criados conjuntos de esferas, cada um com sua individualização baseada em um código de cor. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analito-específico. Utiliza-se então um anticorpo de detecção biotilado que se liga ao analito específico e o resultado final é amplificado através de incubação com conjugado repórter estreptavidina-ficoeritrina. As microesferas foram lidas no equipamento Merck-milipore 200, através de sistema duplo de *lasers* que incide sobre as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de *laser* detecta a microesfera (com um código de cor específico para o ensaio), enquanto o outro *laser* quantifica o sinal de repórter em cada microesfera.

As dosagens foram realizadas nas dependências do Instituto Gênese de Análises Científicas, da empresa Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda (São Paulo - SP).

4.2.1 Parâmetros teciduais

4.2.1.1 Determinação da concentração de proteínas teciduais no músculo esquelético

A concentração de proteínas totais no músculo esquelético de ambas as etapas dos animais participantes foi determinada através de um *kit* comercial (*BCA Protein Assay kit - Pierce*) que forneceu os reagentes para o ensaio, no qual, seguiu-se protocolo recomendado pelo fabricante.

4.2.2 *Western Blotting*

4.2.2.1 Extração de proteínas

PAULA, T. D.

Inicialmente, o músculo sóleo dissecado foi pesado e imerso em nitrogênio líquido por cerca de dez segundos. Posteriormente, foi mantido em tubos criogênicos até a extração.

A extração da proteína foi realizada através da utilização do *kit* NE-PER (*Pierce Chemical*), para extração das frações citoplasmáticas e nucleares.

Para essa extração os tecidos foram alicotados em amostras de aproximadamente 20g, que foram lavadas com PBS e centrifugadas à 500 X g por 5 minutos. Depois disso, o sobrenadante foi removido e o tecido foi homogenizado com o primeiro reagente do *kit* (CERI) seguindo os volumes indicados pela bula.

Depois de homogeneizado o tecido foi agitado por 15 segundos, incubamos e m gelo por 10 minutos e adicionamos o segundo reagente do *kit* (CERII). Novamente a amostra foi agitada, incubada em gelo e centrifugada – Jouan BR4i – por 5 minutos, à 4°C e 16000 X g. Logo após esse processo, se retirou o sobrenadante que corresponde à fração citoplasmática.

O *pellet* contendo a fração nuclear foi suspenso com o terceiro reagente do *kit* (NER) e para extração da fração nuclear, a amostra passou por mais 4 etapas de agitação e incubação no gelo, uma a cada 10 minutos. Isso feito, a amostra foi centrifugada novamente, à 4°C e 16000 X g. O sobrenadante com a fração nuclear foi retirado e armazenado à -80 °C.

4.2.2.2 Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado segundo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) e Harlow e Lane (1988), descrito sucintamente 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 amônia e 0,1 % TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5 e 10 %, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

PAULA, T. D.

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

As amostras foram combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40 % glicerol, 0,8 % SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02 % azul de bromofenol. Amostras contendo 25 µg de proteína foram submetidas a eletroforese no gel de poliacrilamida, inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida

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

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS , 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e, então, incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro 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 25 V, por 90 minutos. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante Ponceau (1 % ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8 % NaCl, 0,2 % KCl, 0,2 % $\text{KH}_2(\text{PO})_4$, 1,15 % $\text{Na}_2\text{H}(\text{PO})_4$, 0,5 % Tween0mM.].

4.2.2.5 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, por 60 minutos, sob agitação. O

anticorpo específico para cada proteína de interesse foi diluído [1: 250 para NF- κ B, IKK β , I κ B α , phospho-NF- κ B, phospho-IKK β (ser177), phospho-IK β (ser32), phospho-p70 S6K(Thr389) e; 1:1000 para, phospho-mTOR(Ser2448), phospho-4E-BP1(Thr70), mTOR , p70 S6K e 4E-BP1] em PBST e utilizado para a incubação das membranas *overnight* sob agitação em geladeira a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com PBST e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:3000 em PBST, por 1h, sob agitação em geladeira. A membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com agitação.

4.2.2.6 Revelação com sistema Quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do *kit ECL Advance* (GE Healthcare) composto por 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 Healthcare) que capturou imagens por 7 minutos e analisados por um *software* ImageQuant TL (GE Healthcare).

4.2.2.7 Quantificação do *blotting*

Para quantificar os *blottings* da expressão e fosforilação das proteínas IKK β , I κ B α , mTOR, S6k1, 4E-BP1 e o normalizador β -actina da fração citoplasmática do músculo sóleo, a quantidade de pixel da proteína em questão foi dividida pela quantidade de pixel do normalizador e esta razão foi dividida pela maior razão encontrada entre as amostras. PCNA, que foi utilizada para correções de possíveis erros de pipetagem.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão. Para a checagem da distribuição dos resultados, o teste de *Hartley* foi aplicado, obtendo-se como resultado um valor de $p > 0,05$. Em seguida, se aplicou *anova-one-way* ou *anova* fatorial para identificação dos contrastes significantes e o pós teste de *Tukey*. A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software GraphPad Prism* versão 4.0 (*GraphPad Software, Inc*). Em todas as análises um valor $p < 0,05$ foi adotado como significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Parâmetros biométricos

6.1.1 Massa corporal dos animais

Os animais foram distribuídos entre os grupos por conveniência e pela massa corporal, a qual foi aferida no dia em que aplicamos o exercício até a exaustão.

Tabela 3. Massa corporal dos animais

Grupo	Peso (g)	<i>P</i>
CON	290,05 ± 6,52	0,54
TE	282,78 ± 35,48	
TA	295,40 ± 20,85	
TL	291,98 ± 25,06	

Resultados são expressos como médias ± desvio-padrão. CON.: animais não exercitados e não suplementados (n=6); TE: animais exercitados e não suplementados (n=9); TA: animais exercitados e suplementados com solução de mistura de aminoácidos não essenciais (n=15); TL: animais exercitados e suplementados com solução de leucina (n=18).

6.1.2 Tempo de exaustão

Como podemos verificar na tabela 4, o tempo de exaustão entre os animais exercitados foi semelhante.

Tabela 4. Tempo de exaustão dos animais exercitados

Grupo	Tempo de exaustão (min)	P
TE	59,29 ± 11,22	0,70
TA	57,29 ± 5,64	
TL	58,68 ± 3,33	

Resultados são expressos como médias ± desvio-padrão. TE: animais exercitados e não suplementados (n=9) TA: animais exercitados e suplementados com solução de mistura de aminoácidos não essenciais (n=15); TL: animais exercitados e suplementados com solução de leucina (n=18).

6.1.3 Consumo de ração

Após a sessão aguda de exercício, os animais foram devolvidos às caixas, dois a dois, sendo que o consumo de ração durante o período de uma hora e trinta minutos anterior à suplementação foi medido. A partir da tabela 5, verificamos que o consumo entre os grupos exercitados também foi semelhante.

Tabela 5. Consumo de ração dos animais dos grupos que receberam gavagem

Grupo	Consumo de ração (g)	P
TE	7,07 ± 2,48	0,82
TA	7,59 ± 3,11	
TL	6,93 ± 2,57	

Resultados são expressos como médias ± desvio-padrão. TE: animais exercitados e que receberam gavagem de água (n=9) TA: animais exercitados que receberam gavagem de solução de mistura de aminoácidos não essenciais (n=15); TL: animais exercitados que receberam gavagem de solução de leucina (n=18).

6.2 Marcadores séricos

6.2.1 Atividade da creatina quinase

Comparando os animais exercitados aos animais controle (não exercitados e não suplementados), observamos aumento de cerca de 10.000 vezes da atividade da enzima creatina quinase nos grupos T3A e T3E comparado a ao controle (figura 4).

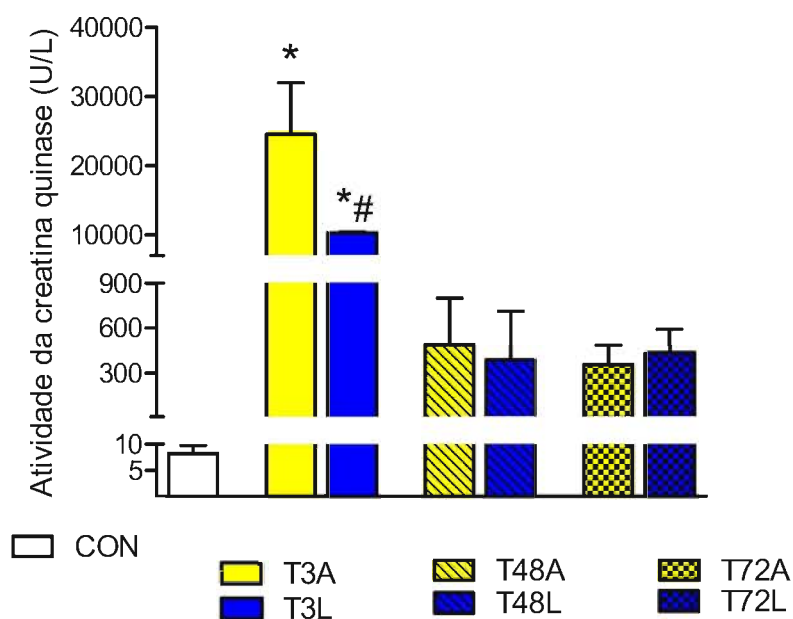


Figura 4: Atividade de creatina quinase no soro dos animais experimentais.

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por *anova-one-way* considerando $p < 0,05$. # marca a diferença entre T3A e T3L e * a diferença entre o controle e os demais grupos.

CON: grupo não suplementado e não exercitado; T3A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T3L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T48A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T48L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T72A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 72 horas após o término do exercício; T72L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 72 horas após o término do exercício.

Entre os grupos T3A e T3L, verificamos que nos animais suplementados com leucina, a concentração sérica dessa enzima foi 45 % menor em relação aos animais suplementados com mistura de aminoácidos não essenciais, como podemos observar na figura acima.

Já nos tempos 48 e 72 horas após exercício, não houve diferença entre as suplementações.

Com relação às dosagens de IL-6, MCP-1, IL-10 e TNF- α foi possível a inclusão dos grupos T3E, T48E e T72E para que pudéssemos avaliar não só as suplementações, mas também o efeito isolado do exercício nos marcadores avaliados; no entanto o mesmo não foi significativo.

Tabela 6: Tabela de comparação entre o efeito do tempo e a suplementação dada aos animais na concentração de MCP-1

	3 horas			48 horas			72 horas			Tempo Supl. T x S (S)
	T3A	T3L	T48A	T48L	T72A	T72L	(T)			
MCP-1	523,08± 131,88	491,39± 102,90	420,05± 140,38	341,78± 86,12	510,50± 64,33	464,84± 53,65	0,12	0,09	0,50	

6.2.2 Concentração sérica de IL-6

Os resultados de IL-6 foram bastante heterogêneos entre os grupos, apesar disso, os grupos T48L, T72E, T72A, T72L não mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle.

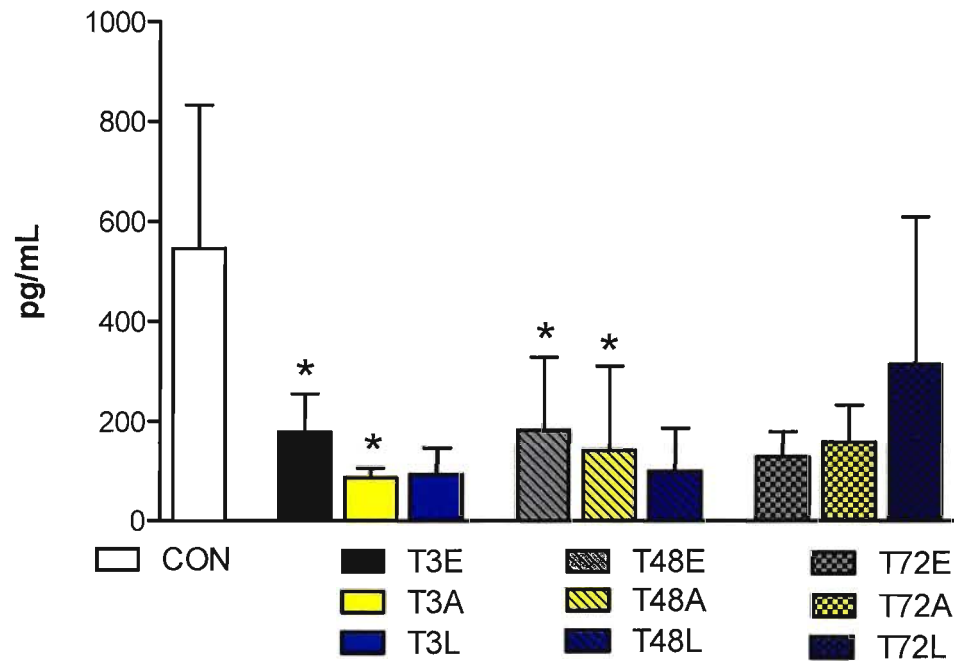


Figura 5: Concentração sérica de IL-6 dos animais experimentais.

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por *anova-one-way* considerando $p < 0,05$. * marca a diferença entre os grupos.

CON: grupo não suplementado e não exercitado; T3E: grupo exercitado que não recebeu suplementação e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T3A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T3L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T48E: grupo exercitado que não recebeu suplementação e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T48A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T48L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T72E: grupo exercitado que não recebeu suplementação e eutanasiado 72 horas após o término do exercício; T72A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 72 horas após o término do exercício; T72L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 72 horas após o término do exercício.

6.2.3 Concentração sérica de IL-10 e TNF- α

Ambos os marcadores tiveram concentrações abaixo da sensibilidade captada pelo aparelho.

6.2.4 Concentração sérica de MCP-1

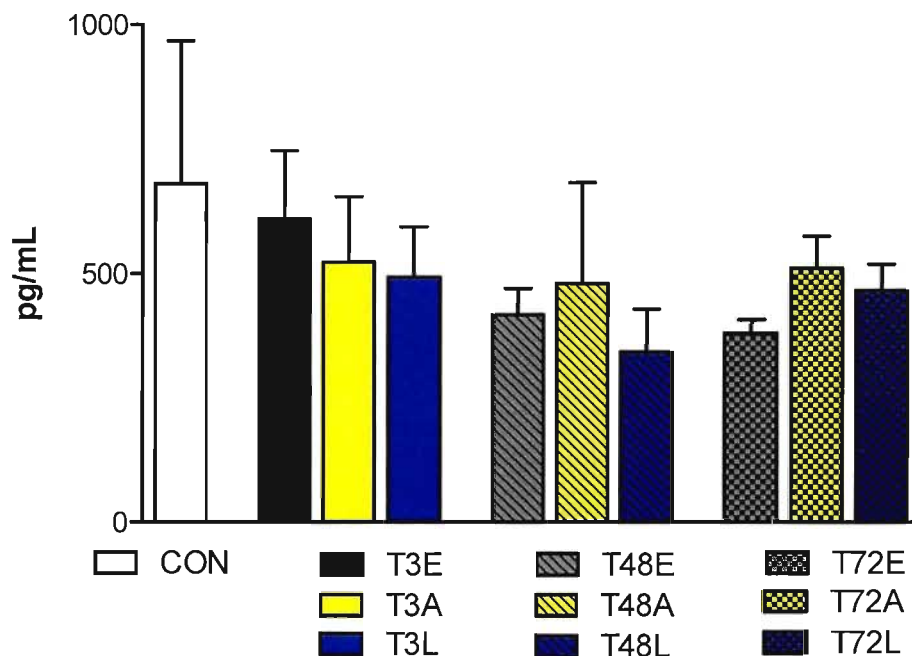


Figura 6: Concentração sérica de MCP-1 dos animais experimentais.

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por *anova-one-way* considerando $p < 0,05$.

CON: grupo não suplementado e não exercitado; T3E: grupo exercitado que não recebeu suplementação e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T3A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T3L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T48E: grupo exercitado que não recebeu suplementação e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T48A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T48L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T72E: grupo exercitado que não recebeu suplementação e eutanasiado 72 horas após o término do exercício; T72A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 72 horas após o término do exercício; T72L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 72 horas após o término do exercício.

Com relação à MCP-1 não houve diferença significativa entre os grupos, porém, apresentou um padrão de resultados semelhante ao encontrado na avaliação da fração nuclear do NF-kB (figura 7).

6.3 Parâmetros teciduais

6.3.1 Western Blotting

A fosforilação da fração nuclear do NF-kB apresenta graficamente na figura 7, mostra uma tendência em ser menor nos grupos suplementados com leucina. Acreditamos que não houve diferença estatística entre os grupos devido ao desvio padrão dos resultados encontrados através da quantificação dos *blottings*.

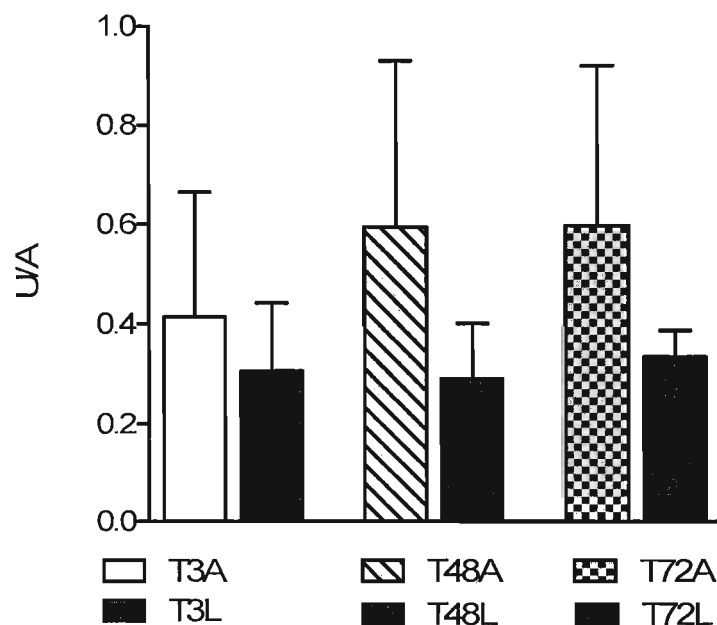


Figura 7: Fosforilação do NF-kB da fração nuclear do músculo sóleo

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por *anova-one-way* considerando $p < 0,05$.

CON: grupo não suplementado e não exercitado; T3A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T3L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 3 horas após o término do exercício; T48A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não

essenciais e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T48L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 48 horas após o término do exercício; T72A: grupo exercitado, suplementado com solução de mistura de aminoácidos não essenciais e eutanasiado 72 horas após o término do exercício; T72L: grupo exercitado, suplementado com solução de leucina e eutanasiado 72 horas após o término do exercício.

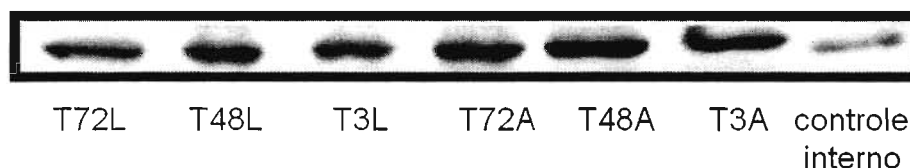


Figura 8: Blotting representativo da fosforilação do NF- κ B da fração nuclear do músculo sóleo.

Não houve diferença significativa na expressão e na fosforilação, nas frações citoplasmáticas, das proteínas avaliadas nos grupos T3A, T3L, T48A, T48L, T72A e T72L como mostram as tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7. Expressão das proteínas avaliadas nos grupos T3A e T3L

Proteínas (U/A)	T3A	n	T3L	n	p
p-MTOR	0,35±0,06	3	0,52±0,16	3	0,38
p-4EBP1	0,43±0,05	3	0,66±0,21	3	0,32
p-I κ B	0,40±0,04	5	0,39±0,09	5	0,93
p-IKK	0,44±0,15	4	0,50±0,11	3	0,75
S6	0,31±0,09	5	0,61±0,13	6	0,10
4EBP1	0,28±0,12	4	0,74±0,28	6	0,23
I κ B	0,39±0,09	5	1,13±0,82	6	0,44
IKK	0,36±0,12	5	0,61±0,21	6	0,35

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por teste *t* não pareado, considerando $p < 0,05$.

Para avaliar um possível efeito residual da suplementação com leucina, também foram avaliados os tempos 48 e 72 horas após o término da sessão de exercício.

Tabela 8. Expressão das proteínas avaliadas nos grupos T48A e T48L

Proteínas (U/A)	T48A	n	T48L	n	p
p-4EBP1	0,36±0,07	6	0,44±0,14	4	0,62
p-IkB	0,51±0,12	6	0,59±0,20	4	0,71
p-IKK	0,16±0,02	5	0,45±0,28	3	0,21
S6	0,32±0,10	6	0,54±0,08	6	0,12
4EBP1	0,18±0,05	6	0,42±0,10	6	0,05*
IkB	0,32±0,10	6	0,47±0,21	6	0,52
IKK	0,28±0,09	6	0,38±0,07	6	0,38

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por teste *t* não pareado, considerando $p < 0,05$.

Tabela 9. Expressão das proteínas avaliadas nos grupos T72A e T72L

Proteínas (U/A)	T72A	n	T72L	n	p
p-4EBP1	0,31±0,04	4	0,34±0,09	3	0,74
S6	0,33±0,16	3	0,46±0,22	5	0,69
4EBP1	0,48±0,25	3	0,33±0,17	5	0,64
IKK	0,37±0,20	3	0,42±0,18	5	0,86

Resultados são expressos como médias \pm desvio-padrão. Contrastes foram calculados por teste *t* não pareado, considerando $p < 0,05$.

6. Discussão

Já está bem descrito na literatura que o exercício excêntrico e o exercício aeróbio prolongado configuram-se como os maiores causadores de lesão muscular (Appell et al., 1992; Clarkson et al., 1992; Feasson et al., 2002). Dentre os marcadores mais utilizados para diagnóstico de lesão muscular, está a atividade da enzima creatina quinase, que se encontra em altas concentrações séricas em presença de danos celulares. Dado que verificamos, em nosso estudo, valores de atividade sérica de creatina quinase 100 vezes superiores às do grupo de animais não exercitados – como já observado previamente por Marqueste et al 2008 –, concluímos que o protocolo utilizado foi capaz de produzir lesão muscular.

Entretanto, em experimento realizado por Gondin e colaboradores (2011), no qual o músculo gastrocnêmio de 6 ratos *Wistar* machos foram estimulados por correntelétrica, se obteve resultado diferente do observado no presente trabalho, uma vez que, em 72 horas após exercício, a atividade da creatina quinase observada foi de aproximadamente 25 vezes maior do que grupo controle. Até o momento, desconhecemos as causas dessas diferenças.

Na literatura científica, já está bem estabelecido o efeito da suplementação com aminoácidos essenciais sobre o aumento da síntese de proteínas, e sobre a redução da proteólise e de marcadores de lesão muscular, caso da atividade sérica da enzima creatina quinase (Brancaccio, Maffulli e Limongelli, 2007). Trabalhos similares que, entretanto, avaliam os efeitos da suplementação de BCAA (Coombes e McNaughton, 2000; Cheung, Hume e Maxwell, 2003) e de leucina isolada (Norton e Layman, 2006) já demonstraram efeitos semelhantes. A leucina, por ter um papel importante no mecanismo de síntese protéica através da ativação da via da mTOR, se tornou alvo de grande discussão no meio acadêmico.

Nesse sentido, Matsumo e colaboradores (2009), supuseram que a menor atividade da creatina quinase verificada nos animais suplementados com leucina poderia ser fruto de possível redução na fluidez das membranas celulares dos miócitos após o estresse provocado pela atividade física exaustiva, bem como

do aumento da síntese e diminuição da proteólise muscular. Baseado nos resultados de síntese e degradação proteica previamente observados, avaliamos, em nosso estudo, a expressão e a fosforilação das proteínas, IKK β , IKK α , mTOR, S6k1, 4E-BP1 e fosforilação do NF- κ B nuclear no músculo sóleo dos animais submetidos ao protocolo de exercício, não havendo, entretanto, alteração significativa desses marcadores.

Em nosso estudo eutanasiámos os animais dos grupos T3E, T3A e T3L, 90 minutos após a gavagem para avaliação da expressão e fosforilação dos alvos moleculares citados acima, no pico de ativação da via da mTOR, como foi feito por Norton e colaboradores (2009). Segundo os autores a ativação da via se inicia 45 minutos após a suplementação e volta ao basal 3 horas depois. Porém, se tratando de um modelo experimental diferente, as mesmas proteínas foram avaliadas 48 e 72 horas após o exercício, afim de se encontrar algum efeito residual da suplementação com leucina sobre as mesmas, mas não houve diferença estatística entre os grupos.

Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significantes, clara está a tendência para a redução da fosforilação de NF- κ B no núcleo dos miócitos em resposta à suplementação com leucina, denotando o potencial deste aminoácido na redução do estímulo inflamatório e proteolítico. Resultado contraditório foi encontrado *in vitro* por Wheichhart e colaboradores (2008), ao verificarem que a fosforilação da mTOR modula a atividade do p65, diminuindo dessa forma, a ativação do NF- κ B (Thomson, Turnquist e Raimondi, 2009). No entanto, em nosso experimento não há correlação da fosforilação da mTOR com a fosforilação do NF- κ B nuclear.

Especulamos então, que a redução do estresse oxidativo induzido pelo exercício possa estar relacionada com os possíveis efeitos da leucina nesse contexto e que um aumento da fluidez da membrana pode estar atrelado ao aumento do fornecimento de HMB (β -hidroxi β -metilbutirato). Esse metabólito da leucina dá origem ao β -hidroxi- β -metilglutaril (HMG-CoA) que, por desidratação se transforma em, ácido metilcrotonoico (MCA) ou por carboxilação direta em HMG-CoA, atuando, assim, como um doador de carbono para a síntese de colesterol, utilizado para manutenção das membranas plasmáticas dos miócitos (Rogerio e Tirapegui, 2008; 2006).

Nesse contexto, o estudo de Someren, Edwards e Howatson (2005) avaliou a atividade da creatina quinase, entre outros marcadores de lesão, em 8 homens não treinados que foram submetidos à uma sessão de exercício excêntrico – 3 séries com 10 repetições à 70% de 1 repetição máxima, com o intervalo de 4 minutos entre cada série – e receberam 3 g de HMB junto com 0,3 g de KIC (outro metabólito da leucina), divididos em 3 doses diárias durante 14 dias. A conclusão do estudo foi que a suplementação com HMB foi capaz de reduzir esse marcador. Os autores associam a redução da creatina quinase à maior fluidez da membrana celular provocada pelo aumento da produção de colesterol intracelular, através do metabolismo do HMG-CoA, mas assim como em nosso trabalho, não existem evidências diretas que possibilitem fazermos esta afirmação. Embora os desenhos experimentais sejam diferentes, em ambos os estudos fica claro que houver lesão muscular induzida pelo exercício e que a suplementação foi capaz de reverter esse quadro.

Como citado anteriormente, acreditamos que a redução da atividade de creatina quinase no grupo T3L também pode ser originada pela ação da leucina na redução do estresse oxidativo. Segundo Rogero e colaboradores (2006; 2008), os BCAA podem atuar como precursores da síntese de glutamina no tecido muscular, pois, esses aminoácidos fornecem grupamentos amino em reações de transaminação, as quais acarretam na formação de glutamato que, posteriormente participa da síntese de glutamina e muitos trabalhos que mostram que a suplementação com glutamina diminui marcadores de estresse oxidativo (Cruzat et al 2009). Entretanto, para comprovação dessa hipótese e da que envolve alterações na fluidez da membrana plasmática, mais estudos são necessários.

Cabe ressaltar que o padrão dos resultados obtidos da fosforilação do NF- κ B é semelhante ao encontrado nas determinações de MCP-1, demonstrando a influência desse fator transcricional sobre proteínas que contribuem para o aumento da inflamação.

Garcia e colaboradores (2011) verificaram que a MCP-1 se mostrou elevada após exercício em estudo realizado com 15 mulheres sedentárias submetidas à 1 hora de exercício físico realizado em bicicleta ergométrica a 70% do VO₂ máximo, (intensidade semelhante à aplicada ao nossos animais). Amostras de

sangue foram coletadas antes e imediatamente após o exercício. Assim como em nosso experimento a IL-6, não apresentou alteração significativa no período pós exercício, o mesmo ocorreu com os outros marcadores avaliados no estudo.

Não encontramos trabalhos comparáveis aos nossos resultados com relação a IL-6. Em nosso experimento, a concentração de IL-6 nos animais treinados foi inferior à encontrada no grupo controle. Contrariamente Pedersen e Febbraio (2008) mostraram aumento dessa interleucina durante a atividade física, seguido também do aumento de IL-10.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos especulamos que a concentração sérica da enzima creatina quinase foi menor nos animais suplementados com leucina 3 horas após o exercício por 2 razões principais. A primeira delas é pelo aumento de um metabólito deste aminoácido, denominado β -metil β -hidroxibutirato (HMB), que é precursor de colesterol e pode ser incorporado às membranas e consequentemente aumentar a fluidez dessa membrana e diminuir a necrose.

A segunda razão é que a atividade da enzima creatina quinase foi atenuada pela suplementação com leucina, nos grupos T3A e T3L, por diminuir o estresse oxidativo induzido pelo exercício e dessa maneira poderia diminuir o processo de morte celular.

Por fim, a leucina poderia ter atenuado o processo de fosforilação do NF- κ B da fração nuclear. Apesar de não termos diferença estatística entre os animais, suplementados com leucina e suplementados com a mistura de aminoácidos não essenciais, os grupos T3L, T48L e T72L tenderam a ter menor fosforilação desse fator nuclear. Essa mesma tendência parece se repetir com os resultados da concentração sérica de MCP-1.

No entanto, não tivemos ferramentas suficientes para sustentar as hipóteses à cima. Para tanto, será necessário avaliar outros marcadores, nesse mesmo modelo experimental, para respondermos as questões levantadas pelo presente estudo e o entendimento do processo de lesão muscular após o exercício físico agudo não habitual.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aldana, S. G.; Greenlaw, R. L. *et al.* Effects of an intensive diet and physical activity modification program on the health risks of adults. **J Am Diet Assoc** 105(3): 371-81, 2005.

Anthony, J. C.; Anthony, T. G. *et al.* Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. **J Nutr** 129(6): 1102-6, 1999.

Anthony, J. C.; Yoshizawa, F. *et al.* Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **J Nutr** 130(10): 2413-9, 2000.

Anthony, J. C.; Anthony, T. G. *et al.* Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **J Nutr** 131(3): 856S-860S, 2001.

Appell, H. J.; Soares, J. M. *et al.* Exercise, muscle damage and fatigue. **Sports Med** 13(2): 108-15, 1992.

Barnett, A. Using recovery modalities between training sessions in elite athletes: does it help? **Sports Med** 36(9): 781-96, 2006.

Bassit, R. A.; Curi, R. *et al.* Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. **Amino Acids** 35(2): 425-31, 2008.

Bickel, C. S.; Slade, J. *et al.* Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol** 98(2): 482-8, 2005.

Bolster, D. R.; Vary, T. C. *et al.* Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. **J Nutr** 134(7): 1704-10, 2004.

Booth, F. W.; Laye, M. J. *et al.* Reduced physical activity and risk of chronic disease: the biology behind the consequences. **Eur J Appl Physiol** 102(4): 381-90, 2008.

Brancaccio, P.; Maffulli, N. *et al.* Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br Med Bull** 81-82: 209-30, 2007.

Cai, D.; Frantz, J. D. *et al.* IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell** 119(2): 285-98, 2004.

Cheung, K.; Hume, P. *et al.* Delayed onset muscle soreness : treatment strategies and performance factors. **Sports Med** 33(2): 145-64, 2003.

- Chiang, J.; Shen, Y. C. *et al.* Honokiol protects rats against eccentric exercise-induced skeletal muscle damage by inhibiting NF-kappaB induced oxidative stress and inflammation. **Eur J Pharmacol** 610(1-3): 119-27, 2009.
- Clarkson, P. M., K. Nosaka, *et al.* Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. **Med Sci Sports Exerc** 24(5): 512-20, 1992.
- Coombes, J. S. e McNaughton, L. R. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. **J Sports Med Phys Fitness** 40(3): 240-6, 2000.
- Cruzat, V. F.; Rogerio, M.; Borges, M. C.; Tirapegui, J. Current aspects about oxidative stress, physical exercise and supplementation. **Rev Bras Med Esporte** 13: 336-346, 2007.
- Cruzat V. F.; J Tirapegui. *et al.* Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition** 25: 428-435, 2009.
- Dennis, P. B.; Jaeschke, A. *et al.* Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. **Science** 294(5544): 1102-5, 2001.
- Donnelly, J. E., Blair, S. N. *et al.* American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Med Sci Sports Exerc** 41(2): 459-71, 2009.
- Dreyer, H. C., Drummond, M. J. *et al.* Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 294(2): E392-400, 2008.
- Feasson, L., Stockholm, D. *et al.* Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. **J Physiol** 543(Pt 1): 297-306, 2002.
- Fell, J. e Williams, D. The effect of aging on skeletal-muscle recovery from exercise: possible implications for aging athletes. **J Aging Phys Act** 16(1): 97-115, 2008.
- Garcia, J. J.; Bote, E. *et al.* A single session of intense exercise improves the inflammatory response in healthy sedentary women. **J Physiol Biochem** 67(1): 87-94, 2011.
- Glass, D. J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends Mol Med** 9(8): 344-50, 2003.

- Gleeson, M. Immune function in sport and exercise. **J Appl Physiol** 103(2): 693-9, 2007.
- Gondin, J.; Giannesini, B. *et al.* Effects of a single bout of isometric neuromuscular electrical stimulation on rat gastrocnemius muscle: A combined functional, biochemical and MRI investigation. **J Electromyogr Kinesiol** 21(3): 525-32, 2011.
- Greer, B. K.; Woodard, J. L. *et al.* Branched-chain amino acid supplementation and indicators of muscle damage after endurance exercise. **Int J Sport Nutr Exerc Metab** 17(6): 595-607, 2007.
- Hawley, J. A. e Holloszy, J. O. Exercise: it's the real thing! **Nutr Rev** 67(3): 172-8, 2009.
- Harlow, E. D.; Lane, D. *Antibodies: A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 726p, 1988.
- Hayden, M. S. e Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev** 18(18): 2195-224, 2004.
- Ho, R. C.; Hirshman, M. F. *et al.* Regulation of IkappaB kinase and NF-kappaB in contracting adult rat skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol** 289(4): C794-801, 2005.
- Ji, L. L.; Gomez-Cabrera, M. C. *et al.* Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. **FASEB J** 18(13): 1499-506, 2004.
- Kimball, S. R. e Jefferson, L. S. Control of protein synthesis by amino acid availability. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 5(1): 63-7, 2002.
- Kimball, S. R. e Jefferson, L. S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. **Am J Clin Nutr** 83(2): 500S-507S, 2006.
- Kimball, S. R. e Jefferson, L. S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **J Nutr** 136(1 Suppl): 227S-31S, 2006.
- Kobayashi, H.; Kato, H. *et al.* Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. **J Nutr** 136(1 Suppl): 234S-6S, 2006.
- Kramer, H. F. e Goodyear L. J. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol** 103(1): 388-95, 2007.
- Li, Q. e Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol** 2(10): 725-34, 2002.

- Lynch, C. J.; Hutson, S. M. *et al.* Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 283(4): E824-35, 2002.
- Marqueste, T.; Giannesini, B. *et al.* Comparative MRI analysis of T2 changes associated with single and repeated bouts of downhill running leading to eccentric-induced muscle damage. **J Appl Physiol** 105(1): 299-307, 2008.
- Matsumoto, K.; Koba, T. *et al.* Branched-chain amino acid supplementation attenuates muscle soreness, muscle damage and inflammation during an intensive training program. **J Sports Med Phys Fitness** 49(4): 424-31, 2009.
- Mero, A.; Leikas, A. *et al.* Effect of strength training session on plasma amino acid concentration following oral ingestion of leucine, BCAAs or glutamine in men. **Eur J Appl Physiol** 105(2): 215-23, 2009.
- Mourkioti, F. e Rosenthal, N. NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. **J Mol Med** 86(7): 747-59, 2008.
- Norton, L. E. e Layman, D. K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. **J Nutr** 136(2): 533S-537S, 2006.
- Norton, L. E. e Layman, D. K., *et al.* The leucine content of a complete meal directs peak activation but not duration of skeletal muscle protein synthesis and mammalian target of rapamycin signaling in rats. **J Nutr** 139(6): 1103-9, 2009.
- Pastre, C. M.; Bastos, F. N. *et al.* Post-exercise recovery methods: a systematic review. **Rev Bras Med Esporte** 15: 138-144, 2009.
- Petersen, A. M. e Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol** 98(4): 1154-62, 2005.
- Pedersen, B. K.; Akerstrom, T. C. *et al.* Role of myokines in exercise and metabolism. **J Appl Physiol** 103(3): 1093-8, 2007.
- Pedersen, B. K. e Febbraio, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev** 88(4): 1379-406, 2008.
- Psilander, N.; Damsgaard, R. *et al.* Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. **J Appl Physiol** 95(3): 1038-44, 2003.
- Rogero, M. M; Mendes, R. R.; Tirapegui, J. Aspectos neuroendócrinos e nutricionais em atletas submetidos a overtraining. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** 49(3): 359-368, 2005.

Rogero, M. M.; Tirapegui, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 44(4), 2008.

Rosa Neto, J. C.; Lira, F. S. *et al.* Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **Eur J Appl Physiol** 106(5): 697-704, 2009.

Rossi, L. Aminoácidos de cadeia ramificada e atividade física in: Tirapegui, J. (editor). **Nutrição, Metabolismo e Suplementação na Atividade Física**. 1ª edição. São Paulo: Atheneu, 2005.

Roumen, C.; Blaak, E. E. *et al.* Lifestyle intervention for prevention of diabetes: determinants of success for future implementation. **Nutr Rev** 67(3): 132-46, 2009.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning*. 2ª edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Shimomura, Y.; Yamamoto, Y. *et al.* Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. **J Nutr** 136(2): 529S-532S, 2006.

van Someren, K. A.; Edwards, A. J. *et al.* Supplementation with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) and alpha-ketoisocaproic acid (KIC) reduces signs and symptoms of exercise-induced muscle damage in man. **Int J Sport Nutr Exerc Metab** 15(4): 413-24, 2005.

Thomson, A. W.; Turnquist, H. R. *et al.* Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nat Rev Immunol** 9(5): 324-37, 2009.

Uchida, M. C.; Nosaka, K. *et al.* Effect of bench press exercise intensity on muscle soreness and inflammatory mediators. **J Sports Sci** 27(5): 499-507, 2009.

Vary, T. C.; Goodman, S. *et al.* Nutrient regulation of PKCepsilon is mediated by leucine, not insulin, in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289(4): E684-94, 2005.

Weichhart, T.; Costantino, G. *et al.* The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. **Immunity** 29(4): 565-77, 2008.

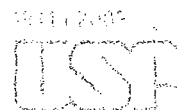
Yang, X.; Yang, C. *et al.* The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. **J Anim Sci** 86(14 Suppl): E36-50, 2008.

ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética em Experimentação Animal



Ofício CEEA/FCF/112/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeito da suplementação com leucina no reparo do dano celular induzido por exercício agudo em ratos adultos” (Protocolo nº 254), de responsabilidade da pesquisadora **Tatyana Dias de Paula** sob a orientação do Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 9 de novembro de 2009.

São Paulo, 10 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP