

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO
COM LEUCINA SOBRE A RESPOSTA ATRÓFICA DA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO USO DE DEXAMETASONA

Nelo Eidy Zanchi

SÃO PAULO
2011

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO
COM LEUCINA SOBRE A RESPOSTA ATRÓFICA DA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO USO DE DEXAMETASONA

Nelo Eidy Zanchi

Dissertação apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da Universidade
de São Paulo, como requisito para obtenção
do grau de Doutor em Educação Física.

ORIENTADOR: PROF.DR. ANTONIO HERBERT LANCHÁ JUNIOR

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Wagner Zanchi, Rosa Leiko Zanchi e ao meu irmão Fábio Akira Zanchi pelo apoio, carinho, muita paciência e por terem incondicionalmente acreditado em mim;

Ao Professor Dr. Antonio Herbert Lancha Junior pela sabedoria, talento e principalmente pela chance perante a carreira acadêmica, ao qual serei eternamente grato.

Aos amigos (sem ordem de importância), Mário Alves de Siqueira Filho, Fabio Santos de Lira, José Cesar Rosa, Vitor Felitti, Lucas Ferreira-Guimarães, Frederico Guerlinger-Romero, Humberto Nicastro e diversos outros que não serão citados por limitações de espaço, mas que possuem cadeira cativa em meu coração.

Aos Professores Marília Seelaender, Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Mariz Vainzof, Jacques Remy Poortmans, François Blachier e tantos outros que tive o orgulho e o prazer de conhecer e de trabalhar em seus laboratórios para confecção deste e de tantos outros subprojetos.

A FAPESP, pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

“A cada dia que passa gosto mais de interagir com pessoas diferentes e seus universos particulares”

SUMÁRIO

	Página
	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	3
3 OBJETIVOS	5
3.1 Geral	5
3.2 Específicos	5
4 REVISÃO DA LITERATURA	5
4.1 Glicocorticóides	5
4.2 Glicocorticóides e atrofia da musculatura esquelética	8
4.3 Leucina	13
4.4 Suplementação com leucina e tratamento com glicocorticóides	14
5 MATERIAIS E MÉTODOS	16
5.1 Amostra e manipulação dos animais	16
5.1.2 Estudo 1	17
5.1.3 Suplementação com leucina	17
5.1.4 Estudo 2	18
5.1.5 Glicemia, insulinemia, índice HOMA-IR e triaciglicerol (TAG) de jejum	19
5.1.6 Testes de função muscular voluntária	19

5.1.7	Eutanásia dos animais	20
5.1.8	Análise da miosina de cadeia pesada (MHC) através de <i>Western Blot</i>	21
5.1.9	Extração do RNA e PCR em tempo real	21
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
7	RESULTADOS	23
7.1	Estudo 1	23
7.2	Estudo 2	32
8	DISCUSSÃO	38
9	CONCLUSÕES	43
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Propriedades gerais de diferentes tipos de glicocorticóides.....	07
TABELA 2 - Primers utilizados para análise através da técnica de RT-PCR em tempo real.....	23
TABELA 3 - Parâmetros morfológicos corporais e musculares dos grupos experimentais.....	24
TABELA 4 - Glicemia pós-prandial (mg/dl) dos grupos experimentais nos dias 1, 3 e 6 de estudo.....	31
TABELA 5 - Peso corporal e parâmetros morfológicos dos grupos experimentais.....	33
TABELA 6 - Glicemia pós-prandial (mg/dl) dos grupos experimentais nos dias 1, 3 e 6 de estudo.....	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Sistema ubiquitina-proteassoma (UP) de degradação protéica.....	10
FIGURA 2 - Modelo de sinalização celular envolvendo a via Akt e o sistema Ubiquitina.....	12
FIGURA 3 - Estrutura do aminoácido leucina em pH 7,4	14
FIGURA 4 - Expressão gênica de FoXO1A, Atrogina-1 e MuRF-1 nos músculos sóleo e EDL.....	26
FIGURA 5 - Expressão de miosina nos músculos sóleo e EDL.....	28
FIGURA 6 - Expressão gênica de GLUT-4 nos músculos sóleo e EDL.....	30
FIGURA 7 - Avaliação funcional da musculatura esquelética	32
FIGURA 8 - Expressão gênica de Atrogina-1 e MuRF-1 no músculo sóleo e EDL	34
FIGURA 9 - Expressão gênica de GLUT-4 nos músculos sóleo e EDL e glicemia, insulinemia, triacilgliceridemia e índice HOMA-IR avaliados em jejum.....	36
FIGURA 10 - Avaliação funcional da musculatura esquelética.....	38

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Akt1	Proteína quinase B isoforma 1
19S	Complexo regulatório do proteassoma
20S	Núcleo catalítico do proteassoma
26S	Complexo proteassoma
Atrogin-1	Atrophy gene-1
MuRF-1	Muscle ring finger protein-1
FOXO	Forkheadbox O
DNA	Ácido desoxiribonucléico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
GLUT4	Transportador para glicose isoforma 4
IR	Receptor de insulina
IRS1	Substrato 1 do receptor de insulina
mTOR	Mammalian target of rapamycin
RNA	Ácido ribonucléico
ATP	Adenosina trifosfato

RESUMO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO
COM LEUCINA SOBRE A RESPOSTA ATRÓFICA DA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELO USO DE DEXAMETASONA

Autor: NELO EIDY ZANCHI

Orientador: PROF.DR. ANTONIO HERBERT LANCHÁ JUNIOR

A dexametasona (DEXA) é um potente agente imunossupressor e antiinflamatório, mas apresenta importantes efeitos colaterais, tais como a atrofia muscular e a resistência à ação da insulina nos músculos esqueléticos. Neste contexto, a suplementação com leucina poderia representar uma estratégia nutricional terapêutica capaz de limitar os efeitos colaterais do tratamento com DEXA. Neste estudo, foram investigados os efeitos da suplementação com leucina em baixas e altas doses sobre a massa muscular, força muscular, assim como vários marcadores metabólicos que estão sob controle da insulina em ratos com restrição calórica e em ratos tratados com DEXA. Como a resposta da suplementação com leucina pode também estar ligada à forma de administração desse aminoácido, realizamos experimentos com leucina administradas via gavagem (bolus) versus leucina diluída no bebedouro dos animais. A suplementação com leucina demonstrou preservar a massa muscular, a força muscular voluntária média e a homeostasia da glicose em animais sob restrição calórica, mas este efeito foi observado apenas com a leucina suplementada em baixas concentrações/doses. Este efeito da leucina sobre a massa muscular esteve associado com a expressão de genes envolvidos no remodelamento da musculatura esquelética. Quanto ao efeito da leucina sobre a homeostasia da glicose, um efeito benéfico do aminoácido foi observado com a suplementação em baixas doses, o qual foi evidenciado pelos dados metabólicos avaliados. No entanto, sob tratamento com DEXA, a suplementação com leucina agravou o estado "diabetogênico" dos animais. Por último, a via de administração da leucina influenciou significativamente a resposta a este aminoácido, onde a suplementação via gavagem mostrou-se menos prejudicial do que a

suplementação com leucina diluída nos bebedouros, ao menos em relação ao aspecto diabetogênico causado pelo tratamento concomitante com DEXA.

Palavras-chave: Suplementação com leucina, massa muscular esquelética, força muscular voluntária, homeostasia da glicose.

ABSTRACT

EFFECTS OF LEUCINE SUPPLEMENTATION ON SKELETAL MUSCLE ATROPHY
DEXAMETHASONE-INDUCED

Author: NELO EIDY ZANCHI

Adviser: PROF.DR. ANTONIO HERBERT LANCHA JUNIOR

Dexamethasone (DEXA) is a potent immunosuppressor and anti-inflammatory agent but presents side effects such as muscle atrophy and insulin resistance in skeletal muscles. In this context, leucine supplementation may represent a way to limit the DEXA side effects. In this study, we investigated the effects of a low and a high dose of leucine on muscle mass, on muscle strength as well as on several metabolic markers that are under insulin control in energy-restricted and DEXA-treated rats. Since leucine response may also be linked to the way of administration of this amino acid, we performed experiments with leucine given in a gavage versus leucine given in drinking water way. Leucine supplementation was found to spare muscle mass, voluntary medium strength and glucose homeostasis in energy restricted animals but the effect was observed only with the low dose/concentration of leucine. The leucine effect on muscle mass was associated with expression of genes involved in muscle remodeling. However, under DEXA treatment, leucine supplementation was found to aggravate the diabetogenic state. Lastly, the route of leucine administration was found to significantly influence this variable to this amino acid, where leucine supplemented via gavage demonstrated to be less deleterious than supplemented diluted in the water drink, concomitantly with DEXA treatment.

Keywords: Leucine supplementation, skeletal muscle mass, voluntary medium strength and glucose homeostasis.

1 INTRODUÇÃO

A suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês *branched chain aminoacid* ou BCAA, compostos pelos aminoácidos leucina, isoleucina e valina), especialmente a leucina, tem sido descrita com sendo uma estratégia terapêutica nutricional capaz de evitar a atrofia do músculo esquelético induzida por diversas situações catabólicas como o câncer, sepse, doenças musculares (NICASTRO, ARTIOLI, DOS SANTOS COSTA, SOLIS, DA LUZ, BLACHIER & LANCHAJR, 2011) e possivelmente o tratamento com glicocorticóides (ZANCHI, FILHO, FELITTI, NICASTRO, LORENZETI & LANCHAJR, 2010). Em ratos e seres humanos saudáveis, a suplementação com leucina tem demonstrado inibir rapidamente a proteólise muscular (NAGASAWA, KIDO, YOSHIZAWA, ITO & NISHIZAWA, 2002; ZANCHI, NICASTRO & LANCHAJR, 2008), além de promover aumento na síntese protéica muscular (CROZIER, KIMBALL, EMMERT, ANTHONY & JEFFERSON, 2005), possuindo, portanto propriedades anti-catabólicas. Digno de nota, os efeitos da suplementação com leucina sobre a síntese protéica parecem ser tempo dependente, significando que a estimulação protéica através da suplementação com aminoácidos ocorre durante certo período de tempo (~1hora), após o qual retorna para valores basais (BOHÉ, LOW, WOLFE & RENNIE, 2001). Estas observações em conjunto, sugerem não só o uso crônico, mas também o uso repetido (várias vezes ao dia) da suplementação com leucina para o aumento da síntese protéica. No entanto, poucos estudos têm adotado tais propostas.

De forma oposta, uma vez que dentre os aminoácidos a leucina é considerada o segundo maior potente secretagogo de insulina (NAIR & SHORT, 2005), este aminoácido tem sido estudado por sua capacidade em modular positivamente (LAYMAN & BAUM, 2004) ou negativamente (DESHMUKH, SALEHZADEH, METAYER-COUSTARD, FAHLMAN, NAIR & AL-KHALILI, 2009) o metabolismo da glicose nos músculos esqueléticos. De fato, a suplementação com leucina pode exercer importantes efeitos positivos no metabolismo da glicose durante a perda de massa corporal (LAYMAN & BAUM, 2004). Contudo, seus efeitos dose-dependentes

in-vivo, bem como sua influência em relação às suas vias de administração permanecem elusivas.

A dexametasona (DEXA) é uma forma sintética do hormônio endógeno cortisona, o qual apresenta potentes propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias (ZANCHI, FILHO, FELITTI, NICASTRO, LORENZETI & LANCHAJR, 2010). O sucesso dos benefícios terapêuticos desta droga em uma ampla variedade de doenças inflamatórias é, contudo, limitado, uma vez que a mesma apresenta diversos efeitos colaterais (STAHN & BUTTGEREIT, 2008) como a indução de atrofia muscular e resistência à ação da insulina, através de ações genômicas e não genômicas respectivamente (HU, WANG, LEE, DU & MITCH, 2009; SAAD, FOLLI, KAHN & KAHN, 1993). De fato, em algumas situações, os músculos tornam-se tão fracos que impossibilitam a saída do indivíduo do leito (LOELL & LUNDBERG, 2011).

Assim, a fim de promover os efeitos desejados do tratamento com DEXA em altas doses, as respostas deletérias devem ser reduzidas. Neste contexto, a suplementação com leucina poderia representar uma interessante intervenção nutricional.

Uma vez que existe falta de evidência científica a respeito dos efeitos benéficos da suplementação com leucina no tratamento com DEXA, decidimos investigar se a suplementação com leucina em baixa dose (incapaz de aumentar a insulinemia) ou em alta dose (capaz de aumentar a insulinemia) também são hábeis em preservar ou aumentar a massa muscular e conseqüentemente a força muscular voluntária, bem como diversos marcadores metabólicos que estão sob controle da insulina (aqui designados como homeostasia da glicose) em ratos saudáveis (sob restrição energética) e não-saudáveis tratados com altas doses de DEXA (diabéticos e atróficos). Uma vez que a resposta à suplementação com leucina pode também estar ligada à latência de seu efeito, também realizamos experimentos a fim de investigar a influência da via de administração (leucina ofertada via gavagem versus leucina diluída na água dos bebedouros) sob os mesmos parâmetros. Apesar do conteúdo total de leucina ser o mesmo ao final de cada dia de tratamento, é sabido que flutuações plasmáticas nas concentrações de aminoácidos influenciam também a

taxa de secreção de insulina e dessa forma podem trazer importantes repercussões sobre marcadores do metabolismo glicídico e sobre a atrofia muscular, quando administrados concomitantemente ao tratamento com dexametasona.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente não há tratamento totalmente eficaz e seguro disponível para se evitar a atrofia muscular esquelética. Conseqüentemente, a busca por novas estratégias faz-se necessária. O quadro de atrofia muscular é uma importante consequência indireta de diversas enfermidades ou do tratamento com fármacos. Este é o caso do tratamento com o glicocorticóide sintético DEXA, especialmente em altas doses e durante prolongado período de tempo. Sob esta ótica, Dardevet et al., (1995) demonstraram que em ratos adultos, a atrofia muscular desencadeada pelo uso de dexametasona durante seis dias não parece ser fruto da diminuição da síntese protéica muscular, mas sim do aumento da proteólise muscular desencadeada pelo sistema ubiquitina-proteassoma.

De importância, constitui-se o fato de que a adoção da suplementação de leucina em diferentes doses/concentrações pode potencialmente repercutir em resultados anti-atróficos, através da diminuição da proteólise muscular (ZANCHI, NICASTRO & LANCHÁ-JR, 2008). Assim, o uso do aminoácido leucina parece ser uma importante estratégia nutricional a ser utilizada na reversão/atenuação da atrofia muscular desencadeada pelo tratamento com DEXA. Apesar de uma série de importantes estudos demonstrarem que a suplementação com leucina é capaz de inibir a atrofia muscular em diversas situações catabólicas, pouco se conhece sobre sua relação entre dose e efeito relacionado aos mecanismos inibidores de proteólise muscular sob tratamento concomitante com DEXA. Entretanto, cabe ressaltar que durante o tratamento com DEXA, se observa o fenômeno de resistência anabólica ao aminoácido leucina (CUTHBERTSON, SMITH, BABRAJ, LEESE, WADDELL, ATHERTON, WACKERHAGE, TAYLOR & RENNIE, 2005), ou seja, a resposta anabólica basal do músculo esquelético à estimulação exógena

por nutrientes, especialmente aminoácidos de cadeia ramificada, é menos sensível e com menor probabilidade de resultar em ganho protéico em decorrência da alimentação (CUTHBERTSON et al., 2005). Assim, durante o tratamento com DEXA, a oferta aumentada de leucina suplementada à dieta parece constituir uma estratégia racional na reversão da atrofia muscular. Corroborando esta informação, importantes estudos realizados por Busquets et al., (2000) demonstraram que a suplementação ex-vivo e in-vitro de leucina em altas concentrações (~5mM) é capaz de inibir, de maneira dose dependente, a proteólise muscular. Entretanto, Desmuhk et al., (2009) demonstraram que células musculares esqueléticas da linhagem C₂C₁₂ tratadas com leucina na mesma concentração (5mM) apresentaram o fenômeno de resistência à ação da insulina. Em adição, no pâncreas endócrino, a leucina é também um importante secretagogo de insulina (NAIR & SHORT, 2005). Assim, é possível especular que incrementos supra-fisiológicos nas doses de leucina, ofertadas isoladamente, poderiam oferecer maior preservação da massa muscular durante processos catabólicos (ex. restrição energética ou tratamento com DEXA). Entretanto, não se pode afirmar ao certo se a suplementação com leucina em altas dosagens trará somente benefícios em termos de preservação da massa muscular quando comparada a suplementação em baixa dosagem, principalmente por causa de sua ação sobre a homeostasia da glicose.

Assim, será de interesse deste projeto investigar se a suplementação crônica de leucina em baixas e altas concentrações respectivamente, ofertadas através de diferentes formas de administração (gavagem vs leucina diluída na água dos bebedouros), são capazes de preservar a massa muscular através da inibição do sistema ubiquitina-proteassoma, de preservar a função muscular e de preservar a homeostasia da glicose em ratos sob restrição energética e sob o tratamento com DEXA em altas dosagens.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem por objetivo investigar os efeitos da suplementação com leucina em diferentes doses bem como sua via de administração sobre a preservação da massa muscular esquelética, a preservação da função muscular e a manutenção da homeostase da glicose sob condição de restrição energética e/ou tratamento com DEXA em altas doses, durante sete dias.

3.2 Específicos

Analisar em animais sob restrição energética e/ou tratamento com DEXA, as seguintes questões:

- a) A suplementação com leucina via gavagem em baixa ou alta dose é capaz de preservar a massa muscular dos animais suplementados?
- b) A suplementação com leucina em baixa ou alta dose é capaz de melhorar a função muscular avaliada através de testes de força voluntários?
- c) A homeostasia da glicose é beneficiada sob a suplementação com leucina em baixa ou alta dose?
- d) A via/rota de administração da suplementação com leucina (gavagem versus leucina diluída nos bebedouros) é capaz de modular as variáveis supracitadas em ratos tratados com DEXA?

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Glicocorticóides

Os corticosteróides são hormônios sintetizados pela glândula adrenal a partir do esteróide colesterol, sendo classificados como glicocorticóides, mineralocorticóides ou androgênios. O córtex é a porção da glândula adrenal responsável pela secreção de cortisol (ou hidrocortisona), o principal hormônio glicocorticóide endógeno. Especificamente, a zona fasciculada (camada média) e a zona reticular (camada profunda), são as regiões do córtex responsáveis por sua produção. Os glicocorticóides recebem esta denominação devido ao seu importante efeito sobre o metabolismo de glicose. O efeito mais bem conhecido dos glicocorticóides é a sua capacidade de estimular a gliconeogênese (formação de glicose a partir de proteínas e outros substratos energéticos) pelo fígado, freqüentemente aumentando a taxa de gliconeogênese de seis a dez vezes. Estes efeitos são oriundos tanto do aumento da capacidade do fígado em converter aminoácidos em glicose, quanto da aumentada capacidade da musculatura esquelética em mobilizar aminoácidos (GUYTON & HALL, 1999).

Além de suas ações sobre o metabolismo dos carboidratos, os glicocorticóides possuem numerosas funções fisiológicas, incluindo efeitos sobre a responsividade vascular, imunossupressão, inflamação e funcionamento do sistema nervoso central (LaPier, 1997). Durante processos infecciosos, a administração de glicocorticóides causa uma importante redução nos linfócitos circulantes e supressão de anticorpos (DJULBEGOVIC, BLUMENREICH, HADLEY & JOSEPH, 1992). Em altas doses, os glicocorticóides inibem a inflamação e reações alérgicas. Essas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras são usadas terapêuticamente em uma ampla variedade de condições patológicas, incluindo doenças cardíacas, asma brônquica, doença pulmonar obstrutiva crônica e em pacientes transplantados cardíacos, pulmonares e renais (KHALEELI, EDWARDS, GOHIL, McPHAIL, RENNIE, ROUND & ROSS, 1983).

O espectro de condições patológicas nas quais os glicocorticóides são freqüentemente prescritos como parte do tratamento farmacológico de pacientes é extremamente amplo e variado. Dessa forma, dependendo da condição patológica e do tecido alvo, os glicocorticóides podem ser administrados em preparações óticas, oftálmicas, inalação, tópica e sistêmica. Algumas propriedades de diferentes

corticóides usados farmacologicamente estão listadas na tabela 1 (adaptada de GUYTON & HALL, 1999).

TABELA 1- Propriedades gerais de diferentes tipos de glicocorticóides.

Tipo	Potência	Fonte
Cortisol	Potente, 95% da atividade total do organismo	Endógeno
Corticosterona	Baixa, 4% da atividade total do organismo	Endógeno
Cortisona	Quase tão potente quanto o cortisol	Sintética
Prednisona	4x mais potente do que o cortisol	Sintética
Metilprednisona	5x mais potente do que o cortisol	Sintética
Dexametasona	30 x mais potente do que o cortisol	Sintética

A investigação das funções fisiológicas e da regulação dos hormônios da glandula adrenal começou a pouco mais de um século. Cushing foi o primeiro a descrever as características clínicas do uso excessivo de glicocorticóides, em 1932 (LaPier, 1997). Posteriormente, os glicocorticóides foram utilizados principalmente para aliviar os sintomas da artrite reumatóide em 1950 (LaPier, 1997). Este evento gerou o impulso inicial para que diversos estudos procurassem formas de atenuar efeitos colaterais causados pelo uso de glicocorticóides.

Um dos efeitos colaterais mais importantes do uso intenso e prolongado de glicocorticóides é a atrofia do músculo esquelético. Em algumas situações, os músculos tornam-se tão fracos que impossibilitam a saída do indivíduo do leito (LOELL & LUNDBERG, 2011).

4.2 Glicocorticóides e atrofia da musculatura esquelética

Como dito anteriormente, a atrofia da musculatura esquelética induzida pelo uso de glicocorticóides é uma manifestação com importantes repercussões clínicas, como a diminuição de sua funcionalidade/geração de força. Este fenômeno abrange a diminuição seletiva no tamanho dos músculos com predominância de fibras de contração rápida quando comparados com músculos predominantemente compostos por fibras de contração lenta (ex. músculo EDL ou Extensor Digital Longo dos dedos vs músculos sóleo, respectivamente) (ALMON & DUBOIS, 1990).

Tradicionalmente, o fenômeno da atrofia induzida por glicocorticóides foi entendido como sendo uma consequência do aumentado catabolismo de aminoácidos na musculatura esquelética, com consequente aumento da gliconeogênese no fígado. Sob esta ótica, o aumento na atividade/expressão da enzima glutamina sintase na musculatura esquelética pareceu ser uma importante explicação fenomenológica, uma vez que mais de 50% dos aminoácidos utilizados pelo fígado no processo de gliconeogênese encontram-se sob a forma de glutamina (ALMON & DUBOIS, 1990). No entanto, o tratamento com glicocorticóides exerce uma profunda predominância atrofica sobre os músculos/fibras musculares de contração rápida (tipo II), os quais exibem apenas metade da expressão e atividade da enzima glutamina sintase quando comparados aos músculos/fibras musculares de contração lenta (Tipo I) (MAX, MILL, MEAROW, KONAGAYA, KONAGAYA, THOMAS, BANNER & VITKOVIĆ, 1988). Desta forma, este tipo de atrofia muscular não parece ser uma consequência direta da indução desta enzima.

Apesar dos efeitos catabólicos dos glicocorticóides serem reconhecidos há mais de trinta anos, seus mecanismos moleculares tem permanecido elusivos. Este questionamento é clinicamente relevante, pois os glicocorticóides permanecem amplamente prescritos na prática médica. Sob esta ótica, Dardevet et al., (1995) demonstraram que em ratos adultos, a atrofia muscular desencadeada pelo uso de dexametasona durante seis dias não parece ser fruto da diminuição da síntese protéica muscular, mas sim do aumento da proteólise muscular desencadeada pelo sistema ubiquitina-proteassoma.

Quando o músculo esquelético encontra-se em estado de atrofia, há ativação de um programa gênico capaz de degradar proteínas musculares. Isto se deve ao fato de que uma grande parte das proteínas musculares “marcadas” para o processo de degradação pelo proteassoma, tem que estar acopladas a cadeias compostas por no mínimo cinco unidades da proteína ubiquitina (TAILLANDIER, COMBARET, POUCH, SAMUELS, BÉCHET & ATTAIX, 2004). Para que este processo ocorra, é necessária a presença da enzima ativadora de ubiquitina (E1), da enzima conjugadora de ubiquitina (E2), e em múltiplas condições catabólicas como o câncer, diabetes e o tratamento com glicocorticóides, da enzima ubiquitina ligase (E3) (DERUISSEAU, KAVAZIS, DEERING, FALK, VAN GAMMERE, YIMLAMA, ORDWAY & POWERS, 2004), a qual é transcrita nos processos catabólicos supracitados apenas nos músculos estriados e são codificadas por apenas dois genes específicos denominados Atrogina-1 e MuRF-1 (muscle RING finger protein 1). Estes genes são conhecidos como “atrogenes” tendo sido descobertos quase simultaneamente por dois grupos independentes de pesquisadores chefiados por Alfred Lewis Goldberg e David Glass respectivamente (LECKER, GOLDBERG & MITCH, 2006; LATRES, AMINI, AMINI, GRIFFITHS, MARTIN, WEI, LIN, YANCOPOULOS & GLASS, 2005) (Figura 1)

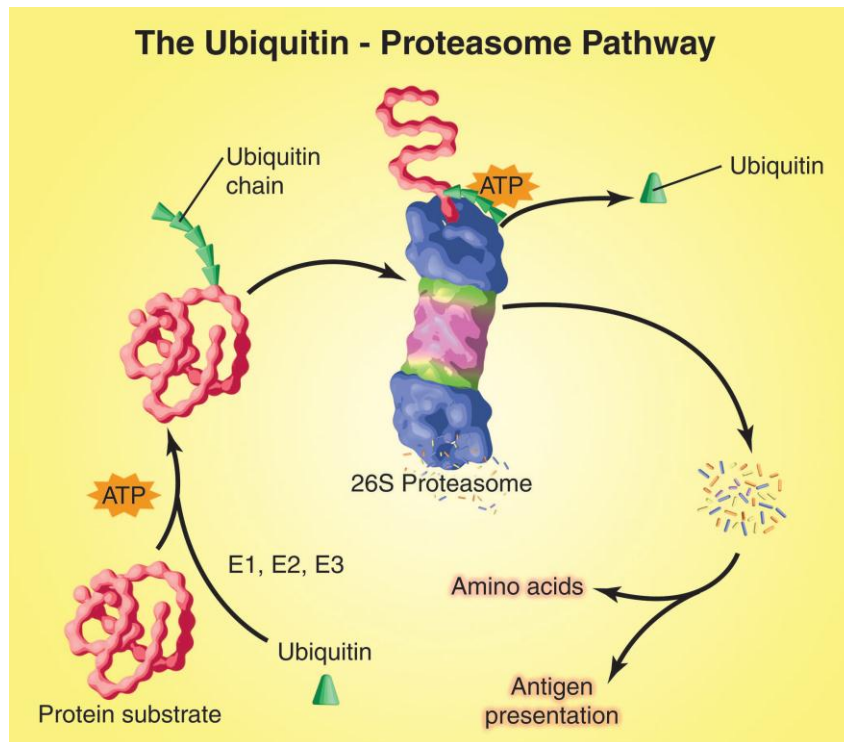


FIGURA 1 - Sistema ubiquitina-proteassoma (UP) de degradação protéica. A proteína ubiquitina (Ub) é conjugada a proteínas que se destinam a degradação por um processo dependente de ATP, que envolve três enzimas. Uma cadeia de cinco moléculas de Ub anexada a proteína substrato é suficiente para o complexo para ser reconhecido pelo proteassoma. De maneira importante, em condições musculares atroficas, observa-se aumento na expressão gênica das E3 ligases Atrogina-1 e MuRF-1, a qual acoplam complexos de Ubiquitina a proteínas musculares. Além dessas reações serem dependentes de ATP, a molécula de Ub é removida pelas subunidades 19S (representadas na figura pela cor azul), tendo a proteína alvo linearizada e injetada no núcleo do proteassoma, sendo digerida a peptídeos. Os peptídeos são degradados em aminoácidos por peptidases no citoplasma ou utilizados na apresentação de antígenos de superfície. (Adaptado de LECKER, GOLDBERG & MITCH, 2006).

Além da degradação protéica, sabe-se que diversas funções fisiológicas são caracterizadas pela ativação do sistema ubiquitina-proteassoma (LECKER et al., 2006). Este sistema exerce uma infinidade de funções, dentre as quais a sinalização intracelular e principalmente a degradação de proteínas mal-formadas advindas do retículo endoplasmático. Dentro do contexto da atrofia muscular induzida pelo uso de dexametasona, a ativação de dois atrogenes parece ter especial importância na degradação de proteínas miofibrilares: o gene codificando a proteína ubiquitina ligase (E3) Atrogina-1 e o gene MuRF-1. Estes dados estão fundamentados, dentre outros, na observação de que células musculares esqueléticas em estado atrófico induzido pelo tratamento com dexametasona são capazes de expressar, de maneira dose dependente, os genes codificando as referidas proteínas (LATRES et al., 2005). Dessa forma, a inibição dos atrogenes parece constituir uma importante estratégia para se evitar a proteólise muscular e a subsequente atrofia muscular induzidas pelo uso de dexametasona.

Embora os processos atróficos e hipertróficos não sejam mecanismos exatamente opostos, é de se esperar que existam pontos comuns na sinalização induzindo aos dois processos. Tal fato parece ser confirmado através da constatação de que a proteína Akt (também conhecida proteína quinase B), tanto pode ativar como pode inativar fatores de transcrição como o FOXO (FOXO, do inglês *forked box O class*), dependendo de seu estado de fosforilação em seu resíduo serina 473. Assim, sob condições anabólicas, a proteína Akt encontra-se fosforilada o qual fosforila uma série de outras proteínas, culminando com a fosforilação do fator de transcrição FOXO. Por sua vez, quando fosforilado, o fator de transcrição FOXO permanece no citoplasma, não translocando-se para o núcleo celular. Assim, as E3 ligases Atrogina-1 e MuRF-1 não são transcritas, e o programa gênico atrófico e proteolítico é bloqueado.

Sob tratamento com glicocorticóides estes fatores de transcrição são ativados, em parte porque o próprio hormônio ligado ao seu receptor é capaz de aumentar a transcrição dos referidos atrogenes (ZANCHI et al., 2010; WADDELL, BAEHR, VAN DEN BRANDT, JOHNSEN, REICHARDT, FURLOW & BODINE, 2008). Entretanto, o tratamento com glicocorticóides também é capaz de induzir resistência

à ação da insulina e desencadear o processo de atrofia muscular. Contudo, neste caso, a diminuição da sensibilidade ao hormônio anabólico insulina desfosforila a proteína ajuante ao receptor de insulina, Akt, e também o fator de transcrição FOXO, translocando-o para o núcleo celular, o qual também acelera a transcrição das E3 ligases envolvidas na proteólise muscular (HOFFMAN & NADER, 2004; HU, WANG, LEE, DU & MITCH, 2009). Estas informações encontram-se esquematizadas na Figura 2.

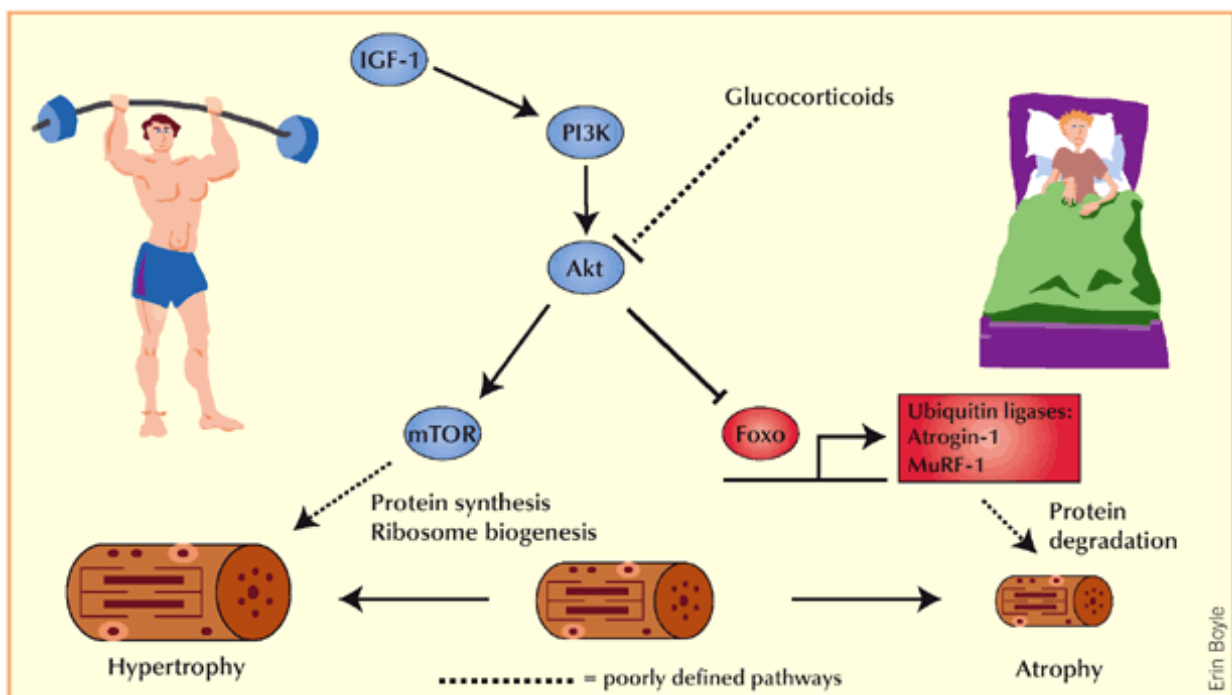


FIGURA 2- Modelo de sinalização celular envolvendo a via Akt e o sistema Ubiquitina - proteassoma induzindo hipertrofia ou atrofia muscular. A indução de um dos dois fenômenos é regulada através do estado de fosforilação da proteína Akt em seu resíduo serina 473, a qual pode ser inativada/desfosforilada por fatores catabólicos, como o tratamento com glicocorticóides, e pode ser ativada/fosforilada por uma série de hormônios anabólicos como por exemplo a insulina. Sob condições anabólicas o fator de transcrição localizado ajuante na via intracelular, FOXO, permanece desfosforilado no citoplasma, não translo-

cando-se para o núcleo celular. Assim, as enzimas E3 ligases Atrogina-1 e MuRF-1 não são transcritas e o programa gênico atrófico é bloqueado. Por outro lado, sob tratamento com glicocorticóides estes fatores de transcrição são ativados em parte por que o próprio hormônio ligado ao seu receptor é capaz de aumentar a transcrição dos atrogenes. Por outro lado, o tratamento com glicocorticóides também é capaz de induzir resistência à ação da insulina, um evento biológico que desfosforila a proteína Akt, translocando o fator de transcrição FOXO para o núcleo celular, ativando as E3 ligases Atrogina-1 e MuRF-1, as quais ubiquitinam proteínas musculares que serão posteriormente degradadas pelo proteassoma. (Adaptado de HOFFMAN & NADER, 2004).

4.3 Leucina

Conforme acontece com todos os aminoácidos, o aminoácido essencial (não produzido pelo organismo ou produzido em quantidades insuficientes para manter sua demanda metabólica em condição de normalidade) leucina, contém um grupo amino carregado positivamente ($-NH_3^+$) e um grupo carboxila carregado negativamente ($-COO^-$) ligados ao mesmo átomo de carbono, o carbono alfa, dentro da faixa do pH fisiológico (pH 5.0 a 8.0). O carbono alfa também forma pontes com a molécula de hidrogênio e um grupo denominado cadeia lateral, sendo este último o determinante da identidade particular de um dado aminoácido. Em relação ao aminoácido leucina, esta cadeia lateral é constituída por um grupo ramificado não polar, o grupo hidrocarbono (MERO, 1999) (Figura 3).

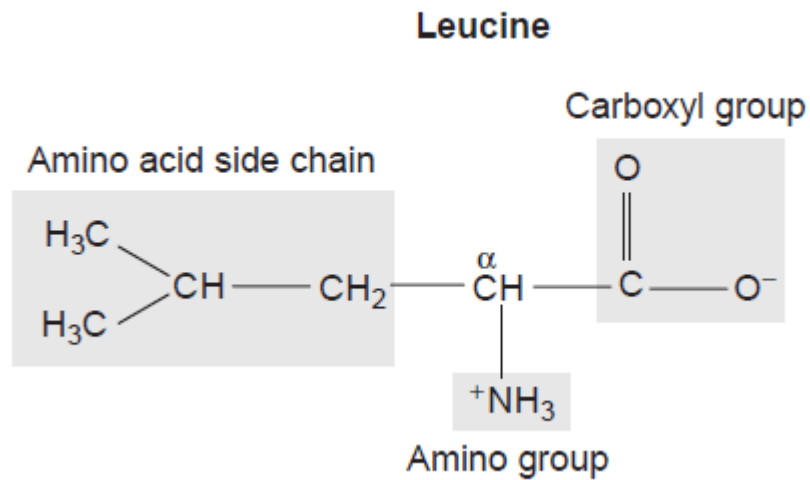


FIGURA 4 - Estrutura do aminoácido leucina em pH 7,4.

4.4 Suplementação com leucina e tratamento com glicocorticóides

Os aminoácidos, em combinação com os hormônios, são conhecidos por serem reguladores primários do balanço protéico corporal. Classicamente, os aminoácidos são conhecidos substratos para a síntese protéica. No entanto, certos aminoácidos, além de substratos, exercem também o papel de sinalizadores celulares, independentemente de seu efeito hormonal (ex. ação independente da secreção de insulina) (LONG, SAFFER, WEI, BARRET, 2000).

Aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) são aminoácidos essenciais e constituem a maior fonte de nitrogênio na musculatura esquelética (NAKASHIMA, ISHIDA, YAMAZAKI, ABE, 2005). Dentre estes aminoácidos, a leucina tem se mostrado especialmente importante para estimular o balanço nitrogenado na direção da positividade.

A presença de leucina constitui o sinal nutricional para indicar ao organismo a disponibilidade de aminoácidos após a ingestão de uma refeição contendo proteína (GARLICK, 2005). Esta observação aumenta sobremaneira a importância deste aminoácido, porque o classifica como importante sinalizador

intracelular, iniciador do processo de síntese protéica (ANTHONY, YOSHIKAWA, ANTHONY, VARY, JEFFERSON, KIMBALL, 2000).

Os efeitos estimulantes da leucina sobre a síntese protéica são bem conhecidos desde a década de 70 (SHERWIN, 1978). No entanto, apenas recentemente seus mecanismos moleculares começaram a ser desvendados. Como dito anteriormente, a ativação da via Akt é capaz de inibir a proteólise celular e de modular positivamente a síntese protéica na musculatura esquelética. Não por acaso, a suplementação com leucina parece estimular consistentemente esta via (KIMBALL, SHANTZ, HORETSKY, JEFFERSON, 1999).

De maneira importante, a suplementação crônica com leucina não parece causar adaptações negativas (downregulation) no funcionamento das proteínas sinalizadoras ou em enzimas metabólicas reguladoras da via Akt/mTOR (LYNCH, HUTSON, PATSON, VAVAL, VARY, 2002). Este mecanismo abre importante precedente para sua suplementação, porque preserva cronicamente a eficácia da mesma. Porém, os efeitos da suplementação com aminoácidos sobre a síntese protéica parecem ser tempo dependente, significando que a estimulação protéica através da suplementação com aminoácidos ocorre durante certo período de tempo (~1 hora), após o qual retorna para valores basais (BOHÉ et al., 2001). Estas observações em conjunto, sugerem não só o uso crônico, mas também o uso repetido (várias vezes ao dia) da suplementação com leucina para o aumento da síntese protéica. No entanto, poucos estudos têm adotado tais propostas.

Os processos de síntese e de degradação são igualmente importantes no equilíbrio do balanço nitrogenado corporal. No entanto, no âmbito da degradação protéica, um número muito menor de informações encontra-se disponível.

Há muito se sabe que os efeitos da suplementação com leucina incluem a inibição da degradação protéica (BUSE & REID, 1975), principalmente através da inibição da degradação de proteínas miofibrilares (NAGASAWA et al., 2002). No entanto, somente muito recentemente começou-se a desvendar os mecanismos moleculares envolvidos neste processo (ZANCHI, NICASTRO & LANCHI-JR, 2008; WADDELL, BAEHR, VAN DEN BRANDT, JOHNSEN, REICHARDT, FURLOW & BODINE, 2008). A suplementação com leucina parece inibir importantes sistemas proteolíticos, como por exemplo, o sistema ubiquitina-proteasoma (NAKASHIMA,

ISHIDA, YAMAZAKI & ABE, 2005). Ainda mais, em preparações isoladas do proteassoma, constatou-se que a leucina é um dos aminoácidos mais eficientes em inibir diversos sítios proteolíticos catalíticos, o que sugere que a leucina possa servir de substrato para o proteassoma, e que a ação da leucina sobre o proteassoma, *per se*, poderia diminuir diretamente sua atividade (HAMEL, UPWARD, SIFORD & DUCKWORTH, 2003). Este achado justifica ainda mais a investigação da suplementação com leucina e suas interações entre dosagens e vias de administração capazes de minimizar a perda de massa muscular desencadeada pelo tratamento com DEXA.

Finalmente, Yamamoto et al., (2010) reportaram que a suplementação com BCAA em baixa dose (600mg/kg) foi capaz de reverter a atrofia do músculo sóleo de ratos tratados com dexametasona durante 5 dias (600µg/kg). Entretanto, a complexidade das interações entre a suplementação com leucina isolada e o tratamento com DEXA em alta dosagem sobre as variáveis previamente descritas ainda não foram reportadas na literatura, até onde pudemos investigar.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra e manipulação dos animais

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia do conselho nacional de pesquisa para cuidado e uso de animais de laboratório. Todos os métodos foram aprovados pelo comitê de ética para pesquisa animal da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo. Ratos adultos machos da raça Wistar provenientes do biotério do instituto de química (média de peso de 440g \pm 5g) foram alocados em caixas individuais sob controle das condições ambientais em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h (início do ciclo escuro às 6:00 h) e temperatura ambiente de 23 \pm 2 °C, alimentados com ração padrão (Nuvilab, Brazil).

5.1.2 Estudo 1

Os animais foram randomizadamente divididos nos seguintes grupos: controle não-suplementado (CON-NS; n=10), controle + leucina baixa-dose (CON-LL; n=10), controle + leucina alta-dose (CON-LH; n=10), DEXA (DEX; n=10), DEXA + leucina baixa-dose (DEX-LL; n=10), DEXA + leucina alta-dose (DEX-LH). Durante sete dias DEXA (um análogo sintético do glicocorticóide cortisol que não se liga a proteínas plasmáticas) foi administrado diariamente (às 09:00h) através de injeções intraperitoneais (5 mg/kg/dia); os grupos controle receberam volume equivalente de salina através de injeções intraperitoneais (0,9% NaCl). Como a DEXA tem sido considerado um fármaco capaz de reduzir o apetite dos animais se ministrado em altas doses, todos os grupos tiveram sua quantidade de ração pareada ao grupo DEX. Dessa forma, diferenças entre os grupos não foram originadas através de possíveis diferenças na ingestão alimentar. Em adição, foi medido o conteúdo calórico da ração padrão utilizada em nosso estudo (16,32 kJ/g) assim como o conteúdo calórico de leucina (25 kJ/g) em uma bomba calorimétrica (FTT Oxygen Bomb Calorimeter, USA) a fim de evitar possíveis diferenças na ingestão calórica entre os grupos. Entretanto, pudemos concluir que a diferença entre o consumo calórico total não foi estatisticamente diferente entre os grupos avaliados.

5.1.3 Suplementação com leucina

Uma suspensão de 54.0 g of L-leucina/L dissolvida em água foi preparada de acordo com Crozier et al. (2005). Ratos pertencentes ao grupo suplementado com leucina receberam uma dose de 0,068 g/kg (baixa-dose) ou 1,35 g/kg (alta-dose) duas vezes ao dia (08:00h e 14:00h) através de gavagem/bolus (CROZIER et al., 2005). Os grupos não suplementados receberam 0,155 mol/L de NaCl com volume de 2,5 mL/100 g de peso corporal duas vezes ao dia. Este volume de salina é equivalente ao volume da suspensão de leucina administrada aos grupos suplementados com leucina e foi escolhida levando-se em conta qualquer possível efeito de volume induzindo efeitos da gavagem administrada por via oral,

contribuindo para anular qualquer possível efeito de expansão gástrica induzindo sinalização celular. A administração de duas doses diárias de leucina foi escolhida para que se mantivessem concentrações plasmáticas aumentadas do referido aminoácido duas vezes ao dia, a fim de contrabalancear os efeitos anorexígenos e catabólicos musculares desencadeados pelo tratamento com DEXA.

5.1.4 Estudo 2

Este estudo foi desenhado a fim de investigar se a suplementação com leucina dissolvida na água e ofertada nos bebedouros é capaz de alterar as concentrações plasmáticas de leucina e de insulina durante cada ingestão de água, quando comparada com a suplementação com leucina via gavagem. Apesar do conteúdo total de leucina ser o mesmo ao final de cada dia de tratamento, é sabido que flutuações plasmáticas nas concentrações de aminoácidos influenciam também a taxa de secreção de insulina e dessa forma podem trazer importantes repercussões sobre marcadores do metabolismo glicídico e sobre a atrofia muscular, quando administrados concomitantemente ao tratamento com dexametasona.

No estudo 2 os animais foram randomizadamente divididos nos seguintes grupos: DEXA + leucina baixa-dose (DEX-LL; n=08), DEXA + leucina baixa-dose na água de beber (DEX-LL-H₂O; n=08), DEXA + leucina alta-dose (DEX-LH; n=08), DEXA + leucina alta-dose na água de beber (DEX-LH-H₂O; n=08). Os grupos receberam a mesma dosagem de DEXA administradas no estudo 1. Todos os grupos foram *pair-fed* ao grupo DEX e nenhuma diferença estatística referente a ingestão alimentar entre os grupos foi observada. Os grupos DEX-LL and DEX-LH foram suplementados via gavagem (0,068 e 1,35 g/kg respectivamente) duas vezes ao dia e alimentados com a mesma dieta regular e volume de água, conforme descrito previamente no estudo 1. Os grupos DEX-LL-H₂O and DEX-LH-H₂O foram suplementados com leucina via bebedouros graduados e a dose de leucina foi ajustada em uma base diária baseados no consumo de água dos bebedouros no dia anterior. A leucina em solução aquosa foi dissolvida na forma

de cristais, os quais foram previamente triturados formando um pó extremamente fina com a ajuda de cadinho e pistilo misturados, banhados em nitrogênio líquido.

5.1.5 Glicemia, insulinemia, índice HOMA-IR e triacilglicerol (TAG) de jejum

A glicemia de jejum foi medida através de sangue coletado da veia caudal após uma noite de jejum (13h) antes da eutanásia ou no estado alimentado, pela manhã nos dias indicados, utilizando-se um glicosímetro digital (ACCU - CHEK Performa, Roche). Imediatamente após a eutanásia, o sangue foi coletado, centrifugado (400 g, 15 min, 4°C) e armazenado a -80°C para posterior análise. As concentrações basais de TAG foram medidas utilizando-se um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Biolab, Brazil). As concentrações de insulina do soro foram quantificadas utilizando-se um kit comercial RIA (DPC®, Brazil). O índice de resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculado segundo o modelo de homeostase para acesso do índice de resistência à insulina, utilizando-se o seguinte cálculo: Índice HOMA-IR ($mmol.mU/L^2$) = $insulina\ de\ jejum\ (mU/L) \times glicose\ do\ soro\ (mmol/L) / 22.5$ (ADAMI, CORDERA, ANDRAGHETTI, CAMERINI, MARINARI & SCOPINARO, 2004).

5.1.6 Testes de função muscular voluntária

A fim de se avaliar a função da musculatura esquelética, dois testes foram efetuados. Estas avaliações são amplamente adotadas como medida da função muscular em camundongos distróficos. A primeira delas, o *Grip Strength System* (ou modelo de preensão manual) (modelo: DFE-002, San Diego Instruments, San Diego, Cal, USA) consiste em um teste no qual os animais são induzidos a agarrar uma grade com as patas dianteiras enquanto o experimentador puxa gentilmente o animal pela cauda. Este teste permite

determinar a força máxima de preensão das patas dianteiras antes que o animal solte-se da grade (ANDERSON, ABDUL & STEWARD, 2004). De maneira importante, estas medidas foram realizadas por um único e experiente avaliador. O segundo teste motor é denominado teste de ambulação. Ele permite determinar a média de comprimento de cada passada do animal, avaliada através da distância das pegadas demarcadas através de tinta aplicada nas patas dos animais e normalizada através do comprimento de cada animal. Brevemente, os ratos são permitidos caminhar livremente através de um corredor confeccionado em madeira (comprimento, 100 cm; largura, 10,5 cm; altura das paredes laterais, 20 cm) 3 vezes. Antes do teste é permitido aos animais explorar o aparato (KENNEL, FONTENEAU, MARTIN, SCHMIDT, AZZOUZ, BORG, GUENET, SCHMALBRUCH, WARTER & POINDRON, 1996). Os valores médios foram individualmente calculados em cada teste, através da média atingida em três testes consecutivos realizados durante 30 segundos.

5.1.7 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados após 13 horas de jejum, depois de serem anestesiados com pentobarbital sódico (Cristália, Brazil) na concentração de (10mg.kg⁻¹ peso corporal) e após ação da anestesia, decapitados através do uso de guilhotina. Os músculos sóleo e EDL de cada pata foram isolados, pesados, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e mantidos posteriormente na temperatura de -80°C para análise.

5.1.8 Análise da miosina de cadeia pesada (MHC) através de *Western Blot*

A análise através de *western blot* foi realizada conforme descrito por Lynch et al., (2002). Brevemente, para o *western blot* de proteínas citosólicas, o

tecido congelado foi triturado utilizando-se cadinho e pistilo e o tecido pulverizado foi homogenizado em 7 volumes de tampão de homogenização (em mM: 20 HEPES; pH 7,4; 2 EGTA; 50 NaF; 100 KCl; 0,2 EDTA; 50 β -glicerofosfato, 1 DTT, 0,1 PMSF; 1 benzamidina; 0,5 vanadato de sódio; e 1 mM microcistina LR) com um homogenizador Polytron. O homogenato foi centrifugado em 10,000 g for 10 minutos em 4°C, e o *pellet* foi descartado. Uma alíquota do subrenadante foi usada para medida da proteína pelo método de Bradford, e o restante foi adicionado a um volume igual de tampão de amostra composto por Laemmli dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura foi borbulhada durante 3 minutos em água e centrifugada em 16,000 g durante 4 minutos. As amostras contendo as proteínas foram separadas em gel contendo 15% de acrilamida e contendo uma concentração de bisacrilamida reduzida que permitisse uma boa resolução eletroforética. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, os blots foram detectados utilizando-se solução de ponceau e os blots para determinação total do conteúdo de miosina foram escaneados na altura da mesma banda correspondente as amostras padrão de miosina. Em adição, *western blots* correspondentes a detecção de miosina foram separados em géis de 15% de acrilamida, corados com solução *coumassie blue*, escaneados e analisados novamente para garantir que a concentração de proteínas analisadas não fosse diferente nas amostras analisadas através da marcação com ponceau devido ao processo de transferência à membrana de nitrocelulose. A proteína miosina foi identificada em cada gel através do marcador para miosina, contendo a proteína MHC purificada (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad).

5.1.9 Extração do RNA e PCR em tempo real

O RNA total foi extraído dos músculos sóleo e EDL sendo homogeneizados com o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. 1 μ g de RNA total foi retranscrito utilizando-se a enzima MMLV (Invitrogen), e uma alíquota foi utilizada para a reação de PCR em tempo real. Todas as reações foram realizadas em volume final de 25 μ l contendo 4 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.25 mM dNTPs (Invitrogen), 1.2U of Taq polymerase (Invitrogen), 1/30000 do fluoróforo Sybr Green (Invitrogen) e oligonucleotídeos específicos para

cada gene, os quais foram desenhados utilizando-se o software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). (Tabela 1). As reações de amplificação foram feitas no equipamento Gene Rotor 3000 (Quiagen Inc.; Hilden, Germany). As reações ocorreram em 40 ciclos sob as seguintes condições: 40 s em 95 °C, 40 s em 65 °C e 40 s em 72 °C. Os produtos exclusivos de cada reação foram verificados utilizando-se a curva de melting e gel de agarose corado com brometo de etídio (Sigma Aldrich). Cada amostra foi amplificada em triplicata. Os níveis de mRNA para GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) foram utilizados como referência (MASCHER, TANNERSTEDT, BRINK-ELFEGOUN, EKBLÖM, GUSTAFSSON & BLOMSTRAND, 2008) e os genes alvos descritos na Tabela 1 foram similarmente medidos e comparados utilizando-se o software Sequence Detector (Applied Biosystems). Os resultados foram expressos como número de vezes das alterações relativas, utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

TABELA 1 – Primers utilizados para análise através da técnica de RT-PCR em tempo real.

Gene	Primer sense	Primer antisense
FoXO1a	5'- GCCCAACCAAAGCTTCCCGC-3'	5'- ATGTTGCCTGCTCACTAACTCCTAGC-3'
Atrogin-1	5'- CGGCACCTTCGTGAGCGACC-3'	5'- GTGCAGTATCCATGGCGCTCCT-3'
MuRF1	5'- GGACCGGCATGGGGTGTACG-3'	5'- TTTCTGCAGGGGCCGACTGG-3'
GLUT-4	5'-GGGCTGTGAGTGAGTGCTTTC-3'	5'-CAGCGAGGCAAGGCTAGA-3'

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis dependentes foram testadas através dos testes ANOVA uma-via ou duas-vias, conforme apropriado. Um teste pós-hoc com ajuste de Tukey foi realizado para propostas de comparações múltiplas. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Os resultados são expressos como médias \pm erro padrão.

7 RESULTADOS

7.1 Estudo 1

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sobre o peso corporal e parâmetros morfológicos musculares.

Como demonstrado na tabela 2, o peso corporal inicial foi similar entre os grupos. Todos os grupos foram caracterizados por uma significativa redução do peso corporal no final do protocolo experimental ($p < 0,05$). Os grupos tratados com dexametasona demonstraram uma significativa redução do peso corporal quando

comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Dessa maneira, a suplementação com leucina em baixas e altas doses não contrabalançou a perda de peso corporal em ambos os grupos, sob restrição energética (grupos controle) e sob tratamento com dexametasona. A massa do músculo sóleo não diferiu entre os grupos. A suplementação com leucina em altas doses atenuou a perda de massa do músculo EDL sob restrição alimentar (grupo CON-LH) quando comparado com o grupo CON-NS ($p < 0,05$). Todos os animais tratados com dexametasona apresentaram redução na massa do músculo EDL quando comparados com o grupo CON-NS ($p < 0,05$) e a suplementação com leucina em ambos baixas e altas doses não atenuaram esta perda.

TABELA 2 – Peso corporal e parâmetros morfológicos dos grupos experimentais.

Variável	Grupo					
	CON-NS	CON-LL	CON-LH	DEX-NS	DEX-LL	DEX-LH
Peso inicial (g)	442.7±5.90	442.2±4.91	441.0±4.35	443.8±6.19	443.3±4.19	444.8±6.16
Peso final (g)	381.9±22.1 ^b	386.3±20.32 ^b	375.0±10.21 ^b	343.4±11.53 ^{a,b}	345.79±15.89 ^{a,b}	339.9±11.73 ^{a,b}
Delta peso (g)	-60.8±4.64	-55.9±5.36	-65.17±4.98	-100.8±2.40 ^a	-103.6±2.08 ^a	-104.5±3.35 ^a
Sóleo (mg)	214.8±5.99	223.3±5.45	221.0±6.13	214.4±4.29	210.8±2.25	212.7±5.45
EDL (mg)	189.4±2.31	197.3±2.08	200.1±1.49 ^a	179.6±3.37 ^a	174.8±2.80 ^a	174.6±4.12 ^a

Valores expressos em média ± E.P. Grupo controle não suplementado (CON-NS; n=10); Grupo controle suplementado com leucina em baixa dose via gavagem (CON-LL; n=10) Grupo controle suplementado com leucina em alta dose via gavagem (CON-LH; n=10); Grupo DEXA não suplementado (DEX-NS; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em baixa dose via gavagem (DEX-LL; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em alta dose via gavagem (DEX-LH; n=10). ^a $p < 0.05$ vs. CON-NS; ^b $p < 0.05$ vs. Peso inicial.

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina na ingestão hídrica. Nos grupos controle, a ingestão hídrica foi significativamente aumentada no grupo CON-LL quando comparado com o grupo

CON-NS no 3º dia do estudo ($p < 0,05$). No 6º dia de tratamento, o grupo DEX-NS mostrou aumentada ingestão hídrica quando comparado com o 1º dia de tratamento ($p < 0,05$) e com o grupo CON-NS no 6º dia de tratamento ($p < 0,05$). O grupo DEX-LL apresentou reduzida ingestão hídrica quando comparado ao 1º dia de tratamento ($p < 0,05$) e aumentada ingestão hídrica quando comparado ao grupo CON-NS no 6º dia de estudo ($p < 0,05$).

Efeitos do tratamento com dexametasona e suplementação com leucina na expressão gênica dos atrogenes e expressão protéica de miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo sóleo. O tratamento com DEXA aumentou significativamente a expressão do gene MuRF-1 (Figura 3C; $1,73 \pm 0,12$ in DEX-NS vs. $1,00 \pm 0,09$ in CON-NS group; $p < 0,05$) mas não de FoXO-1a (Figura 3A), e Atrogina-1 (Figura 3B) quando comparados ao grupo CON-NS. A suplementação com leucina em ambos, baixas e altas doses diminuíram significativamente a expressão do gene FoXO-1a (Figura 3A; $0,18 \pm 0,02$ no grupo CON-LL e $0,51 \pm 0,22$ no grupo CON-LH vs. $1,00 \pm 0,16$ no grupo CON-NS $p < 0,05$) e do gene Atrogina-1 (Figura 3B; $0,39 \pm 0,07$ no grupo CON-LL e $0,31 \pm 0,02$ no grupo CON-LH vs. $1,00 \pm 0,12$ no grupo CON-NS; $p < 0,05$). A expressão gênica de MuRF-1 aumentou no grupo CON-LH quando comparado ao grupo CON-NS (Figura 3C; $1,71 \pm 0,10$ no grupo CON-LH vs. grupo CON-NS; $p < 0,05$). Sob tratamento com DEXA, a suplementação com leucina em ambos, baixas e altas doses aumentaram a expressão gênica de FoXO-1a (Figura 3A; $1,54 \pm 0,29$ no grupo DEX-LL e $1,46 \pm 0,14$ no grupo DEX-LH vs. $1,29 \pm 0,23$ no grupo DEX-NS; $p < 0,05$) e Atrogina-1 (Figura 3B; $1,46 \pm 0,20$ no grupo DEX-LL e $1,94 \pm 0,24$ no grupo DEX-LH vs. $1,73 \pm 0,12$ no grupo DEX-NS; $p < 0,05$) quando comparados a seus respectivos grupos controle.

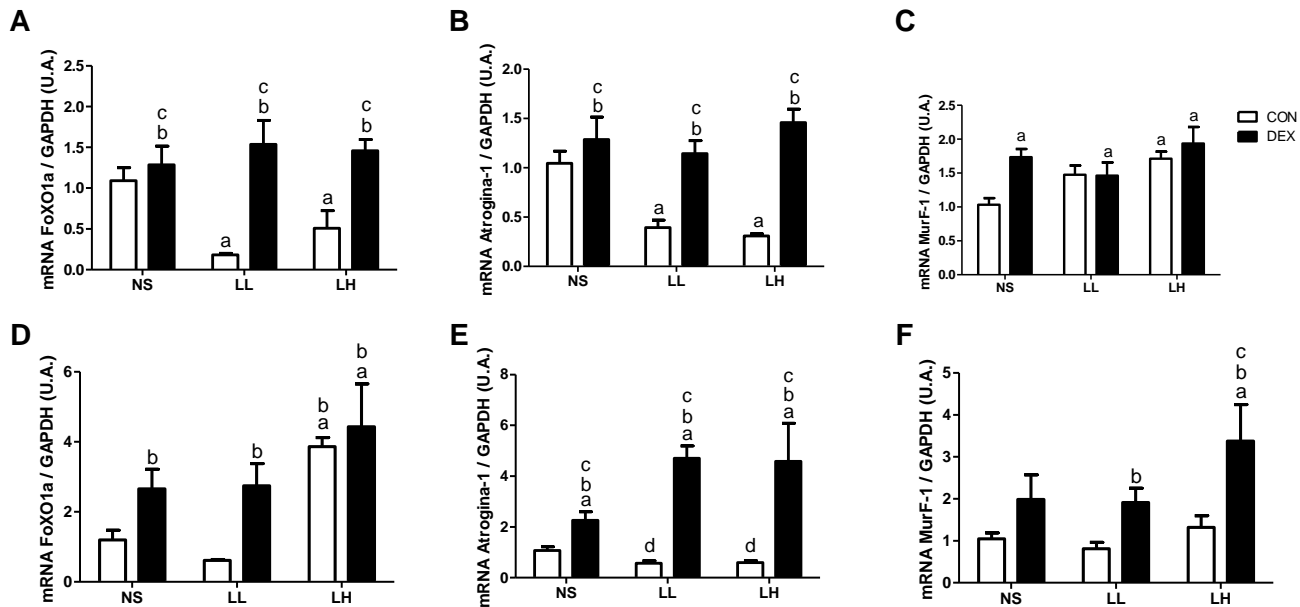


Figura 3 – Expressão gênica (mRNA) de (A) FoXO1A, (B) Atroquina-1 e (C) MuRF-1 no músculo sóleo; (D) FoXO1A, (E) Atroquina-1 e (F) MuRF-1 no músculo EDL dos grupos controle (CON) e DEXA (DEX) não suplementados (NS), suplementados com baixa (LL) e alta dose (LH) de leucina via gavagem. (a) $p < 0.05$ vs. CON-NS; (b) $p < 0.05$ vs. CON-LL; (c) $p < 0.05$ vs. CON-LH.

O conteúdo de miosina de cadeia pesada não foi significativamente modificado nos grupos não suplementados após o tratamento com dexametasona. A suplementação com leucina em altas doses aumentou significativamente o conteúdo muscular de MHC quando comparado ao grupo CON-NS (Figura 3A; 18866 ± 646 no grupo CON-LH vs. 9653 ± 216 no grupo CON-NS; $p < 0,05$). O grupo DEX-LH demonstrou reduzido conteúdo de MHC quando comparado ao grupo CON-LH (Figura 3A; 9532 ± 297 no grupo DEX-LH vs. grupo CON-LH; $p < 0,05$).

Efeitos do tratamento com dexametasona e suplementação com leucina na expressão gênica dos atrogenes e expressão protéica de miosina de cadeia pesada (MHC) no músculo EDL. Em nítido contraste com o que foi observado no

músculo sóleo, o tratamento com dexametasona aumentou significativamente a expressão gênica de FoxO-1a (Figura 4A; $2,66 \pm 0,57$ no grupo DEX-NS vs. $1,19 \pm 0,28$ no grupo CON-NS; $p < 0,05$), MuRF-1 (Figura 4C; $1,98 \pm 0,59$ no grupo DEX-NS vs. $1,00 \pm 0,14$ no grupo CON-NS; $p < 0,05$), e Atrogina-1 (Figura 4B; $2,26 \pm 0,34$ no grupo DEX-NS vs. $1,00 \pm 0,14$ no grupo CON-NS; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CON-NS. A suplementação com leucina em ambas baixas e altas doses diminuíram significativamente a expressão gênica de Atrogina-1 (Figura 4B; $0,39 \pm 0,07$ no grupo CON-LL e $0,31 \pm 0,02$ no grupo CON-LH vs. $1,00 \pm 0,12$ no grupo CON-NS; $p < 0,05$) e em altas doses, aumentou a expressão gênica de FoxO-1a (Figura 4A; $0,51 \pm 0,22$ no grupo CON-LH vs. $1,00 \pm 0,16$ no grupo CON-NS; $p < 0,05$). Quando os grupos tratados com dexametasona foram suplementados em ambas baixas e altas doses de leucina, um aumento na expressão gênica de FoxO-1a (Figura 4A; $1,54 \pm 0,29$ in DEX-LL vs. $0,18 \pm 0,02$ no grupo CON-LL, $p < 0,05$; $1,46 \pm 0,14$ no grupo DEX-LH vs. $0,51 \pm 0,22$ e no grupo CON-LH, $p < 0,05$), MuRF-1 (Figura 4C; $1,46 \pm 0,20$ no grupo DEX-LL vs. $1,47 \pm 0,14$ no grupo CON-LL, $p < 0,05$; $1,94 \pm 0,24$ no grupo DEX-LH vs. $1,74 \pm 0,10$ no grupo CON-LH, $p < 0,05$), e Atrogina-1 (Figura 4B; $1,15 \pm 0,13$ no grupo DEX-LL vs. $0,39 \pm 0,07$ no grupo CON-LL, $p < 0,05$; $1,46 \pm 0,14$ no grupo DEX-LH vs. $0,31 \pm 0,02$ no grupo CON-LH, $p < 0,05$) foram observados quando comparados a seus respectivos grupos controle.

Conforme observado no músculo sóleo, o conteúdo de MHC no músculo EDL foi similar nos grupos não suplementados após o tratamento com dexametasona. Por outro lado, o grupo DEX-LH apresentou conteúdo de MHC significativamente menor quando comparado com o grupo CON-LH (Figura 4B; 16090 ± 509 no grupo CON-LH vs. 5800 ± 2878 no grupo DEX-LH; $p < 0,05$).

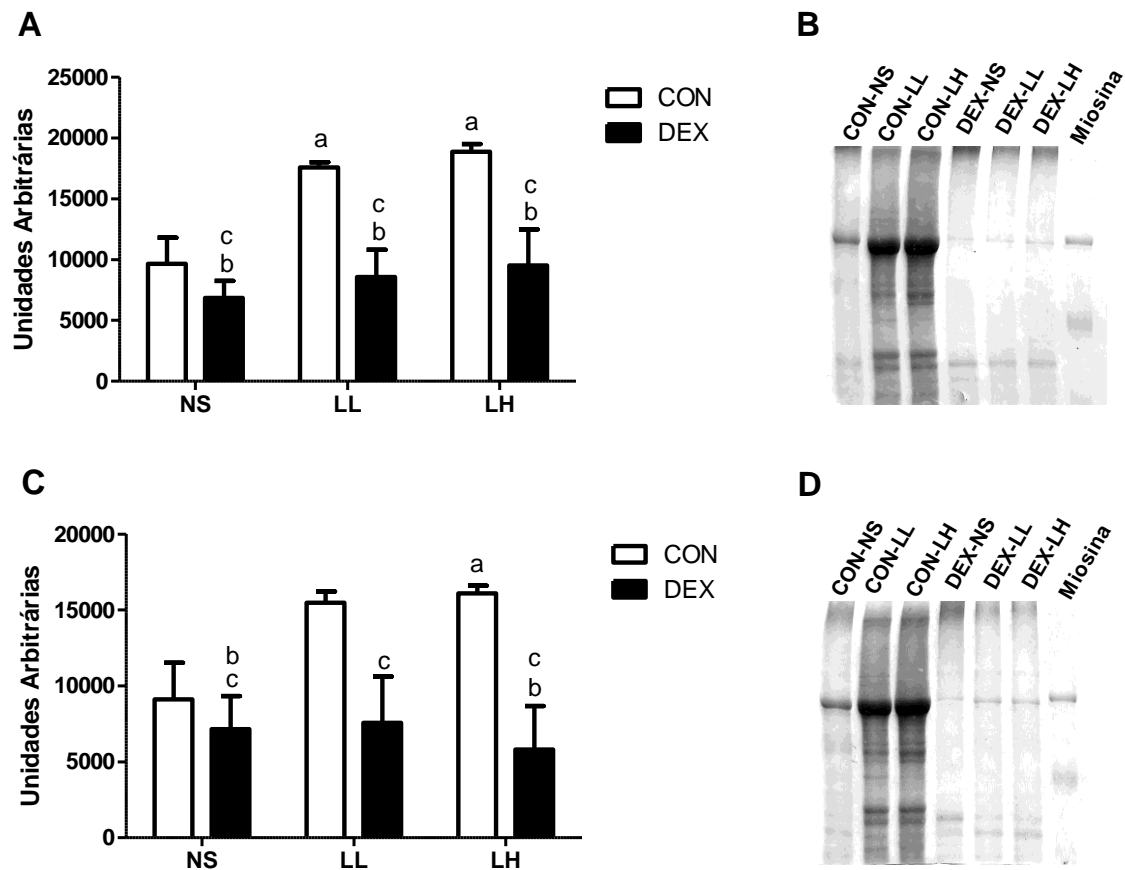


Figura 4 - (A,C) Expressão de miosina nos músculos sóleo e EDL, respectivamente. (B,D) Western Blot representativo da expressão de miosina nos músculos. Valores expressos no músculo sóleo e EDL respectivamente, média \pm E.P. (a) $p < 0.05$ vs. CON-NS; (b) $p < 0.05$ vs. CON-LL; (c) $p < 0.05$ vs. CON-LH.

Efeitos do tratamento com dexametasona e suplementação com leucina na expressão gênica de GLUT-4 nos músculos esqueléticos. No músculo sóleo a expressão do gene GLUT-4 não foi significativamente alterada pela DEXA ou pela suplementação com leucina. Contudo, no músculo EDL o conteúdo de RNAm para GLUT-4 foi significativamente menor nos grupos DEX-NS, DEX-LL and DEX-LH ($0,69 \pm 0,38$, $0,63 \pm 0,18$ and $0,54 \pm 0,17$, respectivamente) quando comparado ao grupo CON-NS ($1,00 \pm 0,15$; $p < 0,05$; Figura 4A). Nos grupos suplementados,

somente o grupo CON-LL mostrou valores mais baixos do que o grupo CON-NS ($0,60 \pm 0,16$ vs. $1,00 \pm 0,15$; $p < 0,05$; Figura 4B).

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sob a glicemia, insulinemia e níveis de triacilgliceróis (TAG) do soro. A glicemia de jejum e os níveis de TAG foram significativamente mais altos no grupo DEX-NS quando comparados com o grupo CON-NS (Figura 5A; $166,6 \pm 20,8$ mg/dl no grupo DEX-NS vs. $118,5 \pm 7,5$ mg/dl no grupo CON-NS $p < 0,05$; Figura 5C; $114,4 \pm 14,4$ mg/dl no grupo DEX-NS vs. $68,3 \pm 9,7$ mg/dl no grupo CON-NS $p < 0,05$). A suplementação com leucina em baixa dose diminuiu as concentrações de insulina e TAG de jejum quando comparados aos grupos CON-NS e CON-LH (Figura 5B; $0,15 \pm 0,01$ mg/dl no grupo CON-LL vs. $2,95 \pm 0,66$ mg/dl no grupo CON-NS e $2,68 \pm 0,79$ mg/dl no grupo CON-LH; $p < 0,05$; Figura 5C; $27,56 \pm 2,89$ mg/dl no grupo CON-LL vs. $68,31 \pm 9,74$ mg/dl no grupo CON-NS; $p < 0,05$). Os grupos DEX-LL e DEX-LH demonstraram aumento na glicemia de jejum (Figura 5A; $157,6 \pm 29,8$ mg/dl no grupo DEX-LL vs. $103,3 \pm 4,0$ mg/dl no grupo CON-LL; $p < 0,05$; $190,1 \pm 27,2$ mg/dl no grupo DEX-LH vs. $96,7 \pm 3,2$ mg/dl no grupo CON-LH; $p < 0,05$), insulina (Figura 5B; $3,54 \pm 0,74$ mg/dl no grupo DEX-LL vs. $0,15 \pm 0,01$ mg/dl no grupo CON-LL; $p < 0,05$; $4,42 \pm 0,51$ mg/dl no grupo DEX-LH vs. $2,68 \pm 0,79$ mg/dl no grupo CON-LH; $p < 0,05$), e TAG (Figura 5C; $122,4 \pm 16,9$ mg/dl no grupo DEX-LL vs. $27,6 \pm 2,9$ mg/dl no grupo CON-LL; $p < 0,05$; $119,7 \pm 32,7$ mg/dl in DEX-LH vs. $38,5 \pm 4,7$ mg/dl no grupo CON-LH; $p < 0,05$) quando comparado a seus respectivos grupos controle.

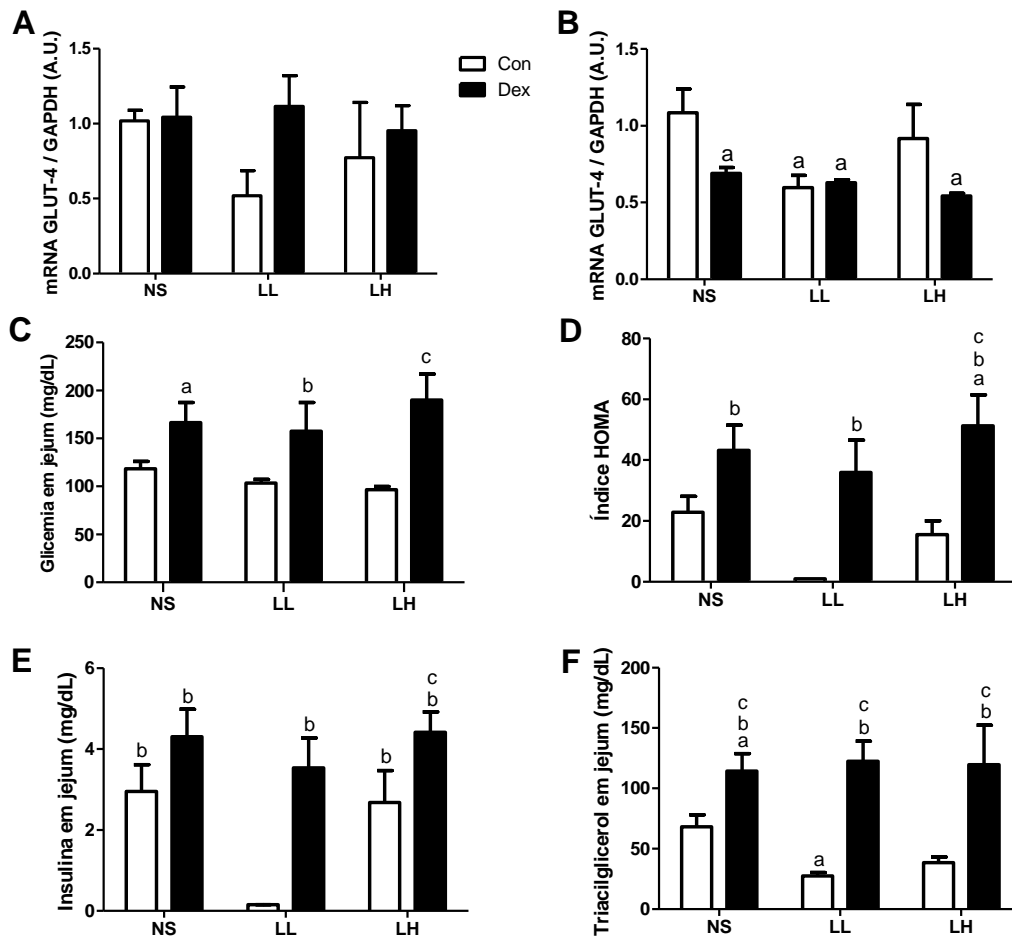


FIGURA 5 – Expressão gênica (mRNA) de GLUT-4 nos músculos (A) sóleo e (B) EDL e (C) glicemia de jejum, (D) insulinemia e (E) triacilglicerol plasmático e (F) índice HOMA. Valores expressos em média ± E.P. (a) $p < 0.05$ vs. CON-NS; (b) $p < 0.05$ vs. CON-LL; (c) $p < 0.05$ vs. CON-LH.

No estado alimentado, os grupos controle não mostraram qualquer alteração significativa na glicemia sanguínea durante o protocolo experimental. Contudo, os grupos tratados com dexametasona mostraram um significativo aumento na glicemia sanguínea avaliada nos dias 3 e 6 quando comparadas ao dia 1 ($p < 0,05$) e com o grupo CON-NS nos dias 3 e 6 ($p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com dexametasona (Tabela 3).

TABELA 3 – Glicemia pós-prandial (mg/dl) dos grupos experimentais nos dias 1, 3 e 6 de estudo.

Dia	Grupo					
	CON-NS	CON-LL	CON-LH	DEX-NS	DEX-LL	DEX-LH
1	110.5±5.73	107.3±0.76	115.5±1.47	120.1±5.06	104.8±4.07	114.7±4.78
3	109.8±5.26	103.5±1.16	129.6±1.28	215.6±29.08 ^{a,b}	196.5±17.27 ^{a,b}	178.1±15.18 ^{a,b}
6	109.8±5.26	110.0±1.64	130.7±2.25	267.3±31.51 ^{a,b}	255.2±23.44 ^{a,b}	215.6±22.33 ^{a,b}

Valores expressos em média ± E.P. Grupo controle não suplementado (CON-NS; n=10); Grupo controle suplementado com leucina em baixa dose via gavagem (CON-LL; n=10) Grupo controle suplementado com leucina em alta dose via gavagem (CON-LH; n=10); Grupo DEXA não suplementado (DEX-NS; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em baixa dose via gavagem (DEX-LL; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em alta dose via gavagem (DEX-LH; n=10).^ap < 0.05 vs. CON-NS no mesmo dia de tratamento; ^bp < 0.05 vs. dia 1 no mesmo grupo.

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sobre parâmetros funcionais da musculatura esquelética. Foram observados que os animais pertencentes ao grupo DEX-LH apresentaram um modesto mas significativo deficit na ambulação média quando comparados ao grupo CON-LH (Figura 6B; 0,54 ± 0,03 cm no grupo DEX-LH vs. 0,59 ± 0,02 cm no grupo CON-LH; p < 0,05). O grupo CON-LH também apresentou menor força media no teste *grip strength* quando comparados ao grupo CON-LL (Figura 6D; 0,46 ± 0,04 N no grupo CON-LH vs. 0,66 ± 0,02 N no grupo CON-LL; p < 0,05).

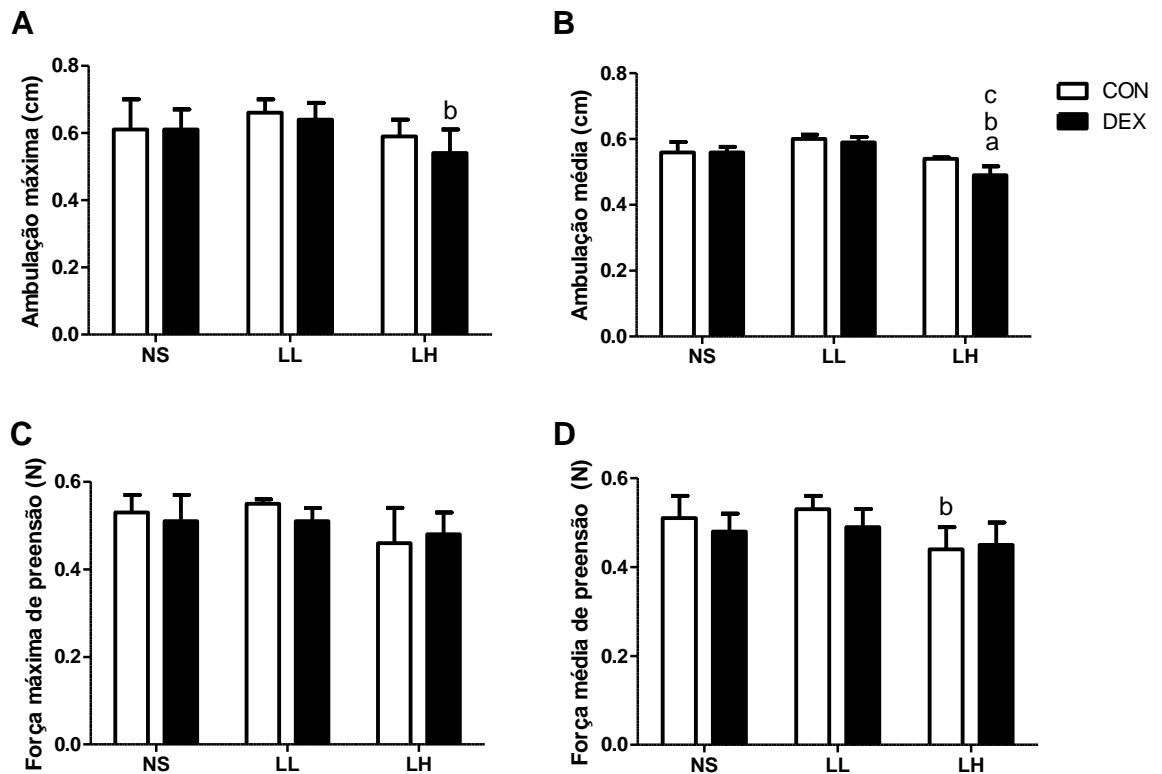


FIGURA 6 – Parâmetros funcionais do músculo esquelético expressos em newtons (N). Valores expressos em média \pm E.P. (a) $p < 0.05$ vs. CON-NS; (b) $p < 0.05$ vs. CON-LL; (c) $p < 0.05$ vs. CON-LH.

7.2 Estudo 2

Efeitos da tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sob os parâmetros morfológicos peso corporal e peso muscular. O peso corporal inicial não diferiu entre os grupos. A suplementação com leucina na dose alta administrada via bebedouro (grupo DEX-LH (H₂O)) atenuaram significativamente a perda de peso corporal quando comparados aos grupos DEX-LL e DEX-LH ($p < 0,05$). A massa do músculo sóleo mostrou-se significativamente reduzida no grupo DEX-LL (H₂O) quando comparado aos grupos DEX-LL e DEX-LH ($p < 0,05$). A massa do músculo EDL não diferiu significativamente entre os grupos (Tabela 4).

TABELA 4 – Peso corporal e parâmetros morfológicos dos grupos experimentais.

Variável	Grupo			
	DEX-LL	DEX-LL (H ₂ O)	DEX-LH	DEX-LH (H ₂ O)
Inicial MC (g)	442.3±1.40	441.8±1.58	444.9±1.49	446.7±1.27
Final MC (g)	338.9±1.83	346.5±3.58	340.0±2.93	361.0±4.13 ^{a,b,c}
Delta MC (g)	-103.6±2.07	-95.27±3.14	-104.5±3.35	-85.67±6.77 ^{a,b}
Sóleo (mg)	222.5±5.28	205.0±2.39 ^{a,b}	222.9±5.54	207.4±3.22
EDL (mg)	174.8±2.79	170.5±1.99	174.6±4.12	169.4±1.27

Valores expressos em média \pm E.P. Grupo DEXA suplementado com leucina em baixa dose via gavagem (DEX-LL; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em baixa dose via bebedouro (DEX-LL (H₂O); n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em alta dose via gavagem (DEX-LH; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em alta dose via bebedouro (DEX-LH (H₂O); n=10). EDL – extensor digitorum longus. ^ap < 0.05 vs. DEX-LL; ^bp < 0.05 vs. DEX-LH; ^cp < 0.05 vs. DEX-LL (H₂O). MC = Massa Corporal.

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sobre a ingestão hídrica. Ambos os grupos DEX-LL (H₂O) e DEX-LH (H₂O) apresentaram aumento na ingestão hídrica no dia 6 quando comparados ao dia 1 (p < 0,05) e com os grupos DEX-LL e DEX-LH no dia 6 (p < 0.05). O grupo DEX-LH (H₂O) mostrou aumento na ingestão hídrica quando comparado aos grupos DEX-LL e DEX-LH no dia 3 (p < 0,05).

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sobre a expressão gênica dos atrogenes no músculo sóleo. Como descrito anteriormente, avaliamos neste estudo os efeitos de duas vias distintas de suplementação de leucina em baixas e altas doses: bolus (gavagem) e H₂O (leucina diluída na água dos bebedouros). Somente a expressão gênica de

Atrogina-1 e MuRF-1 não apresentaram diferenças entre os grupos no músculo sóleo (Figura 7A e 7B).

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sobre a expressão gênica dos atrogenes no músculo EDL. A expressão gênica de Atrogina-1 foi significativamente diminuída nos músculos EDL do grupo DEX-LH (H₂O) quando comparados com os grupos DEX-LL (H₂O) e DEX-LH (Figura 7C; $2,10 \pm 0,26$ no grupo DEX-LH (H₂O) vs. $4,58 \pm 0,64$ no grupo DEX-LH e $3,61 \pm 0,39$ no grupo DEX-LL (H₂O); $p < 0,05$). A expressão gênica de MuRF-1 mostrou-se aumentada no grupo DEX-LH quando comparado ao grupo DEX-LL (Figura 7D; $3,38 \pm 0,37$ no grupo DEX-LH vs. $2,72 \pm 0,37$ no grupo DEX-LL; $p < 0,05$).

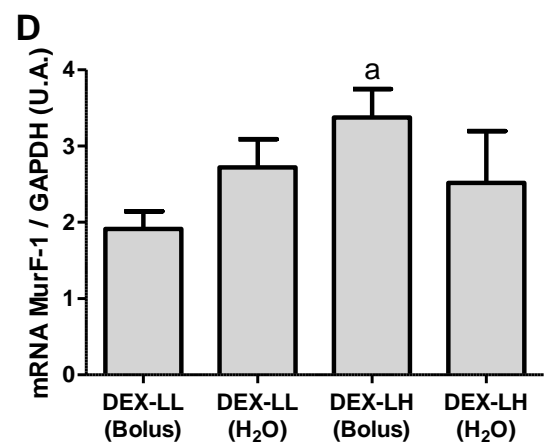
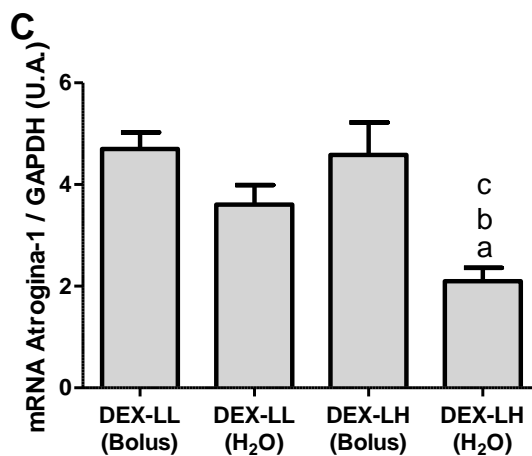
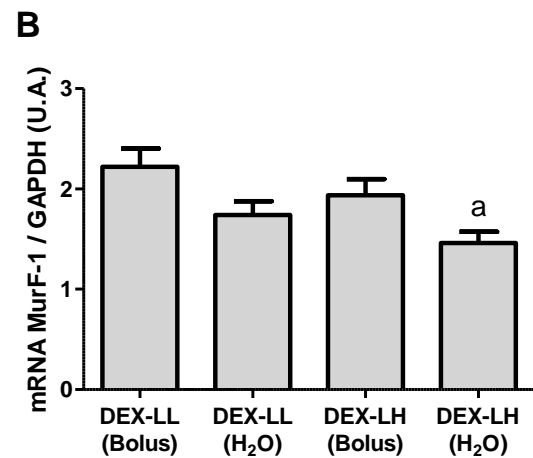
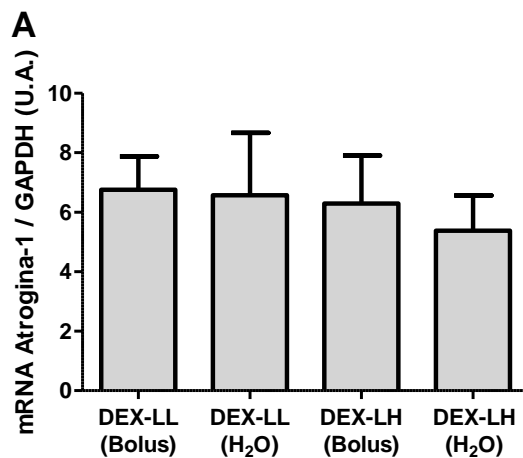


FIGURA 7 – Expressão gênica (mRNA) de atroquina-1 e MuRF-1 nos músculos sóleo (A,B) e EDL (C,D). Valores expressos em média \pm E.P. (a) $p < 0.05$ vs. DEX-LL (Bolus); (b) $p < 0.05$ vs. DEX-LL (H₂O); (c) $p < 0.05$ vs. DEX-LH (Bolus).

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina na expressão gênica de GLUT-4 no músculo esquelético. Nenhuma diferença na expressão gênica de GLUT-4 foi detectada entre os grupos (Figura 8; $p > 0,05$).

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina sob a glicemia, insulinemia e níveis de triacilgliceróis (TAG) do soro. A glicemia de jejum mostrou-se significativamente aumentada no grupo DEX-LL (H₂O) quando comparada ao grupo DEX-LL (Figura 9A; $320,3 \pm 68,4$ mg/dl no grupo DEX-LL (H₂O) vs. $173,6 \pm 28,2$ mg/dl no grupo DEX-LL; $p < 0,05$) e no grupo DEX-LH (H₂O) quando comparado com o grupo DEX-LH ($338,7 \pm 41,9$ mg/dl no grupo DEX-LH (H₂O) vs. $176,1 \pm 21,4$ mg/dl no grupo DEX-LH; $p < 0,05$). O grupo DEX-LH (H₂O) também apresentou diminuição nos valores de insulina de jejum quando comparados com o grupo DEX-LH (Figura 9B; $35,24 \pm 18,94$ mg/dl no grupo DEX-LL (H₂O) vs. $109,3 \pm 12,00$ mg/dl no grupo DEX-LL; $p < 0,05$). Em relação aos níveis de TAG em jejum, o grupo DEX-LL (H₂O) apresentou níveis aumentados quando comparados ao grupo DEX-LL (Figura 9C; $182,3 \pm 37,1$ mg/dl no grupo DEX-LL (H₂O) vs. $72,2 \pm 31,6$ mg/dl no grupo DEX-LL; $p < 0,05$). O índice HOMA-IR não diferiu significativamente entre os grupos (Figura 9D).

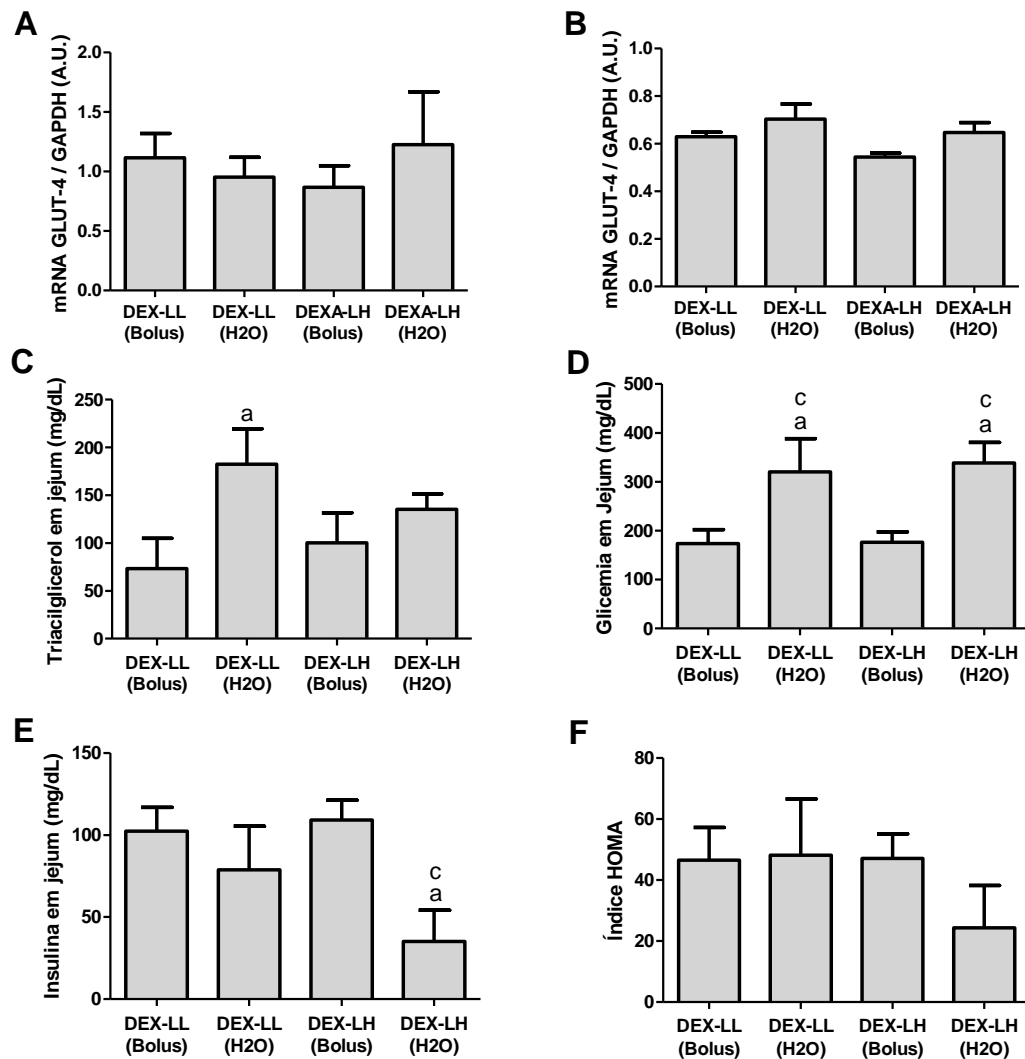


FIGURA 8 – Expressão gênica (mRNA) de GLUT-4 nos músculos (A) sóleo e (B) EDL e (C) glicemia de jejum, (D) insulinemia e (E) triacilglicerol plasmático e (F) índice HOMA. Valores expressos em média ± E.P. (a) p < 0.05 vs. DEX-LL (Bolus); (b) p < 0.05 vs. DEX-LL (H₂O); (c) p < 0.05 vs. DEX-LH (Bolus).

Nos dias 3 e 6 do experimento (com a notável excessão do grupo DEX-LH no dia 3), todos os grupos apresentaram marcadamente aumentos nos níveis de glicose sanguíneas em estado de jejum quando comparados com seus respectivos dia 1 (p < 0,05). DEX-LL (H₂O) e o grupo DEX-LH (H₂O) mostrou

níveis mais altos de glucose no estado alimentado quando comparados com o grupo DEX-LH no dia 6 ($p < 0,05$; Tabela 6).

TABELA 5 – Glicemia pós-prandial (mg/dl) dos grupos experimentais nos dias 1, 3 e 6 de estudo.

Dia	Grupo			
	DEX-LL	DEX-LL (H ₂ O)	DEX-LH	DEX-LH (H ₂ O)
1	104.8±4.07	100.2±4.14	114.7±4.78	100.3±4.95
3	196.5±17.27 ^b	175.4±9.49 ^b	178.1±15.18	177.4±10.16 ^b
6	255.2±23.44 ^b	286.1±37.34 ^{a,b}	215.6±22.33 ^b	314.8±39.34 ^{a,b}

Valores expressos em média \pm E.P. Grupo DEXA suplementado com leucina em baixa dose via gavagem (DEX-LL; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em baixa dose via bebedouro (DEX-LL (H₂O); n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em alta dose via gavagem (DEX-LH; n=10); Grupo DEXA suplementado com leucina em alta dose via bebedouro (DEX-LH (H₂O); n=10). ^a $p < 0.05$ vs. DEX-LH no mesmo dia de estudo; ^b $p < 0.05$ vs. dia no mesmo grupo.

Efeitos do tratamento com dexametasona e da suplementação com leucina nos parâmetros funcionais musculares. Nenhuma diferença significativa foi observada no teste de ambulação máxima, ambulação média, força máxima no teste *grip strenght* e força média no teste *grip strenght*, entre os grupos (Figura 10).

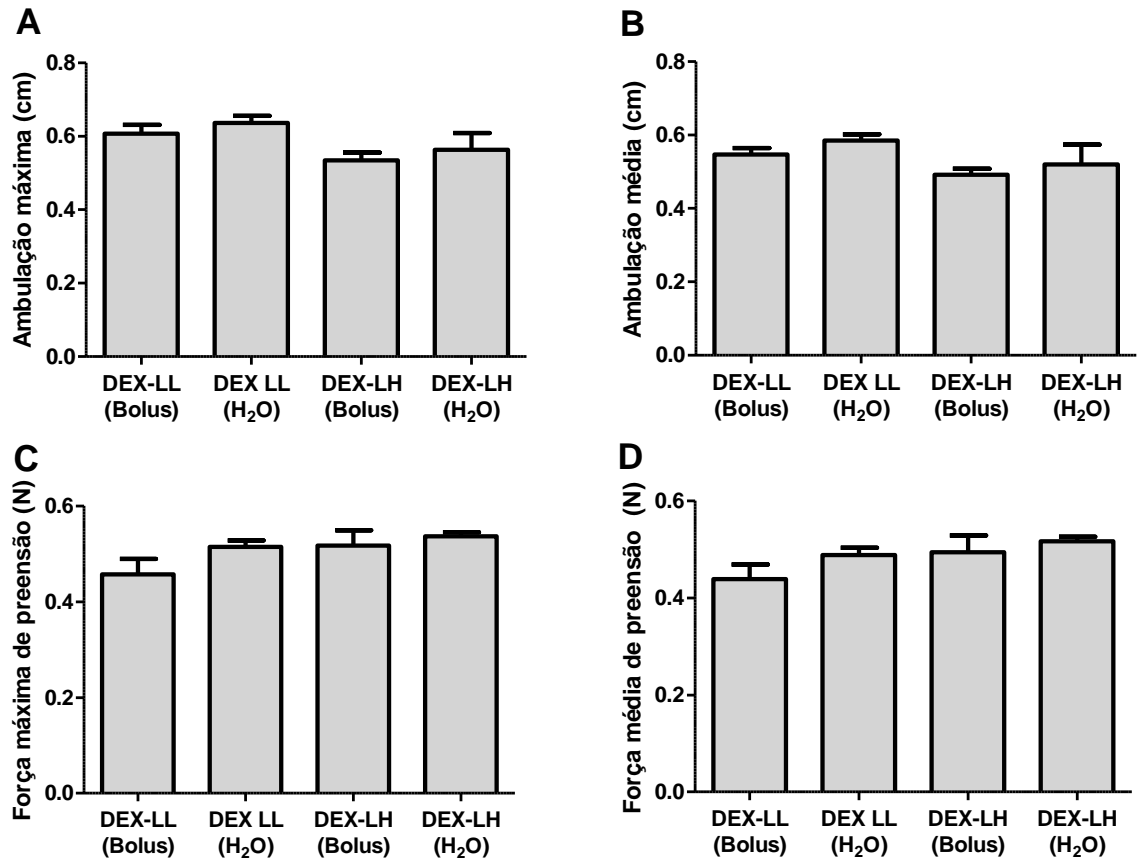


FIGURA 9 – Parâmetros funcionais do músculo esquelético expressos em newtons (N). Valores expressos em média \pm E.P.

8 DISCUSSÃO

Os maiores achados do presente estudo são que a suplementação de leucina em baixas doses é benéfica em termos de manutenção da massa muscular em animais sob restrição energética. Este efeito coincidiu com a expressão de proteínas e genes envolvidos no remodelamento muscular. Em relação à homeostasia do metabolismo da glicose, novamente o efeito benéfico foi evidenciado apenas na baixa dosagem, conforme concluído a partir dos dados metabólicos. Contudo, sob tratamento com DEXA, a suplementação com leucina

agravou o estado “diabetogênico”. Adicionalmente, a via de administração da leucina parece ser importante para a indução destas respostas.

Recentemente foi demonstrado que a suplementação com 600 mg/kg de massa corporal de BCAA (46% leucina, 28% valina, e 23% isovalina) foi capaz de evitar a atrofia do músculo sóleo induzido pelo tratamento com DEXA (0.6 mg/kg de massa corporal durante 5 dias) em ratos *Sprague Dawley* (YAMAMOTO et al., 2010). Em nosso estudo foi escolhida a dosagem de 5 mg DEXA/kg de massa corporal uma vez que o tratamento com 1 mg/kg de massa corporal se mostrou inábil em induzir atrofia da musculatura esquelética. A dosagem de leucina capaz de trazer benefícios ou malefícios para a musculatura esquelética ou o estado de resistência à insulina permanece desconhecido na literatura. Nós então decidimos tratar nossos ratos com duas doses de leucina caracterizadas por Crozier et al., (2005): uma dose incapaz de aumentar os níveis plasmáticos de insulina ou a síntese muscular protéica (0.135 g/kg de massa corporal); e outra capaz de estimular robustamente a secreção de insulina e de estimular em níveis máximos a síntese muscular protéica (1.35g/kg de massa corporal). De maneira importante, estudos ex-vivo demonstram que o tratamento com leucina em concentrações similares, diminuíram marcadamente a proteólise da musculatura esquelética (BUSQUETS et al., 2000).

Neste estudo, a suplementação com leucina ocorreu duas vezes ao dia com intervalos de 6 horas e o tratamento com DEXA ocorreu através de injeção intraperitoneal uma vez ao dia, pela manhã. Foi observado claramente que em ratos controle pair fed, quando suplementados com leucina em baixas doses, demonstram diminuição dos níveis plasmáticos de insulina e também do índice HOMA-IR, sugerindo melhora do metabolismo glicídico. De fato, estes grupos apresentaram aumentada massa muscular quando avaliada através do conteúdo de miosina. Como o músculo parece ser um importante sítio de ação da insulina (contribuindo com aproximadamente 80% da captação de glucose corporal no estado pós prandial), e uma vez que a musculatura esquelética se mostra resistente em indivíduos pré-diabéticos (CLINE, PETERSEN, KRSSAK, SHEN, HUNDAL, TRAJANOSKI, INZUCCHI, DRESNER, ROTHMAN, SHULMAN, 1999);

nossos resultados são compatíveis com esta visão. Em acordo com estes resultados, a expressão gênica muscular de Atrogina-1 e de seu fator de transcrição FoXO1a mostrou-se diminuída quando comparada ao grupo controle e ao grupo tratado com DEXA suplementado com leucina nos dois músculos avaliados, sóleo e EDL. Por outro lado, apesar de ser capaz de preservar a massa muscular, a suplementação com leucina em altas doses não diminuiu os níveis plasmáticos de insulina ou o índice HOMA-IR, sugerindo que a suplementação com leucina *per se* é capaz de promover efeitos dúbios sobre a massa muscular e sobre a sensibilidade à ação da insulina, fato que ocorreu somente nos grupos “pair fed” suplementados. Contudo, sob tratamento com DEXA, a suplementação com leucina não foi capaz de promover qualquer efeito benéfico. Interessantemente, em um estudo realizados com camundongos que consumiram uma dieta alta em lipídios, o consumo paralelo de ração contendo entre os nutrientes 20% de proteínas (a qual continha 1.5% de leucina em sua composição) aumentou o consumo de oxigênio (e o gasto energético de repouso) e apenas os grupos suplementados com leucina foram capazes de proteger os animais dos efeitos deletérios da dieta rica em lipídios, como a resistência à ação da insulina e aumentados níveis de colesterol LDL (ZHANG, GUO, LEBLANC, LOH, SCHWARTZ & YU, 2007). Apesar de não termos medido diretamente os níveis de colesterol LDL em nosso estudo, nós observamos uma significativa redução nos níveis de TAG plasmático no grupo controle suplementado com leucina em baixa dose, o que está indiretamente de acordo com dados prévios da literatura.

A fim de elucidar ainda mais tais efeitos, decidimos realizar um segundo estudo, onde foram comparados os efeitos do tratamento com DEXA paralelamente à suplementação com leucina em baixas e altas doses, através de gavagem (via Bolus) conforme descrito previamente e comparamos estes dados com a suplementação de leucina ofertada nos bebedouros dos animais em baixas e altas doses, de forma que independentemente da forma de administração, todos os grupos tivessem representantes da suplementação com leucina em baixas e altas doses, ofertadas de maneiras diferentes (gavagem/bolus versus bebedouro) na presença de DEXA. Nossos resultados demonstram claramente que a

suplementação com leucina via bebedouro não modifica a massa muscular dos animais tratados com DEXA quando comparados com os animais suplementados via gavagem. O mesmo padrão de resultados foi observado com a suplementação de leucina em altas doses. Contudo, nós observamos um aumento estatisticamente significativo nos níveis de glicose no soro dos ratos tratados com leucina via bebedouro. Isto significa que o consumo crônico de leucina, resultou em uma piora da homeostasia da glicose quando ofertada via bebedouro na presença do tratamento com DEXA. Interessantemente, a suplementação com leucina (1.5% diluída na água do bebedouro durante 8 meses) realizada em um modelo poligênico de camundongos NONcNZO10/LtJ (RCS10), os quais são predispostos a falência das células beta e diabetes melito tipo 2 mostrou-se hábil em melhorar o controle glicêmico, que esteve associado com a aumentada resposta da insulina frente a um estímulo alimentar nestes camundongos (GUO, YU, HOU, ZHANG, 2010). Em nosso estudo, na presença de DEXA e altas doses de leucina ofertadas nos bebedouros, foi observada uma significativa diminuição nos níveis circulantes de insulina quando avaliado nos animais no estado de jejum. Este aumento pode estar associado com a falência das células beta nestes animais em responder com a secreção de insulina frente às altas concentrações de leucina ofertadas. Contudo, este efeito não foi observado no grupo suplementado via gavagem em altas doses de leucina em relação aos níveis basais de insulina, reforçando nossa hipótese de que a suplementação de leucina *per se*, quando administrada cronicamente via bebedouro em baixas e altas doses, é hábil em agravar a perda da homeostase da glicose via múltiplos mecanismos. Estes mecanismos podem presumivelmente estar associados com a disfunção do fígado, músculos de contração lenta e rápida, e estresse do retículo endoplasmático levando a apoptose de células beta (EIZIRIK & CNOP, 2010), uma hipótese que necessita de maiores estudos comprobatórios.

Em células musculares, o transporte de glicose é principalmente controlado através do estímulo da insulina em induzir a translocação dos GLUT-4 das vesículas endossômicas iniciais e tardias para a membrana plasmática, mas também através do controle da produção dos GLUT-4 através de mecanismos de

transcrição em seus níveis, através de múltiplos mecanismos de expressão gênica. De fato, complexos mecanismos controlam a função dos transportadores de glicose GLUT-4 (HUANG & CZECH, 2007). Em adição, é amplamente conhecido que o tratamento com dexametasona afeta diversos passos na cascata de sinalização da insulina, induzindo ao prejudicado transporte de glicose para o interior das células musculares (Saad et al., 1993). Por outro lado, o envolvimento da suplementação com leucina em animais tratados com DEXA na expressão gênica de GLUT-4 em diferentes tecidos musculares é quase desconhecido.

No estudo 1, foi detectado no músculo EDL um marcado prejuízo na expressão gênica de GLUT-4 nos grupos tratados com DEXA. Como o músculo EDL é composto primariamente por fibras de contração rápida (ALMON & DUBOIS, 1990), este resultado pode estar ligado à modificação na expressão gênica que leva ao prejudicado transporte de glicose nas fibras de contração rápida sob tratamento com glicocorticóides (ALMON & DUBOIS, 1990; ZANCHI et al., 2010). Em adição, foi comparado no estudo 2 o efeito da suplementação com leucina sempre na presença do tratamento com DEXA. Os resultados obtidos são compatíveis com a idéia de que sob efeito de altas doses de leucina em curtos períodos de tempo, o principal estímulo sobre a expressão de GLUT-4 no músculo EDL é controlado pelo estímulo hormonal. Contudo, o papel da suplementação com leucina neste cenário é incerto, porque quando comparado com o grupo Controle-NS, apenas o grupo Controle-LL demonstrou uma diminuição na expressão de GLUT-4, e este resultado foi evidenciado apenas no músculo EDL. Estes resultados indicam que a expressão de GLUT-4 no músculo EDL pode ser alterada não somente pela DEXA, mas também através da suplementação com leucina. O papel desta modificação como um todo permanece desconhecido, uma vez que o grupo Controle-LL evidenciou melhora no metabolismo glicídico. Dessa forma, o efeito total da suplementação com leucina no organismo é difícil de prever, uma vez que a soma dos efeitos da leucina em tecidos alvo parece orientar o efeito final no metabolismo da glicose e controle da massa muscular.

Finalmente, quando nós avaliamos a função muscular destes animais, foi observado que animais tratados com DEXA paralelamente à suplementação

com altas doses de leucina demonstraram um significativo déficit nos índices de ambulação média quando comparados com o grupo controle. Surpreendentemente, animais controle suplementados com altas doses de leucina também demonstraram menor força média no teste de *grip strength* quando comparados com o grupo suplementado com leucina em baixas doses, sugerindo que esta dose de leucina, suplementada via gavagem não é inócua neste modelo experimental, após sete dias de tratamento.

9 CONCLUSÕES

De modo geral, nossos dados indicam que a suplementação com leucina em baixas e altas doses parece ser benéfica em termos de preservação da massa muscular. Contudo, somente a dose baixa mostrou-se benéfica em termos de manutenção do metabolismo glicídico. Em contraste, a dose alta induziu uma ligeira mas significativa redução na função muscular, quando avaliada através do teste *grip strength* em seus valores médios. Quando os animais foram tratados com DEXA e suplementados com leucina cronicamente, mesmo a dose baixa de leucina não foi hábil em demonstrar efeitos benéficos em termos de homeostase da glicose, piorando marcadamente este parâmetro. Quando a leucina foi suplementada em altas doses na presença de DEXA, o resultado foi ainda pior levando a uma suposta falência das células beta, a qual permanece a ser investigada em maiores detalhes.

Este projeto foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo); Número do contrato: 08/51090-1.

10 Referências Bibliográficas

ADAMI, G.F.; CORDERA, R.; ANDRAGHETTI, G.; CAMERINI, G.B.; MARINARI, G.M.; SCOPINARO, N. Changes in serum ghrelin concentration following biliopancreatic diversion for obesity. Obes Res v.12, n.4, 684-687, 2004

ALMON, R.R.; DUBOIS, D.C. Fiber-type discrimination in disuse and glucocorticoid-induced atrophy. Med Sci Sports Exerc v.3, n.22, 304-11, 1990.

ANTHONY, J.C.; YOSHIZAWA, F.; ANTHONY, T.G.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S.; KIMBALL, S.R. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. J Nutr. v.10, n.130, p.2413-09, 2000

ANDERSON, K.D.; ABDUL, M.; STEWARD, O. Quantitative assessment of deficits and recovery of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in mice. Exp Neurol v.190, n.1, p.184-191, 2004

BOHÉ, J.; LOW, J.F.; WOLFE, R.R.; RENNIE, M.J. Latency and duration of stimulation of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids. J Physiol. v.532, n.15, p.575-9, 2001

BUSE, M.G.; REID, S.S. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. J Clin Invest. V.56, n.5, p.1250-61, 1975

BUSQUETS, S.; ALVAREZ, B.; LLOVERA, M.; AGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. J Cell Physiol v.184, n.3, p. 380-384, 2000

CLINE, G.W.; PETERSEN, K.F.; KRSSAK, M.; SHEN, J.; HUNDAL, R.S.; TRAJANOSKI, Z.; INZUCCHI, S.; DRESNER, A.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. N Engl J Med v.341, n.4, p.240-246, 1999

CROZIER, S.J.; KIMBALL, S.R.; EMMERT, S.W.; ANTHONY, J.C.; JEFFERSON, L.S. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. J Nutr v.135, n.3, 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 deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. FASEB J. v.19, n.3, p.422-4, 2005

DARDEVET, D.; SORNET, C.; TAILLANDIER, D.; SAVARY, I.; ATTAIX, D.; GRIZARD, J. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. J Clin Invest v.96, n.5, p.2113-9, 1995

DERUISSEAU, K.C.; KAVAZIS, AN.; DEERING, M.A.; FALK, D.J.; VAN GAMMEREN, D.; YIMLAMAI, T.; ORDWAY, G.A.; POWERS, S.K. Mechanical ventilation induces alterations of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm. J Appl Physiol. v.98, n.4, p.1314-21, 2005

DESHMUKH, A.; SALEHZADEH, F.; METAYER-COUSTARD, S.; FAHLMAN, R.; NAIR, K.S.; AL-KHALILI, L. Post-transcriptional gene silencing of ribosomal protein S6 kinase 1 restores insulin action in leucine-treated skeletal muscle. Cell Mol Life Sci v.66, n.8, p.1457-1466, 2009

DJULBEGOVIC, B.; BLUMENREICH, M.; HADLEY, T.; JOSEPH, G. Meta-analysis of chemotherapy in multiple myeloma. J Clin Oncol. v.10, n.8, p.1366-7, 1992.

EIZIRIK, DL.; CNOP, M. ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure. Sci Signal. v.3, n.110, p.7, 2010

GARLICK, P.J. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. J Nutr. v.135, n.6, p.1553S-6S, 2005

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica, Editora Guanabara Koogan, nona edição, p.875-878, 1999

HAMEL, F.G.; UPWARD, J.L.; SIFORD, G.L.; DUCKWORTH, W.C. Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. Metabolism. v.52, n.7, p.810-4, 2003

GUO, K.; YU, YH.; HOU, J.; ZHANG, Y. Chronic leucine supplementation improves glycemic control in etiologically distinct mouse models of obesity and diabetes mellitus. Nutr Metab. v.7, p.57, 2010

HU, Z.; WANG, H.; LEE, IH.; DU, J.; MITCH, W.E. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. J Clin Invest v.119, n.10, p.3059-3069, 2009

HUANG, S.; CZECH, M.P. The GLUT4 glucose transporter. Cell Metab v.5, n.4, p.237-52, 2007.

KHALEELI, A.A.; EDWARDS, R.H.; GOHIL, K.; MCPHAIL, G.; RENNIE, M.J.; ROUND, J.; ROSS, E.J. Corticosteroid myopathy: a clinical and pathological study. Clin Endocrinol (Oxf). v.18, n.2, p.155-66, 1983

KENNEL, P.F.; FONTENEAU, P.; MARTIN, E.; SCHMIDT, J.M.; AZZOUZ, M.; BORG, J.; GUENET, J.L.; SCHMALBRUCH, H.; WARTER, J.M.; POINDRON, P. Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. Neurobiol Dis v.3, n.2, p.137-147, 1996

KIMBALL, S.R.; SHANTZ, L.M.; HORETSKY, R.L.; JEFFERSON, L.S. Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. J Biol Chem. v.274, n.17, p.11647-52, 1999

J LaPier, T.K. Glucocorticoid-induced muscle atrophy. The role of exercise in treatment and prevention. Cardiopulm Rehabil. v.17, n.2, p.76-84, 1997

LATRES E, AMINI AR, AMINI AA, GRIFFITHS J, MARTIN FJ, WEI Y, LIN HC, YANCOPOULOS GD, GLASS DJ. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. J Biol Chem. v.280, n.4, p.2737-44, 2005

LAYMAN, D.K.; BAUM, J.I. Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. J Nutr. v.134, n.4, p.968S-73S, 2004

LECKER SH, GOLDBERG AL, MITCH WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. J Am Soc Nephrol. v.17, n.7, p.1807-19, 2006

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. Methods. V.25, n.4, p. 402-8, 2001

LOELL L, LUNDBERG IE. Can muscle regeneration fail in chronic inflammation: a weakness in inflammatory myopathies? J Intern Med. v.269, n.3, p.243-57, 2011

LONG W, SAFFER L, WEI L, BARRETT EJ. Amino acids regulate skeletal muscle PHAS-I and p70 S6-kinase phosphorylation independently of insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab. v.279, n.2, p.E301-6, 2000

LYNCH, C.J.; HUTSON, S.M.; PATSON, B.J.; VAVAL, A.; VARY, T.C. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab v.283, n.4, p.E824-35, 2002

MASCHER, H.; TANNERSTEDT, J.; BRINK-ELFEGOUN, T.; EKBLUM, B.; GUSTAFSSON, T.; BLOMSTRAND, E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. v.294, n.1, p.E43-51, 2008

MAX, S.R.; MILL, J.; MEAROW, K.; KONAGAYA, M.; KONAGAYA, Y.; THOMAS, J.W.; BANNER, C.; VITKOVIĆ, L. Dexamethasone regulates glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. Am J Physiol. v.255, n.3, p.E397-402, 1988

MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. Sports Med. v.27, n.6, p.347-58, 1999

HOFFMAN, E.P.; NADER, G.A. Balancing muscle hypertrophy and atrophy. Nat Med. v.10, n.6, p.584-5, 2004

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.; SHORT, K.R.; Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. J Nutr v.135, n.6, p.1547S-1552S, 2005

NAKASHIMA, K.; ISHIDA, A.; YAMAZAKI, M.; ABE, H. Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. Biochem Biophys Res Commun. v.336, n.2, p.660-6, 2005

NICASTRO, H.; ARTIOLI, G.G.; DOS SANTOS COSTA, A.; SOLIS, MY.; DA LUZ, CR.; BLACHIER, F.; LANCHAH, JR. An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. Amino Acids. v.40, n.2, p.287-300, 2011

SAAD, M.J.; FOLLI, F.; KAHN, J.A.; KAHN, C.R. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. J Clin Invest v.92, n.4, p.2065-2072, 1993

SHERWIN, R.S. Effect of starvation on the turnover and metabolic response to leucine. J Clin Invest. v.61, n.6, p.1471-81, 1978.

STAHN, C.; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. Nat Clin Pract Rheumatol v.4, n.10, p.525-533, 2008

TAILLANDIER D, COMBARET L, POUCH MN, SAMUELS SE, BÉCHET D, ATTAIX D. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. Proc Nutr Soc. v.63, n.2, p.357-61, 2004

WADDELL, D.S.; BAEHR, L.M.; VAN DEN BRANDT, J.; JOHNSEN, S.A.; REICHARDT, H.M.; FURLOW, J.D.; BODINE, S.C. The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. Am J Physiol Endocrinol Metab. v.295, n.4, p.E785-97, 2008

YAMAMOTO, D.; MAKI, T.; HERNINGTYAS, E.H.; IKESHITA, N.; SHIBAHARA, H.; SUGIYAMA, Y.; NAKANISHI, S.; IIDA, K.; IGUCHI, G.; TAKAHASHI, Y.; KAJI, H.; CHIHARA, K.; OKIMURA, Y. Branched-chain amino acids protect against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats. Muscle Nerve v.41, n.6, p. 819-827, 2010

ZANCHI, N.E.; FILHO, M.A.; FELITTI, V.; NICASTRO, H.; LORENZETI, F.M.; LANCHI, A.H. JR. Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation. J Cell Physiol v.224, n.2, p.311-315, 2010

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

ZHANG, Y.; GUO, K.; LEBLANC, R.E.; LOH, D.; SCHWARTZ, G.J.; YU, Y.H. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. Diabetes v.56, n.6, p.1647-1654, 2007