



i

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MORGANA REJANE RABELO ROSA RUSSO

**“MODULAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS
NA SÍNTESE PROTÉICA EM CAMUNDONGOS:
PAPEL DO TREINAMENTO AERÓBIO E DA
SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Morgana Rejane Rabelo Rosa Russo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R921m	<p>Russo, Morgana Rejane Rabelo Rosa Modulação das vias de sinalização envolvidas na síntese protéica em camundongos: papel do treinamento aeróbio e da suplementação com leucina / Morgana Rejane Rabelo Rosa Russo. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Everardo Magalhães Carneiro. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Exercícios aeróbios. 2. Leucina. 3. Proteínas - Síntese. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	--

Título em inglês: Modulation of signaling pathways involved in protein synthesis in mice: role of aerobic exercise training and supplementation with leucine.

Palavras-chave em inglês: Aerobic exercises; Leucine; Proteins - Synthesis.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Everardo Magalhães Carneiro, Márcia Queiroz Latorraca, Camila Aparecida Machado de Oliveira, Cláudio Alexandre Gobatto, Miguel Arcanjo Areas.

Data da defesa: 28/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 28 de fevereiro de 2011

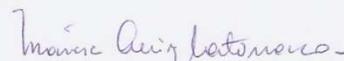
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro (orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Márcia Queiroz Latorraca



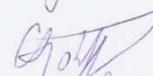
Assinatura

Profa. Dra. Camila Aparecida Machado de Oliveira



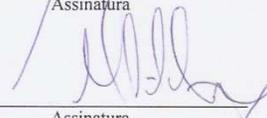
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas



Assinatura

Profa. Dra. Angelina ZanESCO

Assinatura

Profa. Dra. Eliete Luciano

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Assinatura

Dedico este trabalho àqueles que me deram a vida: meus queridos pais Armindo e Nazareth, e àqueles que iluminam a minha vida: meu marido Danilo e minha amada filha Beatriz. Amo muito, muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força para vencer todas as dificuldades e contratemplos pelos quais passei durante o período do meu doutorado.

Ao Danilo, que me manteve motivada em concluir este trabalho e pela ajuda crucial na finalização deste.

Às pessoas que me ajudaram indiretamente cuidando da minha filha nos momentos, que não foram poucos, em que permaneci escrevendo, estudando e concluindo este trabalho. Muito obrigada aos meus queridíssimos amigos Carla Madi (madrinha da Bia) e Walter Te (padrinho da Bia) e minha querida Da. Marília (mãe do meu marido). Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Aos meus Pais por compreenderem a minha ausência durante os momentos mais críticos da conclusão desse trabalho. Apesar da distância, vocês estiveram e estão sempre comigo!!!

Ao Prof. Everardo, conhecido de longa data, que durante todo esse período foi compreensivo e paciente nos momentos difíceis pelos quais passei, e confiante que eu chegaria até aqui. Muito obrigada mesmo Everardo!!!

Aos meus queridos amigos do lab 14 que me deram imensa força no desenvolvimento da parte experimental: Amon, Eliane, Kelly, Heleninha, Andressa e Lécio e aqueles que participaram ativamente na conclusão deste trabalho: Zé Maria e Cláudio. O que seria dos meus camundongos sem o Lécio! Em especial a Kelly que esteve sempre presente, e mais do que nunca agora na etapa final. Obrigada pelo apoio moral, espiritual, psicológico e acadêmico.

Aos queridos amigos que conviveram comigo durante todo ou parte desse período: Vanessa, Priscila, Thiago, Fabrízio, Flávia, Letícia, Emerielle e Marise.

A minha queridíssima amiga Profa. Dra. Ana Palla Kane, que lá dos USA me ajudou muito! Valeu Aninha!

Ao Prof. Leo, USP, que me ajudou imensamente na conclusão deste. Leo muitíssimo obrigada! Por mais que eu tenha lhe escrito isso por diversas vezes, acho que nunca conseguirei expressar o quanto a sua participação neste momento foi importante.

Aos Profs. da banca de qualificação: Angelina ZanESCO, Camila Oliveira e Miguel Areas. Suas observações foram fundamentais para finalização deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

O aminoácido leucina é conhecido por ativar a via de síntese protéica muscular. Pesquisas recentes relatam alterações moleculares de proteínas envolvidas na via de síntese protéica após sessões agudas de exercício. No entanto, o efeito da leucina associada ao treinamento aeróbio foi pouco investigado. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da suplementação crônica com leucina, durante um programa de exercício aeróbio, sobre proteínas sinalizadoras da via de sensibilidade à insulina e síntese protéica em músculo esquelético e fígado de camundongos adultos. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (C), controle suplementado com leucina (CS), grupo de natação treinado (T) e grupo de natação treinado suplementado com leucina (TS). Após 12 semanas de exercício (1h30, 5 vezes/semana), o peso corporal do grupo T estava menor em relação aos outros grupos. O conteúdo de glicogênio muscular e hepático aumentou nos grupos CS, T e TS comparados ao grupo C. Os animais treinados (T e TS) apresentaram atividade da Cis e sensibilidade à insulina aumentada e menor porcentagem de gordura comparado aos animais controle (C e CS). A suplementação aumentou acentuadamente o teor de insulina e leucina plasmática no CS e TS comparado ao C e T. Em músculo esquelético, a suplementação com leucina, apesar de aumentar a fosforilação do IR, não alterou o conteúdo total de IR e IRS-1 e a fosforilação do IRS-1, no entanto, a expressão gênica, o conteúdo total da mTOR e a fosforilação da p70^{s6k} estavam aumentados. O treinamento aeróbio elevou o conteúdo total do IR e a fosforilação do IR e IRS-1, entretanto, reduziu o conteúdo da p70^{s6k} e não alterou o conteúdo total da mTOR e fosforilação da p70^{s6k}. A associação dos tratamentos elevou o conteúdo total e a fosforilação do IR acima dos valores encontrados quando os tratamentos foram administrados de forma individual e a fosforilação do IRS1 em relação aos grupos controle. Houve elevação da expressão gênica e conteúdo total da mTOR e conteúdo total e fosforilação da p70^{s6k} acima dos valores encontrados para o grupo T, porém abaixo dos valores do grupo CS. No músculo esquelético, os resultados da associação dos tratamentos sugerem que a leucina diminuiu o efeito do exercício aeróbio sobre a via da mTOR/p70^{s6k}. No fígado, a suplementação com leucina aumentou o conteúdo de IR e IRS-1 e a fosforilação do IR, assim como o conteúdo total da mTOR e fosforilação da p70^{s6k}. O treinamento aeróbio, apesar de ter aumentado a fosforilação do IR, diminuiu o conteúdo total de IR, IRS-1, mTOR e p70^{s6k}, assim como, a fosforilação do IRS-1. Quando os tratamentos foram associados, a leucina reverteu o efeito atenuador do exercício sobre a via da mTOR/p70^{s6k} e sobre o IR e IRS-1. Estes resultados indicam que a administração de suplementação crônica com leucina para camundongos adultos durante um programa de exercício aeróbio pode ser importante por proporcionar maior ativação de proteínas da via de síntese protéica em músculo esquelético e fígado quando comparadas à atividade expressa somente em função do exercício aeróbio.

Palavras -chave: exercício aeróbio, leucina, via de sinalização protéica.

ABSTRACT

The amino acid leucine is known to activate the pathway of muscle protein synthesis. Recent surveys have reported molecular alterations after acute exercise sessions. However, the effect of leucine associated with the aerobic training was seldom investigated. Thus, this study aimed to evaluate the role of chronic leucine supplementation during a program of aerobic exercise on protein signaling pathway in insulin sensitivity and protein synthesis in skeletal muscle and liver of adult mice. The animals were divided into four groups: control (C), control supplemented with leucine (CS), swim trained group (T) and swim-trained group supplemented with leucine (TS). After 12 weeks of exercise (1h30, 5 times / week), body weight of group T was lower than in the other groups. The glycogen content in muscle and liver increased in T and TS compared with group C. Trained animals (T and TS) had increased activity of Iris, insulin sensitivity and lower fat percentage compared to control animals (C and CS). The supplementation increased significantly the level of plasma insulin and leucine in CS and TS compared to C and T. In skeletal muscle, supplementation with leucine, despite increasing the phosphorylation of IR, did not alter the total content of IR and IRS-1 and phosphorylation of IRS-1; however, gene expression, the entire contents of mTOR and phosphorylation of p70^{s6k} were increased. Aerobic training increased the total content of IR and phosphorylation of IR and IRS-1, however, reduced the content of p70^{s6k} and did not alter the content of total mTOR and phosphorylation of p70^{s6k}. The combination treatment increased the total content and phosphorylation of IR above the values found when the treatments were administered individually and phosphorylation of IRS-1 above the values control groups. There was an elevation of mRNA expression and mTOR total content, and phosphorylation of p70^{s6k} above the values found for the T group, but below the CS group. In skeletal muscle, the results of the association, suggest that leucine reversed the effect of aerobic exercise on the pathway of mTOR/p70^{s6k}. In the liver, leucine supplementation increased the content of IR and IRS-1 and phosphorylation of IR, the entire contents of phosphorylation of mTOR and p70^{s6k}. The aerobic training, although it increased the phosphorylation of IR, decreased the total content of IR, IRS-1, mTOR and p70^{s6k}, as well as the phosphorylation of IRS-1. When the treatments were associated leucine, it reversed the negative effect of exercise on the path of mTOR/p70^{s6k} and the IR and IRS-1. These results indicate that chronic administration of leucine supplementation to adult mice during an aerobic exercise program may be important for making proteins pathways more active to protein synthesis in skeletal muscle and liver when compared to the activity expressed only in terms of aerobic exercise.

Key words: aerobic exercise, leucine, protein signaling pathway

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Via de sinalização da insulina, síntese protéica e aminoácidos.....	4
1.2 - Efeito do exercício aeróbio e da leucina sobre a via de sinalização de síntese protéica	9
2 - OBJETIVOS.....	13
2.1 - Objetivo	13
2.2 - Hipóteses	13
3 - MÉTODOS.....	14
3.1 - Grupos Experimentais	14
3.2 - Procedimentos experimentais.....	15
3.2.1 - Protocolo de treinamento.....	15
3.2.2 - Avaliação da ingestão hídrica e alimentar.....	15
3.2.4 - Análise da gordura peritoneal.....	16
3.2.5 - Teste de tolerância a insulina intraperitoneal (<i>ipITT</i>).....	16
3.2.6 - Dosagem de insulina plasmática	17
3.2.7 - Dosagem de glicogênio muscular, hepático e cardíaco.....	17
3.2.8 - Dosagem da concentração plasmática de leucina.....	18
3.2.9 - Atividade da Citrato Sintase.....	18
3.2.10 - Extração de RNA e RT-PCR semiquantitativo	18
3.2.11 - Western Blotting.....	19
3.2.12 - Imunoprecipitação	20
3.3 - Análise estatística	21
4 - RESULTADOS	22
4.1 - Ingestão hídrica	22
4.2 - Ingestão alimentar	23
4.3 - Efeito da suplementação com leucina e treinamento aeróbio sobre o peso corporal	25

4.4 - Efeito da suplementação com leucina e do treinamento aeróbio sobre a gordura.....	26
4.5 - Efeito da suplementação com leucina e treinamento aeróbio sobre variáveis bioquímicas..	27
4.5.1 - Concentração de glicogênio muscular, hepático e cardíaco	27
4.5.2 - Concentração plasmática de insulina.....	30
4.5.3 - Concentração plasmática de leucina.....	30
4.5.4 - Atividade da citrato sintase	31
4.6 - Sensibilidade à insulina em animais suplementados com leucina.....	32
4.7 - Conteúdo total e fosforilação das proteínas IR, IRS-1, mTOR e p70 ^{s6k} em músculo esquelético	32
4.8 - Conteúdo de mRNA em músculo esquelético de camundongos treinados e suplementados com leucina	36
4.9 - Conteúdo total e fosforilação das proteínas IR, IRS-1, mTOR e p70 ^{s6k} em fígado	37
4.10 - Conteúdo de mRNA em fígado de camundongos treinados e suplementados com leucina	41
5 - DISCUSSÃO.....	42
5.1 - Caracterização dos tratamentos	42
5.2 - Treinamento aeróbio, suplementação com leucina e via de síntese protéica em fígado de camundongos	52
5.3 - Treinamento aeróbio, suplementação com leucina e via de síntese protéica em músculo esquelético de camundongos	55
6 - CONCLUSÕES	66
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO I: Certificado de Análises do Controle de Qualidade da Leucina.....	84
ANEXO II: Certificado do Comitê de Ética.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da sinalização envolvida na síntese protéica estimulada por exercício, insulina e aminoácidos..... 06
- Figura 2:** Esquema do catabolismo de leucina realizado pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (AT-BCAA) e pelo complexo enzimático desidrogenase de cetoácido de aminoácidos de cadeia ramificada (DC-BCAA), mostrando a relação fosforilação/desfosforilação e consequente inativação e ativação do complexo, assim como a concentração comparativa dessas enzimas em músculo esquelético e fígado..... 07
- Figura 3:** Ilustração esquemática do protocolo experimental. Os quadros indicam as semanas de treinamento de natação e as setas as mudanças na carga e tempo de exercício..... 15
- Figura 4:** Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina na ingestão hídrica (ml/dia) dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM do total de água consumida diariamente durante as 12 semanas de experimento (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e ^α p<0,05 comparado ao C, CS e T..... 22
- Figura 5:** Curva de consumo hídrico diário (ml/dia), em cada semana de experimento, dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM em cada uma das semanas do período experimental (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e ^α p<0,05 comparado ao C, CS e T..... 23
- Figura 6:** Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no consumo de ração (g/dia) dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM do total de ração consumida diariamente durante as 12 semanas de experimento (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS 24
- Figura 7:** Curva de consumo diário de ração (g/dia), em cada semana de experimento, dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM em cada uma das semanas do período experimental (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS..... 24
- Figura 8:** Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no peso corporal (g) dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM em cada semana de experimento (n = 15 animais). ^α p<0,05 comparado ao C, CS e TS 25

Figura 9: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina na massa de gordura peritoneal (expresso em porcentagem relativa ao peso corporal total - Figura 9a) e peso absoluto (g) da gordura peritoneal (Figura 9b). Os valores são média±EPM (n = 15 animais). * p<0,001 comparado ao C e # p<0,001 comparado ao CS. 27

Figura 10a, 10b e 10c: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no conteúdo de glicogênio muscular (10a), hepático (10b) e cardíaco (10c) (mg/100mg de tecido) nos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 10). * p<0,05 comparado ao C..... 29

Figura 11: Efeito de 12 semanas de treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no teor de insulina plasmática (ng/ml) no estado alimentado. Os valores são média±EPM (n = 8 animais). * p<0,05 comparado aos grupos C e T..... 30

Figura 12: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina na atividade da citrato sintase (μ moles/min/ μ g prot) em músculo sóleo de camundongos C, CS, T e TS. Os valores são médias±EPM (n = 5 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e α p<0,05 comparado ao C, CS e T..... 31

Figura 13a e 13b: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina sobre o conteúdo de proteína do IR, IRS-1, p70^{s6k} e mTOR (13a) e fosforilação do IR, IRS1 e p70^{s6k} (13b) (porcentagem) em músculo esquelético de camundongos. As abreviações são: grupo controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C. # p<0,05 comparado ao grupo CS, & p<0,05 comparado ao grupo T e α p<0,05 comparado aos demais grupos 35

Figura 14: RT-PCR semiquantitativo de músculo esquelético de camundongos para o IR, IRS-1 e mTOR após o treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina nos seguintes grupos: controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C e α p<0,05 comparado aos demais grupos. 37

Figura 15a e 15b: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina sobre o conteúdo de proteína do IR, IRS1, p70^{s6k} e mTOR (15a) e fosforilação do IR, IRS1 e p70^{s6k} (15b) (porcentagem) em fígado de camundongos. As abreviações são: grupo controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C. # p<0,05 comparado ao grupo CS, & p<0,05 comparado ao grupo T, α p<0,05 comparado aos demais grupos..... 40

Figura 16a, 16b e 16c: RT-PCR semiquantitativo de fígado de camundongos para o IR (16a), IRS1 (16b) e mTOR (16c) após o treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina

nos seguintes grupos: controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). ^a p<0,05 comparado aos demais grupos.41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Primers usados para amplificação do mRNA	19
Tabela 2:	Peso inicial e final, porcentagem de ganho de peso, porcentagem de gordura e consumo diário de ração e de água ao longo das 12 semanas de experimento.....	26
Tabela 3:	Concentração plasmática de leucina	31
Tabela 4:	Valores da constante de decaimento de glicose (<i>k</i> ITT) do <i>ip</i> ITT	32

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E
ADP	Adenosina difosfato
AIN-93	Instituto Americano de Nutrição
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AT-BCAA	Enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo controle
Cis	Citrato sintase
CK	Ciclo de Krebs
CS	Grupo controle suplementado
DC-BCAA	Enzima desidrogenase de cetoácido de aminoácidos de cadeia ramificada
eIF4G	Fator de iniciação eucariótico 4G
EPM	Erro padrão da média
GLUT-2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT-4	Transportador de glicose do tipo 4
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HMB	Beta-hidroxi-beta-metilbutirato
HPLC	Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência
IB	Instituto de Biologia
<i>ipITT</i>	Teste de tolerância a insulina intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato-1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato-2 do receptor de insulina
KIC	α -cetoisocaproato
LEU	Leucina
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
p70 ^{s6k}	Proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC-1 α	Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKB/Akt	Proteína quinase B
RIA	Radioimunoensaio
T	Treinado
TS	Treinado suplementado
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VO ₂ max	Consumo máximo de oxigênio

1 – INTRODUÇÃO

Um dos objetivos do treinamento aeróbio é aumentar a capacidade de sustentar a demanda de energia exigida pelo exercício, assim como a velocidade de movimento por uma determinada distância ou tempo (Hawley, 2002). Para isso, é importante o aumento da capacidade aeróbia, incluindo aumento da capacidade de manter a força por um longo período, o que exige manutenção e/ou aumento da massa muscular, aumento da economia de energia e aumento da expressão de genes e proteínas relacionadas ao metabolismo mitocondrial e oxidativo (Hood, 2001; Atherton et al., 2005), como exemplo, o coativador 1 alfa do receptor que é ativado pelo proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), um importante marcador da atividade mitocondrial (Hood, 2001; Patti et al., 2003; Barr, 2006) e a citrato sintase (Cis), uma enzima que controla o primeiro passo do ciclo de Krebs (CK).

É sabido que o treinamento aeróbio aumenta a atividade mitocondrial do músculo esquelético, confirmado pela maior expressão gênica do PGC1- α no músculo de ratos submetidos ao treinamento de natação (Terada et al., 2002). Estudos recentes em humanos relatam aumento da atividade da Cis após 10 semanas de treinamento de resistência (Akerstrom et al., 2009), 2 semanas de treinamento intervalado (8-12 séries de 60s de corrida a 100% do pico de VO₂ com 75s de intervalo) (Little et al., 2010) e exercício com depleção de glicogênio (Hansen et al., 2005). Em ratos idosos treinados por 3 meses em esteira houve aumento de 45% na atividade da Cis (Reynolds IV et al., 2004). Estes dados fornecem indícios de que alterações nessa variável dependem do tipo de treinamento adotado, assim como do aporte nutricional consumido.

Durante o exercício ocorre a captação de diversos aminoácidos pelo músculo esquelético, com predominância dos aminoácidos de cadeia ramificada ou *branch chain amino acids*

(BCCAs): leucina, valina e isoleucina. Após exercício prolongado (100 km de corrida), realizado por 11 homens treinados, foi verificada diminuição significativa da concentração plasmática de leucina (LEU) comparada com aos valores pré-exercício (Decombaz et al., 1979). Adicionalmente, a concentração sérica de LEU também estava diminuída em homens jovens após 225 min. de ciclismo a 50% do consumo máximo de oxigênio (VO_2max) (Rennie et al., 1981) e em cavalos (2 a 6 anos) que realizaram um exercício aeróbio de 60 km (4 h) (Trottier et al., 2002). Baseado nesse contexto, a administração de suplementação de LEU com o objetivo de aumentar o aporte de aminoácidos durante o exercício parece interessante. Apesar disso, poucos estudos relatam os efeitos da LEU sobre as variáveis PGC-1 α e Cis, dois marcadores bem estabelecidos da adaptação ao treinamento aeróbio. Com a finalidade de verificar o efeito da suplementação de aminoácidos sobre a concentração da Cis, um estudo recente mostrou que esta variável permaneceu inalterada após administração de uma dieta hiperprotéica (3g de proteína/kg massa magra) durante 10 dias em humanos jovens e idosos (Walrand et al., 2008).

Quando submetido ao exercício, o músculo esquelético é capaz de se adaptar a diferentes demandas funcionais e as adaptações são específicas a determinados estímulos (McDonagh e Davies, 1987). O treinamento de força induz crescimento de massa muscular esquelética, enquanto o treinamento de resistência melhora a capacidade aeróbia através do aumento da vascularização, densidade mitocondrial e capacidade oxidativa (Holloszy e Booth, 1976; Hawley, 2002; Hawley et al., 2010). As adaptações fisiológicas e bioquímicas desses dois modelos de exercício são bem caracterizadas, entretanto, alterações moleculares recentemente ganharam importância na literatura.

Uma das vias estudadas e de grande relevância, tanto para o desempenho máximo como para a manutenção da saúde, é a via sinalizadora de síntese protéica. A maioria das pesquisas

relata alterações moleculares de proteínas envolvidas nesta via após sessões agudas de exercício de força. No entanto, as adaptações impostas pelo treinamento e pelo exercício de resistência são pouco investigadas.

Além do exercício, outro estimulador da via de sinalização protéica são os BCAAs: leucina, isoleucina e valina. Há evidências do papel dos BCAAs, principalmente da leucina, na estimulação do crescimento celular de músculo esquelético (Rasmussen et al., 2000; Anthony et al., 2001; Anthony et al., 2002; Volpi et al., 2003). A LEU também pode induzir a secreção de insulina (Malaisse et al., 1981; Gao et al., 2003; Zawulich et al., 2004; MacDonald et al., 2005; Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010; de Oliveira et al., 2010; Amaral et al., 2010).

O efeito da LEU sobre proteínas da via de sinalização de proteínas e secreção de insulina pode contribuir com a ativação da síntese protéica. Baseados nessa premissa atletas envolvidos, principalmente, em exercícios de força, no qual o catabolismo está aumentado, frequentemente, consomem os BCAAs com o objetivo de favorecer a secreção de insulina e aumentar a massa muscular. No entanto, em exercícios de resistência há aumento de proteólise, fato que motivou a investigação do papel da suplementação com aminoácido em associação ao exercício de resistência e não ao de força. Portanto, levanta-se a hipótese de que a suplementação com leucina, associada ao treinamento aeróbio, modula proteínas sinalizadoras da via de síntese protéica, fato que poderia contribuir com o aumento da sinalização desta via em músculo esquelético e fígado de camundongos, compensando a proteólise induzida pelo exercício aeróbio.

1.1 - Via de sinalização da insulina, síntese protéica e aminoácidos

A via de síntese protéica em músculo esquelético é modulada por diferentes estímulos, dentre eles o exercício (Tipton e Wolfe, 1998), os aminoácidos (Kimbal e Jefferson, 2006a; Kimbal e Jefferson, 2006b) e o hormônio insulina (Thomas e Hall, 1997).

A insulina é um hormônio anabólico, essencial na manutenção da homeostase de glicose e modulação de vias celulares que regulam o metabolismo. Esses efeitos iniciam-se após a célula identificar os sinais desencadeados pela insulina. A ação da insulina tem início após a sua ligação ao receptor de insulina (IR), localizado na membrana plasmática, induzindo autofosforilação do IR e, conseqüente fosforilação e ativação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e substrato-2 do receptor de insulina 1 (IRS-2) (White e Kahn, 1994). Uma vez fosforilados, o IRS-1 e IRS-2 ativam a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K) (Folli et al., 1992). Essa interação entre IRS-1 e a enzima PI3-K é essencial na regulação de muitos processos celulares, incluindo a ação metabólica e mitogênica da insulina, como aumento da captação de glicose e proliferação celular (Shepherd et al., 1995; Czech et al., 1999). Assim sendo, os IRS-1 e IRS-2 desempenham função essencial na transmissão do sinal insulínico desencadeando uma série de eventos bioquímicos que modulam a função celular. Apesar das duas proteínas serem importantes moléculas mediadoras da via de sinalização de insulina, possuem diferenças funcionais e específicas para cada tecido. O IRS-1 desempenha papel importante no músculo esquelético e tecido adiposo, tecidos envolvidos com a captação de glicose, enquanto o IRS-2 parece regular a função hepática, tecido responsável pela produção de glicose, bem como o desenvolvimento de células beta do pâncreas, responsáveis pela produção de insulina (Sesti et al., 2001).

Uma das proteínas alvo da PI3-K é a proteína quinase B (PKB/Akt). Downward (1998) e Cho et al. (2001) demonstraram o importante papel da PKB na homeostase da glicose,

crescimento e sobrevivência celular, e fosforilação de proteínas que regulam a síntese de lipídeos, glicogênio e proteínas (Cross et al., 1995; Saltiel e Kahn, 2001; Kido et al., 2001). A PKB ativa uma proteína denominada alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Thomas e Hall, 1997). Esta por sua vez controla a síntese protéica diretamente pela ativação de 3 proteínas: a proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA (p70^{s6k}), a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (Anthony et al., 2000; Anthony et al., 2001). Estes promovem a tradução protéica facilitando o início desse processo (Wang e Proud, 2006). Portanto, a mTOR é indicada como um marcador da síntese protéica em músculo esquelético (Reynolds IV et al., 2004), e uma proteína integradora de sinais metabólicos e fatores de crescimento para regular a proliferação celular (Bodine, 2006). A Figura 1 ilustra a relação entre a via de sinalização da insulina, o exercício físico, a LEU e a via de sinalização de síntese protéica.

Nesse contexto, a estimulação da síntese protéica via mTOR/p70^{s6k} é influenciada pela presença de insulina (Xu et al., 2001). No entanto, a insulina isoladamente não é capaz de restaurar a síntese protéica no estado alimentado, sendo necessária a ingestão de aminoácidos para ativar a via (Norton e Layman, 2006). Sugere-se então que a insulina potencialize a via de sinalização de proteína, facilitando a síntese de proteínas em presença de aminoácidos. Dessa forma, assim como a insulina, os aminoácidos têm sido apontados como moduladores da via de sinalização da mTOR/p70^{s6k} (Tremblay e Marette, 2001; Volpi et al., 2003).

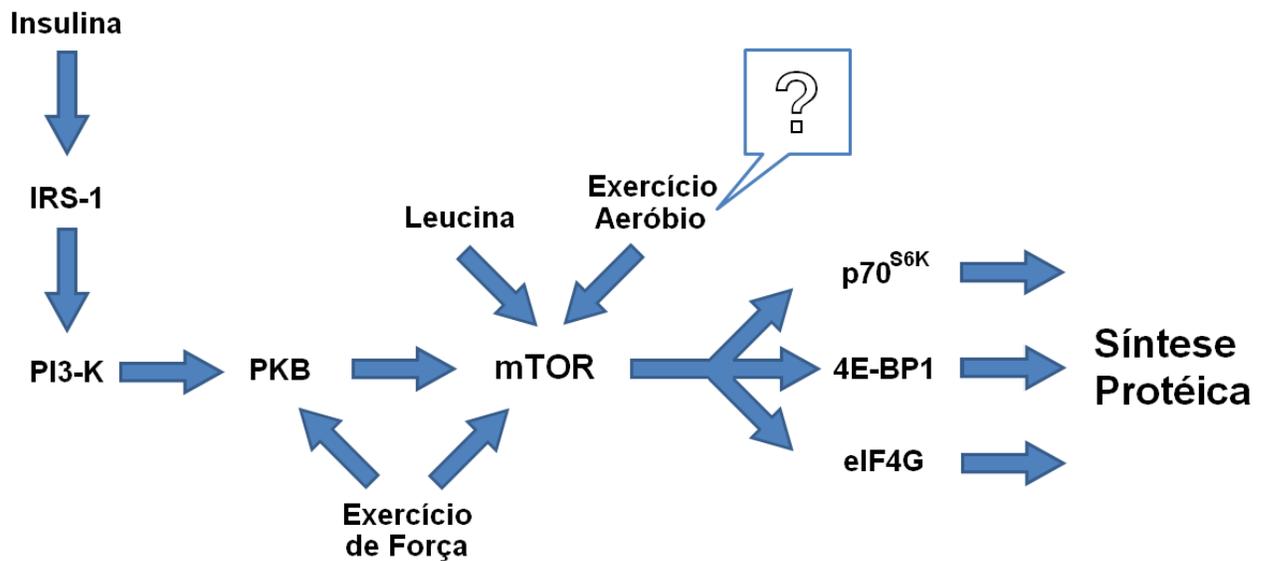


Figura 1: Esquema da sinalização envolvida na síntese proteica estimulada por exercício, insulina e aminoácidos.

Assim como a insulina, os aminoácidos, unidades básicas de uma proteína, são capazes de estimular o anabolismo protéico. Esses são divididos em 2 grupos: os não-essenciais e os essenciais, cuja diferença é a capacidade de serem ou não sintetizados pelo organismo, respectivamente. Nove aminoácidos são considerados essenciais e devem ser consumidos na dieta. Dentre esses se encontram os aminoácidos mais importantes envolvidos na via de crescimento celular: os BCAA - leucina, isoleucina e valina (Garlick e Grant, 1998), cujos produtos do metabolismo produzem sinais que ativam a via de síntese protéica.

O BCAA mais comumente utilizado como suplemento e o mais frequentemente estudado em exercícios é a leucina. São oxidados na mitocôndria e a primeira reação envolvida no catabolismo dos BCAA é a transaminação pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (AT-BCAA), que é dependente da vitamina B6, e que aceita os 3 BCAA como substrato. A reação catalisada pela AT-BCAA converte os BCAA nos seus respectivos cetoácidos. O mecanismo mais ativo para oxidação dos BCAA se localiza no músculo

esquelético, que apresenta alta atividade da enzima AT-BCAA. O fígado apresenta um mecanismo muito ativo para a degradação dos cetoácidos do BCAA, pois a atividade da AT-BCAA é baixa em fígado comparada a do músculo, tornando pouco eficiente a cabolização direta dos BCAA. De interesse do presente estudo, a LEU é convertida no cetoácido α -cetoisocaproato (KIC). Este sofre descarboxilação oxidativa pela enzima desidrogenase de cetoácido de aminoácidos de cadeia ramificada (DC-BCAA), um complexo enzimático presente na membrana interna mitocondrial, em isovaleril coenzima-A, que, posteriormente, sofre oxidação sendo convertido a acetoacetato + acetil coenzima-A (acetil CoA), sendo a leucina, portanto, cetogênica. Cabe resaltar que a atividade da DC-BCAA é maior no fígado comparativamente ao músculo (Nissen e Albumrad, 1997). Um esquema simplificado do catabolismo de LEU é mostrado na Figura 2.

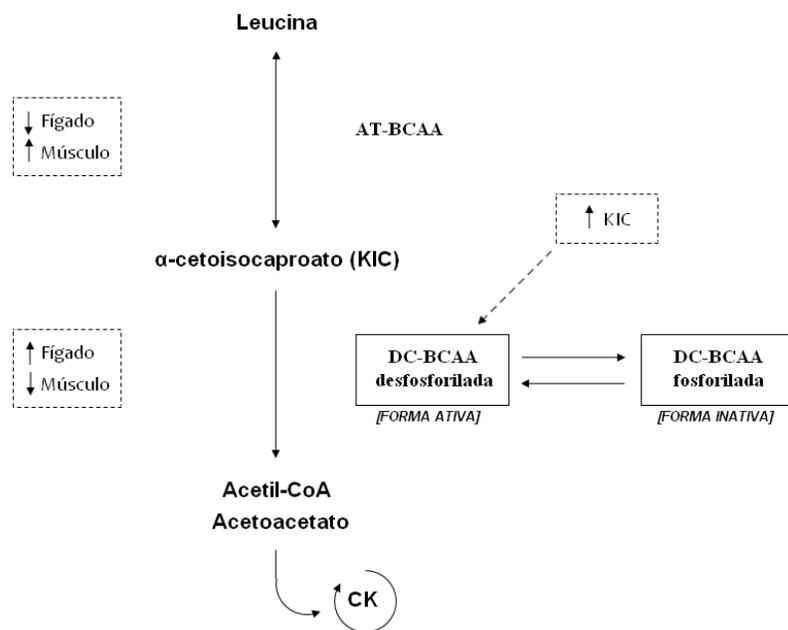


Figura 2: Esquema do catabolismo de leucina realizado pela enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (AT-BCAA) e pelo complexo enzimático desidrogenase de cetoácido de aminoácidos de cadeia ramificada (DC-BCAA), mostrando a relação fosforilação/desfosforilação e consequente inativação e ativação do complexo, assim como a concentração comparativa dessas enzimas em músculo esquelético e fígado.

Ao iniciar o exercício o complexo enzimático DC-BCAA é ativado (desfosforilado) e a sua atividade é modulada pelo aumento da adenosina difosfato (ADP) e diminuição do pH (Kasperek, 1989). A oxidação da LEU é aumentada em exercícios de longa duração, alta intensidade e em situação de depleção de glicogênio (Tarnopolsky, 2004), sendo utilizada como substrato energético.

Estudos relatam que após um período de treinamento, a atividade da DC-BCAA e a oxidação dos aminoácidos são reduzidas, embora sua capacidade total de oxidação esteja aumentada. Estes dados mostram que o treinamento diminui a oxidação dos aminoácidos durante o exercício, mas permite, nos períodos de estresse metabólico, uma maior possibilidade de oxidação em indivíduos treinados comparados com sedentários (Phillips et al., 1993; McKenzie et al., 2000; Gaine et al., 2005).

A LEU tem efeito anabólico no metabolismo protéico por aumentar a razão de síntese protéica e diminuir a razão da degradação de proteínas no músculo esquelético humano em repouso (Karlsson et al., 2004). Ela atua na pós-transcrição, durante a fase de iniciação da tradução do RNA mensageiro (mRNA) em proteína (Anthony et al., 2001; Anthony et al., 2002).

O mecanismo pelo qual a LEU estimula a tradução de proteínas está relacionado à sua ação sobre a mTOR. Embora por um mecanismo não completamente compreendido, a LEU pode ativar, de forma independente, vias de sinalização intracelular que convergem para a mTOR (Volpi et al., 2003). Com o objetivo de verificar o efeito da LEU em ratos, um complemento alimentar rico em LEU foi administrado durante cinco dias. A via de síntese protéica muscular esquelética estava estimulada e este resultado foi relacionado à ação da LEU sobre a estimulação de proteínas envolvidas na via de sinalização protéica (Norton et al., 2009). A LEU também gera sinais metabólicos semelhantes aos da glicose e, por isso, estimula a secreção de insulina, dado

confirmado por estudos conduzidos em nosso laboratório no qual, animais controle e desnutridos foram suplementados com 1,5 % de LEU na água de beber. Ambos os grupos exibiram aumento da secreção de insulina estimulada por diferentes agentes insulíntricos (Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010). Nesse contexto, a LEU e o aumento da secreção de insulina pode levar a estimulação da via de sinalização da mTOR/p70^{s6k}.

Quanto ao fígado, foi demonstrado que a LEU interfere na produção do fator de crescimento de hepatócitos por células satélites hepáticas de ratos estimulando a via da mTOR/p70^{s6k} (Tomiyama et al., 2007), assim como estimulou a fosforilação da p70^{s6k} no fígado quando ratos receberam suplementação oral de BCAA (Anthony et al., 2001 e Anthony et al., 2004). Ratos que receberam uma dieta hiperprotéica por 14 dias demonstraram aumento da ativação da mTOR e fosforilação do 4E-BP1 (Chotechuan et al., 2009). A escassez de estudos em fígado abordando o papel do treinamento aeróbio associado ao consumo de aminoácidos despertou o interesse em investigar também este tecido.

1.2 - Efeito do exercício aeróbio e da leucina sobre a via de sinalização de síntese protéica

A via mTOR/p70^{s6k} vem sendo estudada em músculo esquelético como uma possível sinalizadora do crescimento muscular evidenciado em função da adaptação ao treinamento físico. Num estudo pioneiro os efeitos do papel da mTOR/p70^{s6k} sobre a hipertrofia muscular esquelética provocada pelo treinamento de força foram investigados por Barr e Esser (1999). Os autores verificaram que a fosforilação da p70^{s6k} em músculo tibial anterior e extensor digital longo de ratos estava aumentada após 3 e 6 h de uma sessão aguda de treinamento de resistência e diretamente relacionada ao aumento de massa muscular induzida pelo exercício. A utilização da rapamicina, um inibidor específico da mTOR, consagrou a importância da sinalização aumentada

da mTOR sobre a estimulação de síntese protéica muscular induzida pelo treinamento. Kubica et al. (2004) e Kubica et al. (2005) submeteram ratos a uma sessão aguda de exercício de força e, 16 h após o exercício observaram aumento na síntese protéica no músculo gastrocnêmio. A administração de rapamicina 2 h antes do exercício suprimiu esse efeito.

Ao contrário do exercício resistido, o exercício aeróbio levaria a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), inibidora da mTOR, sugerindo uma supressão da síntese protéica neste tipo de exercício (Atherton et al., 2005; Nader, 2006). Em contraste com esses estudos, Mascher et al. (2007) demonstraram que uma sessão aguda de exercício aeróbio (1 h de ciclismo a 75% do $VO_2\text{max}$) realizada por 6 homens (23 ± 1 anos) aumentou a fosforilação da mTOR e $p70^{\text{S6k}}$ no músculo esquelético (vasto lateral) após o exercício, indicando a possibilidade de síntese protéica aumentada. Adicionalmente, Fujita et al. (2007) demonstraram que uma única sessão de exercício aeróbio moderado (45 min. caminhando na esteira a 70% da frequência cardíaca máxima) aumentou o anabolismo muscular em idosos saudáveis (70 ± 2 anos), comprovado pelo aumento da síntese protéica e balanço nitrogenado positivo. Tais resultados foram confirmados pelo aumento da captação de aminoácidos pelo tecido muscular, acompanhado de um aumento da fosforilação das proteínas mTOR, PKB e $p70^{\text{S6k}}$. No entanto, o aumento da síntese protéica estava presente somente nos indivíduos que receberam infusão de insulina após a sessão de exercício, sugerindo que o efeito anabólico do exercício aeróbio foi dependente da concentração aumentada de insulina, fato demonstrado também em indivíduos jovens (Fujita et al., 2006). Os dois estudos corroboram a importância do aumento da concentração de insulina na estimulação da síntese protéica.

Como a LEU aumenta a secreção de insulina (Malaisse et al., 1981; Gao et al., 2003; Zawulich et al., 2004; MacDonald et al., 2005; Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010; de

Oliveira et al, 2010; Amaral et al., 2010) pode então ser utilizada em associação ao exercício aeróbio para ativar e/ou restaurar a via de sinalização protéica em músculo esquelético, o que levaria ao aumento da síntese de proteínas.

Nesse contexto, a suplementação de BCAAs vem sendo estudada durante o processo de recuperação do exercício e há indícios de que a ingestão de LEU module enzimas chave da via de síntese protéica (Blomstrand et al., 2006). Com essa perspectiva, estudos em ratos têm demonstrado que a administração oral de LEU restaurou a síntese protéica após o exercício de força aos níveis pré-exercício (Gautsch et al., 1998; Anthony et al., 2000; Layman, 2002). Em adição, a suplementação aguda de BCAAs aumentou a atividade da p70^{S6K} em músculo esquelético (quadríceps) durante a recuperação de um exercício de força (4 séries de 10 repetições de extensão de joelhos a 80% de 1 repetição máxima) realizado por homens jovens (25 anos) (Karlsson et al., 2004). No entanto, os mesmos autores relatam que somente a sessão de exercício de força não foi suficiente para fosforilar e ativar totalmente a p70^{S6K}, demonstrando a importância em associar exercício e suplementação.

Reforçando a importância da suplementação de aminoácidos na ativação da via de síntese protéica, verificou-se que a ingestão de BCAAs imediatamente após uma sessão de exercício de resistência (60 min. em bicicleta ergométrica a 60% do VO₂max) estimulou a síntese protéica total e no músculo esquelético exercitado de homens e mulheres (músculos dos membros inferiores), demonstrado pelo balanço nitrogenado positivo (Levenhagen et al., 2001). Esses dados sugerem que o aumento da disponibilidade de BCAAs estimula a via de sinalização de síntese protéica após o exercício aeróbio. No entanto, há escassez de estudos mostrando o comportamento da via mTOR/p70^{S6k} após um programa de exercício aeróbio crônico, assim

como há pouca informação sobre os efeitos do treinamento aeróbio sobre a síntese protéica muscular (Reynolds IV et al., 2004).

Com o objetivo de verificar o efeito do exercício aeróbio crônico sobre a síntese protéica muscular e conteúdo total da mTOR, roedores idosos (20 a 22 meses) foram submetidos ao treinamento aeróbio (3 meses de corrida em esteira). Verificou-se aumento dessas duas variáveis em relação ao grupo controle idoso, sugerindo que o treinamento aeróbio pode atenuar ou prevenir a perda de massa muscular com o avanço da idade por aumentar a capacidade da via de sinalização da mTOR (Reynolds IV et al., 2004). Em acordo com esses dados, Short et al. (2004) mostraram que a síntese protéica muscular no repouso estava aumentada em 22% em humanos jovens e idosos (19 a 87 anos) após 16 semanas de um programa de treinamento de resistência (45 min. em bicicleta ergométrica a 80% da frequência cardíaca máxima, 3 a 4 dias/semana), indicando, segundo os autores, que o exercício aeróbio pode aumentar a síntese de proteínas musculares, no entanto não houve aumento da massa muscular esquelética.

Esses dados mostram a importância da prática do treinamento aeróbio por indivíduos idosos visando à manutenção da massa muscular, já que muitos ainda apresentam resistência à prática de exercícios de força, os quais são bem estabelecidos como potenciais estimuladores do crescimento da massa muscular esquelética (Barr e Esser, 1999).

Embasados nos dados apresentados e com o objetivo de fornecer informações sobre a relação: treinamento aeróbio, suplementação com LEU e proteínas sinalizadoras da via de síntese protéica propusemos este estudo.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a modulação do treinamento aeróbio e da suplementação com leucina sobre proteínas sinalizadoras da via de sensibilidade à insulina e síntese protéica em músculo esquelético e fígado de camundongos adultos.

2.2 - Hipóteses

A hipótese testada no presente estudo foi de que a suplementação com leucina, associada ao treinamento aeróbio, modula proteínas sinalizadoras da via de sinalização de insulina e de síntese protéica. E que a administração da suplementação crônica com leucina para camundongos adultos durante um programa de exercício aeróbio pode tornar a via de síntese protéica mais ativa quando comparada à atividade expressa somente em função do exercício aeróbio.

3 - MÉTODOS

3.1 - Grupos Experimentais

Os experimentos descritos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP. Utilizaram-se camundongos machos com 60 dias de vida, provenientes do Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

Controle (C): 15 camundongos não submetidos ao exercício, alimentados com dieta padrão contendo 17% de proteína por 12 semanas.

Controle Suplementado (CS): 15 camundongos não submetidos ao exercício que receberam dieta padrão contendo 17% de proteína e suplementação com 1,5% de LEU (procedência Anexo I) administrada via oral na água para beber durante 12 semanas.

Treinado (T): 15 camundongos alimentados com dieta padrão contendo 17% de proteína, submetidos a treinamento aeróbio de natação durante 12 semanas como descrito na figura 1 com água na temperatura de 33°C.

Treinado Suplementado (TS): 15 camundongos alimentados com dieta padrão contendo 17% de proteína e suplementados com 1,5% de LEU administrada via oral na água para beber e submetidos às mesmas condições de exercício que o grupo T descrito acima.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais sob condição padronizada de iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura de 22±2 °C. Durante todo o período experimental tiveram livre acesso à água e as respectivas dietas.

12 semanas. Os dados foram utilizados para a construção de curvas de evolução temporal do consumo de ração (g) e ingestão de água (ml), assim como, de figuras mostrando a média de ração (g) e água (ml) consumida durante todo o período experimental.

3.2.3 - Análise do crescimento corporal

Durante as 12 semanas de exercício, todos os camundongos foram pesados uma vez por semana para obtenção da sua massa corpórea (g). Os dados foram utilizados para construção da curva de crescimento corporal.

3.2.4 - Análise da gordura peritoneal

Após sacrifício (por exposição ao gás carbônico e subsequente decapitação) foi coletada toda a gordura peritoneal dos animais e imediatamente pesada. Depois de obtido o peso (g) calculou-se a porcentagem de gordura em relação ao peso corporal total, como demonstrado pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ gordura relativa} = \frac{\text{Gordura peritoneal}}{\text{Peso corporal total}} \times 100$$

3.2.5 - Teste de tolerância a insulina intraperitoneal (*ipITT*)

Na 12^a semana de treinamento, os animais foram colocados em jejum de 6 h (todos os grupos receberam apenas água neste período) e após 16 h sem prática de exercício foram submetidos a um Teste *ipITT* para verificação da captação periférica de glicose. Foi coletada uma gota de sangue da calda de cada animal em jejum (tempo 0) e após este procedimento administrada, via peritoneal, Insulina Humana Recombinante (Humulin N) da Lilly France S.A. (2 U/kg de peso corporal), diluída em solução salina e aferida a glicemia nos tempos: 10, 20 e 30

min. após a administração da insulina. A concentração de glicemia foi obtida utilizando um glicosímetro da marca Accutrend. A constante de decaimento de glicose do sangue (k_{ITT}) foi calculada pela inclinação da linha de regressão obtida com os valores de glicose transformados em escala logarítmica, durante a fase de decaimento linear (0-20 min).

3.2.6 - Dosagem de insulina plasmática

Após 24 h sem exercício 10 animais de cada grupo foram sacrificados (por exposição ao gás carbônico e subsequente decapitação) e o sangue coletado através do tronco em *ependorfs* heparinizados para dosagem da concentração plasmática de insulina no estado alimentado. O soro foi separado por centrifugação a 700 rpm durante 15 min e posteriormente determinada a concentração plasmática de insulina por radioimunoensaio (RIA).

3.2.7 - Dosagem de glicogênio muscular, hepático e cardíaco

Foi realizada a dosagem do glicogênio muscular (músculo sóleo), hepático e cardíaco utilizando-se o método de espectrofotometria (Lo et al., 1970). O sacrifício foi realizado após 24 h sem exercício. Amostras do músculo sóleo e fígado (500 mg) e o coração foram transferidas para tubos contendo KOH a 30% e fervidas por 1 h até completa homogeneização. Adicionou então Na_2SO_4 e o glicogênio foi precipitado com etanol. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min., o sobrenadante descartado e o glicogênio dissolvido em água destilada quente. Foi adicionado etanol aos *pellets* obtidos após uma segunda centrifugação a 2000 rpm por 10 min. Estes foram dissolvidos em água destilada num volume final de 25 ml. O conteúdo de glicogênio foi medido tratando um volume fixado da amostra com reagente fenol e H_2SO_4 . Para

obtenção dos resultados a absorvância foi lida em 490 nm com um espectrofotômetro (Spectronic® 20 Genesis™) (Leighton et al., 1989).

3.2.8 - Dosagem da concentração plasmática de leucina

A concentração de LEU plasmática foi determinada pelo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como demonstrado por Bidlingmeyer et al. (1984).

3.2.9 - Atividade da Citrato Sintase

As amostras do músculo sóleo foram removidas e homogeneizadas em uma solução tampão de extração contendo Tris-HCl (0.5 mM) e EDTA (1 mM) com pH 7.4. A reação foi realizada num meio contendo ris/aminometano (100 mM), DTNB (0.2 mM), acetil-CoA redutase (0.1 mM) e Triton X-100 (0.1%) com pH 8.1. A reação foi iniciada pela adição de 10µL de extrato do tecido e 50µL ácido oxalacético (10 mM). Para obtenção dos resultados a absorvância foi lida em 412 nm (25°C) com um espectrofotômetro (Spectronic® 20 Genesis™) durante 5 min como descrito em Srere et al. (1963).

3.2.10 - Extração de RNA e RT-PCR semiquantitativo

O RNA total do músculo sóleo e fígado foi extraído usando o reagente Trizol, conforme descrito pelo fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), o RNA foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando *primers* randômicos. O cDNA resultante foi amplificado pela reação da transcriptase reversa da cadeia da polimerase (RT-PCR) usando *primers* e parâmetros de PCR conforme indicado na Tabela 1. A partir dos cDNAs obtidos foram realizadas as curvas de ciclos para cada *primer*, com o mínimo de 5 pontos para cada curva. Após obtenção das curvas os experimentos foram realizados com um número de

ciclos equivalente a 20% abaixo do ponto de saturação da reação (platô). A PCR foi realizada em um volume de reação 25 µl contendo cDNA equivalente a 3 µg de RNA, 10 mmol/L de dNTPs/L (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 mmol/L de MgCl₂, tampão PCR 10X, 10 µmol/L do primer adequado e 2 unidades de Taq polimerase. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5% em tampão 1X Tris-borato EDTA e corados com brometo de etídio. Todas as reações de PCR incluíram um controle negativo. A ausência de contaminação genômico nas amostras de RNA foi confirmada pelas amostras de RNA RT-negativo. A digitalização e medição da intensidade da banda relativa foi realizada empregando um sistema de documentação Gel Doc BioRad Laboratory, Hercules, USA). Os resultados foram expressos como uma razão entre a amplificação do gene alvo e RPS29 - controle interno do produto (Higuchi et al., 1992).

Tabela 1: *Primers usados para amplificação do mRNA.*

Nome do gene	Nº banco de genes	Forward 5'	Reverse 5'	Produto do Anelamento		
				Tamanho	Temperatura	Ciclos
IR	NM010568	attccagcaactgatgtgcacc	atggaagaagagctgccctgagt	420	62	24
IRS1	NM010570.4	accactctatcccg	ggcaatgagtagtaagagag	539	54	26
mTOR	NM020009.2	tgtctatgacccgctgctcaac	gtcctgggaactgaatcaagcc	249	58	29
Controle	NM012876	aggcaagatgggtcaccagc	agtcgaatcatccattcaggtcg	202	55	27

3.2.11 - Western Blotting

Para extração de proteínas, amostras do músculo sóleo e fígado foram rapidamente retirados e armazenados a -70° C. As amostras foram novamente homogeneizadas em 0,5 mL de tampão de extração gelado contendo, em mmol/L: 100 Trizma, pH 7,5, EDTA 10, 100 NaF, 10 pirofosfato de sódio, 10 ortovanadato sódio, flúor phenylmethanesulfonyl 2 e 0,01 mg/mL de aprotinina a 4°C por 30 s. Foi adicionado Triton X 100 (1%) e as amostras incubadas por 30 min a 4°C. Após foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 min. a 4°C. Alíquotas do sobrenadante

foram utilizadas para a medição do teor de proteína total pelo método de Bradford, 1976. Quantidades iguais de proteínas de cada amostra (50 µg) foram separadas em SDS-PAGE. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em 120 V. Bandas não-específicas foram bloqueadas por incubação das membranas com 5% de leite em pó desnatado em solução basal (10 mM Trizma, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) em temperatura ambiente por 2 h. Cada membrana foi lavada três vezes de 10 min. em solução basal. O IR, IRS-1, p70^{S6K} e mTOR foram detectados após 2 horas de incubação à temperatura ambiente com um anticorpo policlonal de coelho contra o IR, o IRS-1 , a p70^{S6K} e a mTOR. Como um controle interno foi utilizado o anticorpo α -tubulina (Santa Cruz, CA, EUA). Todos os anticorpos foram diluídos em solução basal contendo 3% de leite em pó desnatado. A detecção foi feita por quimioluminescência (Super Signal West Pico, Pierce, Rockford, IL) após incubação com um anticorpo secundário. As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria (Scion Image, Frederick, MD).

3.2.12 - Imunoprecipitação

Em experimentos que se desejava verificar a fosforilação do IR e IRS-1 em tirosina, os animais foram anestesiados (ketamina + diazepam) e em seguida receberam uma dose de insulina intraperitoneal (10 µL/g peso corporal). Pequenos fragmentos do músculo sóleo (5-6 min após a dose de insulina) e do fígado (1-2 min após a dose de insulina) foram isolados. Estes foram homogeneizados em tampão específico contendo Trisma base a 100 mM, EDTA a 10 mM, pirofosfato de sódio a 10 mM, fluoreto de sódio a 100 mM, ortovanadato de sódio a 10 mM, PMSF a 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X 100 a 1% e 0,1 mg/mL de aprotina a 4°C, foi retirado o sobrenadante para imunoprecipitação com anticorpos anti-IR e anti-IRS-1 (Santa

Cruz), em volume fixo de 10 μ L por amostra . Os volumes das amostras foram normalizados por concentração protéica (1,0 mg de proteína total por amostra). As amostras foram incubadas por 12 a 14 h a 4°C e, a seguir foi acrescentada proteína-A Sepharose (50 μ L) por 2 h a 4°C. Os imunocomplexos foram lavados três vezes com tampão Tris-salina e suspensos com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT, aquecidas em água fervente por 5 min e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE em gel bifásico como descrito anteriormente para o Western Blot. Nos experimentos de imunoprecipitação, os anticorpos utilizados foram anti-fosfotirosina.

3.3 – Análise estatística

Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para análise das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizada ANOVA *two-way* (análise de variância, com 2 variáveis, a saber: suplementação com LEU e treinamento) e aplicado pós-teste de Bonferroni. Adotou-se nível de significância de $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1 - Ingestão hídrica

A análise da ingestão hídrica mostrou que os animais do grupo C ($9,65 \pm 0,14$ ml/dia) não diferiram dos animais do grupo CS ($10,30 \pm 0,31$ ml/dia). No entanto, os animais treinados T ($11,30 \pm 0,22$ ml/dia) e TS ($12,38 \pm 0,35$ ml/dia) superaram o consumo de líquido do grupo C em 17,10% e 28,29% e do grupo CS em 9,7% e 20,19%, respectivamente, (Figura 4). Além disso, o grupo TS ingeriu 9,56% mais água do que o grupo T. A evolução do consumo hídrico durante as 12 semanas experimentais é demonstrada na Figura 5.

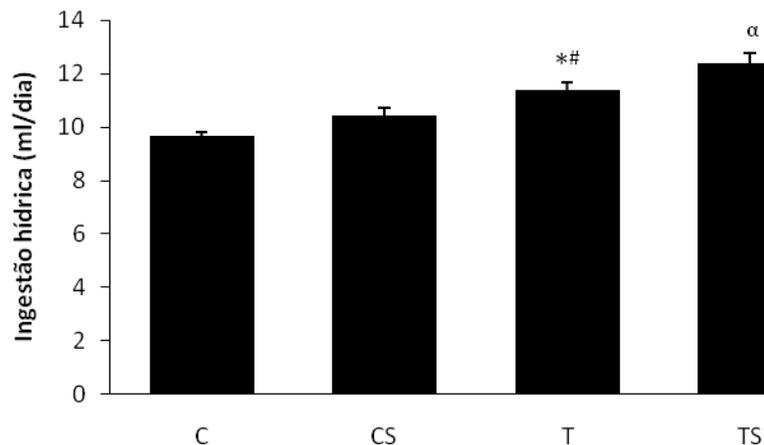


Figura 4: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina na ingestão hídrica (ml/dia) dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM do total de água consumida diariamente durante as 12 semanas de experimento (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e ^α p<0,05 comparado ao C, CS e T.

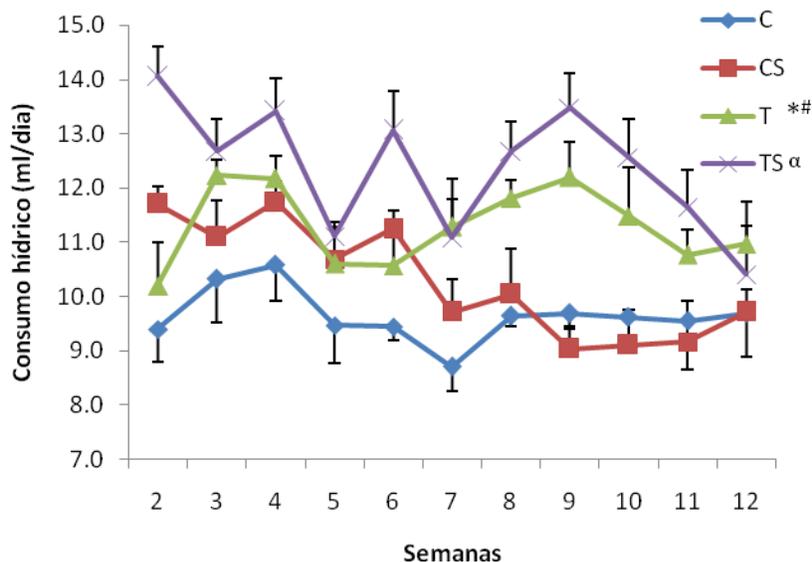


Figura 5: Curva de consumo hídrico diário (ml/dia), em cada semana de experimento, dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM em cada uma das semanas do período experimental (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e α p<0,05 comparado ao C, CS e T.

4.2 - Ingestão alimentar

Quando analisamos o consumo médio de ração por dia durante as 12 semanas de experimento, observou-se que o consumo do grupo CS ($5,47 \pm 0,12$ g/dia) foi 8,68% menor quando comparado ao grupo C ($5,99 \pm 0,12$ g/dia). Os grupos T ($6,87 \pm 0,15$ g/dia) e TS ($6,94 \pm 0,12$ g/dia) apresentaram consumo de ração elevado em 14,70% e 15,86% quando comparado ao grupo C e em 25,59% e 26,87% quando comparado ao grupo CS, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos treinados (T e TS) (Figura 6 e 7).

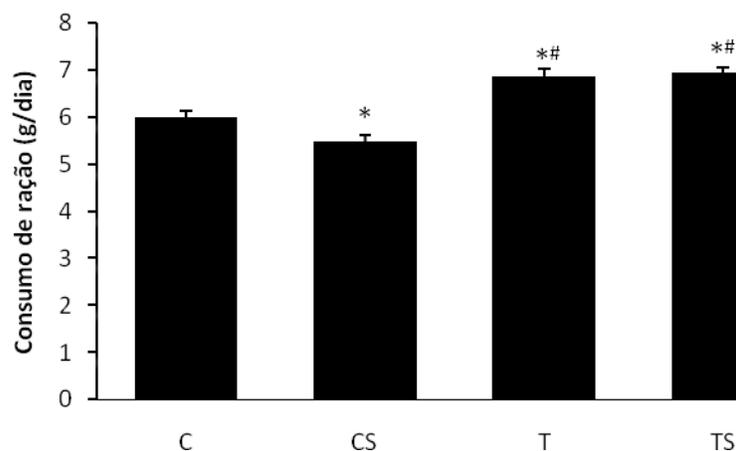


Figura 6: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no consumo de ração (g/dia) dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM do total de ração consumida diariamente durante as 12 semanas de experimento (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS.

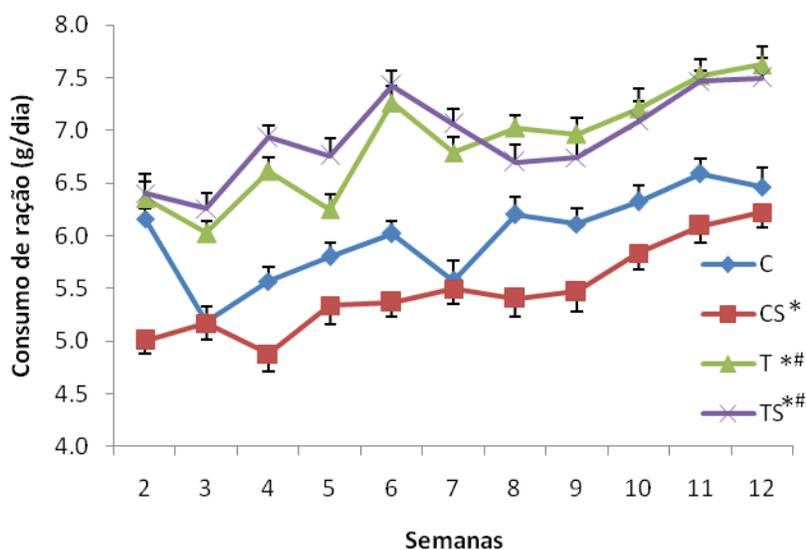


Figura 7: Curva de consumo diário de ração (g/dia), em cada semana de experimento, dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM em cada uma das semanas do período experimental (n = 13 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS.

4.3 - Efeito da suplementação com leucina e treinamento aeróbio sobre o peso corporal

Como demonstrado na Tabela 2, os valores semelhantes do peso inicial entre os grupos mostram uma homogeneidade entre os animais e demonstram que os camundongos foram distribuídos aleatoriamente de modo adequado no início do experimento.

As curvas de evolução do peso corpóreo são apresentadas na Figura 8. A análise do crescimento corporal mostrou que os animais do grupo T apresentaram menor ganho de peso corporal comparado aos outros 3 grupos estudados: C, CS e TS, que não diferiram entre si. A Tabela 2 mostra que o peso final e a porcentagem de ganho de peso dos animais do grupo T foram menores quando comparados aos valores dos animais dos grupos C, CS e TS.

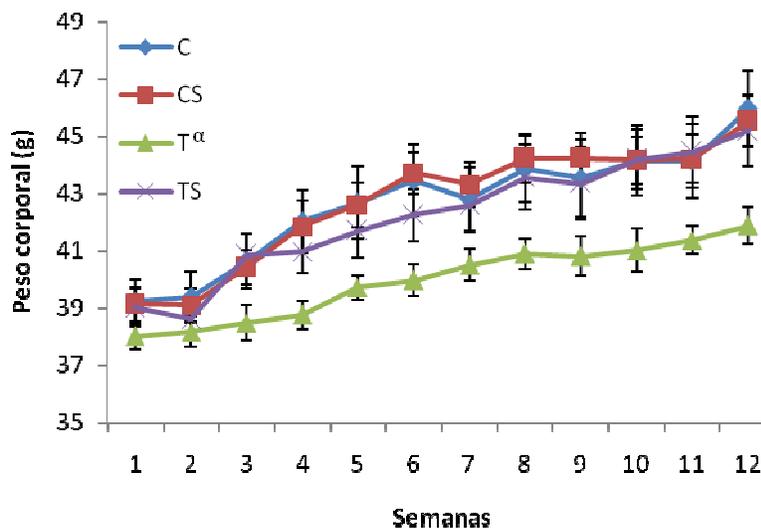


Figura 8: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no peso corporal (g) dos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM em cada semana de experimento (n = 15 animais). ^α p<0,05 comparado ao C, CS e TS.

Tabela 2: *Peso inicial e final, porcentagem de ganho de peso, porcentagem de gordura e consumo diário de ração e de água ao longo das 12 semanas de experimento.*

Grupos	C	CS	T	TS
Peso inicial (g)	39,21±0,79	39,12±0,60	38,01±0,48	39,0±0,67
Peso final (g)	45,96±1,28	45,49±0,89	41,85±0,65 ^α	45,17±1,25
Ganho de peso (%)	17,21	16,28	10,10 ^α	15,82
Gordura (%)	4,96±0,29	5,16±0,24	2,29±0,25 ^{*#}	2,65±0,19 ^{*#}
Consumo ração (g/dia)	5,99±0,12	5,47±0,12 [*]	6,87±0,15 ^{*#}	6,94±0,12 ^{*#}
Consumo hídrico (ml/dia)	9,65±0,14	10,30±0,31	11,30±0,22 ^{*#}	12,38±0,35 ^α

Os valores são média±EPM. * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e ^α p<0,05 comparado com C, CS e TS.

4.4 - Efeito da suplementação com leucina e do treinamento aeróbio sobre a gordura

Os grupos suplementados com LEU não apresentaram alteração no percentual de gordura em relação aos seus respectivos grupos controles. Como esperado, o efeito do treinamento físico sobre o peso corporal foi refletido na porcentagem relativa de massa gorda. Portanto, os grupos treinados, T e TS, apresentaram uma redução acentuada na porcentagem de gordura corporal de 54% e 47% em comparação ao grupo C e de 56% e 49% quando comparado ao grupo CS, respectivamente. (Figura 9a e Tabela 2). Os mesmos resultados relatados para a porcentagem de gordura (valor relativo da gordura peritoneal em relação ao peso corporal) foram encontrados para o peso absoluto da gordura peritoneal (Figura 9b).

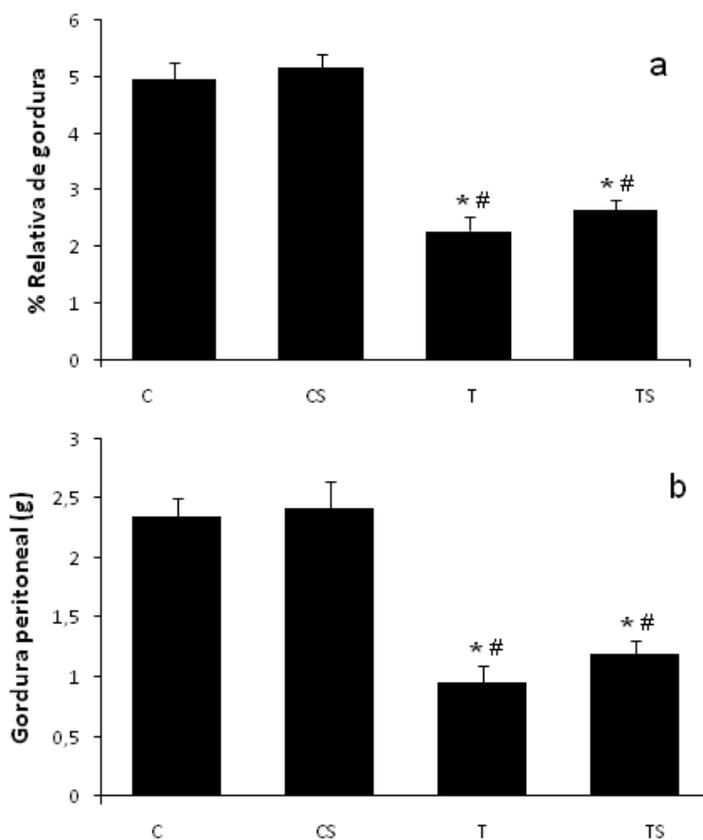


Figura 9: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina na massa de gordura peritoneal (expresso em porcentagem relativa ao peso corporal total - Figura 9a) e peso absoluto (g) da gordura peritoneal (Figura 9b). Os valores são média±EPM (n = 15 animais). * p<0,001 comparado ao C e # p<0,001 comparado ao CS.

4.5 - Efeito da suplementação com leucina e treinamento aeróbio sobre variáveis bioquímicas

4.5.1 – Concentração de glicogênio muscular, hepático e cardíaco

A análise de glicogênio mostrou aumento significativo no conteúdo de glicogênio muscular no grupo T ($1,62 \pm 0,14$ mg/100mg de tecido – 50,00%) e TS ($1,69 \pm 0,10$ mg/100mg de tecido – 56,48%) em relação ao C ($1,08 \pm 0,04$ mg/100mg de tecido), um efeito não dependente da suplementação de leucina, demonstrado pela ausência de diferença entre T e TS. No entanto, no

músculo esquelético dos camundongos do grupo CS ($1,78 \pm 0,11$ mg/100mg de tecido), o conteúdo de glicogênio estava 64,81% aumentado em relação ao grupo C (Figura 10a).

No fígado, o treinamento aeróbio também aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio no grupo T ($7,03 \pm 1,49$ mg/100mg de tecido – 3,88 vezes) e TS ($9,13 \pm 0,88$ mg/100mg de tecido – 5 vezes) em comparação ao grupo C ($1,81 \pm 0,10$ mg/100mg de tecido). Contudo, este efeito também não foi dependente de LEU (Figura 10b). Em contraste ao grupo TS, e semelhante aos resultados do músculo esquelético, a LEU aumentou o conteúdo de glicogênio no grupo CS ($7,62 \pm 0,51$ mg/100mg de tecido – 4,2 vezes) quando comparado ao grupo C (Figura 10b).

A análise da concentração de glicogênio no músculo cardíaco não revelou diferenças entre os grupos estudados (Figura 10c).

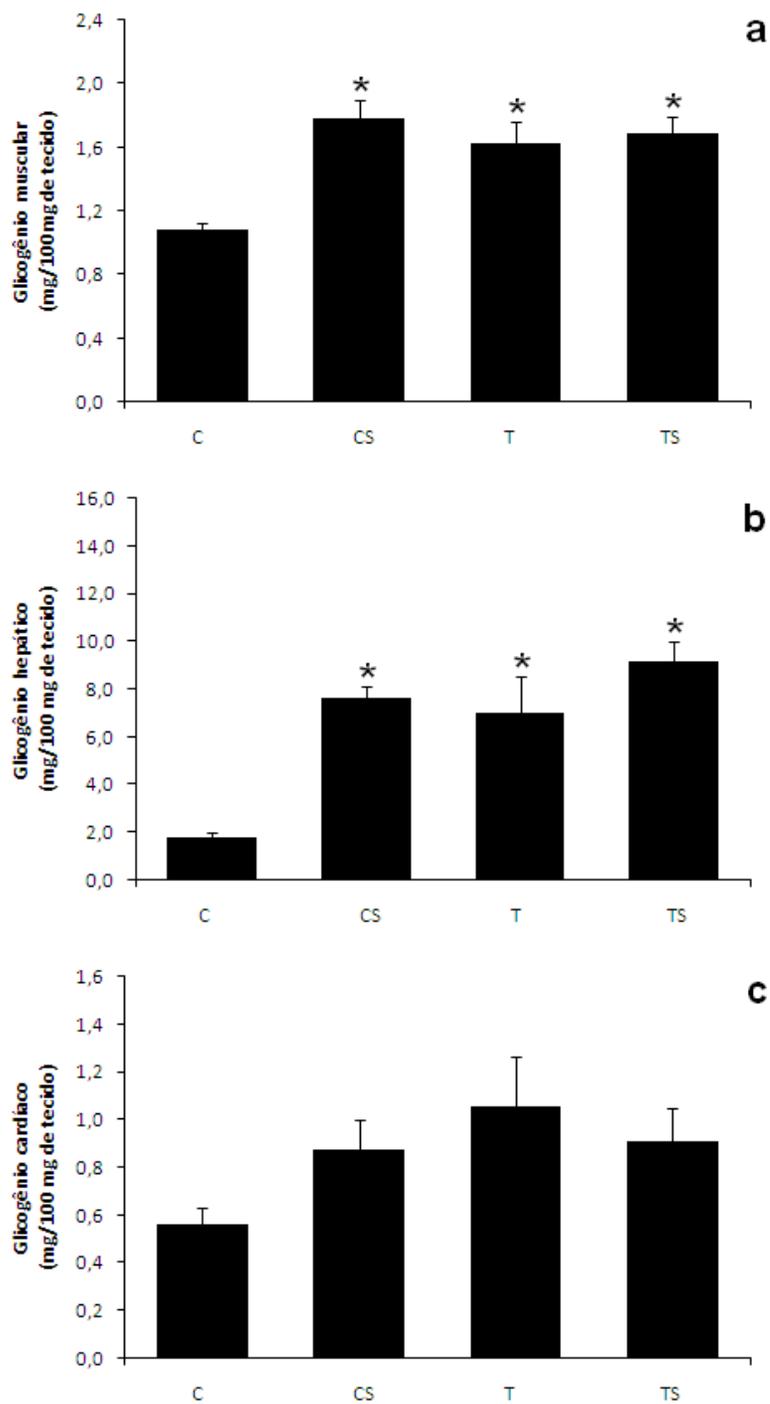


Figura 10a, 10b e 10c: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no conteúdo de glicogênio muscular (10a), hepático (10b) e cardíaco (10c) (mg/100mg de tecido) nos grupos controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 10). * p<0,05 comparado ao C.

4.5.2 – Concentração plasmática de insulina

A concentração plasmática de insulina no estado alimentado foi significativamente aumentada com a suplementação de leucina, em ambos os grupos: CS ($4,11 \pm 0,30$ ng/ml – 2,23 e 1,65 vezes) e TS ($3,61 \pm 0,51$ ng/ml – 1,96 e 1,45 vezes) em relação aos grupos C ($1,84 \pm 0,49$ ng/ml) e T ($2,48 \pm 0,14$ ng/ml), respectivamente (Figura 11).

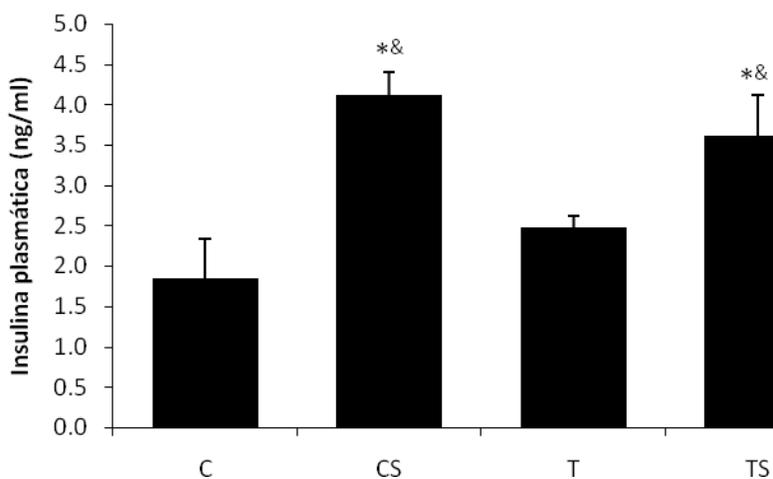


Figura 11: Efeito de 12 semanas de treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina no teor de insulina plasmática (ng/ml) no estado alimentado. Os valores são média±EPM (n = 8 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C; & p<0,05 comparado ao grupo T.

4.5.3 - Concentração plasmática de leucina

Após 12 semanas de suplementação com LEU o teor de LEU plasmática aumentou em ambos os grupos suplementados: CS ($592,38 \pm 10$ nmol/ml - 25,43% e 25,78%) e TS ($496,79 \pm 12$ - 5,2% e 5,49% nmol/ml) quando comparados ao grupo C ($472,28 \pm 8$ nmol/ml) e T ($470,93 \pm 5$ nmol/ml), respectivamente. Em adição, o grupo CS apresentou maior concentração de LEU em relação ao grupo TS (19,24%) (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração plasmática de leucina.

Grupos	C	CS	T	TS
[Leucina] plasmática (nmol/ml)	472,28±4,62	592,38±5,77 ^a	470,93±2,89	496,79±6,00* ^{&}
[Relativa] (%)	100	125,43 ^a	99,7	105,2*

Os valores são média±EPM (n = 3 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C; [&] p<0,05 comparado ao grupo T, ^a p<0,05 comparado ao C, T e TS. A concentração relativa ([Relativa]) é em relação ao grupo C.

4.5.4 – Atividade da citrato sintase

O treinamento aeróbico aumentou acentuadamente a atividade da Cis no músculo esquelético dos camundongos dos grupos T (4,43±0,09 μ moles/min/ μ g prot – 100% e 41,93%) e TS (5,9±0,15 μ moles/min/ μ g prot – 168% e 90,32%) quando comparado ao grupo C (2,2±0,15 μ moles/min/ μ g prot) e CS (3,1±0,32 μ moles/min/ μ g prot), respectivamente (p<0,05). Curiosamente, a suplementação com LEU aumentou a atividade da Cis no grupo TS (34,09%) em comparação ao T (Figura 12).

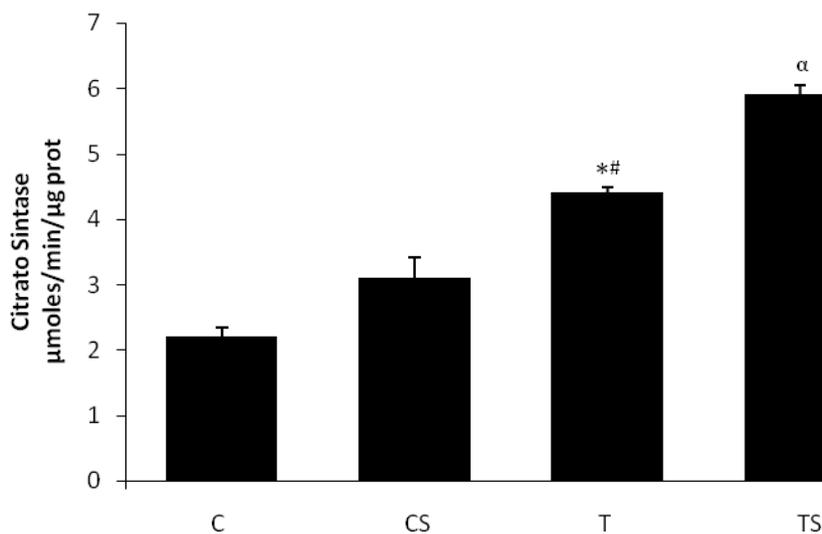


Figura 12: Efeito do treinamento aeróbico de natação e suplementação com leucina na atividade da citrato sintase (μ moles/min/ μ g prot) em músculo sóleo de camundongos C, CS, T e TS. Os valores são médias±EPM (n = 5 animais). * p<0,05 comparado ao C, # p<0,05 comparado ao CS e ^α p<0,05 comparado ao C, CS e T.

4.6 - Sensibilidade à insulina em animais suplementados com leucina

Para verificar se o aumento dos valores de insulina circulante estava relacionado à alteração na sensibilidade à insulina periférica, foi realizado o *ipITT*. Não se observou nenhuma diferença na sensibilidade à insulina periférica entre os grupos C ($3,9 \pm 0,54\%/min$) e CS ($4,7 \pm 0,03\%/min$) baseado na constante de decaimento da glicose (*kITT*) (Tabela 4). No entanto, a sensibilidade à insulina estava aumentada 1,95 e 1,62 vezes no grupo T ($7,6 \pm 0,57\%/min$) e 3,33 e 2,76 vezes no TS ($13,0 \pm 0,06\%/min$) em comparação aos grupos C e CS, respectivamente. O grupo TS apresentou ainda aumento de 1,7 vezes quando comparado ao grupo T.

Tabela 4: Valores da constante de decaimento de glicose (*kITT*) do *ipITT*.

Grupos	C	CS	T	TS
<i>kITT</i> (%/min)	$3,9 \pm 0,54$	$4,7 \pm 0,03$	$7,6 \pm 0,57^{* \#}$	$13,0 \pm 0,06^a$

Os valores são média±EPM (n = 10 animais). * p<0.05 comparado ao C, # p<0.05 comparado ao CS e ^a p<0,05 comparado ao C, CS e T.

4.7 - Conteúdo total e fosforilação das proteínas IR, IRS-1, mTOR e p70^{S6k} em músculo esquelético

A análise dos resultados de conteúdo total em músculo esquelético mostrou aumento do IR no grupo TS de $117,20\% \pm 16$; $88,15\% \pm 13,17$ e $63,49\% \pm 6,67$ quando este foi comparado aos grupos C, CS e T, respectivamente. O grupo T ($53,71\% \pm 7,3$) também apresentou elevação do conteúdo total em relação ao grupo C (Figura 13a). Esses dados fornecem indícios de que o aumento do conteúdo do IR pode estar relacionado ao efeito do treinamento aeróbio. Além disso, como houve diferença entre T e TS, infere-se que a leucina, quando associada ao treinamento aumenta o conteúdo do IR.

A suplementação com leucina, assim como o treinamento aeróbio, não teve efeito sobre o conteúdo do IRS-1 (Figura 13a).

O conteúdo total da mTOR estava elevado nos grupos suplementados CS ($200\% \pm 3$ e $96\% \pm 2$) e TS ($55\% \pm 3,6$ e $51\% \pm 5$) em comparação ao grupo C e T, respectivamente (Figura 13a). O grupo CS (145%) apresentou ainda elevado conteúdo da mTOR quando comparado ao TS.

Quanto à $p70^{S6k}$, o grupo T apresentou conteúdo total diminuído quando comparado ao grupo C ($53,77\% \pm 8,93$), CS ($81,31\% \pm 1$) e TS ($54,73\% \pm 7,69$) (Figura 13a).

Para determinar se as alterações no conteúdo das proteínas estavam associadas com o aumento da atividade, foi determinado o nível de fosforilação do IR e IRS-1 estimulado por insulina e da $p70^{S6k}$.

Semelhante aos resultados para conteúdo total, a fosforilação do IR estava aumentada no grupo TS quando comparado ao grupo C ($246,94\% \pm 30$), CS ($237,23\% \pm 18$) e T ($173,6\% \pm 19,81$). O exercício aeróbio aumentou a fosforilação do IR no grupo T em comparação ao grupo C ($73,34\% \pm 15,79$) e CS ($63,63\% \pm 11,56$) (Figura 13b).

Verificou-se que a fosforilação do IRS-1 estava aumentada nos grupos treinados T ($152,42\% \pm 11$ e $82,67\% \pm 9$) e TS ($197,63\% \pm 13$ e $127,88\% \pm 7$) em relação aos grupos C e CS, respectivamente (Figura 13b). Semelhante ao IR, os dados do IRS-1 indicam efeito positivo do exercício sobre a proteína. A LEU aumentou a fosforilação do IRS-1 no grupo CS ($69,75\%$). Na associação dos tratamentos (LEU e treinamento aeróbio), a LEU não exerceu efeito sobre a fosforilação do IRS-1, pois não houve diferença entre T e TS.

O tratamento com LEU aumentou a fosforilação da $p70^{S6k}$ em ambos os grupos suplementados: CS ($84\% \pm 8$ e $83\% \pm 3,6$) e TS ($43\% \pm 4$ e $42\% \pm 6$) em relação ao C e T, respectivamente (Figura 13b). O grupo CS apresentou ainda fosforilação aumentada em relação

ao grupo TS (41%). Esses dados sugerem uma possível modulação positiva da LEU sobre a via da mTOR/p70^{s6k}. O exercício não exerceu efeito sobre a atividade da p70^{s6k}. No entanto, a associação dos tratamentos mostrou que o aumento da fosforilação da p70^{s6k}, verificada no grupo TS (42%) e CS (83%) comparado ao T, foi menor no TS.

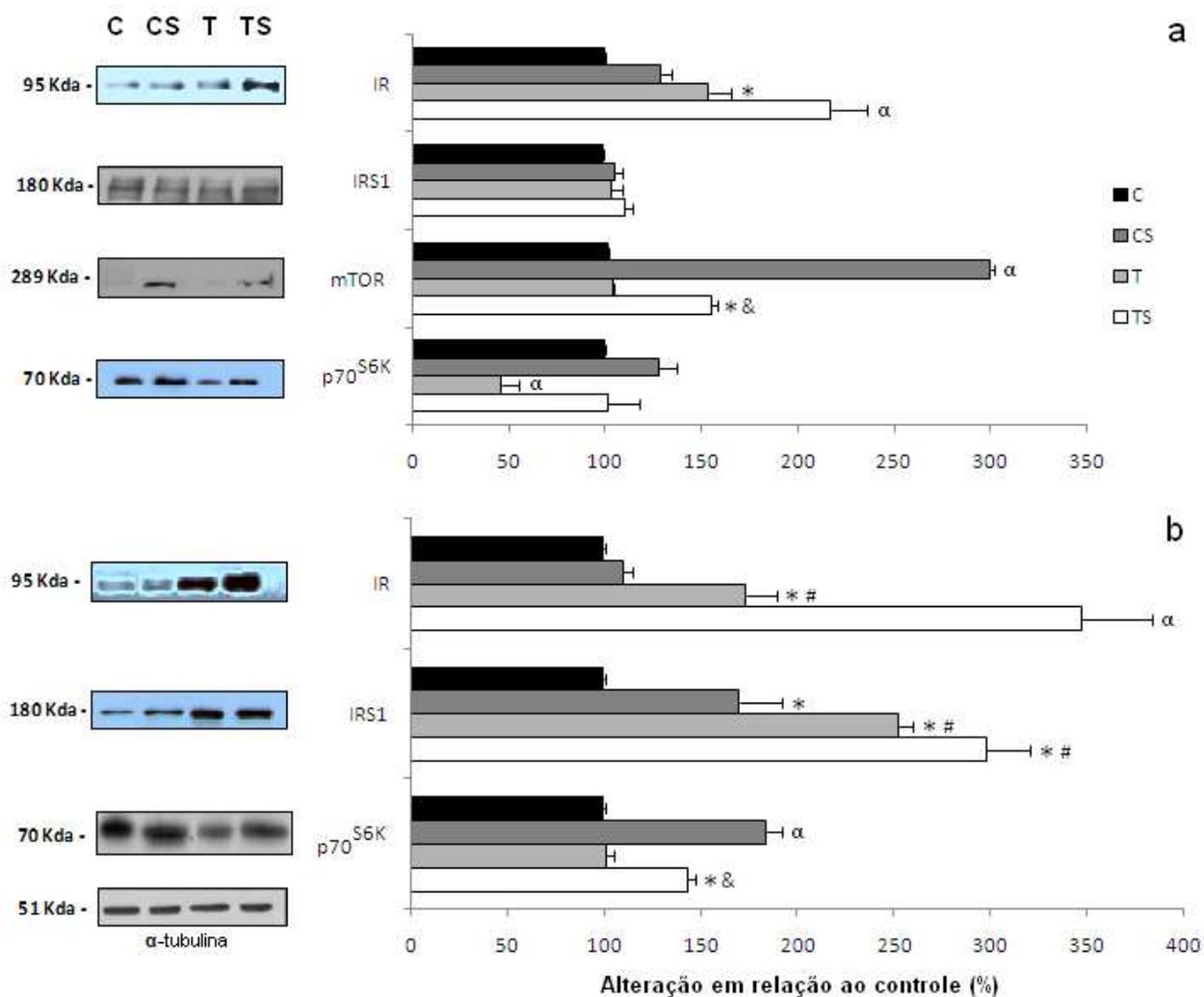


Figura 13a e 13b: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina sobre o conteúdo de proteína do IR, IRS-1, p70^{S6K} e mTOR (13a) e fosforilação do IR, IRS1 e p70^{S6K} (13b) (porcentagem) em músculo esquelético de camundongos. As abreviações são: grupo controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C. # p<0,05 comparado ao grupo CS, & p<0,05 comparado ao grupo T e ^α p<0,05 comparado aos demais grupos.

4.8 - Conteúdo de mRNA em músculo esquelético de camundongos treinados e suplementados com leucina

Para verificar se as alterações observadas no teor de proteína foram acompanhadas por alterações no teor de RNA mensageiro (mRNA), foi realizada a análise por PCR semiquantitativo em músculo esquelético e fígado.

Ao analisar os resultados de músculo esquelético do IR, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos C, CS e T. No entanto, verificou-se que o conteúdo de mRNA do IR estava reduzido no grupo TS em relação ao grupo C ($52,91\% \pm 8,31$), CS ($64,79\% \pm 3,01$) e T ($55,35\% \pm 4,28$) (Figura 14).

A expressão gênica do IRS-1 não foi alterada após o treinamento ou suplementação com LEU (Figura 14).

O treinamento aeróbio aumentou o teor de mRNA da mTOR no grupo T ($127,02\% \pm 16,6$) e TS ($120,37\% \pm 9,81$) em relação ao C. No entanto, a suplementação com LEU não teve efeito sobre TS. Em contraste aos grupos treinados, a suplementação aumentou significativamente a expressão gênica da mTOR no grupo CS em comparação aos 3 grupos estudados: C ($222,65\% \pm 23,57$), T ($95,63\% \pm 6,97$) e TS ($102,28\% \pm 13,76$) (Figura 14).

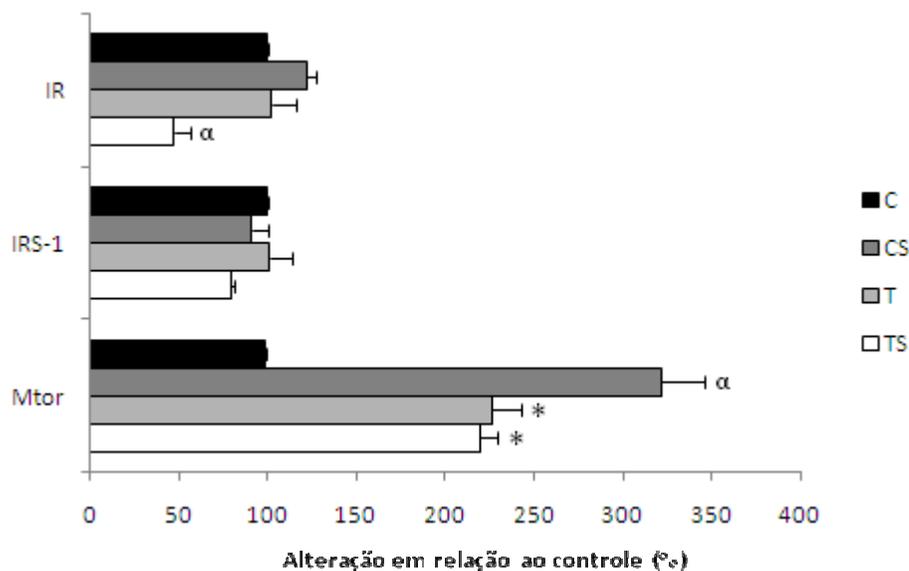


Figura 14: RT-PCR semiquantitativo de músculo esquelético de camundongos para o IR, IRS-1 e mTOR após o treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina nos seguintes grupos: controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C e ^α p<0,05 comparado aos demais grupos.

4.9 - Conteúdo total e fosforilação das proteínas IR, IRS-1, mTOR e p70^{s6k} em fígado

A análise dos dados de conteúdo total de proteína em fígado mostrou que o treinamento diminuiu o conteúdo total do IR nos grupos T (-61,98%±0,63 e -106,28%±5,01) e TS (-61,78%±1,49 e -106,08%±4,15) quando comparado aos grupos C e CS, respectivamente. A suplementação com LEU aumentou o conteúdo do IR no grupo CS em 44,3%±5,64 em relação ao C, e em 106,28%±5,01 e 106,08%±4,15 em relação do T e TS, respectivamente. Essa elevação do conteúdo total da proteína foi omitida quando a suplementação foi associada ao exercício, demonstrada pelos valores significativamente menores no TS (-106,08%±4,15) quando comparado ao CS (Figura 15a).

Semelhante ao relatado para o IR, quando a suplementação foi administrada no grupo sem exercício houve aumento significativo do conteúdo total do IRS-1 no grupo CS em

143,58%±11,92, 174,01%±3,63 e 92,35%±7,01 comparado aos outros 3 grupos: C, T e TS, respectivamente. Quando a suplementação foi associada ao exercício houve aumento de 51%±4,94 em relação ao grupo C e de 81,46±3,38 em relação ao grupo T (Figura 15a).

A suplementação com LEU aumentou o conteúdo total da mTOR no grupo CS (54,91%±8 e 85,48%±6) e TS (91,82%±9 e 122,39%±10) comparado aos grupos C e T, respectivamente (Figura 15a).

A p70^{s6k} apresentou conteúdo total diminuído no grupo T em relação aos 3 grupos estudados: C (61,7%±1), CS (54,8%±7) e TS (68,3%±13). Quando a suplementação foi associada ao treinamento (TS) o conteúdo total da p70^{s6k} não diferiu do C (6%±1) e CS (13%±1), mas estava mais elevado do que o encontrado no grupo T (68%±18) (Figura 15a).

Para determinar se as alterações no conteúdo das proteínas estavam associadas às mudanças na atividade da proteína, foi determinado o nível de fosforilação do IR e IRS-1 estimulado por insulina e da p70^{s6k}.

A suplementação com LEU e o treinamento, isoladamente ou associados, elevaram a fosforilação do IR no fígado dos animais dos 3 grupos: CS (424,94%±66), T (342,84%±6) e TS (1109,50%±35) quando comparado ao C (0,0%±0,57). Quando os tratamentos foram associados (grupo TS) a fosforilação do IR se mostrou também elevada em relação ao grupo CS (684,56%±31) e T (766,67%±29) (Figura 15b).

No entanto, houve diminuição da fosforilação de IRS-1, tanto no grupo CS (29%±6) como no grupo TS (44,01%±8) quando esta foi comparada ao grupo C (0,0%±0,57), sugerindo um efeito contra-regulatório aos valores aumentados de conteúdo total do IRS-1. A fosforilação do IRS-1 nos animais do grupo T também estava diminuída em relação ao C (61,56%±0,28) e CS (32,62%±5) (Figura 15b).

A suplementação com LEU elevou a fosforilação da p70^{s6k} no fígado, tanto dos animais controle (CS=193,79%±60) como dos animais treinados (TS=95,92%±15) quando comparados ao grupo C (0,0%±0,57). A LEU também aumentou em 192,9%±60 e 97,87%±15 a fosforilação da p70^{s6k} no grupo CS em relação ao grupo T e TS, respectivamente. O treinamento isoladamente não exerceu efeito sobre esta variável, pois a fosforilação da p70^{s6k} do grupo T foi semelhante a do grupo C. Entretanto, a associação dos tratamentos (grupo TS) aumentou a fosforilação da p70^{s6k} quando comparado ao grupo T (95,03%±15) (figura 15b).

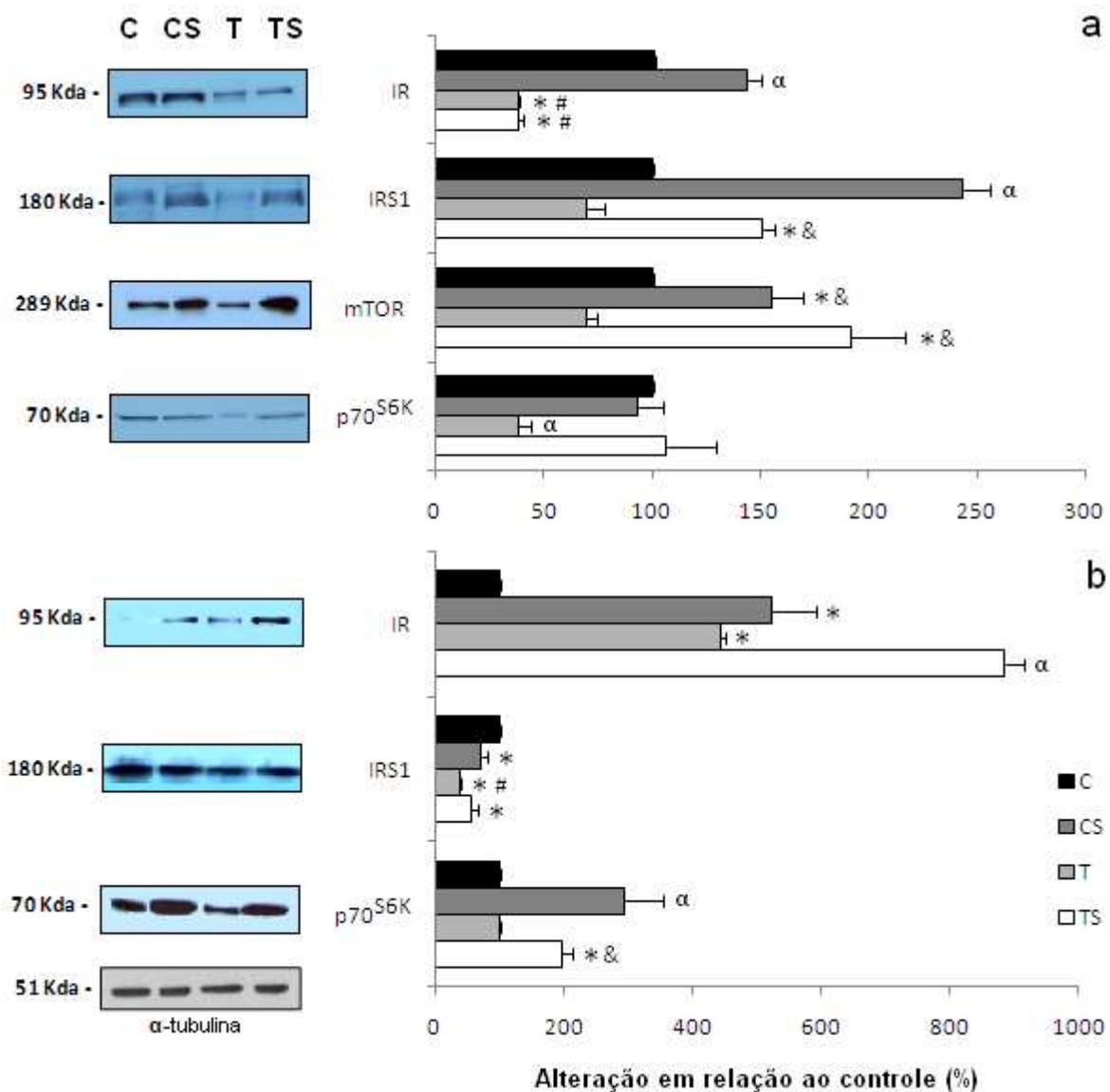


Figura 15a e 15b: Efeito do treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina sobre o conteúdo de proteína do IR, IRS1, p70^{S6K} e mTOR (15a) e fosforilação do IR, IRS1 e p70^{S6K} (15b) (porcentagem) em fígado de camundongos. As abreviações são: grupo controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média±EPM (n = 4 animais). * p<0,05 comparado ao grupo C. # p<0,05 comparado ao grupo CS, & p<0,05 comparado ao grupo T, ^α p<0,05 comparado aos demais grupos.

4.10 - Conteúdo de mRNA em fígado de camundongos treinados e suplementados com leucina

A análise dos dados de PCR semiquantitativo demonstrou que o treinamento aeróbio e a suplementação com LEU não alteraram os níveis de mRNA das proteínas IR e IRS1 no fígado dos camundongos (Figura 16a e 16b).

Ao analisar o efeito do treinamento isoladamente, verificou-se diminuição na expressão gênica da mTOR no grupo T em $55,96\% \pm 6,43$, $50,22\% \pm 3,37$ e $97,24\% \pm 9,51$ quando comparado ao grupo C, CS e TS respectivamente. Quando o exercício foi associado à suplementação com LEU (grupo TS), a expressão gênica da mTOR no fígado estava aumentada $97,24\% \pm 9,51$ em relação ao grupo T, $41,53\% \pm 5,94$ em relação ao C e $47,02\% \pm 6,14$ em relação ao CS (Figura 16c).

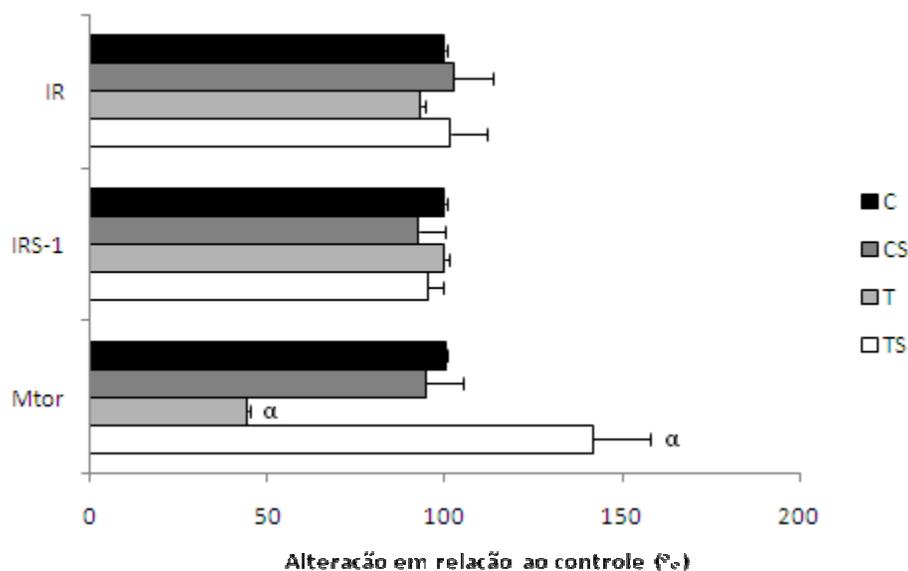


Figura 16a, 16b e 16c: RT-PCR semiquantitativo de fígado de camundongos para o IR (16a), IRS1 (16b) e mTOR (16c) após o treinamento aeróbio de natação e suplementação com leucina nos seguintes grupos: controle (C), controle suplementado com leucina (CS), treinado (T) e treinado suplementado com leucina (TS). Os valores são média \pm EPM (n = 4 animais). ^α p<0,05 comparado aos demais grupos.

5 - DISCUSSÃO

A ambiguidade de dados na literatura sobre a relação exercício aeróbio e via de síntese protéica e o papel da suplementação com LEU associada ao exercício aeróbio na sinalização desta via foi o elemento motivador para o desenvolvimento deste trabalho. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a modulação do treinamento aeróbio e da suplementação com LEU sobre proteínas sinalizadoras da via de sensibilidade à insulina e síntese protéica em músculo esquelético e fígado de camundongos adultos.

5.1 – Caracterização dos tratamentos

A caracterização de cada tratamento foi importante para diferenciar o papel da LEU e do treinamento aeróbio utilizado no presente estudo. Para isso, foi avaliado o consumo hídrico e alimentar; o peso corporal; a massa gorda; o conteúdo de glicogênio muscular; hepático e cardíaco; a atividade da citrato sintase; a concentração plasmática de LEU e insulina e a sensibilidade à insulina.

Os dados relacionados somente ao tratamento com LEU mostraram que a suplementação não teve efeito sobre a ingestão hídrica dos animais, no entanto, diminuiu o consumo de ração dos camundongos suplementados não treinados e estão em acordo com dados da literatura. Há relato da relação inversa entre suplementação com LEU e consumo de ração (Rieu et al., 2007), demonstrando que os animais que receberam maior quantidade de LEU apresentaram diminuição da ingestão de ração. Esse fato levou à manutenção do peso corporal e da massa gorda desses animais. Nesse mesmo contexto, foi demonstrado que a suplementação crônica com LEU na água com concentração de 1,5% (a mesma utilizada no presente estudo) durante 8 meses não alterou o

peso corporal e a massa gorda de camundongos (Guo et al., 2010), assim como 6 semanas de suplementação com BCAA para ratos (Araújo Jr. et al., 2006) e 14 semanas de suplementação com LEU para camundongos machos (Noatsch et al., 2010) não influenciaram o peso corporal final dos animais.

Além disso, os animais suplementados apresentaram maior conteúdo de glicogênio muscular e hepático. Foi demonstrado um aumento na atividade do complexo enzimático DC-BCAA do fígado em ratos cronicamente suplementados com BCAA, sugerindo que a suplementação aumenta o catabolismo desses aminoácidos, e pode aumentar as reservas de glicogênio hepático em repouso (Shimomura et al., 2000). Cabe ressaltar que a atividade da DC-BCAA é alta no fígado e, comparativamente, baixa no músculo, e que o KIC, produto resultante do catabolismo da leucina, é um dos responsáveis pela ativação da DC-BCAA (Paxton e Harris; 1984; Shimomura et al., 2004).

Estudos mostraram que uma dieta rica em proteínas (Shimomura et al., 2004) ou BCAA (Shimomura et al., 2000) elevou a concentração plasmática de BCAA em ratos, com consequente aumento da atividade da DC-BCAA hepática, o que levaria ao aumento do catabolismo da leucina, poupando a utilização de glicose. O transportador de glicose do tipo 2 (GLUT-2), abundante no fígado, é ativado em presença de glicose e promove aumento de sua captação (Leturque et al., 2009). Kruszynska et al. (1986) verificaram que o aumento da concentração de glicose no sangue estava relacionado ao aumento da atividade da glicogênio sintase do fígado. Estes relatos apoiam os resultados de conteúdo elevado de glicogênio hepático nos animais suplementados.

Os animais do presente estudo ingeriram leucina, um BCAA, e apresentaram concentração aumentada desse aminoácido no sangue. Isto indica uma maior disponibilidade de

leucina, que poderia ser catabolizada poupando a glicose, a qual seria utilizada para síntese de glicogênio hepático nos animais suplementados com leucina. Apoiando este contexto, animais suplementados com BCAA durante 6 semanas apresentaram aumento de glicogênio hepático (Araújo Jr. et al., 2006).

Os animais suplementados apresentaram também aumento da concentração plasmática de insulina. Em músculo esquelético foi demonstrado que concentrações elevadas de insulina levam ao aumento da captação de glicose (Jensen e Lay, 2009; Ivy e Kuo, 1998) e da atividade da glicogênio sintase, sendo esta fator determinante da taxa de síntese de glicogênio quando a fonte de substrato é adequada (Jensen e Lay, 2009). A disponibilidade de glicose e insulina parecem determinar a captação de glicose no músculo esquelético. A insulina estimula a utilização da glicose pelas células musculares através da ativação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4), a qual pode ser utilizada para produção de energia ou nos processos anabólicos (Taton et al., 2010). Kruszynska et al. (1986) verificaram que o aumento da concentração de insulina plasmática parece mais importante para ativação da glicogênio sintase em músculo esquelético quando comparada ao fígado.

No presente estudo, os animais que apresentaram aumento da insulina no plasma (grupos suplementados com leucina) apresentaram também aumento de glicogênio muscular. Além do aumento da concentração plasmática de insulina, os animais submetidos exclusivamente à suplementação com LEU apresentaram aumento da fosforilação do IRS-1 estimulada por insulina, o qual desempenha importante papel no músculo esquelético para desencadear os sinais gerados pela insulina (Sesti et al., 2001). A ligação da insulina ao IR promove a ativação dos IRSs e desencadeia uma cascata de reações que utilizam a interação de proteínas como mecanismo para transmitir sinais específicos do receptor em direção ao efeito celular final, como

translocação para a membrana plasmática de vesículas contendo GLUT-4 e ativação da síntese de glicogênio (Carvalho et al., 2002). No entanto, a LEU não alterou o conteúdo total e a fosforilação do IR no músculo esquelético dos animais suplementados e não treinados. Esse fato pode ser explicado por duas hipóteses: 1) O aumento da concentração plasmática de LEU pode ter induzido o uso desta como substrato no músculo esquelético. A atividade da AT-BCAA é alta no músculo e em presença de concentração elevada de leucina, poderia aumentar o catabolismo desse aminoácido, e sua presença dentro da célula modularia diretamente o IRS-1; e, 2) O aumento da concentração do hormônio insulina pode ter exercido um efeito contra-regulatório no IR para permitir a homeostase da glicose. Reforçando essa hipótese, os animais suplementados não apresentaram aumento da sensibilidade a insulina.

Em fígado, o conteúdo total e a fosforilação do IR estimulada por insulina estavam aumentados e, apesar da fosforilação do IRS-1 estar diminuída, o conteúdo total estava significativamente elevado. Um aumento da fosforilação do IRS-2 poderia compensar a diminuição encontrada no IRS-1, uma vez que o IRS-2 regula a função hepática e parece mais importante no metabolismo do fígado do que o IRS-1 (Sesti et al., 2001). A ativação do IRS-2 poderia contribuir com a elevação do conteúdo de glicogênio no fígado dos animais suplementados.

O programa de exercício aeróbio isoladamente promoveu aumento da ingestão hídrica e alimentar, em acordo com a literatura (Mota et al., 2008). Os camundongos treinados também apresentaram menor ganho de peso corporal, semelhante a estudos nos quais o treinamento de natação (Cunha et al., 2005; Mota et al., 2008) e o treinamento de corrida (Chiasera et al., 2000) induziram menor ganho de peso em animais. O menor anabolismo induzido pelo exercício pode ter elevado a taxa de proteólise para fornecimento de energia usada para contração muscular

durante o exercício, e esse fato pode estar relacionado ao menor ganho de peso apresentado pelos animais do grupo treinado.

Outro parâmetro diminuído nos grupos treinados foi a massa gorda. Sugere-se que o treinamento aeróbio induziu aumento na taxa de oxidação de ácidos graxos (Bies et al., 2010; Lange et al., 2007), poupando a utilização de glicogênio (Freysenet, 2007). Esses fatos podem estar relacionados ao menor ganho de peso corporal, à diminuição da massa gorda e ao aumento do conteúdo de glicogênio muscular e hepático encontrado nos animais treinados.

Os resultados de glicogênio aumentado no músculo esquelético e fígado dos camundongos treinados são apoiados pela literatura (Borges-Silva et al., 2007; Nakatani et al., 1997). O aumento do glicogênio muscular pode estar relacionado ao efeito do treinamento físico diretamente sobre o GLUT-4. De fato, o treinamento aeróbio promove elevação do conteúdo, da atividade e da translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (Ploug et al., 1998; Holloszy, 2008; Frosig e Hitcher, 2009; Gomes et al., 2009), o que proporciona maior captação de glicose, a qual pode ser utilizada para síntese de glicogênio.

A ressíntese de glicogênio após a prática de exercício físico ocorre em duas fases. A primeira fase é rápida, não dependente de insulina e ocorre durante os primeiros 45-60 min da fase de recuperação do exercício. A segunda fase é mais lenta, dependente de insulina e continua ocorrendo até o restabelecimento total das reservas de glicogênio, a qual ocorre geralmente, 24 h após o término do exercício (Price et al., 2000). Os tecidos para análise do conteúdo de glicogênio foram coletados após 24 h da última sessão de exercício, sugerindo que os dados de glicogênio se referem à maior concentração esperada para cada grupo aqui estudado.

Os animais treinados apresentaram também maior sensibilidade à insulina e aumento da fosforilação do IR e IRS-1 estimulada por insulina em músculo esquelético. Estudos relatam

aumento da atividade dessas proteínas em músculo esquelético de animais exercitados (Chibalin et al., 2000; Zierath, 2002), o que sugere adaptação da via da insulina. O aumento da atividade da via da insulina induz translocação para a membrana plasmática de vesículas contendo GLUT-4, o que promove maior captação de glicose, a qual pode ser utilizada para produção de energia ou em processos anabólicos (Taton et al., 2010). Nesse contexto há também ativação da enzima glicogênio sintase (Holloszi, 2008; Carvalheira et al., 2002), resultando em aumento do conteúdo de glicogênio no músculo esquelético, fato observado neste estudo.

Os dados de fígado mostram uma elevação na fosforilação do IR estimulada por insulina, o que sugere maior possibilidade de ação da insulina, com posterior diminuição da atividade do IRS-1. Como relatado para o grupo CS, as alterações relacionadas ao início da via da insulina em fígado estão mais relacionadas ao IRS-2 que ao IRS-1 (Sesti et al., 2001), e a ativação do IRS-2 poderia contribuir com a elevação do conteúdo de glicogênio encontrada no fígado dos animais treinados. No entanto, o IRS-2 não foi investigado no presente estudo.

A associação dos tratamentos, suplementação com LEU e treinamento aeróbio, induziu aumento do consumo hídrico, acima do encontrado nos outros três grupos, e manutenção do peso corporal. Além disso, a ingestão alimentar foi maior e a massa gorda menor que a dos grupos não treinados, e, ambos os parâmetros, não diferiram do grupo treinado. Em canoístas treinados e suplementados com placebo e treinados e suplementados com LEU durante 6 semanas não foi encontrada nenhuma diferença na porcentagem de massa gorda (Crowe et al., 2006), o que apóia os resultados encontrados pelo presente estudo.

O peso corporal do grupo TS estava aumentado em relação ao grupo T. Atribui-se à leucina, que foi administrada na água para beber, o maior ganho de peso corporal dos animais do grupo TS. Esse fato pode estar relacionado a dois fatores: 1) Aumento da massa gorda em outros

compartimentos não investigados no presente estudo; e 2) Aumento da massa isenta de gordura, como por exemplo, aumento do teor de proteínas funcionais e estruturais no músculo esquelético. Relatos demonstram que a ingestão de proteínas ou BCAA é necessária para aumentar a disponibilidade de leucina, a qual é fundamental para ativar a via de síntese protéica (Anthony et al., 1999; Mero, 1999; Shimomura et al., 2004; Norton e Layman, 2006; Kimbal e Jefferson, 2006b). Como o peso corporal dos animais do grupo suplementado e do grupo controle não foi diferente, sugere-se que o efeito da LEU sobre via de síntese protéica pode levar ao aumento da massa magra somente quando a suplementação é associada ao exercício físico. De fato, foi relatado que 8 semanas de suplementação de LEU e proteínas do soro do leite aumentou a massa livre de gordura de 30 pessoas ativas (Walker et al., 2010) e que a administração de beta-hidroxi-beta-metilbutirato (HMB), um metabólito da leucina, durante 7 semanas associada a um programa de treinamento de força diminuiu a proteólise induzida pelo exercício e aumentou a massa livre de gordura (Nissen et al., 1996).

Os animais treinados e suplementados apresentaram aumento do conteúdo de glicogênio muscular e hepático, porém, diferente do que ocorre no grupo controle, a LEU não influenciou a taxa de aumento do glicogênio em ambos os tecidos desse grupo. Desta forma, a elevação nos estoques do glicogênio muscular e hepático pode ser atribuída aos mecanismos impostos pelo treinamento aeróbio discutidos anteriormente. Esses animais também apresentaram maior concentração plasmática de LEU em relação ao grupo treinado, porém a concentração desse aminoácido foi 19,24% menor que a encontrada no grupo sedentário e suplementado com leucina. Essa diferença entre os grupos pode estar relacionada ao aumento da utilização da LEU como substrato energético, como descrito adiante.

Além disso, os animais suplementados e treinados apresentaram aumento da concentração de insulina no plasma, em acordo com dados da literatura que mostram aumento da secreção de insulina em presença de leucina (Malaisse et al., 1981; Gao et al., 2003; Zawalich et al., 2004; MacDonald et al., 2005; Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010; de Oliveira et al., 2010; Amaral et al., 2010) e, diferente do encontrado nos animais suplementados e sedentários, a LEU induziu aumento expressivo do conteúdo total e da fosforilação do IR estimulada por insulina quando comparado aos outros três grupos do estudo. Em adição, neste mesmo grupo (TS) a leucina induziu aumento da fosforilação do IRS-1 estimulada por insulina em relação ao grupo C e CS e houve tendência a elevação em relação ao grupo T ($p = 0,09$). Estes resultados indicam maior ativação da via da insulina. Além disso, os animais apresentaram maior sensibilidade à insulina quando comparados aos outros três grupos, que vai ao encontro e compensa o aumento expressivo da atividade da via verificada neste grupo e poderia manter a homeostase de glicose.

No fígado dos animais treinados e suplementados, a LEU também aumentou a fosforilação do IR estimulada por insulina, mas não a fosforilação do IRS-1. Cabe ressaltar a relevância do IRS-2 abordada anteriormente na discussão dos resultados do grupo suplementado.

A eficiência do protocolo de treinamento aeróbio adotado no presente estudo foi verificada pelos resultados da atividade da Cis. É bem documentado na literatura que o exercício físico aeróbio aumenta a expressão do PGC1- α e a atividade da Cis no músculo esquelético, dois marcadores relacionados ao metabolismo mitocondrial deste tecido (Saltin e Gollnick, 1983; Booth e Baldwin, 1996; Hood, 2001). O aumento da atividade da Cis nos grupos treinados do presente estudo corroboram com os dados da literatura (Reynolds IV et al., 2004; Araújo Jr. et al., 2006; Akerstrom et al., 2009; Little et al., 2010), e indicam que o protocolo de exercício adotado

promoveu adaptações musculares compatíveis com o treinamento proposto e induziu aumento da atividade oxidativa nos animais treinados.

A LEU elevou a atividade da Cis no grupo TS acima dos valores encontrados nos 3 grupos estudados, mostrando que a leucina, quando administrada durante um programa de exercício aeróbio, promove maior adaptação dessa enzima, o que sugere uma maior eficiência do metabolismo oxidativo. De fato, foi demonstrado uma relação positiva entre o aumento da atividade total da Cis e da atividade total da DC-BCAA, responsável pela descarboxilação oxidativa dos BCAA, em decorrência da resposta adaptativa a um programa de treinamento aeróbio de 38 dias (McKenzie et al., 2000). Esse fato possibilitaria uma maior utilização de LEU quando a demanda energética estiver aumentada. Além disso, estudos mostram aumento de desempenho em exercício de resistência associados com suplementação de LEU (Crowe et al., 2006; Barbosa et al., 2010) e HMB (Vukovich e Dreifort, 2001). Isto sugere que a LEU pode exercer modulação sobre adaptações impostas pelo exercício aeróbio.

A concentração plasmática de LEU estava elevada no grupo TS, porém diminuída em relação ao grupo CS. O fato da LEU estar aumentada no plasma a torna disponível para ser utilizada como substrato. A menor concentração em relação ao grupo CS demonstra que a LEU pode ter sido usada pelo metabolismo mitocondrial como substrato anaplerótico no CK durante o exercício aeróbio. Foi demonstrado que o metabolismo de LEU pode fornecer KIC ao CK, sendo este metabolizado para acetil-coenzima A e acetoacetato (MacDonald et al., 2005). A LEU pode também ativar alostericamente a enzima glutamato desidrogenase (GDH) que converte glutamato a α -cetogluturato, um importante substrato anaplerótico para a segunda extensão do CK (Srere et al., 1963; MacDonald et al., 2005). Este é um mecanismo bem estabelecido da secreção de insulina em ilhotas pancreáticas que pode estar associado com a atividade elevada da Cis

(MacDonald et al., 2005). Recentemente, Ortenblad et al. (2005) relataram uma correlação positiva entre Cis e sensibilidade à insulina, indicando que a atividade da Cis pode ser regulada pela PKB, uma proteína que ativa a via da mTOR. No presente estudo, os animais que apresentaram atividade aumentada da Cis também eram mais sensíveis à insulina, sendo condizentes com os dados apresentados na literatura.

A LEU aumentou a concentração de insulina no plasma dos animais suplementados em estado alimentado. Corroborando esses dados, em ilhotas pancreáticas a LEU induziu a liberação de insulina (Malaisse et al., 1981; Gao et al., 2003; Zawalich et al., 2004; MacDonald et al., 2005; Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010; de Oliveira et al., 2010; Amaral et al., 2010), um processo associado à elevada produção de energia mitocondrial (MacDonald et al., 2005). Além disso, estudos anteriores sugeriram uma relação entre a ação da insulina e a capacidade oxidativa do músculo esquelético (Patti et al., 2003; Stump et al., 2003). Em humanos diabéticos tipo 2, a razão entre atividade enzimática oxidativa e glicolítica estava diminuída em células do músculo esquelético (Simoneau e Kelley, 1997). Stump et al. (2003) relataram que a infusão de insulina em humanos aumentou a capacidade mitocondrial de fosforilação oxidativa no músculo esquelético, efeito que foi acompanhado pela elevada síntese protéica mitocondrial. Esses dados permitem explicar a concentração aumentada de insulina e maior atividade da Cis encontradas no grupo TS, e relaciona a presença de insulina à atividade mitocondrial aumentada.

5.2 – Treinamento aeróbio, suplementação com leucina e via de síntese protéica em fígado de camundongos

O fígado é um dos principais órgãos envolvidos com o consumo, estocagem e produção de glicose e lipídeos. Por esse motivo, o papel metabólico central do fígado é manter a

homeostase de glicose e lipídeos. O metabolismo hepático de glicose inclui a síntese de glicogênio, síntese de glicose a partir de substratos não derivados de carboidratos e fornecimento de energia para a via glicolítica. O metabolismo lipídico envolve a oxidação dos ácidos graxos, síntese de colesterol e a formação das lipoproteínas (Fritsche et al., 2008).

O fígado desempenha papel importante durante o exercício, principalmente por fornecer energia para o trabalho muscular (Heled et al., 2004). Diante disso, alterações metabólicas no fígado podem ser mediadas pelo treinamento aeróbio. Nesse contexto, a via de sinalização de insulina desempenha papel importante e pode ser modulada em presença de aporte aumentado de aminoácidos e diante de treinamento físico. No entanto, a influência do exercício na modulação molecular do metabolismo de substratos como as proteínas, é pouco investigada em fígado, e mais estudada em músculo esquelético.

Um dos objetivos do presente estudo foi investigar a sinalização de proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina e via de síntese protéica no fígado de camundongos submetidos ao treinamento aeróbio e a suplementação com leucina.

O fígado tem capacidade limitada de catabolizar a leucina, uma vez que expressa quantidade relativamente diminuída da enzima AT-BCAA, a qual converte a LEU em KIC. Entretanto, o conteúdo e a atividade do complexo DC-BCAA é comparativamente alto e responsável pela metabolização do KIC. Isto pode ser importante para a oxidação de cetoácidos em concentração elevada na circulação, o que mantém a homeostase e remove o sinal estimulado pela leucina. A quantidade diminuída da AT-BCAA no fígado assegura que a LEU dietética atingirá os tecidos periféricos em concentrações relativamente altas para desempenhar a sua função sinalizadora (Lynch et al., 2002). É muito discutido na literatura que a concentração

elevada de LEU pode ativar proteínas relacionadas a via de sinalização protéica, mas pouco explorado no fígado a modulação dessa via.

Ratos suplementados com LEU na água para beber durante 12 dias apresentaram aumento na síntese de proteínas no fígado, no entanto, não foi encontrada alteração das proteínas mTOR, p70^{s6k} e 4E-BP1 (Lynch et al., 2002). Entretanto, a administração de LEU para animais em jejum promoveu a fosforilação da p70^{s6k} e do 4E-BP1 no fígado (Kimbal e Jefferson, 2006b). A suplementação aguda com LEU (1 h antes da obtenção das amostras) aumentou a fosforilação da p70^{s6k} e do 4E-BP1 e o início da tradução no fígado, mas não foi encontrada alteração na razão de síntese protéica total (Anthony et al., 2001a). Essas diferenças podem estar relacionadas à duração da suplementação, o que evidencia que a síntese de proteínas pode ser ativada pela LEU quando a suplementação é administrada por tempo prolongado. Outra variável que pode explicar as discrepâncias de dados na literatura é a concentração utilizada em cada estudo.

A administração de LEU induziu aumento da secreção do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) em células satélites hepáticas, fato não observado quando utilizou-se valina e isoleucina, confirmando o efeito estimulatório da LEU dentre os BCAA e sua importância em modular fatores metabólicos no fígado. A estimulação da secreção do HGF foi relacionada a via da mTOR, demonstrado pelo aumento da p70^{s6k} e do 4E-BP1, e o efeito estimulatório da LEU foi suprimido quando a rapamicina foi administrada, confirmando que as alterações provocadas pela LEU foi dependente da via da mTOR (Tomiya et al., 2007).

No presente estudo a LEU aumentou o conteúdo de mTOR e a fosforilação da p70^{s6k} em animais suplementados com LEU durante 12 semanas, indicando possibilidade de ativação da sinalização de síntese protéica no fígado.

Em acordo com esse dados, foi verificada uma estreita relação entre a concentração plasmática de LEU e a fosforilação da p70^{s6k} e do 4E-BP1 em fígado de ratos, mostrando que o aumento da LEU no sangue é mediador da ativação dessas proteínas no fígado (Yoshizawa et al., 2001) e suportam os resultados encontrados nos animais CS e TS, que apresentaram concentração elevada de LEU no plasma e aumento da fosforilação da p70^{s6k}.

A ação estimulatória da LEU sobre a via da mTOR em fígado parece ser dependente da presença de insulina como confirmado por dados que mostraram ativação da p70^{s6k} e do 4E-BP1 em ratos normais, mas não em diabéticos (Yoshizawa et al., 2002). No presente estudo, verificou-se aumento do conteúdo de mTOR e da atividade da p70^{s6k} somente nos animais que apresentaram aumento da concentração de insulina plasmática (CS e TS). Esse fato estava relacionado com a presença de concentração aumentada de leucina, independente do treinamento aeróbio.

Recentemente constatou-se que a fosforilação do 4E-BP1 em hepatócito estava aumentada na presença de LEU e insulina. Entretanto o aumento da fosforilação da mTOR ocorreu quando somente a LEU estava presente (Chotechuang et al., 2009), demonstrando que a LEU e a insulina exercem ação coordenada na modulação de proteínas da via mTOR em fígado.

Foi relatado que os primeiros passos da via de sinalização de insulina, incluindo IR e IRS-1, foram alterados em hepatócitos na presença de insulina, que aumentou a sinalização dessas proteínas (Krause et al., 2002) e apoiam os resultados dos animais suplementados do presente estudo, que apresentaram concentração elevada de insulina no plasma e aumento da fosforilação do IR, mas não do IRS-1. Por outro lado, o efeito de 4 semanas de treinamento em um grupo de animais em combinação com uma dieta hipercalórica aumentou a fosforilação do IR e a associação do IRS-2, mas não do IRS-1, à PI3-K (Heled et al., 2004). Isto indica que o exercício

aumentou a sinalização da via da insulina no fígado, suporta a teoria de que o IRS-2 tem papel dominante em hepatócitos e apoia os resultados encontrados em nosso estudo.

Diante do contexto, os resultados deste estudo sugerem que a modulação pela LEU da via da mTOR em fígado pode ter sido exercida pela sinalização aumentada da via da insulina, de modo independente do treinamento aeróbio.

5.3 – Treinamento aeróbio, suplementação com leucina e via de síntese protéica em músculo esquelético de camundongos

O tipo, a intensidade e a duração do exercício são fatores críticos na regulação da síntese de proteínas no músculo esquelético (Mascher et al., 2007). Na década de 80 iniciaram os relatos de que durante o exercício aeróbio intenso e de longa duração há degradação de proteínas e disponibilização de aminoácidos para oxidação (Dohm et al., 1987). O catabolismo protéico aumentado em exercícios aeróbios de longa duração foi confirmado pela oxidação elevada de proteína no músculo esquelético durante o exercício (Tarnopolsky et al., 1988; Tipton e Wolfe, 1998; Gibala, 2007). Este fato sugere que atletas de modalidades de resistência, cuja rotina de treinamento é o exercício aeróbio, requerem elevado consumo diário de proteína para atender a demanda aumentada durante o exercício.

Há relatos na literatura de que a síntese de proteínas no músculo esquelético pode ser estimulada se aminoácidos essenciais forem ingeridos, dentre eles a LEU (Kimball et al., 1999; Rasmussen et al., 2000; Volpi et al., 2003). A administração de LEU durante 12 dias na água para beber (114 mM) aumentou a síntese protéica em músculo esquelético e fígado de ratos (Lynch et al., 2002) e em diferentes tecidos de suínos que receberam LEU via gavagem (Torrazza et al., 2010). A suplementação com leucina também parece atenuar os efeitos do envelhecimento sobre a

massa muscular. Isto mostra que a suplementação crônica pode ser uma ferramenta interessante na prevenção e tratamento da sarcopenia (Fujita e Volpi, 2006).

É relatado que a síntese de proteínas é mediada pela via da mTOR. A utilização da rapamicina, um inibidor da mTOR, 2 h antes de um exercício de força suprimiu a síntese protéica em músculo esquelético (Kubica et al., 2004; Kubica et al., 2005). Estes resultados comprovam que a mTOR é um importante regulador da síntese de proteínas. Uma vez ativada, a mTOR (Thomas e Hall, 1997; Reynolds IV et al., 2004) controla a síntese protéica diretamente pela ativação de 3 proteínas: p70^{s6k}, 4E-BP1 e eIF4G (Anthony et al., 2000; Anthony et al., 2001, Kimbal e Jefferson, 2006b; Vary e Lynch, 2007). A mTOR é também uma proteína integradora de sinais metabólicos e fatores de crescimento para regular a proliferação celular (Bodine, 2006) e modulada pela presença de aminoácidos, principalmente da LEU (Tremblay e Marette, 2001; Volpi et al., 2003).

No presente estudo, os animais não treinados que receberam a suplementação crônica com LEU apresentaram aumento, em músculo esquelético, da expressão gênica e do conteúdo total da mTOR e da fosforilação da p70^{s6k} quando comparado aos outros 3 grupos estudados. Esses resultados estabelecem uma relação entre a LEU e a via da mTOR, como exposto na literatura (Anthony et al., 2001; Tokunaga et al., 2004; Rennie et al., 2006; Vary e Lynch, 2007; Norton et al., 2009).

Reforçando esses dados, a administração de LEU para animais em jejum promoveu a fosforilação das proteínas que são consideradas substratos diretos da mTOR, incluindo o 4E-BP1 e a p70^{s6k} em músculo e fígado de animais (Kimbal e Jefferson, 2006b). Isto sugere que o aminoácido ativa a mTOR em ambos os tecidos e que outros componentes da via parecem importantes para o aumento da síntese protéica. Nesse contexto, a sinalização apenas da mTOR

não é suficiente para explicar a estimulação da síntese de proteínas dependente de LEU em ratos. No entanto, é documentado que a fosforilação e ativação do 4E-BP1 e da p70^{s6k} pela mTOR induz à síntese protéica (Vary e Lynch, 2007). Como as proteínas mTOR e p70^{s6k} estavam aumentadas no grupos suplementados deste estudo, infere-se que a síntese de proteínas desses animais poderia também estar elevada no músculo esquelético.

Dados mostram uma estreita relação entre suplementação com aminoácidos, ativação da via da mTOR e síntese protéica (Bloomstrand et al., 2006; Karlsson et al., 2004; Norton e Layman, 2006; Anthony et al., 2007). Logo que houve aumento da mTOR e da fosforilação da p70^{s6k} no grupo suplementado sugerimos que a LEU pode ter ativado a via de síntese de proteínas estruturais e funcionais no músculo esquelético.

A LEU aumenta a secreção de insulina (Malaisse et al., 1981; Gao et al., 2003; Zawalich et al., 2004; MacDonald et al., 2005; Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010; de Oliveira et al., 2010; Amaral et al., 2010). A concentração aumentada de insulina provoca ativação da via de sinalização de insulina, iniciada pela ligação da insulina ao IR, com consequente ativação do IRS-1, IRS-2, PI3-K e PKB/Akt, a qual estimula a mTOR, e resulta na fosforilação da p70^{s6k} e 4E-BP1 (Folli et al., 1992; White e Kahn, 1994; Thomas e Hall, 1997; Anthony et al., 2000; Anthony et al., 2001). A literatura relata que a estimulação da PKB retorna aos valores basais após a diminuição do sinal insulínico, no entanto, a ativação da mTOR continua, possivelmente, devido à concentração plasmática elevada de aminoácidos e é mantida enquanto houver a presença de aminoácido. A remoção do aminoácido reduz a via da mTOR aos valores de pré-suplementação (Vary e Lynch, 2007). Esses dados indicam que a estimulação da via da síntese protéica ocorre tanto através de mecanismos dependentes de insulina, como de mecanismos independentes, envolvidos com a ativação da fosforilação da p70^{s6k}, 4E-BP1 e eIF4G e sua

atividade é mantida quando há disponibilidade de aminoácidos, o que corrobora com os dados encontrados nos animais suplementados do presente estudo, que apresentaram aumento da modulação da mTOR e p70^{S6k}.

Apesar da estimulação da síntese protéica via mTOR também ser influenciada pela presença de insulina (Xu et al., 2001), a insulina isoladamente não é capaz de restaurar a síntese de proteínas no estado alimentado, sendo necessária a ingestão de aminoácidos para ativar a via (Norton e Layman, 2006). Os animais suplementados com LEU não apresentaram aumento do conteúdo e da fosforilação do IR no músculo esquelético, porém a fosforilação do IRS-1 estava aumentada. Embora por um mecanismo não completamente compreendido, a LEU pode ativar de forma independente vias de sinalização intracelular que convergem para a mTOR (Volpi et al., 2003). Isto sugere que a LEU pode ter agido diretamente sobre a via da mTOR, independente da via da insulina.

Estudos relatam que sessões de exercício aeróbio aumentam a oxidação de proteínas (Tarnopolsky et al., 1988; Tarnopolsky, 2004; Gibala, 2007). Apesar da aparente importância do metabolismo de proteínas no exercício aeróbio há escassez de dados e contrasenso na literatura sobre os efeitos desse tipo de intervenção sobre a via de sinalização de síntese protéica em músculo esquelético.

Alguns estudos mostram aumento da síntese protéica (Fujita et al., 2006; Fujita et al., 2007; Reynolds IV et al., 2004; Short et al., 2004) acompanhado de aumento da ativação das proteínas PKB, mTOR (Reynolds IV et al., 2004) e p70^{S6k} (Fujita et al., 2006 ; Fujita et al., 2007; Mascher et al., 2007) após exercício aeróbio. No entanto, o envolvimento de diversas variáveis, como idade, tipo de estímulo utilizado (efeito agudo ou crônico do exercício) e protocolo de coleta (tipo de tecido analisado, momento de obtenção das amostras em relação ao término do

estímulo e tipo de proteína analisada), dificultam a correlação entre eles e os tornam muitas vezes controversos.

Short et al. (2004) foram os pioneiros na investigação do efeito do treinamento aeróbio (4 meses de ciclismo a 80% da frequência cardíaca máxima, 3-4 dias/semana) sobre o aumento da síntese de proteína total em músculo esquelético de pessoas jovens e idosas. Porém, nenhuma das proteínas da via de sinalização de síntese protéica foi investigada. Ratos idosos submetidos a 3 meses de exercício aeróbio exibiram aumento da síntese protéica muscular após 8 h da última sessão de exercício, o que foi relacionado a uma maior atividade da via da mTOR e PKB (Reynolds IV et al., 2004). O efeito de uma sessão aguda de exercício aeróbio (45 min de corrida em esteira a 70% da frequência cardíaca máxima) foi suficiente para ativar a via da mTOR em músculo esquelético de idosos sedentários estimulados com insulina após 20 h do término do exercício (Fujita et al., 2007). O mesmo foi encontrado após 3 h de repouso de uma sessão aguda de exercício aeróbio (1 h de exercício em cicloergômetro a 75% do $VO_2\text{max}$) realizada por indivíduos jovens sedentários (Masher et al., 2007) e os autores sugeriram uma ativação da síntese protéica após o exercício de resistência.

Nos estudos citados acima que avaliaram sujeitos adultos e sugeriram alguma alteração na via da mTOR, a análise das proteínas da via foi realizada até 3 h após o término do exercício. Devido ao catabolismo induzido pelo exercício, a síntese de proteínas poderia estar realmente mais ativa neste período, o que concorda com os resultados aumentados da sinalização da via da mTOR poucas horas depois do exercício. É relatado que alterações na síntese protéica muscular induzida pelo exercício aeróbio perduram por, aproximadamente, 24 h após o término do exercício (Short et al., 2004; Picosky et al., 2006) e, possivelmente, as alterações metabólicas observadas imediatamente após o exercício decaíam durante o processo de recuperação. Em

apoio a essa hipótese, após 48 h da última sessão de exercício não foi encontrada alteração na mTOR e na p70^{S6k} em músculo esquelético de homens submetidos a 10 semanas de treinamento aeróbio. No entanto, quando esses mesmos sujeitos foram submetidos a uma sessão aguda de exercícios (45 min em cicloergômetro a 75% do VO₂max) foi encontrada ativação da mTOR e da p70^{S6k} depois de 3 h do término da sessão (Wilkinson et al., 2008). Somado a isso, um programa de 10 dias de treinamento aeróbio em cicloergômetro atenuou a resposta da via da mTOR em homens jovens. Porém, imediatamente depois de uma sessão aguda de exercício aeróbio (1 h em cicloergômetro) houve aumento da fosforilação da p70^{S6k} (Benziane et al., 2008).

Esses dados sugerem que a ativação da via da mTOR pode ser tempo dependente e apóiam os resultados encontrados neste estudo, no qual nenhuma alteração do conteúdo da mTOR e da fosforilação da p70^{S6k} foi encontrada em camundongos treinados após 24 h da última sessão de exercício aeróbio. Essa suposição é amparada pela expressão gênica aumentada da mTOR nos animais treinados, a qual não seria influenciada pelo tempo de coleta. Ainda indica que a via de síntese protéica não estava ativada 24 h depois do exercício aeróbio e que houve atenuação da expressão das proteínas mTOR e p70^{S6k} em função do treinamento aeróbio.

Além disso, o grupo exercitado apresentou ativação da via da insulina, demonstrado pelo aumento do conteúdo total do IR e da fosforilação aumentada do IR e do IRS-1 estimulada por insulina, em acordo com os resultados de elevação da sensibilidade à insulina. Alguns dos mecanismos que podem aumentar o consumo de glicose em função da adaptação ao treinamento aeróbio é o aumento da expressão do IR, o aumento da ligação da insulina ao IR e maior fluxo sanguíneo no tecido muscular (Henriksen, 2002; Pauli et al., 2009).

A ativação dos passos iniciais da via da insulina gera um série de eventos intracelulares que culminam na ativação da PKB e posterior ativação da mTOR, que, como descrito

anteriormente, desencadeia sinais metabólicos que ativam a via da síntese protéica, fato não observado neste estudo 24 h após o término do exercício.

É importante ressaltar que a fosforilação do IR e do IRS-1 foi observada após a estimulação com insulina, e que o treinamento aeróbio induziu uma maior responsividade da via em presença aumentada do hormônio. Nos animais treinados não houve alteração da concentração de insulina no plasma no estado alimentado. Em concentrações fisiológicas, possivelmente, não haveria alteração da fosforilação do IR e do IRS-1 após 24 h do término do exercício, uma vez que as alterações metabólicas provocadas pelo exercício, como citado anteriormente, perduram por aproximadamente 24 h e seriam menos expressivas no momento da coleta do tecido muscular.

Apesar da relação existente entre as proteínas da via da insulina e a ativação da via da síntese protéica, a ativação das proteínas iniciais da via de sinalização da insulina não convergiram para o aumento da sinalização da via da mTOR em músculo esquelético de camundongos exercitados. Isso sugere que o modelo de treinamento aeróbio proposto não aumentou a sinalização das proteínas envolvidas na via de síntese protéica. Porém, esse fato pode estar relacionado ao período de tempo que decorreu entre o término do exercício e a obtenção das amostras.

Embora a importância da suplementação de proteínas seja bem estabelecida na literatura em associação ao exercício de força (Higuchi, 1992; Karlsson et al., 2004; Bloomstrand et al., 2006; Reitelsheder et al., 2011; Phillips, 2011) muito pouco se sabe sobre o efeito da suplementação crônica com aminoácidos, em destaque a leucina, sobre as adaptações impostas por programas de exercício aeróbio.

A associação da LEU à ativação da via de síntese protéica é bem documentada na literatura e difundida entre os praticantes de exercício de força, os quais a ingerem com objetivo de aumentar a massa muscular. No entanto, estudos relatam que sessões de exercício aeróbio aumentam a oxidação de proteínas (Tarnopolsky et al., 1988; Tarnopolsky, 2004; Gibala, 2007) e, se a ingestão alimentar de aminoácidos não for adequada, pode haver indução de proteólise.

Anthony et al. (1999) foram os pioneiros em demonstrar que a suplementação oral com LEU pós-exercício de longa duração é importante para desencadear os mecanismos que conduzem à síntese protéica. A ingestão de BCAA imediatamente após uma sessão de exercício de resistência estimulou a síntese protéica total e no músculo esquelético de sujeitos exercitados (Levenhagen et al., 2001).

Esses dados sugerem que o aumento da disponibilidade de aminoácidos estimula a via de sinalização de síntese protéica após o exercício aeróbio e apóiam a hipótese de que a suplementação com LEU pode ser importante para atletas envolvidos em modalidades de resistência, as quais induzem aumento do catobolismo protéico. Nessa situação, a suplementação poderia contribuir com a melhora da recuperação após exercício aeróbio, como por exemplo, induzindo um maior acúmulo de glicogênio. A suplementação de BCAA por 6 semanas durante um programa de exercício aeróbio de natação levou ao aumento do conteúdo de glicogênio muscular e hepático em relação ao grupo não suplementado (Araújo Jr. et al., 2006).

A suplementação aguda de uma mistura de carboidrato com proteína de soja (20%) ou de carboidrato com proteína do soro do leite (20%) aumentou a síntese de proteínas em ratos submetidos a 2 h de corrida em esteira e foi acompanhado do aumento da fosforilação da mTOR e da p70^{S6k}, e os resultados foram mais expressivos nos animais que ingeriram a proteína do soro do leite (Anthony et al., 2007). Ratos que receberam uma mistura de carboidrato adicionado de

proteína imediatamente após uma sessão aguda de exercício aeróbio apresentaram aumento da fosforilação da mTOR, da p70^{S6k} e do 4E-BP1 quando comparados aos animais que receberam apenas o carboidrato. Além disso, a taxa de fosforilação do 4E-BP1 foi altamente correlacionada com o aumento da concentração de insulina nos animais que receberam a mistura (Morrison et al., 2008).

Esses estudos demonstram a importância da ingestão do aminoácido para a ativação da via da síntese protéica e, associados a um estudo que encontrou maior elevação da concentração plasmática de insulina em sujeitos que ingeriram uma mistura de carboidrato e proteína imediatamente após o exercício (Van Loon et al., 2000), mostram uma relação entre a suplementação com aminoácido e a secreção aumentada de insulina.

Fujita et al. (2007) demonstraram que uma única sessão de exercício aeróbio moderado aumentou o anabolismo muscular em idosos saudáveis. Esses resultados foram acompanhados de aumento na captação de aminoácidos pelo tecido muscular e aumento da fosforilação das proteínas mTOR, PKB e p70^{S6k}. No entanto, o aumento da síntese protéica estava presente somente nos indivíduos que receberam infusão de insulina após a sessão de exercício, sugerindo que o efeito anabólico do exercício aeróbio foi dependente da concentração aumentada de insulina, e isto foi demonstrado também em indivíduos jovens (Fujita et al., 2006). Esse fato apóia os dados encontrados no nosso estudo, que mostra aumento da sinalização das proteínas da via de síntese protéica em animais com concentração de insulina elevada no plasma, possivelmente induzida pela leucina, logo que somente os animais que receberam a suplementação apresentaram aumento da insulina.

Os dois estudos corroboram a importância do aumento da concentração de insulina na estimulação da síntese protéica. A suplementação crônica adotada neste estudo induziu aumento

da concentração plasmática de LEU e de insulina nos animais treinados, que também apresentaram aumento da expressão gênica da mTOR, do conteúdo total da mTOR e da fosforilação da p70^{S6k}. Os dados aumentados das proteínas da via de sinalização protéica sugerem uma possível modulação da síntese protéica no músculo esquelético dos camundongos treinados e que essa modulação foi exercida pela presença de LEU e de insulina.

A LEU aumenta a secreção de insulina (Malaisse et al., 1981; Gao et al., 2003; Zawulich et al., 2004; MacDonald et al, 2005; Filiputti et al., 2008; Filiputti et al., 2010; de Oliveira et al, 2010; Amaral et al., 2010) e pode ser utilizada em associação ao exercício aeróbio para ativar e/ou restaurar a via de sinalização protéica em músculo esquelético, o que levaria ao aumento da síntese de proteínas.

Como houve ativação das proteínas da via de sinalização de síntese protéica nos animais suplementados e submetidos ao treinamento aeróbio mesmo após 24 h do término do exercício, fato não que não foi observado nos animais exclusivamente treinados, postula-se que a LEU foi capaz de manter a estimulação da via da síntese protéica durante a recuperação após o exercício.

A suplementação com LEU associada ao exercício aeróbio elevou também o conteúdo total do IR e a fosforilação do IR e do IRS-1 estimulada por insulina no músculo esquelético acima do encontrado nos outros três grupos. Esse fato mostra uma maior responsividade da via da insulina em presença do hormônio insulina, que também estava aumentado neste grupo. Ainda sugere que a sinalização aumentada da via da insulina poderia aumentar a captação de glicose, de acordo com os dados de sensibilidade aumentada, e modular a via de síntese protéica, aumentando a ativação de proteínas da via, fato observado neste estudo. Essas relações sugerem que a modulação da via de síntese protéica em camundongos treinados e suplementados com LEU foi exercida por mecanismo dependente de insulina.

Esses dados nos permitem aceitar a hipótese de que a suplementação crônica com LEU, associada ao treinamento aeróbio, modula proteínas sinalizadoras da via de sensibilidade à insulina e de síntese protéica, o que pode tornar a via mais ativa em músculo esquelético de camundongos quando comparada à atividade expressa somente em função do exercício aeróbio.

6 - CONCLUSÕES

Considerando que o objetivo do presente estudo foi analisar a modulação do treinamento aeróbio e da suplementação com leucina sobre proteínas sinalizadoras da via de sensibilidade à insulina e síntese protéica em músculo esquelético e fígado de camundongos adultos, concluiu-se que o treinamento aeróbio, apesar de induzir aumento na via de sinalização de insulina, atenuou, a sinalização da via de síntese protéica após 24 h de uma sessão de exercício aeróbio. Em contrapartida, a principal conclusão deste estudo mostra que a leucina manteve a via de sinalização protéica ativada após 24 h de uma sessão de exercício aeróbio realizada por camundongos treinados aerobiamente e suplementados com leucina durante 12 semanas.

Outras investigações sobre os efeitos da administração de leucina associada a modalidades de resistência são necessárias, uma vez que a suplementação crônica parece ser uma estratégia interessante para compensar o catabolismo protéico induzido pelo exercício aeróbio de longa duração e manter a via de sinalização protéica ativa, e pode ser benéfica em situações de catabolismo protéico aumentado e de síntese protéica diminuída.

A suplementação com leucina para indivíduos que não possuem aporte calórico aumentado pode induzir o aumento da secreção de insulina e possível estresse pancreático. A administração da suplementação com leucina deve ser realizada por profissional competente, independente do indivíduo. Deve ser observado com atenção especial o uso em indivíduos idosos, que frequentemente possuem catabolismo protéico elevado.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERSTROM, T.C.A.; FISCHER, C.P.; PLOMGAARD, P.; et al. Glucose ingestion during endurance training does not alter adaptation. *J. Appl. Physiol.* 106:1771-1779, 2009.
- AMARAL, A.G.; RAFACHO, A.; MACHADO DE OLIVEIRA, C.A.; et al. Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas* 39:847-855, 2010.
- ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; KIMBALL, S.R.; et al. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* 131(3):856S-60S, 2001.
- ANTHONY, J.C.; ANTHONY, T.G.; LAYMAN, D.K. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *J. Nutr.* 129:1102-1106, 1999.
- ANTHONY, J.C.; LANG, C.H.; CROZIER, S.J.; et al. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, 282(5):E1092-E01, 2002.
- ANTHONY, J.C.; YOSHIZAWA, F.; ANTHONY, T.G.; et al. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J. Nutr.* 130:2413-9, 2000.
- ANTHONY, T.G.; ANTHONY, J.C.; YOSHIZAWA, F.; et al. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J. Nutr.* 131:1171-1176, 2001a.

- ANTHONY, T.G.; McDANIEL B.J.; KNOLL, P.; et al. Feeding meals containing soy or whey protein after exercise stimulates protein synthesis and translation initiation in the skeletal muscle of male rats. *J. Nutr.* 137:357-362, 2007.
- ANTHONY, T.G.; McDANIEL, B.J.; BYERLEY, R.L.; et al. Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J. Biol. Chem.* 279(35):36553-36561, 2004.
- ARAUJO JR, J.A.; FALAVIGNA, G.; ROGERO, M.M.; et al. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. *Life Sci.* 79:1343-1348, 2006.
- ATHERTON, P.J.; BARBRA, J.; SMITH, J.; et al. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J.* 19:786-788, 2005.
- BARBOSA, A.W.; BENEVIDES, G.P.; ALFERES, L.M.; et al. A leucine-rich diet and exercise affect the biomechanical characteristics of the digital flexor tendon in rats after nutritional recovery. *Amino Acids.* 24, 2010.
- BARR, K. Training for endurance and strength: lessons from cell signaling. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(11):1939-1944, 2006.
- BARR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70 (S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am. J. Physiol.* 276:C120-C127. 1999.
- BENZIANE, B.; BUTON, T.J.; SCANLAN B.; et al. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:1427-1438, 2008.

- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 336:93-104, 1984.
- BIES, E.R.; CALVO, S.S.C.; LOZANO, A.F.; et al. Muscle Physiology Changes Induced by Every Other Day Feeding and Endurance Exercise in Mice: Effects on Physical Performance. *PLoS ONE* 5(11), 2010.
- BLOMSTRAND, E.; ELIASSON, J.; KARLSSON, H.K.; et al. Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J. Nutr.* 136:269S-273S, 2006.
- BODINE, S.C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(11):1950-1957, 2006.
- BOOTH, F.W.; BALDWIN, K.M. Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In: *The Handbook of Physiology Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*, ed. Rowell LB & Shepherd JT, 1075–1123, 1996.
- BORGES-SILVA, C.N.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; et al. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. *J. Pineal Res.* 43(1):96-103, 2007.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.
- CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46(4):419-425, 2002.
- CHIASERA, J.M.; WARD-COOK, K.M.; McCUNE, S.A.; et al. Effect of aerobic training on diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30(4):346-353, 2000.

- CHIBALIN, A.V.; YU, M.; RYDER, J.W.; et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: Differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. *PNAS* 97(1):38-43, 2000.
- CHO, H.; THORVALDSEN, J.L.; CHU, Q.; et al. Akt1/PKB alpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 276: 38349-52, 2001.
- CHOTECHUANG, N.; AZZOUT-MARNICHE, D.; BOS, C.; et al. mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E1313-1323, 2009.
- CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; COHEN, P.; et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789, 1995.
- CROWE, M.J.; WEATHERSON, J.N.; BOWDEN, B.F. Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance. *Eur. J. Appl. Physiol.* 97:664-672, 2006.
- CUNHA, T.S.; TANNO, A.P.; MOURA, M.J.C.S.; et al. Relação entre a administração de esteróide anabólico androgênico, treinamento físico aeróbio e supercompensação do glicogênio. *Rev. Bras. Med. Esporte* 11(3): 187-192, 2005.
- CZECH M.P.; CORVERA S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* 274: 1865-1868, 1999.
- de OLIVEIRA, C.A.; LATORRACA, M.Q.; de MELLO, M.A.; et al. Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. *Amino Acids.* 2010.
- DECOMBAZ, J.; REINHARDT, P.; ANANTHARAMAN, K.; et al. Biochemical changes in a 100 km run: free amino acids, urea, and creatinine. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 41(1):61-72, 1979.

- DOHM, G.L.; TAPSCOTT, E.B.; KASPEREK, G.J. Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Med. Sci. Sports Exerc.* 19(5):S166-S171, 1987.
- DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:262-267, 1998.
- FILIPUTTI, E.; FERREIRA, F.; SOUZA, K.L.; et al. Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. *Life Sci.* 82(9-10):542-548, 2008.
- FILIPUTTI, E.; RAFACHO, A.; ARAÚJO, E.P.; et. al. Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism* 59:635-644, 2010.
- FOLLI, F.; SAAD, M.J.A.; BACKER, J.M.; et al. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J. Biol. Chem.* 267:22171-22177, 1992.
- FREYSSINET, D. Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 102:529-540, 2007.
- FRITSCHÉ, L.; WEIGERT, C.; HÄRING, H.U; et al. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver - implications for health and disease. *Current Medicinal Chemistry* 15:1316-1329, 2008.
- FROSIG, C.; RICHTER, E.A. Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling obesity. *Obesity* 17(3):S15-S20, 2009.

- FUJITA, S.; RASMUSSEN, B.B.; CADENAS, J.G.; et al. Aerobic exercise overcomes the age-related insulin resistance of muscle protein metabolism by improving endothelial function and Akt/Mammalian target of rapamycin signaling. *Diabetes* 56:1615-1622, 2007.
- FUJITA, S.; RASMUSSEN, B.B.; CADENAS, J.G.; et al. The effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291:E745-754, 2006.
- FUJITA, S.; VOLP, E. Amino Acids and Muscle Loss with Aging1–3J. *Nutr.* 136:277S–280S, 2006.
- GAINE, P.C.; VIESSELMAN, C.T.; PIKOSKY, M.A.; et al. Aerobic exercise training decreases leucine oxidation at rest in healthy adults. *J. Nutr.* 135:1088-1092, 2005.
- GAO, Z.; YOUNG, R.A.; LI, G.; et al. Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 144(5):1949-1957. 2003.
- GARLICK, P.J.; GRANT, I. Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. *Biochem. J.* 254(2):579-584, 1998.
- GAUTSCH, T.A.; ANTHONY, J.C.; KIMBALL, S.R.; et al. Availability of eIF4E regulates skeletal muscle protein synthesis during recovery from exercise. *Am. J. Physiol.* 274:C406–414, 1998.
- GIBALA, M.J. Protein metabolism and endurance exercise. *Sports Med.* 37(4-5):337-340, 2007.
- GOMES, F.R.; REZENDE, E.L.; MALISCH, J.L.; et al. Glycogen storage and muscle glucose transporters (GLUT-4) of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *J. Exper. Biology* 212:238-248, 2009.

- GUO, K.; YU, Y.H.; HOU, J.; et al. Chronic leucine supplementation improves glycemic control in etiologically distinct mouse models of obesity and diabetes mellitus. *Nutrition & Metabolism* 7:57, 2010
- HANSEN, A.K.; FISCHER, C.P.; PLOMGAARD, P.; et al. Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once day. *J. Appl. Physiol.* 98:93-99, 2005.
- HAWLEY, J.A. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin. Exper. Pharmacology and Physiology* 29:218-222, 2002.
- HAWLEY, J.A.; BURKE, L.M.; PHILLIPS, S.M.; et al. Nutritional modulation of training-induced skeletal muscle adaptation. *J. Appl. Physiol.* 2010.
- HELED, Y.; SHAPIRO, Y.; SHANI, Y.; et al. Physical exercise enhances hepatic insulin signaling and inhibits phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in diabetes-prone *Psammomys obesus*. *Metabolism* 53(7):836-841, 2004.
- HENRIKSEN, E.J.; Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J. Appl. Physiol.* 93:788–796, 2002.
- HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S. et. al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413-417, 1992.
- HOLLOSZY, J.O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT-4. *J. Physiol. Pharmacol.* 59(7, 5), 2008.
- HOLLOSZY, J.O.; BOOTH, F.W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 38:273-291, 1976.
- HOOD, D.A. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 90:1137–1157, 2001.

- IVY J.L.; KUO, C.H. Regulation of GLUT4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise. *Acta Physiol. Scand.* 162(3):295-304, 1998.
- JENSEN, J.; LAI, Y.C. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. *Arch. Physiol. Biochem.* 115(1):13-21, 2009.
- KARLSSOM, H.K.R.; NILSSON, P.A.; NILSSON, J.; et al. Branched-chain amino acids increase p70S6K phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287:E1-E7, 2004
- KASPEREK, G.J; Regulation of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase activity during exercise. *Am. J. Physiol.* 256:E186-190, 1989.
- KIDO Y.; NAKAE J.; ACCILI D. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *Clin. Endocrinol. Metab.* 86:972-979, 2001.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(2):500S-507S, 2006a.
- KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 136:227S-231S, 2006b.
- KIMBALL, S.R.; SHANTZ, L.M.; HORETSKY, R.L.; et al. 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.* 274:11647-11652, 1999.
- KRAUSE, U.; BERTRAND, L.; MAISIN, L.; Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 269:3742-3750, 2002.

- KRUSZYNSKA, Y.T.; HOME, P.D.; ALBERTI, K.G. In vivo regulation of liver and skeletal muscle glycogen synthase activity by glucose and insulin. *Diabetes*. 35(6):662-7, 1986.
- KUBICA, N.; BOLSTER, S.R.; FARRELI, P.A.; et al. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2Bepsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 280:7570-7580, 2005.
- KUBICA, N.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S.; et al. Alterations in the expression in the expression of mRNAs and proteins that code for species relevant to eIF2B activity after an acute bout of resistance exercise. *J. Appl. Physiol.* 96:679-687, 2004.
- LANGE, P.; MORENO, M.; SILVESTRI, E.; et al. Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB J.* 21: 3431–3441, 2007.
- LAYMAN, D.K.. Role of leucine in protein metabolism during exercise and recovery. *Can. J. Appl. Physiol.* 27:646–663, 2002.
- LEIGHTON, B.; PARRY-BILLINGS, M.; DIMITRIADIS, G.D.; et al. Effect of the Walker 256 carcinoma in rats on insulin-stimulated glucose metabolism in soleus muscle in vitro. *Biochem. Soc. Trans.* 17:1043-1044, 1989.
- LETURQUE, A.; LAROCHE, E.B.; MAUDE LE GALL, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296:E985–E992, 2009.
- LEVENHAGEN, D.K.; GRESHAM, J.D.; CARLSON, M.G.; et al. Postexercise nutrient intake timing in humans is critical to recovery of leg glucose and protein homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E982–993, 2001.

- LITTLE, J.P.; SAFDAR, A.; WILKIN, G.P.; et al. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J. Physiol.* 588(6):1011-1022, 2010.
- LO, S.; RUSSEL, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28:234-236, 1970.
- LYNCH, C.J.; HUTSON, S.M.; PATSON, B.J.; Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:E824-835, 2002.
- MacDONALD, M.J.; FAHIEN, L.A.; BROWN, L.J.; et al. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288:E1-15, 2005.
- MALAISSÉ, W.J.; CARPINELLI, A.R.; LEBRUN, P.; et al. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. IV. Ionic response to L-leucine and L-glutamine. *Pflugers Arch.* 391:112-118, 1981.
- MASCHER, M.; ANDERSSON, H.; NILSSON, P.A.; et al. Changes in signaling pathways regulating protein synthesis in human muscle in the recovery period after endurance exercise. *Acta Physiol.* 191:67-75, 2007.
- McDONAGH, M.J.N.; DAVIES, C.T.M. Adaptive responses of mammalian skeletal muscle to exercise with high loads. *Eur. J. Appl. Physiol.* 56:178-198, 1987.
- McKENZIE, S.; PHILLIPS, S.M.; CARTER, S.L.; et al. Endurance exercise training attenuates leucine oxidation and BCOAD activation during exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278(4):E580-587, 2000.
- MERO A. Leucine supplementation and intensive training. *Sports Med.* 27(6):347-358, 1999.

- MORRISON, P.J.; HARA, D.; DING, Z.; et al. Adding protein to a carbohydrate supplement provided after endurance exercise enhances 4E-BP1 and RPS6 signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104:1029-1036, 2008.
- MOTA, C.S.A.; RIBEIRO, C.; ARAÚJO, G.G. et al. Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats *BMC. Endocrine Disorders* 8(11):1-9, 2008.
- NADER, G.A. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38(11):1965-1970, 2006.
- NAKATANI, A., HAN, D.H.; HANSEN, P.A.; et al. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. *J. Appl. Physiol.* 82(2): 711–715, 1997.
- NISSEN, S.; SHARP, R.; RAY, M.; et al. Effect of leucine metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J. Appl. Physiol.* 81(5):2095–2104, 1996.
- NISSEN, S.L.; ABUMRAD, N.N. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). *J. Nutr. Biochem.* 8:300-311, 1997.
- NOATSCH, A.; PETZKE, K.J.; MILLROSE, M.K.; et al. Body weight and energy homeostasis was not affected in C57BL/6 mice fed high whey protein or leucine-supplemented low-fat diets. *Eur. J. Nutr.* 2010.
- NORTON, L.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.; LAYMAN, D.K.; BUNPO, P.; 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):1103-1109, 2009.

- ORTENBLAD, N.; MOGENSEN, M.; PETERSEN, I.; et al. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. *Biochim. Biophys. Acta* 1741:206-214, 2005.
- PATTI, M.E.; BUTTE, A.J.; CRUNKHORN, S. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8466-8471, 2003.
- PAULI, J.R.; CINTRA, D.E; SOUZA, C.T.; Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência a insulina no músculo esquelético. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 53(4):399-408, 2009.
- PAXTON, R.; HARRIS, R.A. Regulation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 231:48-57, 1984.
- PHILIPS, S.M. The science of muscle hypertrophy: making dietary protein count. *Proc. Nutr. Soc.* 70(1):100-103, 2011.
- PHILIPS, S.M.; ATKINSON, S.A.; TARNOPOLSKY, M.A.; et al. Gender differences in leucine kinetics and nitrogen balance in endurance athletes. *J. Appl. Physiol.* 75(5): 2134-2141, 1993.
- PIKOSKY, M.A.; GAINE, P.C.; MARTIN, W.F.; et al. Aerobic exercise training increases skeletal muscle protein turnover in healthy adults at rest. *J. Nutr.* 136:379-383, 2006.
- PLOUG, T.; DEURS, I.B.V.; AI, H.; et al. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J. of Cell Biology* 142(6):1429–1446, 1998.

- PRICE, T.B.; LAURENT, D.; PETERSEN, K.F.; et al. Glycogen loading alters muscle glycogen resynthesis after exercise. *J. Appl. Physiol.* 88:698–704, 2000.
- RASMUSSEN, B.B.; TIPTON, K.D.; MILLER, S.L.; et al. An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. *J. Appl. Physiol.* 88:386-392, 2000.
- RENNIE, M.J.; BOHÉ, J.; SMITH, K.; et al. Branched-chain amino acids as fuels and anabolic signals human muscle. *J. Nutr.* 131(3):856S-60S, 2001.
- RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.T.; KRYWAWYCH, S.; et al. Effect of exercise on protein turnover in man. *Clin. Sci.* 61(5):627-639, 1981.
- RETELSEDER, S.; AGERGAARD, J.; DOESSING, S.; et al. Whey and casein labeled with L-[1-13C] leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300(1):E231-E242, 2010.
- REYNOLDS IV, T.H.; REID, P.; LARKIN, L.M.; et al. Effects of aerobic exercise training on the protein kinase B (PKB) mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in aged skeletal muscle. *Experimental Gerontology* 39:379-385, 2004.
- RIEU, I.; BALAGE, M.; SORNET, C.; et al. Increase availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition* 23:323-331, 2007.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001.
- SALTIN, B.; GOLLNICK, P.D. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: *The Handbook of Physiology: Skeletal Muscle*, ed. Peachey LD, Adrian RH & Geiger SR, 1983:555–631, 1983.

- SESTI, G.; FEDERICI, M.; HRIBAL, M.L.; et al. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15:2099-2111, 2001.
- SHEPHERD P.R.; NAVE B.T.; SIDDLE K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* 305:25-28, 1995.
- SHIMOMURA, Y.; MURAKAMI, T.; NAKAI, N.; et al. Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise. *J. Nutr.* 134:1583S–1587S, 2004.
- SHIMOMURA, Y.; MURAKAMI, T.; NAKAI, N.; et al. Suppression of glycogen consumption during acute exercise by dietary branched-chain amino acids in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 46:71–77, 2000.
- SHORT, K.R.; VITTONI, J.L.; PROCTOR, D.N.; et al. Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286:E92-E101, 2004.
- SIMONEAU, J.A.; KELLEY, D.E. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J. Appl. Physiol.* 83:166-171, 1997.
- SRERE, P.A.; BRAZIL, H.; GONEN, L. The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* 17:129–134, 1963.
- STUMP, C.S.; SHORT, K.R.; BIGELOW, M.L.; et al. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7996-8001, 2003.
- TARNOPOLSKY, M. Protein requirements for endurance athletes. *Nutrition* 20:662-668, 2004.

- TARNOPOLSKY, M.A.; MACDOUGALL, J.D.; ATKINSON, S.A. Influence of protein intake and training status on nitrogen balance and lean body mass. *J. Appl. Physiol.* 64:187-193, 1988.
- TATON, J.; CZECH, A.; PIATKIEWICZ, P. Insulin as the main regulator of cellular glucose utilization - a etiological aspects of insulin resistance. *Endokrynologia* 61(4), 2010.
- TERADA, S.; GOTO, M.; KATO, M.; et al. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(2):350-354, 2002.
- THOMAS, G.; HALL, M.N. TOR signaling and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:782-787, 1997.
- TIPTON, K.D.; WOLFE, R.R. Exercise-induced changes in protein metabolism. *Acta Physiol. Scand.* 162:377-387, 1998.
- TOKUNAGA, C.; YOSHINO, K.; YONEZAWA, K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 443-446, 2004.
- TOMIYA, T.; NISHIKAWA, T.; INOUE, Y; et al. Leucine stimulates HGF production by hepatic stellate cells through mTOR pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358(1):176-180, 2007.
- TORRAZZA, M.R.; SURYAWAN, A.; GAZZANEI, M.C. et al. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *J. Nutr.* 140(12):2145-2152, 2010.
- TREMBLAY, F.; MARRETE, A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276(41):38052-38060, 2001.

- TROTTIER, N.L.; NIELSEN, B.D.; LANG, K.J.; et al. Equine endurance exercise alters serum branched-chain amino acid and alanine concentrations. *Equine Vet. J. Suppl.* 34:168-72, 2002.
- VAN LOON, L.J.C.; SARIS, W.H.M.; KRUIJSHOOP, M.; et al. Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:106:111, 2000.
- VARY, T.C.; LYNCH, C.J. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. *J. Nutr.* 137:1835-1843, 2007.
- VOLPI, E.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; et al. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:250-258, 2003.
- VUKOVICH, M.D.; DREIFORT, G.D. Effect of beta-hydroxy beta-methylbutyrate on the onset of blood lactate accumulation and VO₂ peak in endurance-trained cyclists. *J Strength Cond Res.* 15(4):491-497, 2001.
- WALKER, T.B.; SHITH, J.; HERRERA, M.; et al. The influence of 8 weeks of whey-protein and leucine supplementation on physical and cognitive performance. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 20(5): 409:417, 2010.
- WALRAND, S.; SHORT K.R.; BIGELOW, M.L.; et al. Functional impact of high protein intake on healthy elderly people. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295(4):E921-928, 2008.
- WANG, X.; PROUD, C.G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology* 21:362-369, 2006.
- WHITE, M.F.; KAHN, C.R. The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 261:1-4, 1994.

- WILKINSON, S.B.; PHILLIPS, S.M.; ATHERTON, P.J.; et al. Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signaling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. *J. Physiol.* 586(15):3701-3717, 2008.
- XU, G.; KWON, G.; CRUZ, W.S.; et al. Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the mTOR-signaling pathway by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50(2):353-360, 2001.
- YOSHIZAWA, F.; HIRAYAMA, A.; SEKIZAWA, H.; et al. Oral administration of leucine phosphorylation of 4-BP1 and S6K1 in muscle but not in liver of diabetic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 48(1):59-64, 2002.
- YOSHIZAWA, F.; SEKIZAWA, H.; HIRAYAMA, A.; et al. Time course of leucine-induced 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation in the liver and skeletal muscle of rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 47(4):311-315, 2001.
- ZAWALICH, W.S.; YAMAZAKI, H.; ZAWALICH, K.C.; et al. Comparative effects of amino acids and glucose on insulin secretion from isolated rat or mouse islets. *J. Endocrinol.* 183(2):309-319, 2004.
- ZIERATH, J.R. Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle *J. Appl. Physiol.* 93:773-781, 2002

Anexo I: Certificado de Análises do Controle de Qualidade da Leucina

CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7 Autorização Especial de Funcionamento M.S.: 1.20182-2

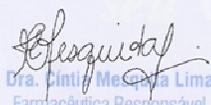
Insumo : L LEUCINA Lote : 20060922 #3 Formula: C6 H13 N O2 DCB : 04070.01-1 Categoria Terapeutica: AMINOACIDO	10/12 NF 517.006 12/06/2007 Origem: China Procedencia: China Fabric.: 09/2006 Validade: 09/2009 PM: 131.17 Frac: 536563-2 04/06/2007 CAS: 61-90-5
--	---

Ensaio	Especificacao	Resultado
*DESCRICOÃO	PÓ CRISTALINO OU CRISTAIS BRANCOS, SABOR POUCO AMARGO.	DE ACORDO
*SOLUBILIDADE	-LIGEIRAMENTE SOLÚVEL EM ÁGUA -FACILMENTE SOLÚVEL EM ÁCIDO FÓRMICO -PRATICAMENTE INSOLÚVEL EM ETANOL E ÉTER -DISSOLVE-SE EM HCl DILUÍDO	DE ACORDO
*IDENTIFICAOÃO	POR ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO	DE ACORDO
*ROT. ESPECÍFICA	+14,9° A +16,0°	+15°
*TRANSMITÂNCIA	MÍNIMO 98,0% A 430 nm	98,5%
*CLORETO	MÁXIMO 0,02%	< 0,02%
*SULFATO	MÁXIMO 0,02%	< 0,02%
*METAIS PESADOS	MÁXIMO 10 ppm	DE ACORDO
*PERDA P/SECAGEM	MÁXIMO 0,2% A 105°C POR 3 HORAS	0,06%
*RESÍDUO IGNIÇÃO	MÁXIMO 0,1%	0,04%
*DOSEAMENTO	POR POTENCIOMETRIA: 98,5 - 100,5% EM BASE SECA	100,21%
*pH	SOLUÇÃO A 1% EM ÁGUA: 5,5 - 6,5	6,1
*MICROBIOLOGIA	CONTAGEM TOTAL DE BACTERIAS: <10(3) UFC/g	1,0x10 UFC/g
*	PSEUDOMONAS AERUGINOSA: AUSENTE/1g	AUSENTE/1g
	STAPHYLOCOCCUS AUREUS: AUSENTE/1g	
	SALMONELLA SP: AUSENTE/1g	
	COLIFORMES TOTAIS: AUSENTE/1g	
	COLIFORMES FECAIS: AUSENTE/1g	
*	CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS: <10(2) UFC/g	<10 UFC/g
*DENSIDADE	APARENTE	0,2620 g/mL
	Ensaio adicional realizado pelo fabricante:	
AMONIO (NH4)	MAX. 0,02%	0,012%
ARSENICO	MAX 1 ppm	DE ACORDO
OUTROS	AMINOÁCIDOS: CROMATOGRAFICAMENTE NÃO DETECTADO	DE ACORDO
FERRO	MAX 10 ppm	5 ppm

MONOGRAFIA : AJI 92 PAG 105
 LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE CUMPRE COM AJI92
 MICROBIOLOGIA CUMPRE: USP 29 E FARM. EUROPÉIA 5ª EDIÇÃO.

Parecer Técnico : DENTRO DOS ITENS PESQUISADOS, O LOTE CUMPRE COM AS ESPECIFICACOES

OBS: (*)Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratorio de Controle de Qualidade DEG e os demais estao em conformidade c/o Certif.de Analise do Fabric



Dra. Cintia Mesquita Lima
Farmacêutica Responsável
CRF-SP: 25.721

Dra. Patricia Dornellas Giarreta
Farmacêutica Co-Responsável
CRF-SP: 31.746

As assinaturas são válidas somente quando acompanhadas de nota fiscal





ISO 14001
CUIDANDO TAMBEM DA NATUREZA

DEG IMPORTAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS LTDA.
Rua Jurupari 775 / 779 / 803 - Cep 04348.070 - Jd. Oriental - São Paulo - SP
Tel.: 11 5033.3700 - Fax: 11 5033.3711 - deg@deg.com.br - www.deg.com.br



Deg
ATIVANDO PRINCÍPIOS
1.3.0.0.0.1.2.0.0.0

Anexo II: Certificado do Comitê de Ética



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

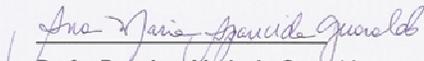
Certificamos que o Protocolo nº 1764-1, sobre "Modulação, pelo exercício físico e suplementação com leucina da via protéica em camundongos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / Morgana Rejane Rabelo Rosa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

CERTIFICATE

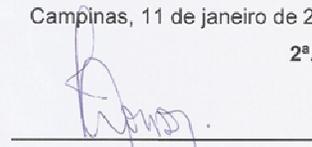
We certify that the protocol nº 1764-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on march 16, 2009.

Campinas, 11 de janeiro de 2011.

2ª. VIA



Profa. Dra. Ana-Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada "Modulação das vias de sinalização envolvidas na síntese protéica em camundongos: papel do treinamento aeróbio e da suplementação com leucina"

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Comissão de Ética na Experimentação, sob Protocolo(s) nº 1764-1
Animal CEEA/Unicamp.

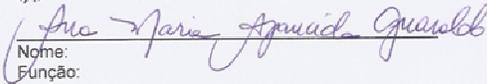
* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.


Aluno: Morgana Rejane Rabelo Rosa


Orientador: Everardo Magalhães Carneiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome:

Função:

Profª. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP