



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JOSÉ MARIA COSTA JUNIOR

**“MODULAÇÃO DO METABOLISMO MUSCULAR EM
CAMUNDONGOS EXERCITADOS E SUPLEMENTADOS COM
LEUCINA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
José Maria Costa Junior
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Aparecida Machado de Oliveira

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C823m Costa Junior, José Maria, 1981-
Modulação do metabolismo muscular em camundongos exercitados e suplementados com leucina / José Maria Costa Junior. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Everardo Magalhães Carneiro.
Coorientador: Camila Aparecida Machado de Oliveira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Camundongo - Exercícios. 2. Leucina. 3. Insulina. 4. Proteínas - Síntese. 5. Glicose - Metabolismo. I. Carneiro, Everardo Magalhães, 1955- II. Oliveira, Camila Aparecida Machado de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Modulation of muscle metabolism by exercise and leucine supplementation in mice

Palavras-chave em Inglês:

Mice - Exercises

Leucine

Insulin

Proteins - Synthesis

Glucose - Metabolism

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Everardo Magalhães Carneiro [Orientador]

Nelo Eidy Zanchi

José Rodrigo Pauli

Data da defesa: 03-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas 02 de março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro



Assinatura

Prof. Dr. Jose Rodrigo Pauli



Assinatura

Prof. Dr. Nelo Eidy Zanchi



Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle

Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura

Assinatura

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS:	9
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	14
MATERIAIS E MÉTODOS	15
Animais.....	15
Intervalo Entre as Sessões de Natação e as Coletas de Dados:.....	16
Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício	16
Peso Corporal	16
Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)	16
Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT).....	16
Teste de Esforço.....	16
Consumo Máximo de Oxigênio:.....	16
Avaliações Efetuadas Após o Sacrifício.....	17
Avaliações Efetuadas no Sangue	17
Avaliações Efetuadas em Tecidos	17
Atividade da Enzima Citrato Sintase:	17
Western Blotting.....	17
Síntese de Proteínas:	18
Degradação de Proteínas:	19
Quantificação do RNA mensageiro (mRNA) por Real-time PCR	20
Estatística	21
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO	50

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai e Mãe por me dar total apoio permitindo assim, que eu seguisse nos estudos. Dois grandes orientadores da vida.

Ao professor Everardo Magalhães Carneiro pela confiança e apoio.

A professora Camila Aparecida Machado de Oliveira, Coorientadora extremamente presente, paciente e eficaz.

Ao professor Leonardo Reis Silveira. (Obrigado pela indicação).

A professora Isis do Carmo Kettelhut (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto) e sua técnica Neuza pelo apoio dado com experimentos importantes.

Aos pós-doutorandos do laboratório que em muitos momentos participaram também, como “coorientadores não formais” Fernanda Ortis, Claudio Zoppi, Luiz Resende, Emerielle Vanzela.

Aos meus colegas de laboratório que auxiliaram demais e muito me ensinaram; Técnica Marise, André, Flavia, Sandra, Gustavo, Jane, Ana Paula, Junia, Jean, Tarlissa, Patricia Brandimarti e Nicole.

E aos demais colegas pela companhia agradável durante o dia-dia no laboratório; Thaís, Rafael, Renato, Thiago, Priscila, Débora, Luciana, Kelly, Patricia Borck.

As colegas do laboratório de sinalização celular Érica e Daniele Vitorino.

E a FAPESP pelo apoio financeiro.

“Porque para DEUS nada é impossível”

Lucas cap. 1 vers. 37.

RESUMO

Neste trabalho investigamos os efeitos do treinamento físico aeróbio de longa duração, associado ou não com a suplementação de leucina, sobre o metabolismo protéico e glicídico em músculo *soleus* de camundongos Swiss. Para isso, parte dos camundongos (T) realizou protocolo de 12 semanas de exercício de natação, com 1h de duração, 5 dias/semana, sem sobrecarga, e a outra parte permaneceu sedentária (C). Metade dos animais dos grupos C e T foram suplementados com leucina (1,5%) na água para beber (grupos CL e TL, respectivamente) ao longo do experimento. Os dados foram analisados pela ANOVA Two-Way (variáveis exercício e suplementação com leucina) e o teste post hoc de Newman-Keus foi empregado nos casos de interação das variáveis. Foi adotado um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Resultados: A área abaixo da curva glicêmica durante o teste de tolerância à glicose foi maior nos grupos suplementados com leucina (CL e TL). Já a sensibilidade à insulina, estimada pelo KITT, foi maior por efeito do exercício. A fosforilação da AS160, etapa distal da cascata de sinalização que leva a captação de glicose no músculo, foi maior no grupo T em relação aos demais tanto na condição basal quanto estimulada com insulina, provavelmente via AMPK, cuja fosforilação foi maior por efeito do exercício em ambas as condições, mas diminuída por efeito da suplementação com leucina após estimulação com insulina. A fosforilação da Akt não foi afetada pelo exercício, mas foi menor no grupo CL em relação aos demais. Apesar do maior peso do músculo soleus por efeito do exercício, a síntese protéica não diferiu entre os grupos, mesmo com a maior fosforilação da mTOR na condição basal no grupo CL, e a redução por efeito do exercício após estimulação com insulina. A degradação protéica no referido músculo, contudo, foi reduzida por efeito do exercício. A expressão gênica de isoformas específicas de E2 e E3 ligases, integrantes da via proteolítica ubiquitina-proteossoma, também foi menor por efeito do exercício. Todos os indicadores de resposta ao treinamento aeróbio foram aumentados por efeito do exercício: tempo até a exaustão em teste de esforço, o consumo máximo de oxigênio e atividade da enzima citrato sintase. Alguns destes indicadores também sofreram interferência da suplementação. Concluimos que a suplementação com leucina pode prejudicar a homeostase glicêmica e reduzir os efeitos positivos do exercício sobre a sinalização insulínica. O exercício aumentou o peso do músculo soleus ao diminuir a degradação protéica por inibição da via proteolítica ubiquitina-proteossoma, enquanto a síntese protéica não foi afetada por nenhum tratamento (exercício ou suplementação com leucina).

ABSTRACT

We investigated the effects of chronic physical training, associated or not with leucine supplementation, on protein and glucose metabolism in soleus muscle of Swiss mice. Half of the mice (T) performed a 12 weeks protocol of swimming exercise, 1h/day, 5 days/week, bearing no overload, and the other half remained sedentary (C). Additionally, half of the C and T mice were supplemented with leucine (1,5%) into the drinking water (groups CL and TL, respectively) throughout the experiment. Data were analysed by Two-Way ANOVA (variables exercise and leucine supplementation) and the Newman-Keus post hoc test was used in the cases of interaction between the variables. A $p < 0,05$ was considered statistically significant. Results: The area under glucose curve during glucose tolerance test was increased in the leucine supplemented groups (CL and TL). Insulin sensitivity, estimated by kITT, was higher as an effect of exercise. AS160 phosphorylation, a distal step in the signaling pathway which leads to muscle glucose uptake, was increased in the T group compared to the others in both basal and insulin-stimulated condition, probably via AMPK, whose phosphorylation was increased by exercise in both conditions, but it was reduced by an effect of leucine supplementation following insulin stimulation. Akt phosphorylation was not affected by exercise, but it was reduced in the CL group compared to the other groups. Despite the increased weight of soleus muscle caused by an effect of exercise, protein synthesis was similar among the groups, even with the increased mTOR phosphorylation at the basal condition in the CL group, and the reduction caused by exercise following insulin stimulation. Protein degradation in the soleus muscle was reduced by an effect of exercise. Gene expression of specific isoforms of E2 and E3 ligases, members of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, was also reduced by an effect of exercise. All the indicators of response to aerobic training were increased by exercise: time to exhaustion in the effort test, maximal oxygen uptake and citrate synthase enzyme activity. Some of these indicators were also affected by leucine supplementation. We conclude that leucine supplementation may impair glucose homeostasis and reduce the positive effects of exercise on insulin signaling. Exercise increased soleus muscle weight by reducing protein degradation via an inhibition of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, whereas protein synthesis was not affected by either of the treatments (exercise or leucine supplementation).

LISTA DE ABREVIATURAS:

AMP	-	-Adenonesine Monophosfate
AMPK	-	-AMP Activated Protein Kinase
AS160	-	- Akt Substrate 160 Kda
ATP	-	-Adenosine Triphosfate
CaMKII	-	- Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II
EIF4A	-	- Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A
EIF4E	-	- Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
FOXO	-	- Forkhead Box Protein
GAPDH	-	-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GLUT-4	-	-Glucose Transporter Type 4
GTP	-	-Guanine Triphosfate
IR	-	- Insulin Receptor
IRS-1	-	- Insulin Receptor Substrate Subunit-1
IR β	-	- Insulin Receptor β Subunit
LKB-1	-	- Liver Kinase B 1
MAFBX	-	- Muscle Atrophy F-Box
mRNA	-	- Messenger Ribonucleic Acid
MTOR	-	-Mammalian Target of Rapamycin
MURF-1	-	-Muscle Ring Finger -1
P70S6K	-	- 70 KDa Ribossomal Protein S6 Kinase 1
PDK	-	- Phosphoinositide Dependent Kinase
PGC1- α	-	-Peroxisome Proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha

Pi3K	-	- Phosphoinositide 3-Kinase
PKC	-	-Protein Kinase C
PSMB-7	-	- Proteosome Subunit Member 7
RAC1	-	- Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
SER	-	- Serine
SUP	-	-Sistema Ubiquitina Proteossomo
TBC1 D1	-	- TBC member family, member 1
TBC1 D4	-	- TBC member family, member 4
THR	-	- Threonine
TYR	-	- Tyrosine
UBE2K	-	- Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 K
UCHL1	-	- Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L 1

INTRODUÇÃO

Em extensa revisão, (Booth, Chakravarthy *et al.*, 2002) e (Pedersen, 2006) apresentam evidências científicas para uma relação entre inatividade física e diversas doenças crônicas, incluindo doenças respiratórias e cardiovasculares, câncer, disfunção imune, desordens músculo-esqueléticas e neurais, e doenças metabólicas, tais como obesidade, dislipidemia e diabetes tipo 2, evidenciando dessa forma a grande importância da realização da atividade física de forma regular e constante.

Apenas recentemente os mecanismos envolvidos nas adaptações ao exercício vêm sendo elucidados. No que diz respeito às respostas musculares, exercícios com características distintas, como endurance e treinamento de força, ativam vias de sinalizações celulares diferentes que geram adaptações no sentido de aumentar a produção de energia ou aumentar a síntese de proteínas, respectivamente. No primeiro caso, exercício aeróbico ou de endurance, uma das proteínas-chave nessa resposta é a AMPK, que é ativada em situações em que a razão AMP/ATP está elevada. No outro é a via da mTOR que se torna mais ativa, favorecendo a síntese proteica global (Nader, 2006).

Outra resposta importante ao exercício é a inibição da degradação proteica, ou proteólise. Esse é um efeito bastante importante, principalmente se levarmos em conta o fato de o tecido muscular ser metabolicamente muito ativo e corresponder a cerca de 40% da massa corporal (Foletta, White *et al.*, 2011). Dentre as diversas vias de degradação proteica, em situações de desuso muscular o sistema de degradação ubiquitina-proteassoma (SUP) é muito ativado, e o exercício parece ser capaz de reduzir a atividade dessa via (Jones, Hill *et al.*, 2004; Dupont-Versteegden, Fluckey *et al.*, 2006).

Por outro lado, os aminoácidos de cadeia ramificada demonstram ser agentes anabólicos muito eficazes, especialmente a leucina, e sua ação parece estar relacionada a ativação da via mTOR (Deldicque, Theisen *et al.*, 2005). Além disso, esse aminoácido modula a secreção de insulina, importante hormônio anabólico (Filiputti, Rafacho *et al.*, 2010; De Oliveira, Latorraca *et al.*, 2011).

A leucina também têm sido estudada como possível agente anti-atrófico e dentro deste contexto, alguns estudos têm reportado a sua eficácia em inibir a degradação muscular via modulação da via SUP, induzida por diferentes intervenções, tais como, tratamento com

dexametasona e imobilização de membros inferiores de animais. (Nicastro, et al, 2011, Baptista, et al., 2010).

As três vias de sinalização citadas, da AMPK, mTOR e SPU, em algum ponto sofrem interferência uma das outras. A AMPK inibe a via da mTOR, reduzindo dessa forma a síntese protéica (Nader, 2006). O exercício de força via Akt (Winder, Taylor *et al.*, 2006), e também a suplementação com leucina em ratos idosos (Combaret, Dardevet *et al.*, 2005) se mostraram capazes de inibir ou diminuir a atividade do SUP no músculo. O exercício de endurance (via PGC-1 α /FOXO) também pode ter um papel nesse sentido (Favier, Benoit *et al.*, 2008). Entretanto, ainda não sabemos se a interação da suplementação com leucina concomitante ao exercício de *endurance* crônico resultaria em uma possível potencialização dos efeitos inibitórios sobre a via do SUP.

O exercício também exerce influencia na homeostase glicêmica, aumentando a captação de glicose por mecanismos independentes de insulina, como o observado durante a execução do exercício agudo (aumento da captação de glicose induzida por contração muscular) e pode também aumentar a sensibilidade á insulina por vias de sinalização celulares que diferem da via clássica da cascata insulínica (IR-IRS-PI3K-PDK-AKT). (Zierath, 2002; Frøsig e Richter, 2009). Outros estudos sugerem possíveis candidatos para o aumento na sensibilidade à insulina induzida pelo exercício físico e apontam evidências para as proteínas RAC1, TBC1 D4, TBC1 D1, CAMKKII, AMPK, aPKC e mencionam ainda outras alterações fisiológicas, como por exemplo modificações vasculares no musculoesquelético, (Maarbjerg, et al., 2011).

A suplementação com leucina também pode afetar o controle glicêmico alterando a captação de glicose basal ou estimulada por insulina (Balage, Dupont *et al.*, 2011)(Macotela, Emanuelli *et al.*, 2011). Nos estudos de Balage, et al., 2011, foi demonstrado que 5 semanas de tratamento com leucina induzia um atraso na fosforilação das proteínas IR β , IRS-1 e atividade da PI3K em ratos. Enquanto que no trabalho de Macotela, et al., 2011., os pesquisadores mostraram uma melhora no controle glicêmico de animais obesos suplementados com leucina. Esta discrepância entre os resultados encontrados em diferentes trabalhos pode resultar no fato de que os estudos são muito heterogêneos com relação ao tipo de tratamento; dosagem administrada do suplemento, grupo de animais utilizados, espécie utilizada etc. Esta realidade se torna ainda mais relevante quando observamos os resultados encontrados em um estudo que demonstrou que a privação de leucina, melhorava a via de sinalização insulínica em hepatócitos de camundongos

por inibir a via mTOR/p70S6K como também, através do aumento da atividade da AMPK e que estas alterações moleculares repercutiam na melhora da homeostase glicêmica dos animais (Xiao, et al., 2011).

Quando nos referimos a análise de ambas as intervenções (exercício físico e suplementação com leucina) sobre a homeostase glicêmica os dados na literatura são ainda mais escassos, entretanto podemos encontrar o trabalho realizado por (Iwanaka, Egawa *et al.*, 2010) que analisaram o efeito da suplementação com leucina na captação de glicose durante o exercício agudo e sugeriu que ambas as intervenções exerciam impacto nas vias AMPK e mTOR.

Dessa forma nosso estudo visa investigar em camundongos os efeitos do exercício crônico de natação, com características aeróbias, e a suplementação com leucina, sobre o metabolismo de glicose e proteínas no músculo esquelético bem como as principais vias envolvidas na regulação desses processos (AMPK, Akt/mTOR e SPU).

OBJETIVOS

Este estudo foi delineado para avaliar as alterações moleculares e funcionais induzidas pelo treinamento físico de *endurance* e suplementação com leucina sobre o metabolismo muscular proteico e glicídico de camundongos Swiss.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos (fêmeas) da linhagem Swiss, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, com 21 dias de vida. Os camundongos foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Purina) e água “ad libitum”, e foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas (3 por gaiola) à temperatura ambiente de 25 °C e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- a) **Controle (C):** camundongos alimentados do desmame (21 dias) até a idade adulta (120 dias) com ração comercial;
- b) **Treinado (T):** camundongos alimentados do desmame (21 dias) até a idade adulta (120 dias) com ração comercial e treinados por natação dos 30 aos 120 dias;
- c) **Controle - Suplementado (CL):** camundongos alimentados do desmame (21 dias) até a idade adulta (120 dias) com ração comercial e suplementados com 1,5% de leucina via oral (na água para beber);
- d) **Treinado - Suplementado (TL):** camundongos alimentados do desmame (21 dias) até a idade adulta (120 dias) com ração comercial e suplementados com 1,5% de leucina via oral (na água para beber) e treinados por natação dos 30 aos 120 dias;

O treinamento físico consistiu de 12 semanas de exercício de natação em tanques coletivos, 50 cm x 80 cm x 120cm contendo água à 30-32°C, com 35 cm de profundidade, 5 dias por semana, com sessões de 1 hora de duração, sem sobrecarga.



A suplementação foi realizada de acordo com outros trabalhos do grupo; (da Silva, et al, 2011; Filiputti, et al, 2010). com 1,5% de leucina “ad libitum” diluído na água de beber.

Intervalo Entre as Sessões de Natação e as Coletas de Dados:

Todas as demais análises citadas abaixo foram realizadas 48 horas após a última sessão de exercício físico na água.

Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício**Peso Corporal**

Os animais tiveram o peso corporal registrados semanalmente.

Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT)

Os camundongos foram mantidos em jejum por 12h e após a verificação da glicemia de jejum com o aparelho Accu-Check Advantage II, foi administrada na cavidade peritoneal uma solução de glicose 20% (2,0 g/Kg de peso corpóreo). As glicemias foram verificadas nos tempos 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. As áreas sob as curvas de glicose sanguínea ($\Delta G = \text{mM} \cdot 180 \text{min}^{-1}$) durante o GTT foram calculadas pelo método trapezoidal (Mathews et al., 1990) utilizando o Software ORIGIN 6.0 (1999). Coletamos sangue por drenagem caudal nos tempos 0, 30 e 60 para análise da insulinemia que foi dosada através de kit de Eliza marca Milipore.

Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Após a verificação da glicemia de jejum (6 horas) com o aparelho Accu-Check Advantage II, foi administrado na cavidade peritoneal 1,5U/kg de peso corpóreo de insulina regular humana. A glicemia foi verificada nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos. A razão constante do clearance da glicose (*kitt*), foi calculada usando a fórmula $0.693/t_{1/2}$. A glicose $t_{1/2}$ foi calculada usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear.

Teste de Esforço

Os animais foram submetidos à um teste de esforço, que consistiu da avaliação do tempo máximo de permanência em exercício de natação, sem submergir por tempo maior que 4 segundos. Nesse teste, os animais foram avaliados individualmente, em tanque com as mesmas dimensões do utilizado no treinamento, com água a temperatura de 30-32°C. Os camundongos do grupo não exercitados passaram por um período de adaptação ao meio aquático (3 min. por 5 dias consecutivos antes do teste).

Consumo Máximo de Oxigênio:

O VO₂ máx. foi medido em esteira metabólica totalmente selada, (Pan Lab/Harvard instruments, Barcelona, Espanha) com 25° de inclinação, acoplada ao sistema de respirometria

Oxylet system (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha). Os valores do consumo de oxigênio foram coletados utilizando o software Metabolism[®] (Pan Lab/Harvad instruments, Barcelona, Espanha), acoplado ao sistema. Considerou-se o valor de VO₂ máx. quando a curva de consumo de O₂ atingiu um platô, a despeito do aumento da velocidade da esteira. Os animais caminharam por 8 minutos (tempo médio necessário para a estabilização da concentração de oxigênio e calibração automática do equipamento). O teste foi iniciado com uma velocidade de 15 m/seg. e foi acrescido mais 15 m/seg a cada 45 seg. O teste era interrompido quando os animais paravam de correr ou quando passavam a se apoiar na base inferior da esteira, conforme protocolo descrito por Rezende et al. (2006).

Avaliações Efetuadas Após o Sacrifício

Avaliações Efetuadas no Sangue

O plasma foi separado por centrifugação a 1800 rpm por 15 minutos à 4°C e foi armazenado a -20 °C para posterior determinação da concentração de insulina por kit de Eliza da marca milipore.

A dosagem plasmática de leucina foi determinada no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, sendo às amostras submetidas à hidrólise ácida e aplicadas em um analisador automático de aminácidos a concentração foi detectada colorimetricamente e então quantificada.

Avaliações Efetuadas em Tecidos

Atividade da Enzima Citrato Sintase:

A atividade da enzima citrato sintase foi determinada segundo o método descrito por Srere (1969). O sistema de reação continha: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 100,0 uM, acetil CoA 300,0 uM e aproximadamente 20,0 ug de proteína mitocondrial. A absorção a 412 nm foi acompanhada por 3 minutos para medir a possível desacilação do acetil-CoA, sendo posteriormente a reação iniciada pela adição de 500,0 uM de oxaloacetato. A velocidade de formação dos grupos SH livres correspondente ao CoA-SH e sua complexação com o DTNB, gerando um íon mercaptídeo foi monitorada em 412 nm, onde o produto formado apresenta forte absorção. A atividade específica foi expressa em nanomoles de CoA-SH formado por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do íon mercaptídeo.

Western Blotting

Os animais foram anestesiados e o músculo *sóleus* do membro esquerdo foi extraído. Em seguida foi administrada uma injeção contendo 10 unidades de insulina humana (100µl de

insulina) na veia cava e após 2 min o músculo *sóleus* do membro inferior direito foi retirado (Arruda, Milanski *et al.*, 2011). O tecido foi homogeneizado em tampão de homogeneização (0,3 M Tris, pH 8,0, 0,1 mL NaCl, 10 mM EDTA, 0,2 M sacarose e 0,01% SDS). Os extratos obtidos tiveram o seu conteúdo protéico quantificado pelo método de Bradford (1976). Cerca de 30 µg/µL de proteína/amostra foram separadas por eletroforese gel SDS-PAGE 10% (Hybond, Amersham) em aparelho minigel (Miniprotean) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Após corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45µm (BioRad). Esta foi incubada por 2 h em solução bloqueadora de leite desnatado (5%) para diminuir a ligação inespecífica das proteínas. As proteínas foram detectadas na membrana de nitrocelulose por incubação durante 2 h, à temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal específico para as diferentes proteínas em estudo; p-AKT (Thr-308), p-mTOR (Ser-2448), p-AS160 (thr-642), p-AMPK (Thr-172), p-FOXO3a (Ser-253) e GAPDH como controle interno. Após o tempo de incubação, os anticorpos primários foram removidos e posteriormente realizada a lavagem das membranas. Em seguida as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP (Invitrogen), diluído 1:1000 em leite desnatado 5%, por 2h. Após lavagem, as membranas foram incubadas em solução reveladora Super Signal (Pierce) e colocadas junto a filmes radiográficos (Kodak) para auto-radiografia. A intensidade das bandas foram avaliadas por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

Síntese de Proteínas:

A síntese total de proteínas foi determinada em músculos *soleus* de camundongos alimentados. Os músculos foram incubados com seus tendões fixos a suportes apropriados para manutenção dos seus comprimentos de repouso, em tampão Krebs Ringer Bicarbonato, contendo glicose (5 mM) e todos os vinte aminoácidos, em concentrações semelhantes às encontradas no plasma de camundongos, conforme apresentadas na tabela 1.

Tabela 1:

Aminoácidos	Concentração (mM)	Aminoácido	Concentração (mM)
Ác. Aspártico	0,035	Isoleucina	0,100
Ác. Glutâmico	0,174	Leucina	0,170
Alanina	0,450	Lisina	0,400
Arginina	0,200	Metionina	0,070
Asparagina	0,061	Prolina	0,180
Cisteína	0,070	Serina	0,280
Fenilalanina	0,500	Tirosina	0,100

Após um período de 1 hora de pré-incubação, o meio de incubação foi substituído por meio idêntico acrescido de traços de tirosina marcada ([U-14C] tirosina; 0,05 μ Ci/mL), tendo permanecido os músculos incubados por um período final de 2 horas. Em seguida, os músculos foram removidos de seus suportes e lavados com água destilada fria, secos em papel de filtro e colocados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após homogeneização e centrifugação a 1800g por 10 minutos, 1 ml do sobrenadante foi utilizado para a avaliação da tirosina livre total no músculo e uma alíquota de 100 μ l foi usada na medida da radioatividade, para a determinação da atividade específica da tirosina de cada músculo separadamente. Posteriormente, o precipitado foi lavado 3 vezes com 2 mL de TCA 10%. A dissolução do precipitado final foi obtida pela adição de 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, a temperatura ambiente por 12 horas ou em banho-maria a 40°C por 2 horas. A seguir, foram adicionados 10 mL de coquetel de cintilação para contagem da radioatividade em espectrômetro de cintilação líquida (TRI-CARB 2100TR, Packard BioScience Company, EUA).

Degradação de Proteínas:

Os camundongos foram sacrificados por decapitação e os músculos *soleus* foram mantidos no seu comprimento de repouso por meio de suportes específicos que os prenderam pelos tendões. Todos os músculos foram imediatamente incubados a 37°C no tampão Krebs-

Ringer bicarbonato (0,120M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃; 4,828 mM de KCl; 1,2 mM de MgSO₄; 1,212 mM de KH₂PO₄; 2,4 mM de CaCl₂; pH 7,4; 95% O₂ 5% CO₂), contendo glicose (5 mM) e cicloheximida (0,5 mM). Os músculos foram então pré-incubados por 1 hora e incubados por mais 1 hora em um novo meio de mesma composição. Logo após, 1 ml do meio foi coletado e adicionado a 0,25 ml de ácido perclórico 1,5 N. Colocou-se 1,5 ml de um reagente formado por partes iguais de nitroso naftol e ácido nítrico. Então, as amostras foram para banho a 55° C por 30 minutos. Logo após, 5 ml de clorofórmio foram adicionados às amostras que foram agitadas vigorosamente. Por fim, foi realizada a centrifugação destas (10 minutos; 24° C; 2500 rotações por minuto) e foi coletado somente o sobrenadante em uma cubeta de quartzo para leitura no fluorômetro.

Quantificação do RNA mensageiro (mRNA) por Real-time PCR

Inicialmente as células musculares foram lisadas usando Trizol (1 ml). Três µg de RNA foram submetidos à reação de transcrição reversa (RT) para obtenção de cDNA. A reação foi composta por primers randômicos, enzima transcriptase reversa, dNTPs e tampão específico, mantidos por 10 min à 25°C, 120 min à 37°C, 5 seg à 85°C e para finalizar um resfriamento à 4°C. A reação de PCR quantitativo foi de um volume final de 15µl, composta por 0.5µl de cDNA, 10 µmol/l de cada primer e 7.5µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram de 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos à 95°C por 10 seg e 60°C por 45 seg. As curvas de amplificação foram analisadas utilizando-se o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). Os primers foram desenvolvidos e testados contra o genoma *Mus Musculus* (Gene Bank) para permitir a amplificação somente dos genes de interesse. Os resultados estão apresentados como % do controle a partir do valor de RQ (Relative Quantity), que obedece a fórmula matemática $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. O valor de $\Delta\Delta CT$ compreende a diferença entre o valor do ciclo da amostra em que se inicia a fase exponencial da curva de amplificação do gene em análise normalizado pelo valor do ciclo do gene utilizado como controle endógeno e o valor do ciclo da amostra referência em que se inicia a fase exponencial da curva de amplificação do gene em análise (Roma, Bosqueiro *et al.*, 2009). Os primers utilizados estão descritos na tabela 1.

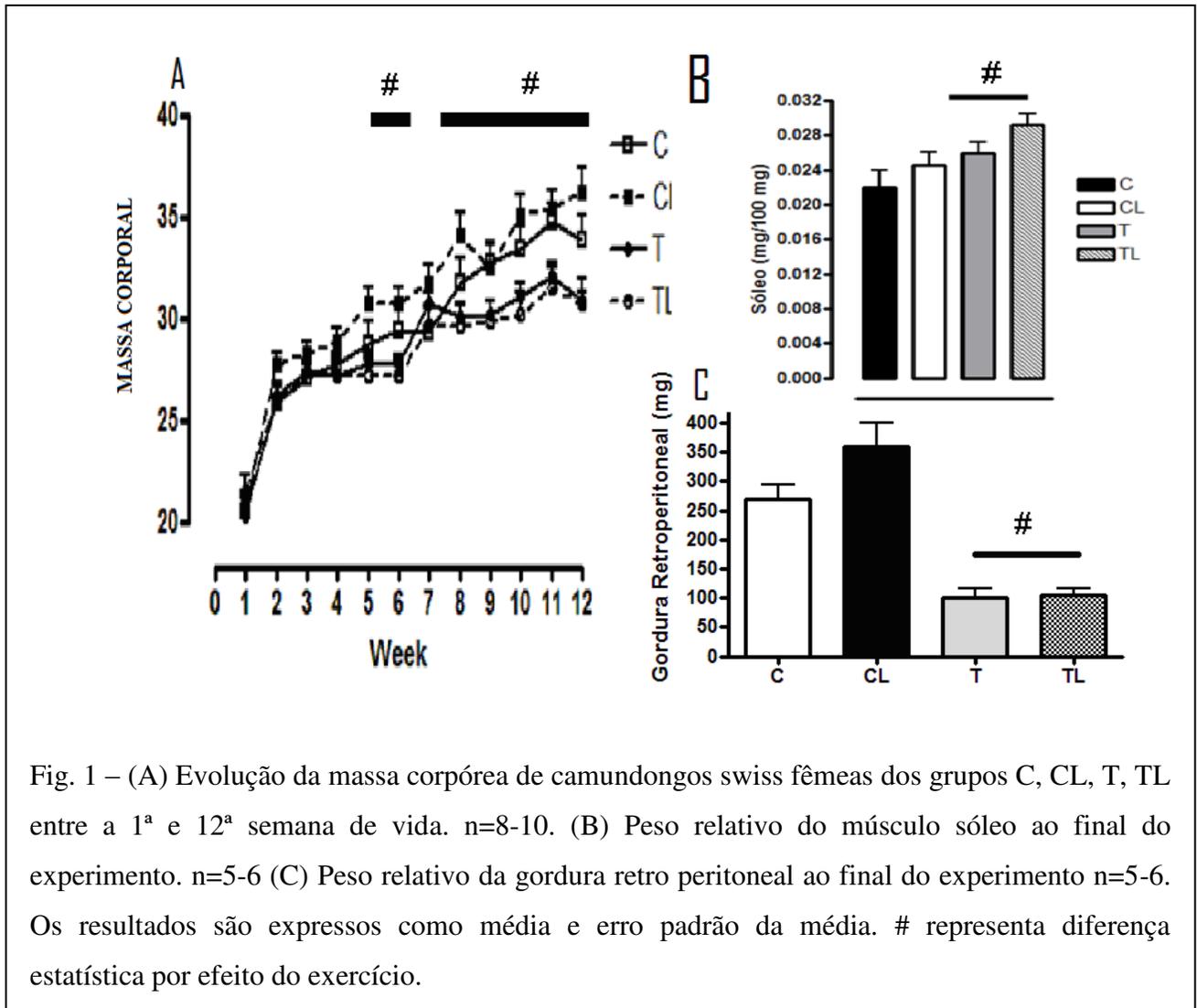
Nome do Gene	Foward 5'	Reverse 5'
MURF-1	5'- GACTCCTGCAGAGTGACCAAG	5'- CTTCTACAATGCTCTTGATGAGC
PGC-1 α	5'-CCGTAAATCTGCGGGATGATG	5'-CAGTTTCGTTTCGACCTGCGTAA
UBE2K	5'- GCGTTTCGTGTGCTCGGGTC	5'- CTCCTCCGCCACCGCTACGA
PSMB7	5'- TGCCGCAGGAATGCGGTCTTG	5' - AGACCACCCCCGCGATGGTA
UCHL1	5' - GGCCTTTGCCGACGTGCTA	5' - TTTTCATGCTGGGCCGTGAGGG

Estatística

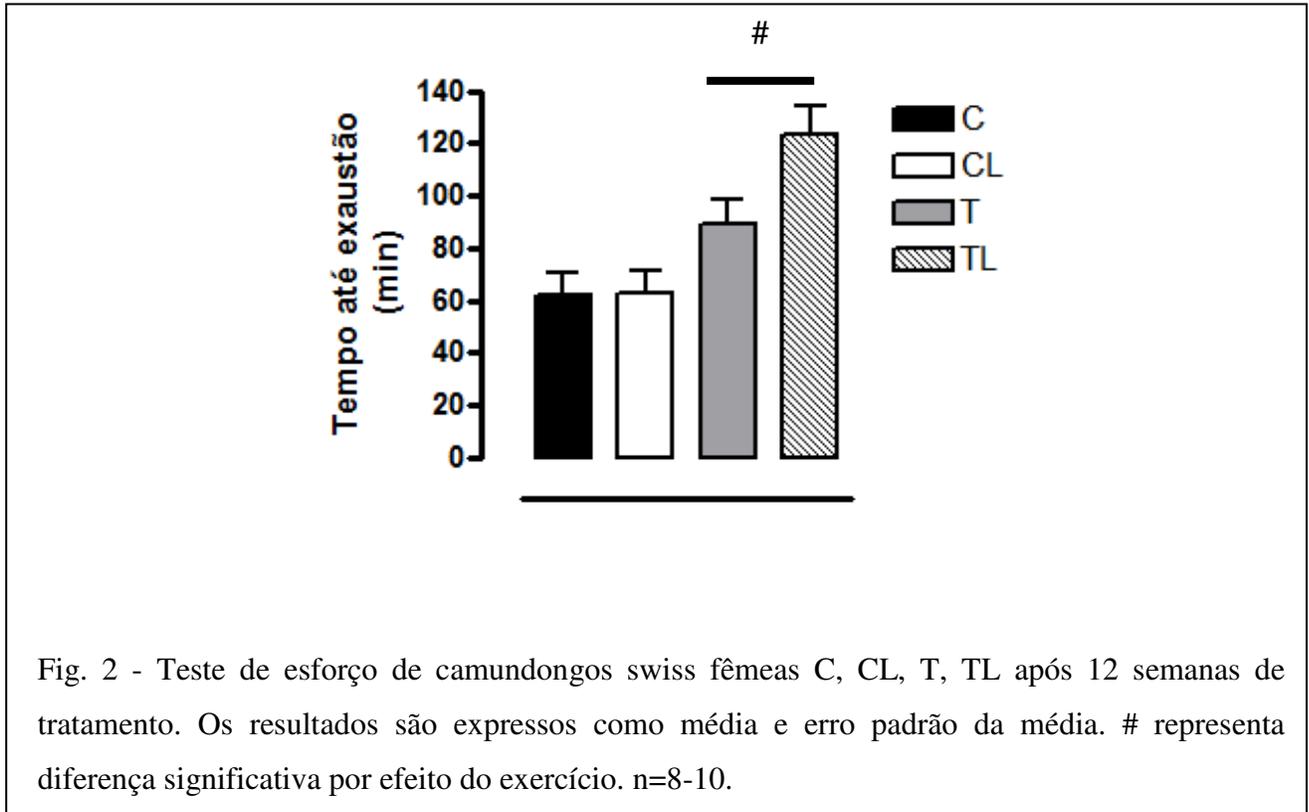
Os resultados estão expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). Antecedendo a aplicação da análise paramétrica ANOVA Two-Way (variáveis exercício e suplementação com leucina), os dados foram checados quanto a homogeneidade de variância e normalidade com os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors), respectivamente. Para correção de heterogeneidade de variância ou não normalidade, os dados foram transformados em logaritmo antes de serem submetidos ao teste paramétrico. Efeitos significantes da variável “exercício” são representados pelo símbolo #, e da variável “suplementação com leucina”, pelo símbolo \$. Nos casos de detecção de interação entre as duas variáveis pela ANOVA Two-Way, o teste post hoc de Newman-Keuls foi empregado, e letras foram utilizadas para mostrar diferença estatística entre os grupos (letras diferentes indicam diferença estatística). $p < 0.05$ foi considerado significativo estatisticamente.

RESULTADOS

Na figura 1 apresentamos os dados do peso corporal (A), peso relativo do músculo sóleo (B) e peso relativo da gordura retro peritoneal (C) nos grupos C, CL, T e TL. Demonstramos que o ganho de peso foi significativamente menor nos animais treinados, a partir da 5ª semana (Figura 1A). Houve um efeito do exercício também sobre os valores de peso relativo do músculo sóleo e peso relativo da gordura retroperitoneal. Como mostra a figura 1B, o peso relativo do músculo sóleo foi significativamente maior nos animais treinados. Já o peso relativo da gordura retro peritoneal foi significativamente menor nos grupos treinados (Figura 1C). A suplementação com leucina não foi capaz de induzir alterações nesses parâmetros.



Realizamos diversas análises para testar a eficiência do nosso protocolo de treinamento, inclusive um teste de esforço em natação nos grupos C, CL, T e TL. Na fig.2 podemos observar que o treinamento induziu um aumento significativo na tolerância ao esforço físico nos grupos T e TL.



Avaliamos também o consumo máximo de oxigênio nos grupos C, CL, T e TL. Houve efeito do exercício e interação entre as duas variáveis estudadas, exercício e suplementação com leucina. A suplementação com leucina aumentou o VO_2 máx no grupo CL em relação ao C. O treinamento aumentou o VO_2 máx de forma semelhante entre os grupos T e TL, que foi maior que nos grupos C e CL. Fig.3.

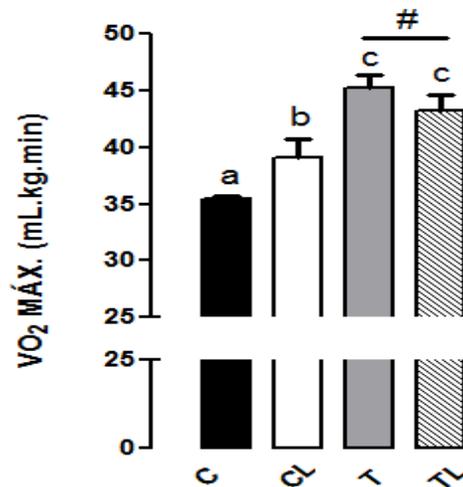


Fig. 3 - Teste de consumo máximo de oxigênio em camundongos swiss fêmeas C, CL, T, TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # representa diferença significativa por efeito do exercício. Letras diferentes apontam diferença em relação as demais letras n=5.

Ainda com o mesmo objetivo, testar a eficiência do protocolo de treinamento, realizamos a análise da atividade da enzima citrato sintase em musculo *sóleus* de camundongos swiss nos grupos C, CL, T e TL. Verificamos que os animais treinados tiveram um aumento significativo na atividade da enzima citrato sintase e que a suplementação com leucina potencializou este efeito nos animais TL. Fig- 4.

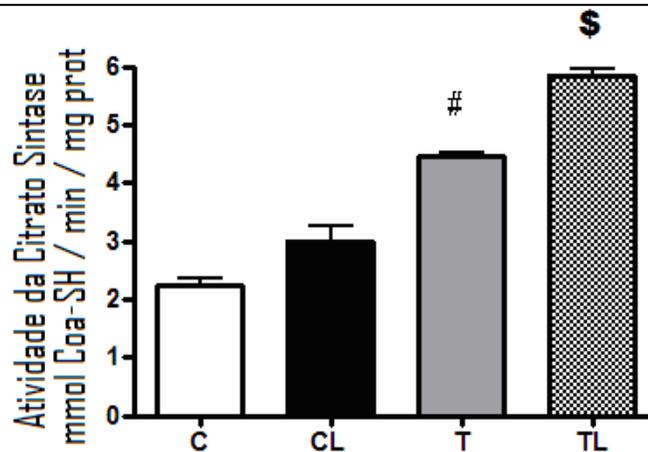


Fig. 4 – Atividade da enzima citrato sintase de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T, TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # representa diferença significativa por efeito do exercício. & representa diferença estatística e efeito somatório do exercício com a suplementação n=4-5.

Na figura 5 - apresentamos os valores da leucinemia de jejum nos grupos C, CL, T e TL. A suplementação com leucina induziu aumento significativo nos níveis de leucina plasmática nos grupos tratados (CL e TL).

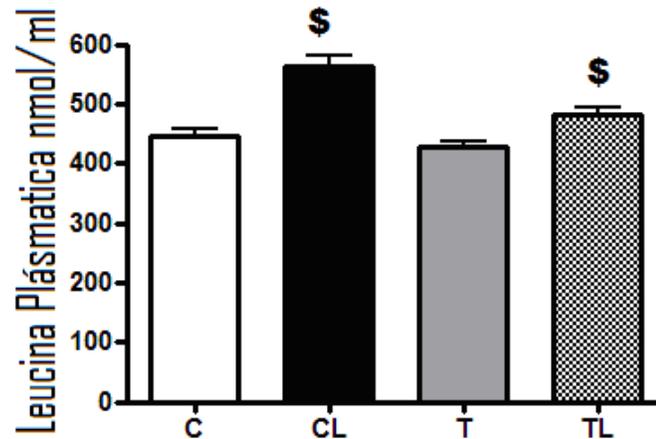
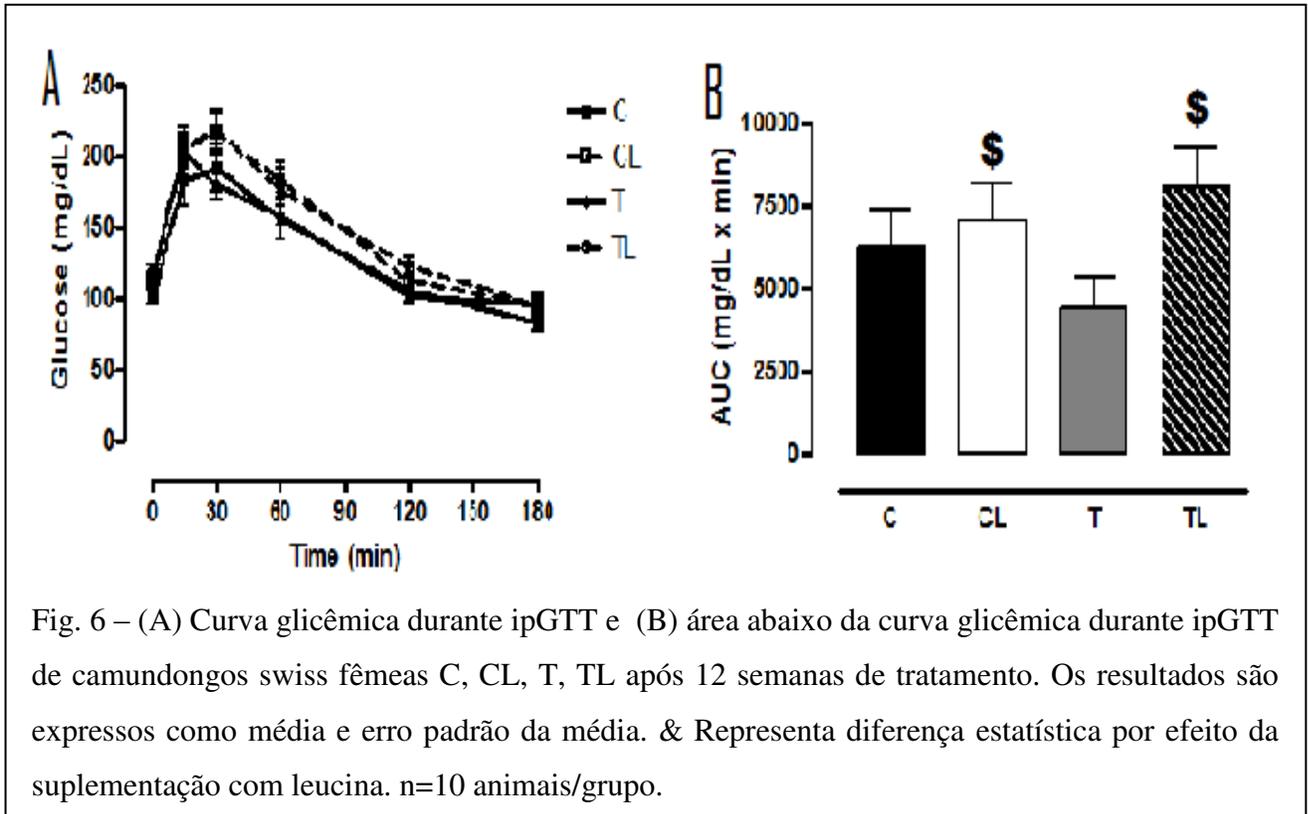
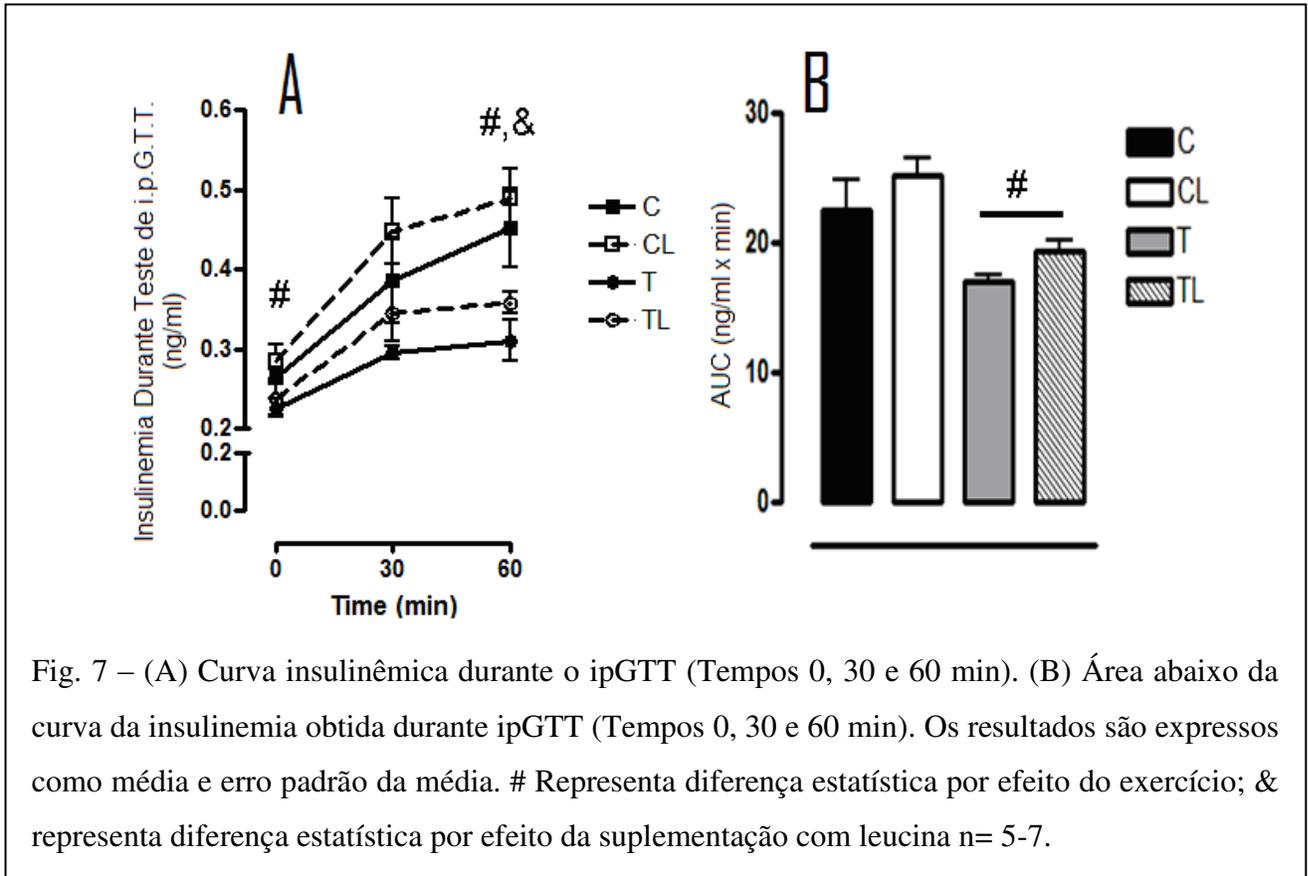


Fig.5 - Concentração de leucina plasmática de camundongos swiss fêmeas C, CL, T, TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. & representa diferença significativa por efeito da suplementação com leucina n=5 animais/grupo.

Diversos experimentos funcionais foram realizados para analisar o controle glicêmico dos grupos estudados C, CL, T e TL. Na Figura 6^a apresentamos os valores da glicemia durante teste de tolerância à glicose (ipGTT). Observamos efeito prejudicial da suplementação com leucina na tolerância a glicose, demonstrado pela maior área abaixo da curva glicêmica durante ipGTT dos animais CL e TL (Figura 6B).



Analisamos também, a insulinemia durante o ipGTT nos grupos C, CL, T e TL. Observamos que o exercício induziu uma diminuição da concentração plasmática de insulina nos tempos 0 e 60 do ipGTT, enquanto a suplementação com leucina gerou aumento significativo nesse parâmetro no tempo 60 do referido teste. fig.7A. Já na fig.7B podemos notar que houve efeito significativo apenas do exercício na AUC de insulina durante o ipGTT.



Realizamos também, teste de tolerância à insulina (ipITT) nos grupos C, CL, T e TL. Na figura 8B - encontram-se os valores do kITT dos mesmos grupos, calculados à partir dos valores glicêmicos mostrados na fig.8A. Verificamos efeito significativo do treinamento sobre a sensibilidade à insulina, com maior valor de kITT nos grupos T e TL, um indicativo de maior sensibilidade ao hormônio nos grupos treinados.

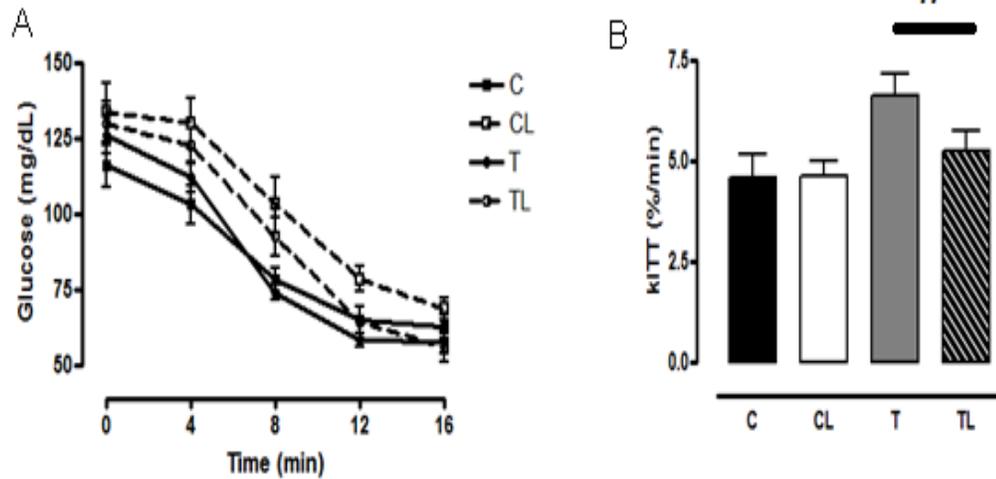


Fig. 8 – Curva glicêmica durante teste de tolerância à insulina (A) e (B) valores de kITT de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T, TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # Representa diferença estatística por efeito do exercício n=8-10.

Para complementar os experimentos funcionais fizemos análises ao nível molecular. Resolvemos dosar a expressão protéica da p-AKT (Thr-308) no músculo *sóleus* nos grupos C, CL, T e TL. Para avaliar se os tratamentos modulavam a via de sinalização insulínica. A ANOVA apontou interação entre os efeitos do exercício e da suplementação com leucina tanto na condição basal quanto na estimulada com insulina. O teste pos hoc indicou que a expressão protéica da p-AKT (Thr-308) em condições basais estava diminuída em relação ao controle nos grupos CL e T. Na condição estimulada com insulina observamos diminuição da fosforilação da AKT no grupo CL. Fig.9.

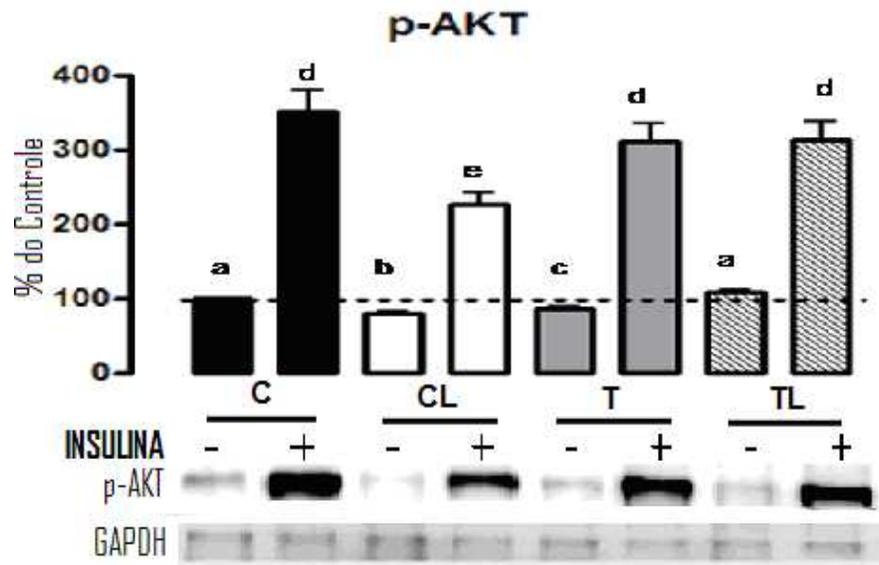


Fig. 9 – Expressão da p-AKT (Thr-308) em condição basal (-) e estimulada com insulina (+) (10 unidades via veia cava) no músculo soleus de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. n=3.

Existem outras proteínas que interferem nas funções biológicas investigadas em nosso estudo, como por exemplo a p-mTOR (Ser-2448). Nós avaliamos o nível de expressão proteica da p-mTOR (Ser-2448) no músculo *sóleus* nos grupos C, CL, T e TL, e observamos que na condição não estimulada houve interação entre os efeitos do exercício e suplementação com leucina. O teste pos hoc indicou que a expressão protéica da p-mTOR (Ser-2448) em condições basais foi significativamente maior no grupo CL. Já na condição estimulada com insulina, houve apenas efeito significativo do exercício sobre a fosforilação da mTOR (Ser-2448). Observamos uma diminuição na expressão da referida proteína nos grupos T e TL. Fig.10.

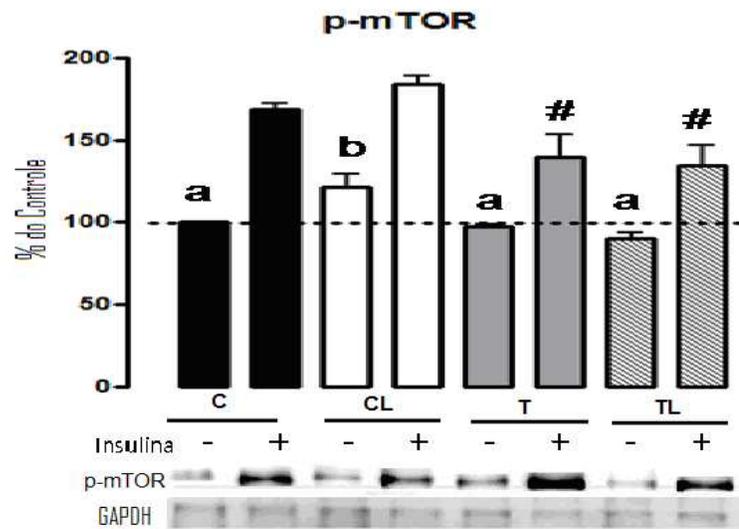
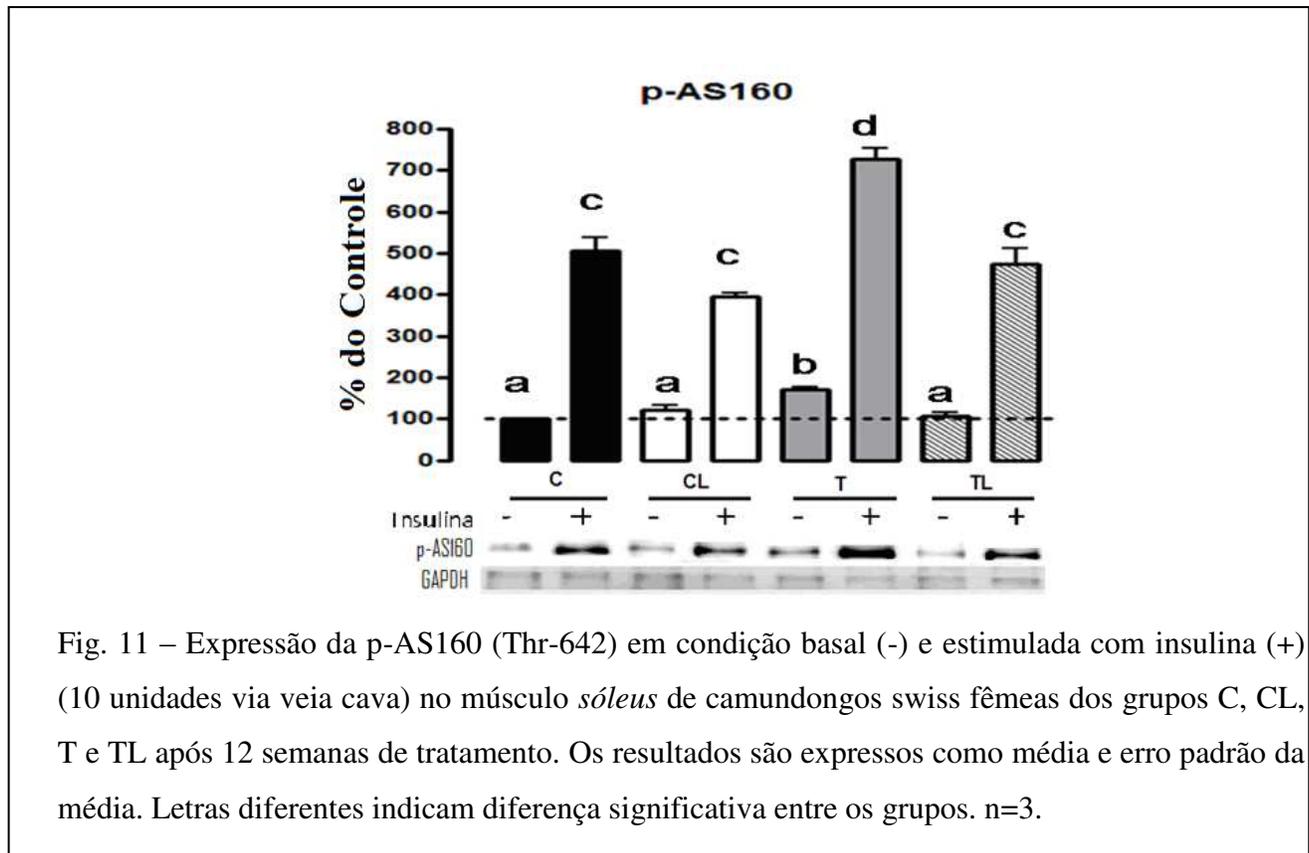


Fig. 10 – Expressão protéica da p-mTOR (Ser-2448) no músculo soleus em condição basal (-) e estimulada com insulina (+) (10 unidades via veia cava), em camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # Representa diferença significativa por efeito do exercício. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. n=3.

A proteína AS-160 (Thr-642) é conhecida como o ponto de convergência entre a cascata insulínica e vias que induzem a captação de glicose de forma independente de insulina, daí a importância da dosagem da referida proteína em nosso estudo. Nós avaliamos o nível de expressão da p-AS-160 (Thr-642) em músculo *sóleus* dos grupos C, CL, T e TL. A ANOVA apontou efeitos do exercício, da suplementação com leucina, e interação entre os efeitos das duas variáveis tanto na condição basal quanto na estimulada por insulina. O teste post hoc indicou aumento significativo na fosforilação da AS160 (Thr-642) nas condições basais e estimuladas com insulina apenas no grupo T. fig.11.



Outra proteína importante para melhor entendermos as sinalizações moleculares envolvidas dentro do contexto do nosso estudo é a AMPK, portanto decidimos dosar o nível de expressão da p-AMPK (Thr-172) no músculo *sóleus* nos grupos C, CL, T e TL. A ANOVA apontou efeitos do exercício na condição basal e estimulada com insulina, com maior expressão da referida proteína em ambas as condições nos grupos T e TL. Houve ainda efeito da suplementação com leucina na condição estimulada com insulina, onde podemos observar que a suplementação com o aminoácido diminuiu a fosforilação da AMPK provocada pelo exercício no grupo TL. Fig.12.

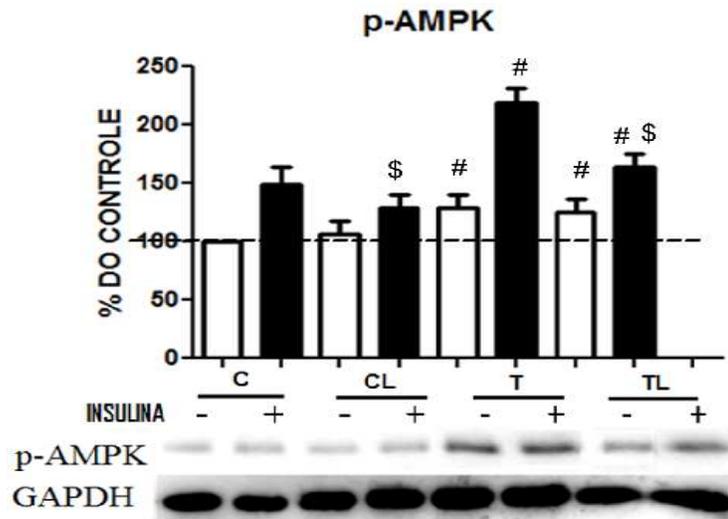


Fig. 12 – Expressão da p-AMPK (Thr-172) em condição basal (-) e estimulada com insulina (+) (10 unidades via veia cava) no músculo soleus de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # indica efeito do exercício, \$ indica efeito da suplementação. n=4.

O fator de transcrição FOXO3a está envolvido com o controle da expressão de genes envolvidos com vias de degradação proteica, por isso dosamos o nível de expressão da p-FOXO3a no músculo *soleus* nos grupos C, CL, T e TL. A ANOVA apontou efeito do exercício tanto na condição basal quanto na estimulada com insulina. O exercício provocou uma redução em ambas as condições. Já a suplementação demonstrou efeito somente na condição estimulada com insulina, também induzindo. Fig.13.

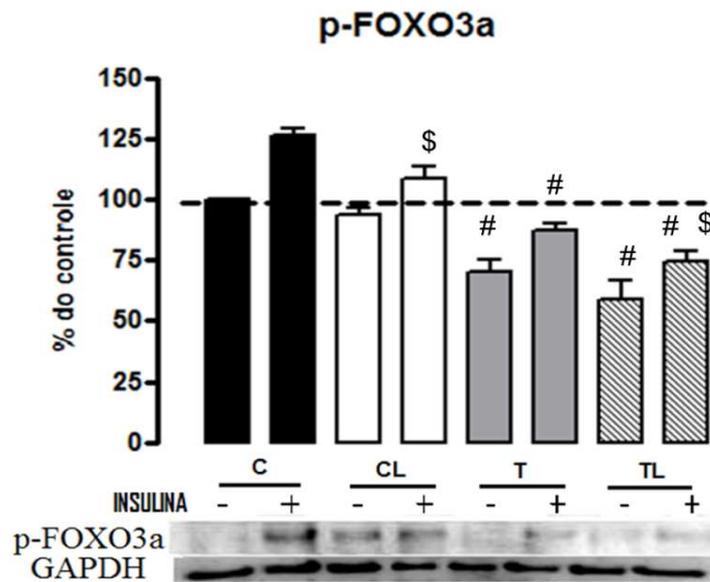


Fig. 13 – Expressão da p-FOXO3a (Ser- 253) em condição basal (-) e estimulada com insulina (+) (10 unidades via veia cava) no músculo sóleus de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # indica efeito do exercício. \$ indica efeito da suplementação.n=4.

Realizamos experimentos funcionais para avaliar a síntese de proteínas no músculo *sóleus* isolado dos grupos C, CL, T e TL. Apesar da tendência em diminuição do nível da síntese proteica observado no grupo T em relação ao grupo C a ANOVA não demonstrou efeito dos tratamentos (exercício ou suplementação com leucina).

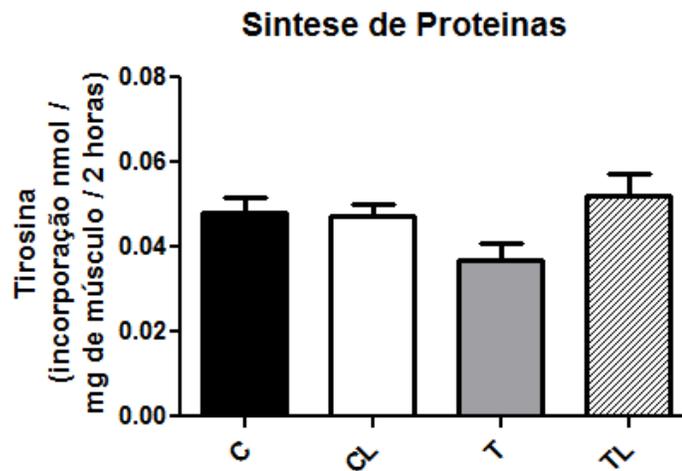


Fig. 14 – Síntese de proteínas no músculo *sóleus* isolados de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. n=6-8.

Avaliamos também a degradação de proteínas por músculo *sóleus* isolados dos grupos C, CL, T e TL. A ANOVA apontou efeito somente do exercício, que reduziu significativamente a degradação protéica nos grupos T e TL. A suplementação com leucina não gerou alterações neste parâmetro. Fig.15.

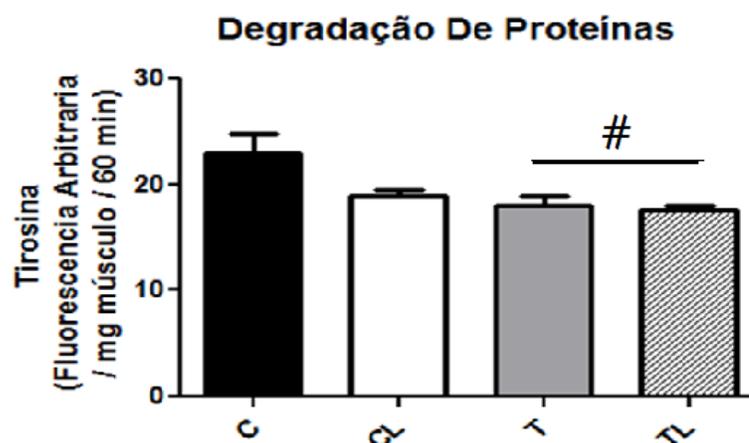
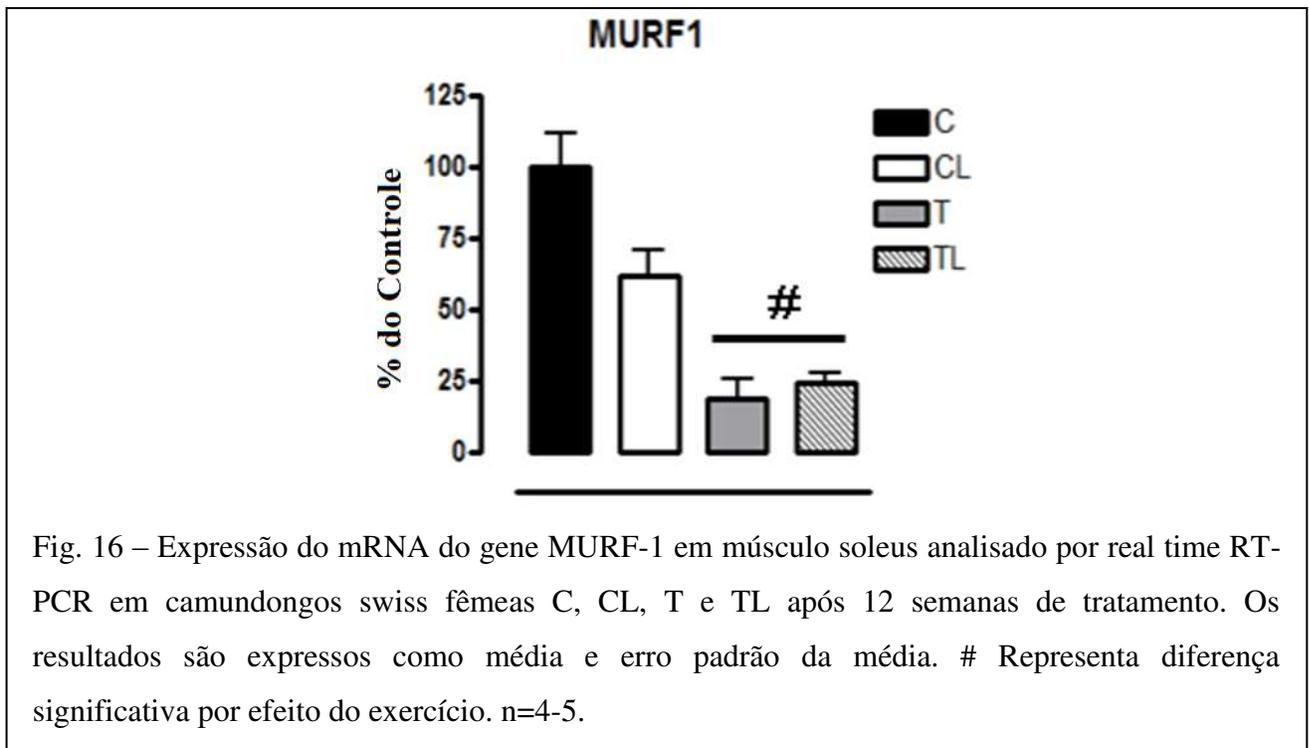


Fig. 15 – Degradação de proteínas de músculo *sóleus* isolados de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # indica efeito do exercício. n=4.

Analizamos a expressão de genes envolvidos com a via do SUP no músculo *sóleus* dos grupos C, CL, T e TL. Verificamos efeito significativo do exercício em reduzir a expressão gênica da MURF1. A suplementação com leucina não gerou alterações neste parâmetro. Fig.16.



A análise da expressão gênica da UBE2K no músculo *sóleus* dos grupos C, CL, T e TL. Demonstrou que o exercício físico foi capaz de diminuir a expressão gênica da UBE2K. A suplementação com leucina não induziu alterações neste parâmetro. Fig.17.

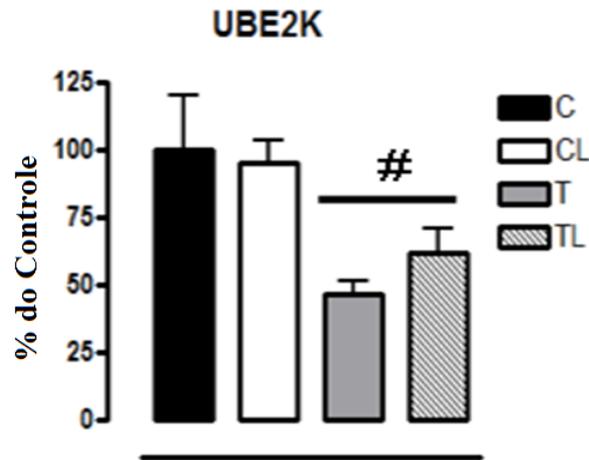


Fig. 17 – Expressão do mRNA do gene UBE2K analisado por real time PCR em músculo soleus de camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # Representa diferença significativa por efeito do exercício. n=4-5.

Avaliamos também a expressão gênica da PGC-1 α em músculo soleus dos grupos C, CL, T e TL. Houve efeito significativo do exercício e da suplementação com leucina sobre esse parâmetro, mas não houve interação entre os efeitos das duas variáveis. Tanto a suplementação com leucina como o exercício aumentaram a expressão gênica da PGC-1 α . Fig.18

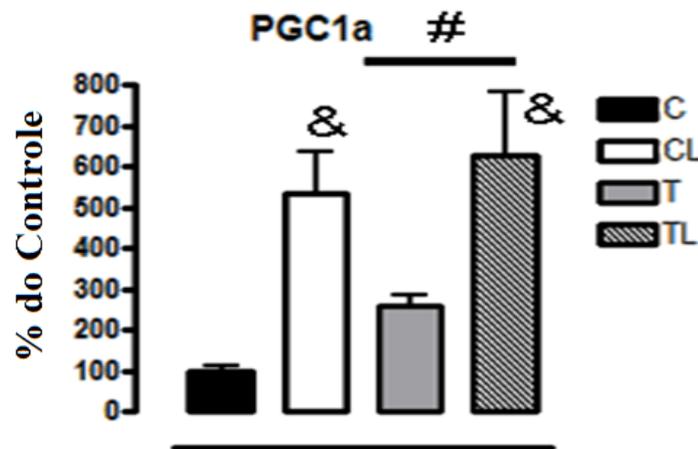
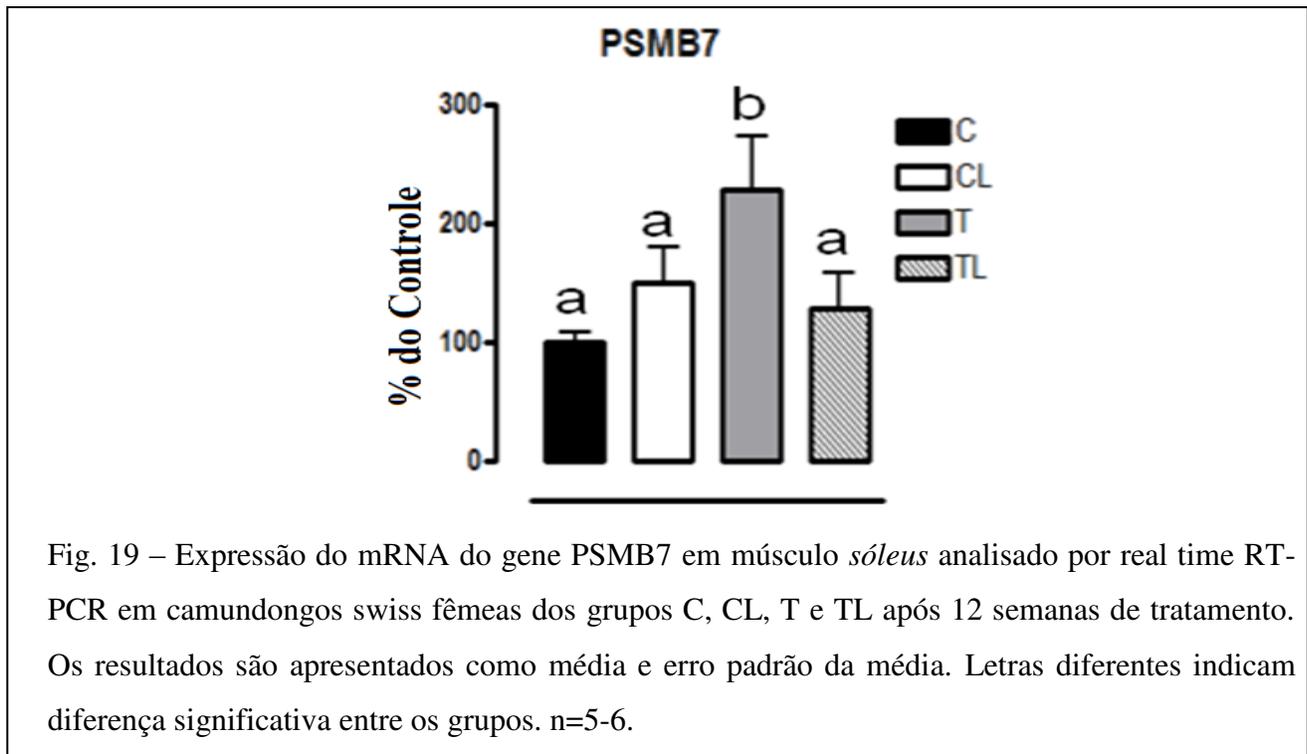


Fig. 18 – Expressão do mRNA do gene PGC1- α em músculo soleus analisado por real time PCR em camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média. # Representa diferença significativa por efeito do exercício. & representa diferença significativa por efeito da suplementação com leucina. n=5-6.

Avaliamos a expressão do gene PSMB7 (gene relacionado com a subunidade catalítica do proteossomo) no músculo *sóleus* dos grupos C, CL, T e TL. Houve interação entre os efeitos do exercício e da suplementação com leucina sobre esse parâmetro. O teste post hoc indicou aumento significativo na expressão gênica da PSMB7 no grupo T em relação aos demais grupos.



Encerramos as análises de expressão gênica em nosso estudo com a dosagem da expressão do gene UCHL1 no músculo *sóleus* dos grupos C, CL, T e TLA ANOVA apontou efeito significativo do exercício e interação entre os efeitos do exercício e suplementação com leucina. O teste post hoc mostrou maior expressão do referido gene no grupo T. em relação aos demais grupos.

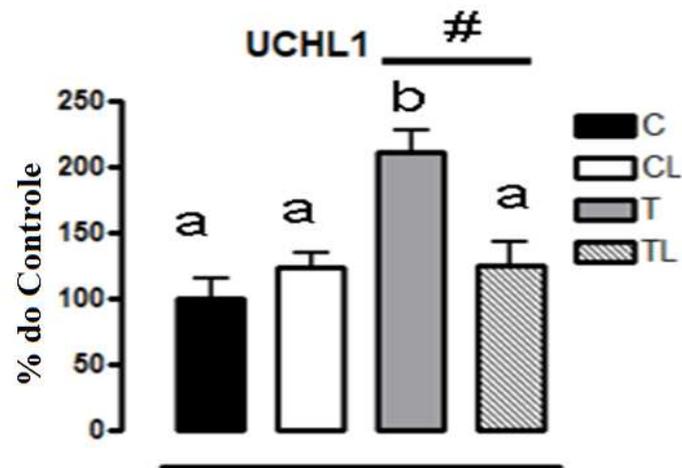


Fig. 20 - Expressão do mRNA do gene UCHL1 no músculo soleus analisado por real time RT-PCR em camundongos swiss fêmeas dos grupos C, CL, T e TL após 12 semanas de tratamento. Resultados expressos como média e erro padrão média. #Representa diferença significativa por efeito do exercício. Letras diferentes indicam diferença significativa em relação às demais letras.n=5-6.

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm demonstrado que o exercício físico de endurance promove aumento na captação de glicose pelo músculo esquelético (Zierath, 2002; Pauli, Cintra *et al.*, 2009). Além disso, a redução do peso corporal associada com o aumento da atividade física esta relacionada com redução da incidência de diabetes e outros distúrbios metabólicos (Knowler, Barrett-Connor *et al.*, 2002). Demonstramos nesse trabalho que 12 semanas de exercício físico de longa duração foi capaz de promover a redução do ganho de peso nos animais T e TL e que esta redução no peso se deve, principalmente pela redução de tecido adiposo, (Fig.1). Embora diversos estudos tenham demonstrado efeito da suplementação crônica com leucina em reduzir o peso (Zhang, Guo *et al.*, 2007; Balage e Dardevet, 2010; Torres-Leal, Fonseca-Alaniz *et al.*, 2011) o mesmo não foi observado em nosso trabalho. Esta divergência talvez se deva ao fato de que, este efeito da suplementação em induzir um menor ganho de peso, tenha sido observado somente em animais que receberam dieta rica em gordura. No trabalho publicado por (Balage e Dardevet, 2010), entretanto, os animais alimentados com dieta padrão e suplementados com leucina (4,5%) demonstraram um aumento em torno de 27% no conteúdo de gordura perirenal. Em nosso estudo, os animais CL demonstraram forte tendência no aumento da gordura retroperitoneal, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Para caracterização de nosso modelo de treinamento físico realizamos teste de esforço, que consistiu da análise do tempo máximo de permanência do animal em meio aquático sem submergir por tempo maior que 4 seg., e confirmamos a efetividade do nosso protocolo de treinamento em induzir melhoras significativas na performance no referido teste. Os animais TL tiveram uma resposta ainda mais satisfatória (fig.2) corroborando dados obtidos em outros trabalhos (Crowe, Weatherson *et al.*, 2006; Matsumoto, Koba *et al.*, 2009). Complementamos o teste de exaustão com a análise do consumo máximo de oxigênio em esteira e observamos que os animais T e TL aumentaram sua potencia aeróbia, porém sem a interação das intervenções (treinamento / suplementação). O grupo CL também obteve aumento neste parâmetro em relação ao grupo C (fig.3). Um padrão muito parecido foi verificado na análise da atividade da enzima citrato sintase (fig.4). Nós hipotetizamos que a melhor *performance* do grupo TL em relação aos demais, se deve à um desvio do metabolismo da glicose para o de aminoácidos, poupando assim, os estoques de glicogênio, visto que estes animais do grupo TL apresentaram um valor de leucinemia maior do que o dos grupos C e T, e menor que o grupo CL. Este último, apresentou

maior concentração plasmática de leucina que os demais (Fig. 8). Esta hipótese ganha força, quando observamos os resultados obtidos por nosso grupo sobre a concentração de glicogênio muscular, com valores maiores nos grupos CL, T e TL comparado com o grupo C (dados não publicados). Esta resposta aos tratamentos (treinamento e suplementação com leucina) fica ainda mais aparente no tecido hepático, com os grupos CL e T apresentando um conteúdo de glicogênio maior que o grupo C. Os animais do grupo TL se sobrepõem aos demais, demonstrando um efeito somatório do exercício e suplementação com leucina neste parâmetro (dados não publicados).

Os benefícios do exercício físico também estão presentes no controle da homeostase glicêmica (Hawley e Lessard, 2008) e aumento na sensibilidade a insulina (Zierath, 2002). De forma semelhante, nesse trabalho, observamos aumento do kITT, nos grupos T e TL (Fig.5b), e forte tendência a uma menor área abaixo da curva no teste de tolerância a glicose no grupo T (Fig. 7b). O aumento na captação de glicose por indivíduos treinados parece não afetar a via insulínica clássica ou pelo menos suas etapas iniciais IR, PI3K, IRS-1 e AKT (Funai, Schweitzer *et al.*, 2010; Maarbjerg, Sylow *et al.*, 2011). O exercício físico pode gerar um aumento na captação de glicose por um mecanismo independente de insulina. Esse mecanismo ocorre durante o exercício agudo e sua magnitude depende do tempo, duração, intensidade e tipo de exercício. (Maarbjerg, Sylow *et al.*, 2011).

Embora o exercício agudo afete a captação de glicose por mecanismos independentes de insulina, o exercício também potencializa a sensibilidade ao referido hormônio, e este efeito pode perdurar por até 48 h após a execução do mesmo. Com relação aos efeitos do exercício crônico, os dados apresentados na literatura ainda são escassos. (Hawley e Lessard, 2008; Frøsig e Richter, 2009; Funai, Schweitzer *et al.*, 2010; Maarbjerg, Sylow *et al.*, 2011).

Como as etapas proximais da via de sinalização insulínica não parecem serem alteradas pelo exercício, estes mesmos autores sugerem outras proteínas como possíveis candidatos: AMPK, PKC, AS-160 dentre outras. Esta teoria pode ser reforçada com os dados obtidos em nosso trabalho, tendo em vista que os animais T e TL não demonstraram diferença em relação ao grupo C na fosforilação da AKT na condição basal ou estimulada com insulina (FIG.9).

Existe um ponto de convergência entre as vias que induzem a captação de glicose mediada por exercício e pela insulina através da proteína substrato da AKT de 160 kda, também chamada de AS160. Esta proteína pode ser fosforilada pela AKT, que por sua vez é fosforilada pela sinalização insulínica, ou ainda, pela AMPK, que pode ser ativada pela contração muscular,

de maneira bilateral, ou seja, a contração muscular pode aumentar o nível sarcoplasmático de cálcio e assim fosforilar a AMPK via Cálcio Calmodulina Kinase, ou e o músculo em contração pode levar a um aumento da razão AMP/ATP e aumentar a atividade da AMP via LKB-1. (Nader, 2006; Maarbjerg, Sylow *et al.*, 2011; O'Neill, Maarbjerg *et al.*, 2011).

Quando fosforilada, a AS160 permanece associada à proteína 14-3-3 e inibida, ou seja, não executa a sua atividade GTPásica e permite que o GTP fique associado as vesículas que contém o GLUT-4 aumentando a sua translocação até a membrana plasmática. Em nosso estudo demonstramos que a fosforilação da AS160 é maior no grupo T em relação ao C tanto em situação basal quanto em condição estimulada com insulina. A suplementação com leucina no grupo TL aboliu o efeito do exercício (fig.11). Esta resposta pode ser resultado de uma menor ativação de proteínas não relacionadas com a via canônica da insulina no grupo TL, visto que a fosforilação da AKT foi semelhante ao grupo T. Essa hipótese ganha força quando analisamos os resultados obtidos no nível de expressão da proteína p-AMPK (Thr-172), (fig.12), pois verificamos que os animais treinados apresentam uma maior expressão da proteína supra-citada, tanto em condições basais quanto estimuladas com insulina, o que explicaria o aumento na p-AS160 (Thr-642) observadas no grupo T. Acreditamos que sejam estas alterações moleculares as responsáveis para os resultados obtidos no ipGTT por exemplo, (fig.8) onde o grupo CL e TL apresentaram uma menor tolerância à glicose.

Surpreendente, o aumento observado na expressão da p-AMPK (Thr-172), do grupo T em relação aos demais foi ainda mais evidente nas condições estimuladas com insulina, sugerindo que a proteína *up-stream* à AMPK nessa condição seria a CAMKII, visto que a insulina induz o aumento nos níveis de cálcio citoplasmático no músculo esquelético, (LANER, *et al* 2006, ESPINOSA, *et al*, 2009). O aumento do cálcio por sua vez, poderia aumentar a atividade da CAMKII, que resultaria em uma maior ativação da AMPK. Dados não publicados do nosso grupo tem demonstrado que o exercício físico aumenta o nível de fosforilação da CAMKII em condições estimuladas com insulina em relação ao controle. Sendo assim, pretendemos realizar a dosagem do nível de fosforilação da CAMKII em experimentos futuros para podermos defender com mais convicção tal hipótese. Já que, outros estudos têm proposto que a CAMKII não participa do aumento na sensibilidade à insulina induzida por exercício agudo em músculos excitados eletricamente *in vitro* (WITCZAK, CA, *et al*, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que a suplementação com leucina pode induzir prejuízos na captação de glicose por diminuir o nível de fosforilação da AMPK (Saha, Xu *et al.*, 2010). Paralelamente, isso diminuiria a ação inibitória da AMPK sobre a proteína alvo da rapamancina em mamíferos (mTOR). A mTOR, quando fosforilada, se torna ativa e fosforila a proteína p70S6K que, por sua vez, atua sobre o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), fosforilando-o em resíduos de serina, um resíduo que quando fosforilado torna o IRS-1 inibido. Em outras palavras, esta via mTOR - p70S6K – IRS-1 funciona como um sensor do status energético da célula através de um mecanismo de retroalimentação negativa, impedindo que mais nutriente seja absorvido por uma célula rica em energia (Saha, Xu *et al.*, 2010).

Em nosso estudo observamos que a suplementação com leucina diminuiu o nível de expressão da p-AMPK (Thr-172), nas condições estimuladas com insulina no grupo CL e bloqueou o aumento na expressão da mesma no grupo TL ou seja, o aumento na expressão da p-AMPK (Thr-172) observada no grupo T, não foi evidenciado no grupo TL, na mesma magnitude, dados que vão ao encontro dos resultados obtidos nas análises de área abaixo da curva do ipGTT, kITT e nível de fosforilação da AS-160. Este efeito da suplementação com leucina em bloquear o efeito do treinamento sobre a expressão da p-AMPK (Thr-172), não foi observado nas condições basais sem estímulo com insulina, onde ambos os grupos responderam com aumento similares (T e TL).

Para explorar melhor este complexo sistema de sinalização, nós analisamos a atividade da mTOR e notamos que os grupos T e TL tiveram menor fosforilação dessa proteína do que os demais grupos na condição estimulada com insulina. Na condição basal, a fosforilação da mTOR foi menor nos demais grupos em relação ao grupo CL. Porém, tendo em vista que a fosforilação da AKT foi menor no grupo CL, inferimos que este aumento na p-MTOR possa ter sido induzida também por mecanismos independentes da insulina, possivelmente por uma interação direta da leucina com a mTOR, regulação já proposta em outros trabalhos (Cohen et al, 2009)

A proteína mTOR também é conhecida por suas ações sobre a síntese protéica através da facilitação de etapas fundamentais do processo de iniciação da tradução protéica atuando basicamente sobre três proteínas - a 4EBP-1, EIF4G e p70S6K. A mTOR fosforila e inibe a 4EBP1, uma proteína inibidora da iniciação da tradução protéica. Uma vez inibida, a 4EBP-1 libera o EIF4E, que pode se acoplar ao EIF4G, o qual está também sob controle da mTOR, e ao EIF4A, o que forma o complexo EIF4F. A montagem desse complexo é necessária para a

continuação da etapa de iniciação da tradução do RNA mensageiro em proteína. Já a p70S6K, quando fosforilada pela mTOR, se torna ativa e estimula a tradução, bem como a elongação da síntese protéica (Baar, Nader *et al.*, 2006; Matsakas e Patel, 2009; Goodman, Mayhew *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que a mTOR pode ser ativada pela suplementação de aminoácidos, principalmente os de cadeia ramificada, e que esta resposta pode ser aumentada quando administrada somente leucina. Sabe-se também que o exercício resistido ou de força pode também contribuir para o aumento de sua fosforilação por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (Nader, 2006; Goodman, Mayhew *et al.*, 2011). Quando se trata dos efeitos do treinamento de *endurance* sobre os mecanismos de síntese protéica, os dados na literatura são muito escassos, e quando se refere à associação deste tipo de exercício com a suplementação com leucina e seu efeitos sobre a referida situação este quadro se agrava. Em nosso trabalho a suplementação com leucina promoveu um aumento na fosforilação da mTOR nas condições basais, e o treinamento induziu uma diminuição da fosforilação desta proteína nas condições estimuladas com insulina. A suplementação com leucina no grupo TL não foi suficiente para bloquear este efeito inibitório do exercício sobre a atividade da mTOR. Entretanto, não encontramos diferença entre os grupos na síntese protéica (fig. 14), sugerindo que as alterações moleculares encontradas não foram de magnitude suficiente para influenciar esse processo. Apesar disso, o peso do músculo *sóleus* de ambos os grupos treinados (T e TL) foi maior em relação aos grupos não exercitados (C e CL).

O aumento do peso do músculo *sóleus* na ausência de alteração da síntese protéica nos levou a levantar a hipótese de que ambas as intervenções, suplementação e exercício de *endurance*, poderiam acarretar no aumento da massa muscular por um mecanismo dependente da inibição da degradação proteica, pois como se sabe, a manutenção da massa muscular se dá através do equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação de proteínas. Confirmamos esta hipótese com o experimento de degradação proteica avaliando o nível de liberação de tirosina do músculo *sóleus* dos grupos estudados e verificamos que nosso protocolo de exercício reduziu a degradação de proteínas musculares (fig 15).

Uma outra hipótese que nos ajuda a explicar o maior peso do músculo encontrado nos grupos T e TL mesmo sem apresentar diferença na síntese de proteínas é o aumento no conteúdo de glicogênio muscular encontrado nestes animais (dados não publicados), acreditamos também

que embora os tratamentos (suplementação e treinamento), não tenham levado à um aumento do conteúdo de proteínas estruturais o mesmo não deve ter ocorrido com proteínas funcionais. Tendo em vista que, outros estudos têm demonstrado que a suplementação com leucina induz um aumento na síntese de proteínas mitocondriais e do sarcoplasma sem afetar a síntese de miosina (Guillet, et al, 2004).

Este foi um dado muito interessante encontrado em nosso estudo, já que pouco se sabe sobre como o exercício físico de *endurance* pode modular a degradação protéica da musculatura esquelética, pois esse processo não consiste apenas da situação reversa dos mecanismos de síntese protéica deste tecido, e ocorre principalmente através do sistema ubiquitina proteossomo ATP- dependente (SUP). Esta via é fundamental nos processos de atrofia muscular que acometem uma variedade de condições, incluindo câncer, caquexia, sepsia, jejum, exposição a glicocorticóides, desuso, diabetes entre outros (Sandri, Sandri *et al.*, 2004). O SUP envolve basicamente duas etapas essenciais - a poliubiquitinização da proteína e a degradação mediada pelo proteossomo. A poliubiquitinização da proteína é regulada por um processo multi-enzimático que requer ATP, a enzima ativadora de ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) que funciona sozinha ou na presença da ubiquitina ligase (E3), esta última, responsável pelo reconhecimento do substrato e marcação do mesmo com moléculas de ubiquitina (Bodine, Latres *et al.*, 2001), demonstraram que animais knockout para as E3 ligases Murf-1 e Maf-bx apresentaram redução maior do que 50% no nível de atrofia do músculo esquelético induzido por denervação. Assim, a análise da expressão gênica destas enzimas permite inferir o nível de degradação protéica presente no músculo esquelético. Um outro processo que pode interferir com o nível de degradação protéica no músculo esquelético é a etapa conhecida como desubiquitinização mediada por enzimas desubiquitinantes. A regulação da expressão gênica destas enzimas é bastante controversa na literatura, já que, existem estudos que apontam que elas podem ter sua expressão aumentada por condições de estímulo à degradação como a imobilização (Wing, 2005) ou ainda não ser alterada por estes processos (Baptista, Leal *et al.*, 2010). Alguns trabalhos têm apontado que a expressão destas enzimas não é paralela ao aumento do SUP, mas sim inversamente proporcional a massa muscular. Esta divergência da função das enzimas desubiquitinantes se dá devido à grande variedade de isoformas encontradas e diferentes modelos empregados para o seu estudo (Attaix, Ventadour, Codran *et al.*, 2005).

Nós analisamos em nosso estudo a expressão de genes chaves no SUP e observamos que o treinamento foi eficaz em diminuir a expressão do RNA mensageiro da E3 ligase MURF-1, enzima chave nos processos de degradação muscular (Bodine, Latres *et al.*, 2001; Sandri, Sandri *et al.*, 2004; Baar, Nader *et al.*, 2006). Embora o grupo CL tenha demonstrado tendência na diminuição deste gene, esta não foi estatisticamente significativa. O mesmo padrão foi verificado com a expressão do RNA mensageiro da E2 EB2K. Nós hipotetizamos que a modulação do exercício sobre estes genes pode ser através da PGC-1 α , fator de transcrição que tem sido postulado como supressor dos atrogenes (genes relacionados com a atrofia do músculo esquelético) (Sandri, Lin *et al.*, 2006). A PGC1- α diminui a expressão do fator de transcrição FOXO que, na forma desfosforilada, se torna ativo e migra para o núcleo, onde interage com o promotor gênico das E3 ligases e outros fatores indutores da degradação protéica (Brault, Jespersen *et al.*, 2010). Em nosso trabalho, a expressão do RNA mensageiro da PGC 1- α foi aumentada pelo exercício e exacerbada com a suplementação com leucina. No entanto, a diminuição na expressão gênica das E2 e E3 ligases só foi observada no grupo T e TL, o que sugere que embora a expressão gênica da PGC-1 α seja extremamente aumentada pela suplementação com leucina, sua ação bloqueadora da expressão de genes relacionados com a atrofia muscular deve ser regulada por mecanismos distintos, uma vez que existem diferentes formas de regulação da PGC-1 α , (Silveira, Pilegaard *et al.*, 2006; Rodgers, Lerin *et al.*, 2008).

Nós avaliamos a expressão da p-FOXO3a (Ser-253) e observamos que o exercício físico induziu uma diminuição na mesma, tanto nas condições basais quanto nas estimuladas com insulina, e a suplementação reduziu a expressão da referida proteína na condição estimulada. Acreditamos que este efeito se deva à uma diminuição do conteúdo total da FOXO3a induzida pela PGC-1 α , o que explicaria a diminuição observada nos genes da via do SUP e conseqüente redução da degradação protéica nos grupos T e TL demonstrada neste trabalho, visto que, como citado anteriormente, a expressão do mRNA da PGC-1 α em todos os grupos tratados estavam aumentados.

Quando marcadas com as moléculas de ubiquina, as proteínas alvo do SUP são reconhecidas pela subunidade 19S do proteossomo 26S e direcionadas para a subunidade 20S, a região catalítica, localizada no centro do proteossomo, onde existem diversas enzimas que irão degradar as proteínas em pequenos peptídeos e/ou aminoácidos. No entanto, o nível de degradação depende também da atividade destas enzimas (Attaix, Ventadour, Taillandier *et al.*,

2005). Nós verificamos que o treinamento imposto em nosso estudo induziu um aumento em torno de 100% em relação ao controle na expressão do RNA mensageiro da PSMB7, uma subunidade catalítica do complexo multi-enzimático que envolve a subunidade catalítica 20S do proteossomo. A suplementação com leucina no grupo TL aboliu este efeito. Inferimos que o aumento observado no grupo T confere uma maior eficiência ao SUP destes animais, uma vez que eles possuem uma diminuição muito expressiva das E3 ligases e precisam de maior eficiência nas etapas finais do sistema para garantir a manutenção do *turn-over* protéico necessário para a renovação e manutenção do tecido muscular.

Um outro dado surpreendente encontrado em nosso estudo foi o aumento na expressão do RNA mensageiro da UCHL-1, o gene que codifica a enzima desubiquitinante que leva o mesmo nome do gene, nos animais treinados. A função exata da UCHL1 não é conhecida, mas acredita-se que enzimas desubiquitinantes sejam importantes reguladoras de uma grande variedade de processos celulares, uma vez que elas podem reverter modificações catalizadas por ligases de ubiquitina. A UCHL1 é superexpressa em uma variedade de câncers (Kim et al. 2009; Hussain et al. 2010). Recentemente Hussain et al (2010) observaram que a expressão aberrante da UCHL1 leva a um aumento dramático na sinalização da Akt *in vitro* e *in vivo* ao reduzir os níveis da PHLPP1, uma fosfatase que reverte a fosforilação da Akt. A quantidade de PHLPP1 é maior em músculo e tecido adiposo de sujeitos obesos comparados a não obesos, e se correlaciona com o índice de massa corporal, insulinemia e índice HOMA (Andreozzi et al 2011). Esses resultados são interessantes, a medida que mostram a complexa interação entre as vias investigadas em nosso estudo: mTOR, AMPK, e SUP.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

A suplementação com leucina foi capaz de potencializar a *performance* física dos animais exercitados, (aumento do tempo até a exaustão) possivelmente por melhorar vias fundamentais para os processos de obtenção de energia no metabolismo aeróbio (citrato sintase e PGC-1 α).

O exercício físico promoveu melhora na sensibilidade à insulina, por mecanismos independentes da via canônica da insulina, com participação importante da AMPK nesse processo;

A suplementação com leucina prejudicou a tolerância a glicose, efeito possivelmente induzido pela redução na p-AKT (Thr-308) no grupo CL e p-AMPK (Thr-172) nos grupos CL e TL. Além disso, a fosforilação da AS-160 (Thr-642), em ambas as condições, foi maior apenas nos animais exercitados que não receberam a suplementação.

O exercício aeróbio aumentou a massa relativa do músculo *sóleus*, e este resultado se manifestou pela redução da degradação de proteínas musculares, que relacionamos com a diminuição significativa na expressão de genes envolvidos no processo de degradação de proteínas musculares (E2 e E3 ligases), provavelmente regulados pela interação PGC1- α – FOXO3a, uma vez que o treinamento reduziu a fosforilação da mTOR após estimulação com insulina, e não promoveu alterações na síntese de proteínas. Surpreendentemente, verificou-se aumento em genes que codificam as enzimas desubiquitinantes e enzimas envolvidas com a subunidade catalítica do proteossomo, a suplementação com leucina não exerceu efeito nestes parâmetros.

Diante do exposto, fica claro que a suplementação com leucina é uma prática terapêutica que deve ser cuidadosamente manipulada e que o emprego deste tipo de intervenção em indivíduos sedentários de peso normal pode ser danoso à homeostase glicêmica, e que embora a suplementação com leucina possa gerar benefícios no que diz respeito à *performance* física, alguns dos efeitos deletérios sobre a homeostase glicêmica, que acometeram os animais suplementados, também se manifestaram nos animais do grupo treinado que foram suplementados com o aminoácido (grupo TL).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOZZI F., et al., [Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance]. **Diabetologia**. Jul;54(7):1879-87. 2011.

ARRUDA, A. P. et al. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1314-26, Apr 2011. ISSN 1945-7170.

ATTAIX, D. et al. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. **Essays Biochem**, v. 41, p. 173-86, 2005. ISSN 0071-1365. _____. The ubiquitin-proteasome pathway: limitations and opportunities. **J Support Oncol**, v. 3, n. 3, p. 221-2, 2005 May-Jun 2005. ISSN 1544-6794.

BAAR, K.; NADER, G.; BODINE, S. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. **Essays Biochem**, v. 42, p. 61-74, 2006. ISSN 0071-1365.

BALAGE, M.; DARDEVET, D. Long-term effects of leucine supplementation on body composition. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 3, p. 265-70, May 2010. ISSN 1535-3885.

BALAGE, M. et al. Leucine supplementation in rats induced a delay in muscle IR/PI3K signaling pathway associated with overall impaired glucose tolerance. **J Nutr Biochem**, v. 22, n. 3, p. 219-26, Mar 2011. ISSN 1873-4847.

BAPTISTA, I. L. et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 6, p. 800-8, Jun 2010. ISSN 1097-4598.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 2001. ISSN 0036-8075.

BOOTH, F. W.; CHAKRAVARTHY, M. V.; SPANGENBURG, E. E. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 2, p. 399-411, Sep 2002. ISSN 0022-3751.

BRAULT, J. J.; JESPERSEN, J. G.; GOLDBERG, A. L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. **J Biol Chem**, v. 285, n. 25, p. 19460-71, Jun 2010. ISSN 1083-351X.

COMBARET, L. et al. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. **J Physiol**, v. 569, n. Pt 2, p. 489-99, Dec 2005. ISSN 0022-3751.

CROWE, M. J.; WEATHERSON, J. N.; BOWDEN, B. F. Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance. **Eur J Appl Physiol**, v. 97, n. 6, p. 664-72, Aug 2006. ISSN 1439-6319.

DE OLIVEIRA, C. A. et al. Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. **Amino Acids**, v. 40, n. 4, p. 1027-34, Apr 2011. ISSN 1438-2199.

DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; FRANCAUX, M. Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 94, n. 1-2, p. 1-10, May 2005. ISSN 1439-6319.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. et al. Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. **J Appl Physiol**, v. 101, n. 1, p. 202-12, Jul 2006. ISSN 8750-7587.

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSENET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflugers Arch**, v. 456, n. 3, p. 587-600, Jun 2008. ISSN 0031-6768.

FILIPUTTI, E. 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**, v. 59, n. 5, p. 635-44, May 2010. ISSN 1532-8600.

FOLETTA, V. C. et al. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Pflugers Arch**, v. 461, n. 3, p. 325-35, Mar 2011. ISSN 1432-2013.

FRØSIG, C.; RICHTER, E. A. Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17 Suppl 3, p. S15-20, Dec 2009. ISSN 1930-7381.

FUNAI, K. et al. In vivo exercise followed by in vitro contraction additively elevates subsequent insulin-stimulated glucose transport by rat skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 5, p. E999-1010, May 2010. ISSN 1522-1555.

GOODMAN, C. A.; MAYHEW, D. L.; HORNBERGER, T. A. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. **Cell Signal**, v. 23, n. 12, p. 1896-906, Dec 2011. ISSN 1873-3913.

HAWLEY, J. A.; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 192, n. 1, p. 127-35, Jan 2008. ISSN 1748-1716.

IWANAKA, N. et al. Leucine modulates contraction- and insulin-stimulated glucose transport and upstream signaling events in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 108, n. 2, p. 274-82, Feb 2010. ISSN 1522-1601.

JONES, S. W. et al. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. **FASEB J**, v. 18, n. 9, p. 1025-7, Jun 2004. ISSN 1530-6860.

KNOWLER, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**, v. 346, n. 6, p. 393-403, Feb 2002. ISSN 1533-4406.

MAARBJERG, S. J.; SYLOW, L.; RICHTER, E. A. Current understanding of increased insulin sensitivity after exercise - emerging candidates. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 202, n. 3, p. 323-35, Jul 2011. ISSN 1748-1716.

MACOTELA, Y. et al. Dietary leucine--an environmental modifier of insulin resistance acting on multiple levels of metabolism. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21187, 2011. ISSN 1932-6203.

MATSAKAS, A.; PATEL, K. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. **Histol Histopathol**, v. 24, n. 2, p. 209-22, Feb 2009. ISSN 1699-5848.

MATSUMOTO, K. et al. Branched-chain amino acid supplementation attenuates muscle soreness, muscle damage and inflammation during an intensive training program. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 49, n. 4, p. 424-31, Dec 2009. ISSN 0022-4707.

NADER, G. A. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. **Med Sci Sports Exerc**, v. 38, n. 11, p. 1965-70, Nov 2006. ISSN 0195-9131.

O'NEILL, H. M. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 38, p. 16092-7, Sep 2011. ISSN 1091-6490.

PAULI, J. R. et al. [New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 4, p. 399-408, Jun 2009. ISSN 1677-9487.

PEDERSEN, B. K. [Fitness, physical activity and death from all causes]. **Ugeskr Laeger**, v. 168, n. 2, p. 137-44, Jan 2006. ISSN 1603-6824.

RODGERS, J. T. et al. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 46-53, Jan 2008. ISSN 0014-5793.

ROMA, L. P. et al. Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 10, p. 1386-93, Nov 2009. ISSN 1873-4596.

SAHA, A. K. et al. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2426-34, Oct 2010. ISSN 1939-327X.

SANDRI, M. et al. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 44, p. 16260-5, Oct 2006. ISSN 0027-8424.

_____. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399-412, Apr 2004. ISSN 0092-8674.

SILVEIRA, L. R. et al. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 9, p. 969-76, Sep 2006. ISSN 0006-3002.

TORRES-LEAL, F. L. et al. Leucine supplementation improves adiponectin and total cholesterol concentrations despite the lack of changes in adiposity or glucose homeostasis in rats previously exposed to a high-fat diet. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, n. 1, p. 62, 2011. ISSN 1743-7075.

WINDER, W. W.; TAYLOR, E. B.; THOMSON, D. M. Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 38, n. 11, p. 1945-9, Nov 2006. ISSN 0195-9131.

WING, S. S. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 10, p. 2075-87, Oct 2005. ISSN 1357-2725.

ZHANG, Y. et al. Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1647-54, Jun 2007. ISSN 1939-327X.

ZIERATH, J. R. Invited review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 2, p. 773-81, Aug 2002. ISSN 8750-7587.



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1984-1, sobre "Modulação do metabolismo muscular e da secreção de insulina em camundongos exercitados e suplementados com leucina", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro / José Maria Costa Junior, 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 05 de outubro de 2009.

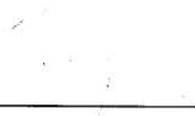
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1984-1, entitled "Modulation of muscle metabolism and insulin secretion by exercise and leucine supplementation in mice", 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 October 5, 2009.

Campinas, 05 de outubro de 2009.



Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva