

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**AS AÇÕES DO BCAA ASSOCIADO À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
NEUROMUSCULAR EM MÚSCULOS IMOBILIZADOS DE RATOS**

Roselene Cristina Triboli Watanabe

2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ROSELENE CRISTINA TIBIOLI WATANABE

**AS AÇÕES DO BCAA ASSOCIADO À
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
NEUROMUSCULAR EM MÚSCULOS
IMOBILIZADOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Metodista de Piracicaba, como requisito para obtenção do título de mestre em Fisioterapia. Área de Concentração: Intervenção Fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva.

PIRACICABA
2010

RESUMO

A imobilização utilizada freqüentemente na clínica ortopédica promove ao tecido muscular uma série de efeitos deletérios que retardam o processo de reabilitação, por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com BCAA e da EENM sobre o perfil metabólico de músculos de membro posterior imobilizado de ratos *Wistar* divididos em 7 grupos (n=6): Controle, Tratado com BCAA, Tratado com EENM, Imobilizado, Imobilizado tratado com BCAA, Imobilizado tratado com EENM, Imobilizado + EENM + BCAA. Foram avaliadas a secreção de insulina em ilhotas isoladas, decaimento percentual de glicose (KITT), reservas de glicogênio (RG) dos músculos S, GB e GV, relação PT/DNA no S, GB, GV e peso do músculo S. A avaliação estatística foi realizada pelo teste de normalidade, seguida pela ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que: 1- as RG e a PT/DNA da musculatura imobilizada foram reduzidos; 2- a secreção de insulina foi elevada nos 3 primeiros dias e retornou ao índice controle no 7º dia; 3- o KITT mostrou-se reduzido no 3º dia e retornou ao basal no 7º dia; 4- o tratamento com BCAA e a EENM isoladamente promoveram elevação no conteúdo muscular de glicogênio e na relação PT/DNA com maior intensidade no músculo imobilizado; 5- a associação da EENM com a suplementação com BCAA promoveu a mais expressiva elevação na RG e na relação PT/DNA nos músculos imobilizados. Estes resultados sugerem que tanto a suplementação quanto a EENM, foi eficaz interferindo nas alterações metabólicas desencadeadas pela imobilização, no entanto, no tratamento com a associação os músculos apresentaram as melhores condições energéticas além de demonstrar uma ação anti-catabólica, fatores que podem favorecer uma recuperação mais rápida na fase pós-imobilização.

Palavras Chaves: Aminoácidos, suplementação, imobilização, atrofia, fisioterapia.

ABSTRACT

The immobilization often used in orthopedic clinic promotes muscle tissue to a number of deleterious effects that slow the rehabilitation process; therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of treatment with BCAA (branched chain amino acid) and neuromuscular electrical stimulation (NMES) on the metabolic profile of muscle of hind limb immobilized rats. For this, rats were divided into 7 groups (n = 6): control, treated with the BCAA, treated with NMES, immobilized, immobilized treated with BCAA, immobilized + EENN and immobilized + NMES treated with BCAA. We evaluated the following variables: insulin secretion in isolated pancreatic islets, decay rate of glucose (KITT), glycogen reserves (RG) in soleus, gastrocnemius white portion (WG) and red (RG), and relationship (TP/DNA) in S, WG, RG and weight (S). Statistical analysis was performed using normal, followed by ANOVA and Tukey's test, $p < 0.05$. The results showed that: 1- the GC and TP/DNA immobilized muscles were reduced; 2-insulin secretion was increased in the first 3 days and returned to control content on day 7; 3- KITT was reduced in the 3rd days and returned to baseline by day 7, 4 - treatment with BCAA or NMES alone promotes an elevation in muscle glycogen content and the ratio PT/DNA with greater intensity in the muscle immobilized, 5 - the association of NMES with BCAA supplementation promoted the most significant increase in the RG and for PT/DNA in the immobilized muscles. These results suggest that both the supplementation and the NMES were effective in interfering with metabolic changes triggered by the immobilization, however, treatment with the combination BCAA + NMES showed the best energy conditions also demonstrate an anti-catabolic action, factors that can promote faster recovery in the post-immobilization.

Key words: Amino acids, supplementation, immobilization, atrophy, physiotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

° C: Graus Célsius

Akt: Serina treonina quinase

APS: Substrato do receptor de insulina

BCAA: Aminoácido de cadeia ramificada

C: Grupo Controle

CAP: Proteína adaptadora

Cbl: Protooncogene da via de sinalização de insulina

CEEA: Comitê de Ética e Experimentação Animal

cm: Centímetros

DNA: Ácido desoxirribonucléico

E: Grupo estimulado com EENM

EE: Eletroestimulação

EENM: Estimulação elétrica neuromuscular

epm: Erro padrão da média

g/L: Gramas por litro

Gab-1: Gene da família dos substratos do IRS

GB: Músculo gastrocnêmio fibras brancas

GDP: Guanosina difosfato

GLUT: Proteína transportadora de glicose

GSK-3: Glicogênio sintetase quinase-3

GTP: Guanosina trifosfato

GV: Músculo gastrocnêmio fibras vermelhas

Hz: Hertz

I: Grupo imobilizado

ip: Intra-peritoneal

IRS: Substrato do receptor de insulina

ITT: Teste de tolerância à insulina

JAK2: Proteína tirosina-quinase citoplasmática

KITT: Constante de decaimento da glicose

KOH: Hidróxido de potássio

mA: Miliamperes

MAPK: Proteínas ativadas por mitógenos

mg/Kg: Miligramas por quilogramas

mg: Miligramas

ml: Mililitros

mmol/L: Milimol por litro

ms: Milisegundos

mTOR: Proteína quinase ligada à hipertrofia muscular

ng: Nanogramas

PKC: Proteína quinase C

p60^{dok}: Proteína substrato do IRS

PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1: Proteína co-ativadora da transcrição gênica

PI-3K: Fosfatidil-inositol-3-quinase

PKC: Creatinofosfoquinase

PPAR δ : Ativador do receptor proliferador de peroxissomo gama

PT/DNA: Relação de proteínas totais e DNA

PVC: Cloreto de polivinila

Ras: Enzima ligada à proliferação celular

RG: Reservas glicogênicas

rpm: Rotações por minuto

S: Músculo sóleo

Shc: Proteína do substrato do IRS

T: Grupo suplementado com BCAA

U/L: Unidade por litro

UFSCAR: Universidade Federal de São Carlos

VO_{2max}: Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 IMOBILIZAÇÃO.....	11
2.2 Ações Insulínicas.....	14
2.2.1 Relações com a síntese de glicogênio.....	16
2.3 BCAA.....	17
2.4 EENM.....	20
3 OBJETIVO.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Tratamento com BCAA.....	23
4.3 Anestesia.....	23
4.4 Avaliação da resposta secretória da insulina.....	24
4.5 Modelo de órtese utilizada para imobilização.....	25
4.6 Procedimento da EENM.....	26
4.7 Amostragens e análises.....	28
4.8 Determinação do glicogênio muscular.....	28
4.9 Determinação da glicemia, conteúdo de proteínas totais e DNA (PT/DNA).....	28
4.10 Teste de tolerância a insulina (ITT).....	29
4.11 Análises estatísticas.....	29

5 RESULTADOS.....	30
5.1 Efeitos da imobilização.....	32
5.2 Efeito do tratamento com BCAA durante	33
5.3 Efeito do tratamento com BCAA durante a imobilização.....	34
5.4 Efeito da EENM	35
5.5 Efeito da EENM durante a imobilização.....	36
5.6 Efeito da associação do tratamento com BCAA e a EENM.....	37
5.7 Efeito da associação do tratamento com BCAA e a EENM durante a imobilização	38
5.8 Análise da relação PT/DNA durante os diferentes tratamentos.....	40
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	49
8	
REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

A imobilização músculo-esquelética, como recurso terapêutico, tem vasta aplicabilidade prática no campo da traumatologia e medicina desportiva, merecendo destaque nos entorses, fraturas ósseas, rupturas ligamentares, tendíneas e de outros tecidos moles. O princípio de sua indicação baseia-se sobre a contenção dos efeitos potencialmente álgicos dos movimentos bem como ser um instrumento para possibilitar e facilitar a cicatrização dos tecidos danificados, ou seja, visa permitir que estes tecidos possam atravessar as fases do processo de reparo sem interferências externas (Urso, 2009).

Através destes conhecimentos podemos dizer que a imobilização torna-se de certa forma um “mal necessário”. Por outro lado, a imobilização pode desencadear uma série de alterações adaptativas nos sistemas orgânicos que se traduzem em perda funcional global e local, comprometendo o tempo de retorno do indivíduo às suas atividades normais. No sistema músculo-esquelético, a redução da massa muscular e óssea são os efeitos mais marcantes desse processo (Clark, 2009).

Vários modelos experimentais aplicados ao estudo da imobilização são descritos na literatura. A maioria destes experimentos foi realizada em animais devida principalmente a questões éticas. Investigações em humanos, voluntários ou pacientes, fornecem dados limitados como medidas de trofismo muscular, força de um grupo de músculos, características de contração e alguns parâmetros morfológicos e bioquímicos obtidos por biópsias musculares e amostras sanguíneas (Appel, 1990).

Os efeitos da imobilização induzida por técnicas não invasivas como a imobilização por aparelho gessado ou suspensão do corpo, têm sido estudados

com mais frequência em animais. Tais técnicas têm merecido especial atenção da NASA (*National Aeronautics and Space Administration – USA*), na busca de informações sobre o comportamento dos sistemas orgânicos submetidos a microgravidade, que apresentam alguns traços de semelhança com a imobilização. Um modelo invasivo utilizado para estudar os efeitos da hipoatividade motora em animais consiste na neurectomia ciática, que tem algumas limitações impostas pelas alterações neurotróficas que acompanham este modelo quando se deseja estudar aspectos do metabolismo focados neste estudo (Akima et al., 2009).

Na tentativa de se criar a situação mais próxima da realidade da imobilização dos membros, tão comum na prática ortopédica, o presente estudo utilizou um modelo de imobilização do membro posterior dos animais induzida pela aplicação de uma órtese que manteve o membro na posição de 90° e não impediu o deslocamento do animal. A partir desse modelo, alguns efeitos sobre o metabolismo geral e local do animal foram estudados.

No contexto de minimizar os efeitos deletérios e/ou acelerar a recuperação funcional de um segmento pós-imobilização, a EENM apresenta-se como um recurso com potencialidades locais e sistêmicas que podem agir significativamente sobre o sistema músculo-esquelético. Como recurso terapêutico, a EENM tem ampla aplicabilidade na prática clínica, sobretudo quando o movimento ativo normal não pode ocorrer. Esse fato obriga a busca incessante de novos estudos, tanto do processo de inatividade quanto da EENM, visando possibilitar a aplicação terapêutica deste recurso com a máxima eficiência, segurança e com o mínimo de riscos à saúde do indivíduo.

Em virtude da freqüência com que a EENM é utilizada na prática clínica, há uma grande importância no desenvolvimento de trabalhos que determinem a influência da EE na recuperação das condições energéticas comprometidas pelo desuso. Modelos experimentais têm sido desenvolvidos com o intuito de se estudar a adaptação muscular durante a imobilização havendo sugestões de que as alterações mais relevantes da atrofia ocorrem nos dias iniciais da imobilização (Qin et al., 1997).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMOBILIZAÇÃO

O sistema músculo-esquelético, como todos os sistemas orgânicos, tem a capacidade de reagir às demandas funcionais impostas a ele, visando fornecer o maior rendimento possível para atender ao aumento nesta demanda ou sofrer as conseqüências da redução desta. Em linhas gerais, são respostas adaptativas que visam ajustar a capacidade funcional do sistema para gerar a máxima eficiência com o menor consumo energético possível.

O efeito mais marcante da imobilização no sistema músculo-esquelético é a atrofia muscular (Kannus et al., 1998). Neste ínterim, os estudos dos efeitos metabólicos locais e sistêmicos da imobilização se revestem de grande importância, pois fornecem as informações necessárias para a compreensão e intervenção terapêuticas e preventivas nas situações de privação da mobilidade de partes do corpo, na imobilização, em lesões do neurônio motor ou ainda do corpo todo, como nos repousos prolongados no leito.

Os modelos animais permitem uma compreensão mais global sobre o envolvimento metabólico nos processos de imobilização músculo-esquelética. Mussachia et al., (1988), em um estudo sobre atrofia muscular, comparou diferentes modelos de indução de atrofia muscular e sua influência nos aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e de força muscular. A principal característica observada foi a atrofia muscular e a diminuição da atividade contrátil do músculo. Vale ressaltar que estes resultados sofrem profundas influências das técnicas utilizadas para induzir a imobilização. Interessantemente, nas décadas de 70 e 80 foram descritos diferentes comportamentos entre fibras musculares secundários à imobilização. Nos trabalhos de Jafee et al. (1978) e Mcdougall et al. (1980), as fibras brancas (tipo II) são as mais acometidas por atrofia pós-imobilização enquanto que, nos relatos de Booth e Kelso (1973), e Edgerton et al. (1975) as fibras vermelhas (tipo I) respondem mais significativamente à atrofia. Existem ainda, trabalhos que não encontraram diferenças significativas na atrofia pós-imobilização nos diferentes tipos de fibras (Williams e Goldspink, 1973; Boyes e Johnston, 1979). A atrofia do músculo esquelético decorrente da imobilização ocorre pela diminuição dos níveis de síntese protéica e conseqüentemente aumento dos níveis de degradação protéica. Nas primeiras 6 horas de imobilização já existe uma redução de 37% nos níveis de síntese protéica (Booth e Seider, 1979). Esta redução parece afetar a unidade motora também.

A posição em que o músculo é imobilizado também tem importante influência no comportamento morfológico do mesmo. Se o músculo for imobilizado em encurtamento, ocorrerá uma significativa redução do número de sarcômeros em série (Appell, 1986), enquanto que numa posição de estiramento, ocorrerá o

contrário, com aumento das unidades sarcoméricas (Williams e Goldspink, 1978). Neste sentido, alguns estudos foram realizados considerando a posição articular em que os tornozelos dos animais em experimentação foram mantidos, sendo que Ploug et al. (1995), utilizaram a posição neutra, Seki et al. (2001), utilizaram a dorsiflexão enquanto que Sakakima et al. (2004), utilizaram a flexão plantar. Järvinen et al. (1992), estudando os efeitos da imobilização no membro posterior em posição neutra de ratos, encontraram um marcado aumento do tecido conjuntivo tanto no endomísio quanto no perimísio, principalmente no sarcolema das células musculares. Esse aumento foi acompanhado por aumento significativo das fibras conjuntivas peri-capilares, podendo comprometer o suprimento sanguíneo para as fibras musculares e potencializar o processo de atrofia. Também descreveram aumento do número das fibras perpendiculares aderidas às fibras musculares adjacentes, notando que estas fibras tornaram-se muito aumentadas podendo contribuir para a restrição da mobilidade entre as fibras adjacentes.

O músculo-esquelético atua como sítio no metabolismo de glicose e da ação insulínica, sendo auto-regulado pela demanda funcional e fornecimento do substrato. Assim, fatores como a imobilização pode gerar modificações intrínsecas comprometendo essa dinâmica. Hirose et al. (2000) mais recentemente, encontraram resultados semelhantes quando descreveram a redução da resposta à sinalização da insulina em músculos imobilizados, comprometendo, portanto o transporte total de glicose.

Hilder et al. (2003), observaram também redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados e a correlacionaram à redução na efetividade da proteína IRS-1, evidenciando o comprometimento na sinalização

insulínica. Além disso, verificou-se uma redução na atividade da enzima Akt, indicando alterações nas vias citosólicas responsáveis pela glicogênese bem como a glicólise. Tais alterações podem refletir diretamente no processo de hipotrofia por comprometer o fornecimento e as reservas de substratos metabolizáveis.

2.2 Ações Insulínicas

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica. A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (White, 1997; Saad, 1994).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, já foram descritos inúmeros substratos do receptor de insulina, porém, merecem destacar que quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram recentemente estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e

retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (Cavalheira et al., 2002b; Saad et al., 1992).

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que reduz a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina. Essas fosforilações inibitórias causam *feedback* negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina. A PI 3-quinase é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulada pela insulina. A PI-3 quinase foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação dos sítios YMXM e YXXM (onde Y= tirosina, M= metionina e X= qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI 3-quinase ativa o domínio catalítico associado. A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da PKC, porém a função destas proteínas no transporte de glicose ainda não está bem estabelecida (Cavalheira et al., 2002a).

Além da ativação da PI 3-quinase, outros sinais também são necessários para que a insulina estimule o transporte de glicose. Essa segunda via envolve a fosforilação do protooncogene Cbl a associado com a proteína adaptadora CAP formando o complexo Cbl-CAP que ao migrar para a membrana celular interage com a proteína CrkII que fica associada com a proteína C3G que

é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP por GTP da proteína TC10 ativando-a. Uma vez ativada, TC10 causa um sinal para a translocação da proteína GLUT4, em paralelo à ativação da via da PI 3-quinase (Thomas e Hall, 1997).

A insulina também estimula a *mitogen-activated protein* (MAP) quinase, que é uma via iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras ativando-a. A ativação da Ras requer a participação da SHP2. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares. A insulina aumenta a síntese e bloqueia a degradação de proteínas através da ativação da mTOR, esta controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da p70- ribossomal S6 quinase (p70^{rsk}), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína. A mTOR também fosforila a PHAS1, que aumenta a síntese protéica via aumento da translação de proteínas (Cross et al., 1995).

2.2.1 Relações com a síntese de glicogênio

A insulina inibe a produção e liberação de glicose no fígado através do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise e ainda estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo. Este evento é obtido pela desfosforilação da glicogênio-sintetase. Após estímulo com insulina a Akt fosforila e inativa a GSK-3, o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio-sintetase aumentando sua atividade. A insulina também ativa a proteína fosfatase 1, por um processo

dependente da PI 3-quinase, que desfosforila a glicogênio sintetase diretamente.

Na neoglicogênese, a insulina inibe diretamente a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave no controle desse processo além de diminuir a taxa de transcrição do gene que codifica a frutose-1,6-bifosfatase e a glicose 6 fosfatase e aumenta a transcrição de genes de enzimas glicolíticas como a glicoquinase a piruvato quinase As vias de sinalização que regulam a transcrição desses genes permanecem desconhecidas, mas envolvem a Akt e fatores de transcrição da família *forkhead* e o coativador do PPAR δ , PGC-1.

2.3 BCAA

A suplementação de BCAA especificamente a leucina, valina e isoleucina, surgiu com a hipótese da fadiga central (Gomes e Tirapegui, 2000). Este tipo de fadiga seria causado por um declínio da concentração plasmática de BCAA permitindo então, um maior influxo de triptofano livre no cérebro, que por sua vez é precursor do neurotransmissor serotonina, relacionada ao estado de letargia, cansaço e sono. Os BCAA e o triptofano são aminoácidos neutros que competem na barreira hematoencefálica, logo aquele que estiver em maior concentração é transportado para dentro do cérebro (Gomes e Tirapegui, 2000; Chevont et al,2004; Watson et al, 2004).

Tem sido sugerida a suplementação oral com BCAA como um meio de limitar a entrada de triptofano no sistema nervoso central, reduzindo a taxa de síntese de serotonina e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de

realização do exercício (Watson et al, 2004; Chevront et al, 2004; Othani et al, 2006).

Durante a atividade motora prolongada o músculo capta BCAA da corrente sanguínea para oxidá-los. Logo, a ingestão de BCAA poderia resultar num aumento do desempenho por oferecer ao músculo substratos que diminuíssem a necessidade da quebra de glicogênio (Othani et al, 2006).

Alguns estudos observaram os efeitos da suplementação de aminoácidos na recuperação muscular. Recentemente foi demonstrado que BCAA livres, especialmente a leucina, têm papel importantíssimo no metabolismo de proteínas (Shimomura et al, 2006; Norton e Layman, 2006). Inúmeros efeitos têm sido atribuídos aos BCAA nas últimas décadas, como melhoras nas respostas fisiológicas e psicológicas ao treinamento e no desempenho (Coombes e Mcnaughton, 2000). É sabido que o exercício aumenta a oxidação de BCAA no músculo, podendo sua suplementação ser de grande interesse para atletas e esportistas (Shimomura et al, 2006).

Acredita-se que a leucina seja o BCAA de maior importância para a recuperação muscular (Crowe et al, 2006; Norton e Layman, 2006). Sabe-se que sua suplementação oral é capaz de elevar sua concentração intracelular e altas concentrações de leucina intracelulares são fundamentais para a ativação da proteína mTOR (mammalian target of rapamycin) e de fatores de iniciação de transdução que, por sua vez, são responsáveis pela recuperação da síntese protéica muscular após o exercício tanto de resistência quanto de força (Norton e Layman, 2006).

Sob a hipótese de que a adição de BCAA em bebida com carboidratos pudesse melhorar o rendimento físico e a percepção cognitiva de esforço durante

o exercício em condições de estresse (calor, desidratação e depleção de glicogênio muscular), sete homens fisicamente ativos consumiram um total de 1,4 litros de solução contendo 60 g/L de glicose com adição de 10 g/L de maltodextrina (placebo) ou 10 g/L de BCAA (55% valina, 30% leucina e 15% isoleucina). As bebidas foram ingeridas em doses de 200 ml imediatamente antes e a cada 15 minutos durante 60 minutos de exercício em bicicleta ergométrica a 50% VO_{2max} , seguida de 30 minutos de pedalada para avaliar o desempenho. Observamos que a suplementação com BCAA não melhorou o desempenho ou a percepção cognitiva de esforço durante o exercício em condições de estresse (Chevront et al, 2004).

Em um estudo semelhante, oito homens praticantes de exercício de resistência foram suplementados com 250 ml de solução de BCAA (6 g/L leucina, 3 g/L isoleucina, 3 g/L valina) a cada 30 minutos durante duas horas antes do exercício e com 150 ml da mesma solução a cada 15 minutos ao longo do teste de esforço em cicloergômetro até a exaustão, realizado em condições de calor e depleção de glicogênio muscular. A suplementação de BCAA não influenciou o rendimento físico em ambiente quente (Watson et al, 2004).

Outros estudos têm demonstrado que os BCAA, principalmente a leucina, são altamente oxidados durante o exercício prolongado (Crowe et al, 2006; Othani et al, 2006; Norton e Layman, 2006). Após seis semanas de suplementação com L-leucina (45 mg/kg/dia) 13 canoístas (10 mulheres e 3 homens) apresentaram melhora no desempenho de longa duração e na potência de membros superiores. No entanto, não houve elevação significativa do triptofano livre no plasma nem da relação deste com a concentração plasmática

de BCAA, indicando que a melhora do desempenho não foi mediada por redução na fadiga central durante o exercício (Crowe et al, 2006)

Coombes e McNaughton, (2000), investigaram os efeitos da suplementação com BCAA em indicadores plasmáticos de danos musculares (creatina quinase e lactato desidrogenase) após exercício prolongado. Neste estudo, suplementaram 12 g/dia de BCAA (33,3% leucina, 33,3% isoleucina e 33,3% valina) por 14 dias em homens saudáveis praticantes de atividade física regular e consumidores de dieta adequada em proteínas. Antes e depois do exercício (pedalar 120 minutos a aproximadamente 70% $VO_{2máx}$), os indivíduos consumiram 20 g adicionais de BCAA. Observamos significativa queda nas concentrações plasmáticas dos marcadores de danos musculares estudados após o exercício, sugerindo que a suplementação de BCAA pode diminuir os danos musculares associados a exercícios de longa duração.

Segundo Shimomura et al. (2006), a ingestão de 5 g BCAA antes de exercício de agachamento reduziu a dor muscular tardia em homens e mulheres adultos sedentários por vários dias após o teste físico, sugerindo que talvez o BCAA possa atenuar a degradação protéica induzida pelo exercício.

2.4 EENM

A EENM é um recurso bastante utilizado tanto em reabilitação quanto na preparação de atletas. Dentre os inúmeros sistemas celulares que são ativados pela EENM, temos a interação entre a dinâmica metabólica e as vias sinalizadoras celulares e a ativação ou inibição de vias específicas que visam manter o músculo mais ativo e saudável. É importante salientar que este recurso

não substitui a ação fisiológica da contração muscular, mas pode ter uma ação aditiva no comando neuromuscular em situações de hipoatividade músculo-esquelética.

Sabe-se que a captação da glicose pelo músculo é favorecida tanto pelas contrações musculares induzidas pelos exercícios físicos quanto pela ação sinalizadora da insulina. No entanto, esses processos parecem acontecer por vias distintas na cadeia de fosforilação pós receptor (Franch et al., 1999), mas que resultam ao final, em uma via comum, levando a uma maior translocação de transportadores de glicose (Glut4) para a membrana celular. Neste contexto, Ass et al. (2002) encontraram, em resposta à EENM, uma maior ativação de sistemas celulares que permitem a elevação na captação de substratos energéticos. Yoshida et al. (2003), em um estudo realizado em ratos suspensos pela cauda, encontraram melhora significativa na capacidade oxidativa nos músculos que foram submetidos à EENM.

Jaffe e Stern (1979) demonstraram inúmeros benefícios da EENM para o músculo desnervado e para a regeneração dos tecidos biológicos. Outros importantes efeitos são descritos em trabalhos mais antigos e também nos mais recentes tais como: a elevação na força muscular e resistência, redução da fibrose mantendo as fibras em melhores condições metabólicas e elevação na densidade e fluxo dos capilares (Silva et al., 1999; Durigan, 2006). Em 1997, Qin et al., descreveram que a EENM preveniu a atrofia muscular secundária à imobilização aplicada aos músculos do membro posterior de coelhos, minimizando assim, a redução na área de secção transversa, na fibrose intersticial e no aporte sanguíneo.

Dessa forma, parece-nos pertinente avançar nos estudos desse modelo, sobretudo nos efeitos da suplementação com BCAA associado a estimulação elétrica, buscando um maior entendimento dos processos locais e metabólicos envolvidos e fornecer informações que poderão ser úteis em muitas situações cotidianas de terapia e reabilitação que necessitam revestir-se de evidências científicas.

3 OBJETIVO

Avaliar o padrão quimio-metabólico dos músculos esqueléticos S, GB e GV de ratos, com o tornozelo imobilizado na posição de 90° e suplementados com BCAA, associado ou não a EENM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos, *Wistar* adquiridos junto a empresa ANILAB (Paulínia- SP) com idade entre 3 a 4 meses, os quais foram alimentados com ração e água *ad libitum* e submetidos a ciclo foto periódico de 12 h claro/escuro sob condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais, como demonstra a tabela 1. A pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFSCar, sob o Protocolo nº 010/2006.

Tabela 1 - Distribuição dos ratos em grupos experimentais, (n=6)

Grupos experimentais
Controle
Imobilizados 7 dias
Suplementados com BCAA 7 dias
Estimulados com EENM 7 dias
Imobilizados suplementados com BCAA 7dias
Imobilizados estimulados com EENM 7 dias
Imobilizados e tratados com a associação BCAA e EENM 7dias

4.2 Tratamento com BCAA

Os grupos suplementados receberam o complexo de aminoácidos BCAA (Nutristore®) na concentração de 9,2 mg/100g/dia através da via orogástrica durante 3 ou 7 dias (Kobayashi et al., 2006).

4.3 Anestesia

Nas condições onde houve necessidade da utilização de anestesia utilizou-se pentobarbital sódico (40 mg/Kg, ip) devido a molécula não expressar alteração quimio-metabólica (Cardoso et al., 2005).

4.4 Avaliação da resposta secretória da insulina

Para avaliação da resposta secretória da insulina à glicose, as ilhotas foram isoladas segundo a técnica originalmente descrita por Boschero, Delatree e Santos (1984).

Em cada experimento, foram sacrificados de um a três animais por concussão cerebral e decapitados para sangria. Após laparotomia e localização do ducto biliar comum, esse foi ocluído no extremo distal, junto ao duodeno, e dissecado próximo ao pedículo hepático, onde se introduziu uma cânula de polietileno no sentido da desembocadura. Cerca de 8 ml de solução de Hanks contendo 8 mg de colagenase, foram injetados via cânula, provocando a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12x2 cm) e incubado por aproximadamente 18 minutos a 37° C em banho maria.

Em seguida, ainda em 37° C, o conteúdo do tubo foi agitado vigorosamente por um minuto e vertido em um Becker sendo misturado com solução de Hanks. O sobrenadante foi aspirado com seringa (50 ml) após 3 minutos de decantação. Após repetir essa operação por 3 vezes, o produto final foi transferido para placas de Petri, de onde, e sob lupa, as ilhotas foram coletadas por aspiração com auxílio de pipeta de vidro de ponta afilada.

As ilhotas isoladas de ratos, pertencentes aos 3 grupos experimentais, foram coletadas alternadamente em placa de polietileno com 24 poços contendo, 4 ilhotas em cada poço, 0,5 ml de solução tampão Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina, onde foi adicionado glicose 5,6 mM e incubada por 45 minutos (pré-incubação), a 37° C em atmosfera de carbogênio, pH 7,4. A solução de Krebs foi substituída por 1,0 ml do mesmo tampão, contendo

diferentes concentrações de glicose: 2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L.

Em seguida procedeu-se uma nova incubação durante 90 minutos, nas condições acima referidas. Após este período, o sobrenadante de cada poço, transferidos para tubos de polietileno e conservados na geladeira a -20° C, até o momento da dosagem da insulina secretada. A insulina secretada durante o período de incubação foi avaliada de acordo com o método descrito por Scott et al., (1981).

4.5 Modelo de órtese utilizada para imobilização

Após anestesia, a pata posterior esquerda de cada animal foi imobilizada com órtese de resina acrílica, com um peso aproximado de 22 g associada a uma cinta de PVC ligada por rotadores laterais, como demonstrados na figura 1, permitindo a manutenção da articulação do tornozelo em posição de 90° e possibilitando a liberdade de movimento nas articulações do joelho e quadril, não restringindo a deambulação do animal de acordo com o modelo de Silva et al (2006).

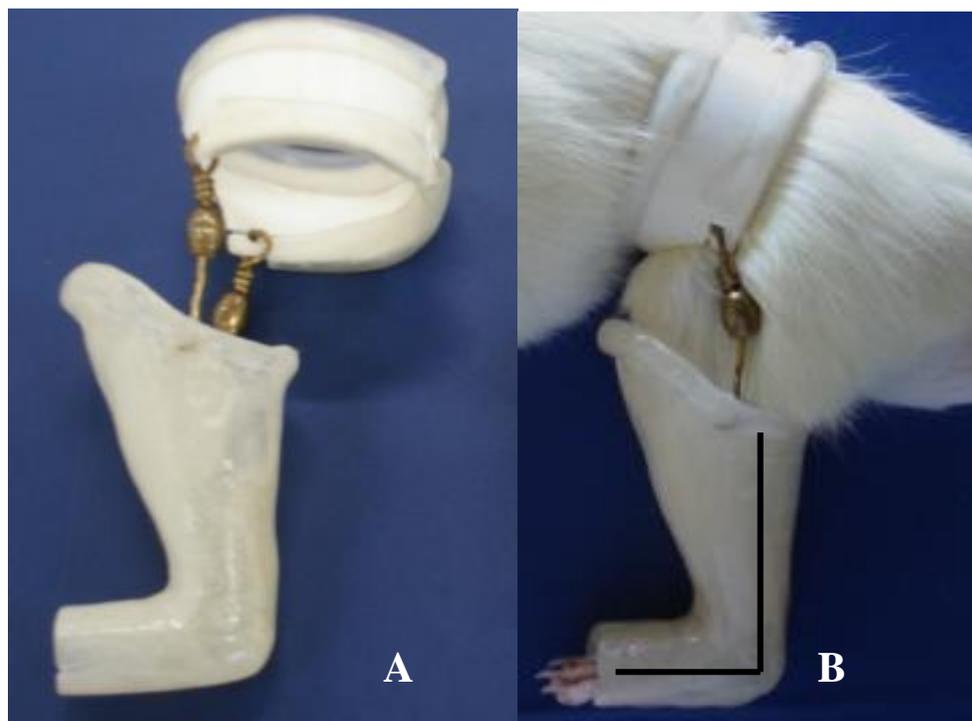


Figura 1 – Adaptação da órtese no membro posterior do animal. (A) modelo de órtese que não interfere na deambulação, porém, permite a descarga de peso no membro imobilizado. (B) modelo de órtese adaptada ao animal mantendo o tornozelo na posição de 90°.

4.6 Procedimento para a EENM

Os animais pertencentes aos grupos submetidos à EENM foram anestesiados com pentobarbital sódico (HYPNOL, CRISTÁLIA, SP) na concentração de 40 mg/Kg de peso corporal. Para a execução do protocolo de estimulação elétrica, o membro inferior esquerdo foi tricotomizado para garantir uma maior efetividade da estimulação e o posicionamento dos eletrodos.

Os músculos S, GB e GV dos grupos eletroestimulados foram submetidos à estimulação diária, por um período de 7 dias, iniciando 24 horas após a imobilização.

A frequência estabelecida foi de 10 Hz em função da ênfase dada ao músculo S, constituído principalmente por fibras do tipo I. A largura de fase foi de 0.4 ms, e a intensidade da corrente foi padronizada em 5.0 mA, a partir da visualização da contração muscular, onde a cada 5 minutos aplicou-se um acréscimo de 1.0 mA à corrente para não haver acomodação, totalizando 20 minutos diários.

O equipamento utilizado para a estimulação elétrica foi o Dualpex 961, além de 4 eletrodos de silicone-carbono com 1 cm² cada (vide figura 2).

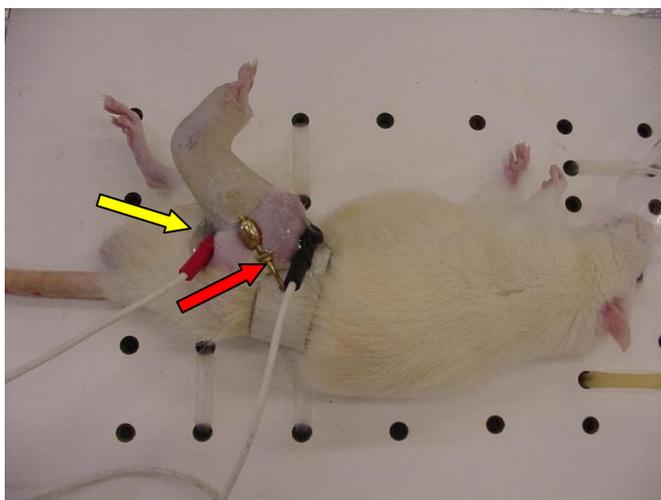


Figura 2 - Posicionamento de eletrodos (setas) durante a sessão de estimulação elétrica.

4.6 Amostragem e análises

Após o período experimental de 3 e 7 dias, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg peso, i.p.). O sangue, coletado através da veia renal, sendo centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e o plasma separado e direcionado para análise bioquímica. Amostras dos músculos S, GB, GV, foram retiradas e encaminhadas para a determinação do conteúdo de glicogênio. O S também foi encaminhado para a análise do peso e do conteúdo de proteínas totais e DNA.

4.7 Determinação do glicogênio muscular

As amostras dos músculos foram digeridas em KOH 30% a quente e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol a quente. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu, Russeau e Taylor, (1970). Os valores estão expressos em mg/100 mg de peso úmido.

4.8 Determinação da glicemia, conteúdo de proteínas totais e DNA

Para determinação da glicemia foi utilizado glicosímetro (Accu-check® - Roche). A concentração de proteínas totais foi avaliada através do KIT (PRO-

TOTAL) e a determinação da concentração de DNA muscular foi realizada através da metodologia proposta por Giles e Myers, (1965).

4.9 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para o ITT os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso i.p.) e após 15 minutos foi feita a primeira coleta de sangue por um pequeno corte na cauda do animal constituindo este o tempo zero. Após a primeira coleta (tempo zero) foi injetado insulina regular Biobrás[®] 1U/Kg de peso e novas amostras coletadas nos tempos 2,5; 5; 10 e 20 minutos e a glicemia avaliada pelo glicosímetro (Accu-check[®]).

4.10 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov seguido de ANOVA seguida do teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5%.

Para o teste ITT a variável analisada foi à porcentagem de decaimento (KITT), sendo calculada a porcentagem de cada animal e, logo após, calculada a média dessa variável a qual foi comparada com a média do outro grupo pelo teste “t” ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Inicialmente como parte dos procedimentos, realizamos uma avaliação bioquímica buscando conhecer se haveriam fatores ligados a toxicidade decorrente do tratamento com BCAA, e como demonstrado na tabela 2, observou que não houve diferença entre os índices de toxicidade comparando os grupos tratados e controle, sendo sugestiva a segurança na suplementação.

Tabela 2. Índices de toxicidade obtidos na avaliação bioquímica realizada no plasma dos animais controle (C) e suplementadoS durante 7 dias. Os dados representam as médias±epm, n=6. *p<0,05.

Grupos experimentais	C	S
Aspartatoaminotrasferase - AST (U/L)	110,80±18	122,80±6,8
Alaminoaminotransferase - ALT (U/L)	46±12	56±11
Uréia - (mg/dL)	36±7,2	39±2,7
Creatinina - (mg/dL)	0,60±0,03	0,63±0,06
Gamaglutamil transferase -(U/L)	0,42±0,01	0,45±0,04

A seguir, o estudo foi direcionado para a avaliação das relações entre o tratamento com BCAA e a resposta pancreática com ênfase na secreção de insulina. Foram avaliadas ilhotas pancreáticas de ratos controle (C), tratados com BCAA por 3 dias (T3D) e tratados com BCAA 7 dias (T7D). Estas foram isoladas e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose, como descrito anteriormente. Observamos que as ilhotas incubadas na concentração de 2,8 mmol/L não diferiram entre os grupos. Por outro lado, na concentração de 5,6 mmol/L, o grupo tratado 3 dias apresentou uma elevação significativa na resposta secretória quando comparado ao grupo controle. No entanto, o grupo tratado durante 7 dias não diferiu do controle. Este comportamento também observamos nas concentrações de glicose 8,3 mmol/L e 16,7 mmol/L

manifestando elevação na secreção de insulina nos primeiros 3 dias retomando a normalidade no tratamento durante 7 dias, como mostra a figura 3.

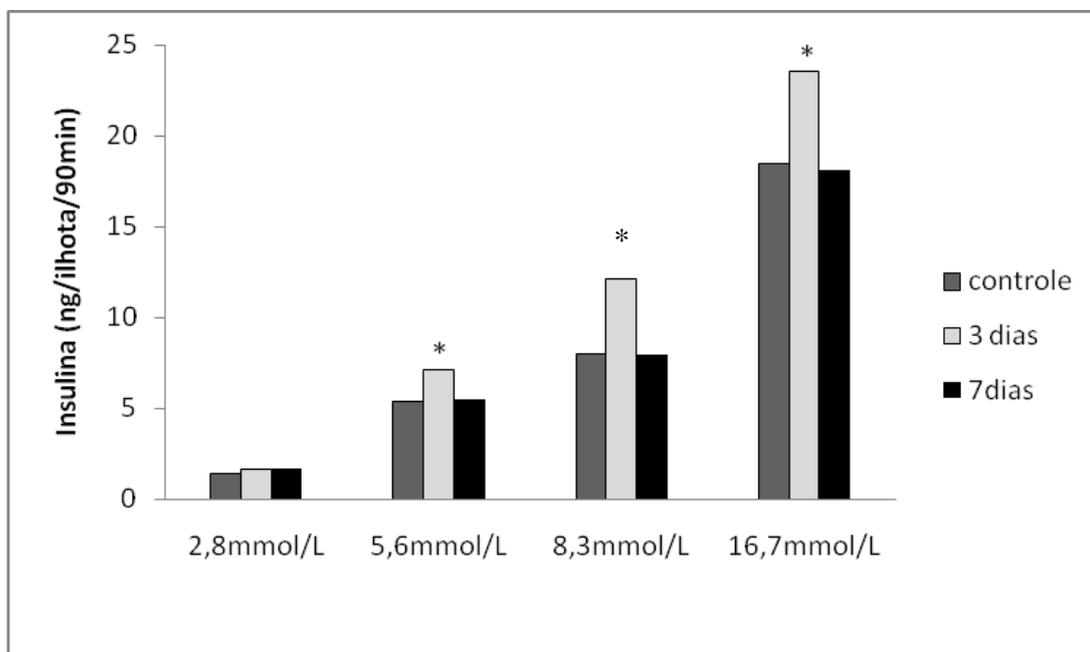


Figura 3 - Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos controle (C) e de ratos tratados com BCAA (9,2 mg/dia, via orogástrica) durante 3 dias (T3D) e 7 dias (T7D) e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L). Os valores estão expressos em ng/ilhota/90 minutos, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Após verificarmos que houve um efeito sensibilizador das células beta pancreáticas, passamos a avaliar se o tratamento com BCAA modificaria a velocidade de captação de glicose pelos tecidos periféricos, através do teste de tolerância a insulina que expressa a ação através da constante de decaimento (KITT). Como pode ser verificado na figura 4, após 3 dias de tratamento houve redução na constante de captação que passou de $2,90 \pm 0,3\%$ /minuto no grupo controle para $4,13 \pm 0,2\%$ /minuto no tratado 3 dias, retomando valores similares ao controle após 7 dias de suplementação, quando a constante foi, $2,35 \pm 0,2\%$ /minuto.

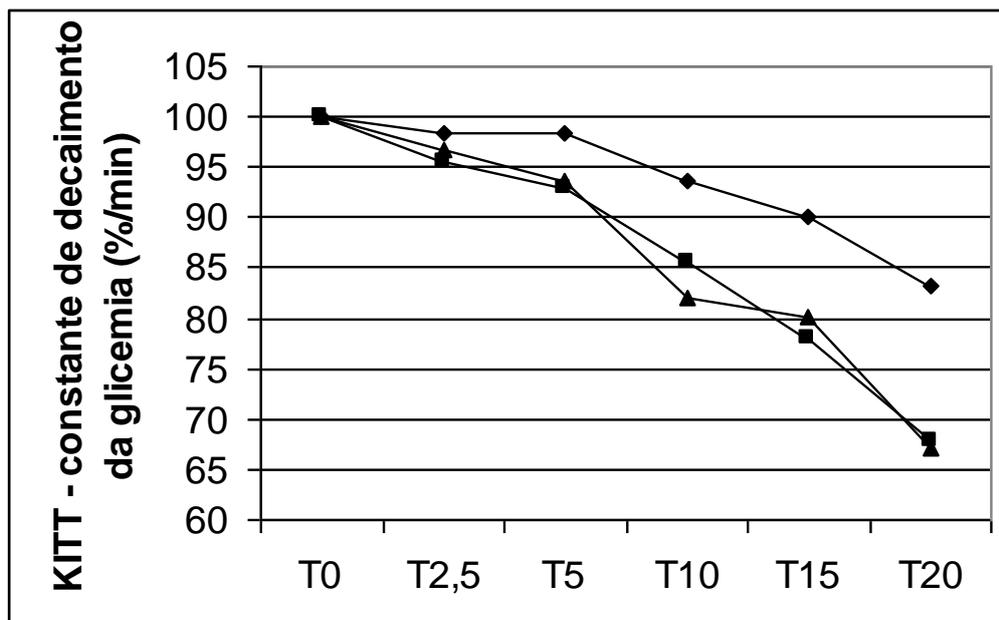


Figura 4 - Constante de decaimento da glicose (KITT, %/min.) durante o teste de tolerância à insulina realizada em ratos controle (■), tratados com BCAA durante 3 dias (◆) e tratados com BCAA durante 7 dias (▲).

5.1 Efeitos da imobilização

Inicialmente avaliamos os efeitos decorrentes da imobilização sobre as reservas de glicogênio do músculo esquelético submetido à imobilização na posição do tornozelo em 90°, comparando-os ao controle. Nesta condição, observamos que as reservas musculares foram significativamente reduzidas pelo desuso atingindo valores 48% menores no S, 24% no GBs e 53% no GV demonstrando que houve uma interface funcional entre a manutenção da atividade contrátil e a eficiência das vias metabólicas (vide figura 5). Outro fato a se destacar está relacionado ao peso do músculo S imobilizado que foi reduzido durante a imobilização atingindo valores 36% menores, passando de $135,71 \pm 2,3$ mg no grupo controle para $86,6 \pm 1,9$ mg no grupo imobilizado.

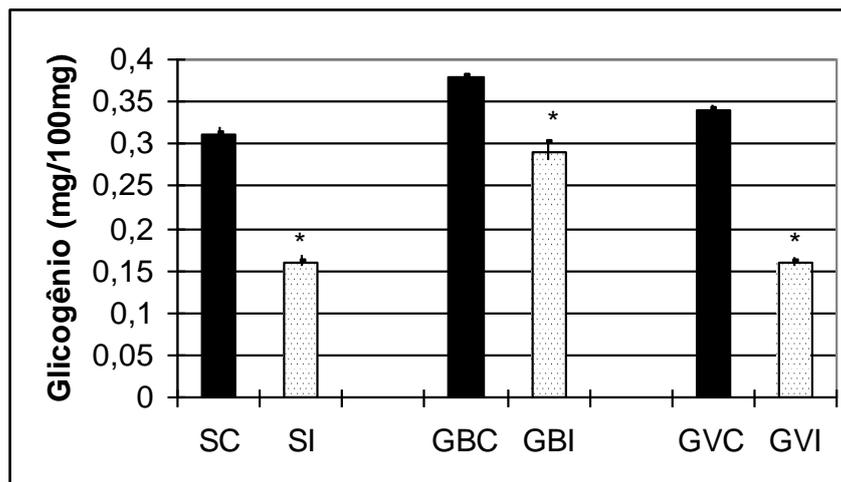


Figura 5 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S, GB e GV de ratos controle (C) e imobilizados (I). Os valores correspondem à média±epm, n=6. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

5.2 Efeitos do tratamento com BCAA

Nesta fase experimental analisamos os efeitos ligados ao tratamento (suplementação) com BCAA onde observamos aumento significativo nas reservas de glicogênio no grupo tratado quando comparado ao controle, uma vez que o grupo tratado apresentou reservas de glicogênio 39% maiores no S, 26% no GB e 29% no GV, demonstrando que o suplemento interferiu nos processos envolvidos nos ajustes metabólicos potencializando a formação desta reserva (vide figura 7). Nesta condição, o peso do músculo S também foi avaliado e não observamos diferença, sendo que, o peso do S controle foi $135,71 \pm 2,3$ mg e $137,87 \pm 1,6$ mg no grupo suplementado com BCAA.

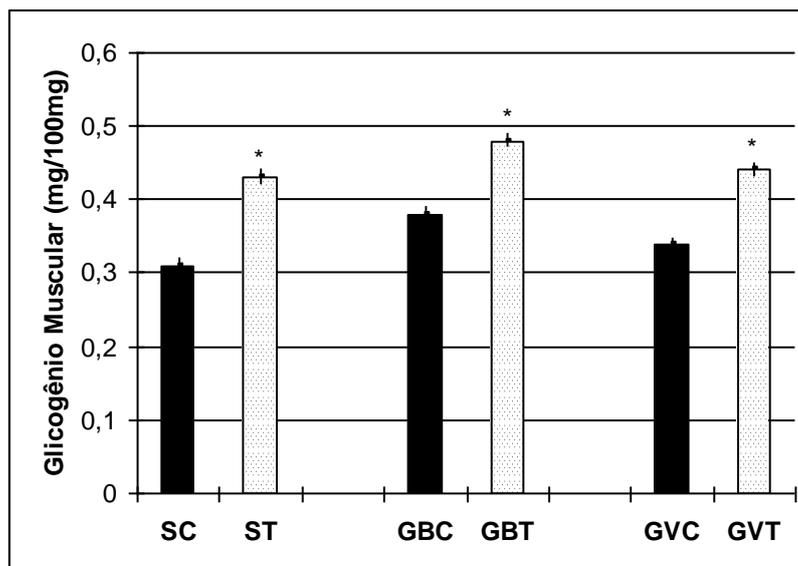


Figura 6 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S, GB e GV de ratos controle (C) suplementados com BCAA (T). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

5.3 Efeitos do tratamento com BCAA durante a imobilização

No decorrer dos experimentos optamos por avaliar os efeitos da suplementação com BCAA durante período de imobilização e ao analisarmos as reservas musculares de glicogênio verificaram-se maiores reservas de glicogênio muscular no grupo imobilizado suplementado se comparado ao grupo que não recebeu o suplemento, sendo observados valores 19% maiores no músculo S, 18% no GB e de 12% no músculo GV como demonstrado na figura 9. A seguir também foi analisado o peso do músculo S sendo verificado valores 7,6% maiores no grupo suplementado, sendo observado valores $86,6 \pm 1,9$ mg no grupo imobilizado e $93,7 \pm 2,2$ mg no grupo imobilizado suplementado.

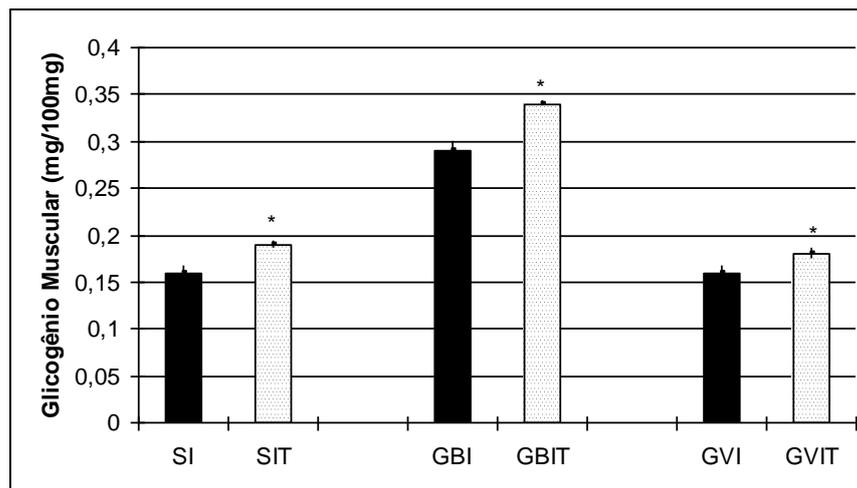


Figura 7 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S, GB e GV de ratos imobilizados (I) e imobilizados tratados (IT). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *p<0,05 comparado ao grupo imobilizado.

5.4 Efeitos da EENM

De acordo com a proposta buscamos avaliar a ação de uma ferramenta da prática fisioterapêutica associada à suplementação e optamos pela aplicação de EENM direcionando a análise ao conteúdo de glicogênio muscular. Em músculos normais observamos um aumento significativo no músculo S 32%, no GB observamos elevação de 31% já no GV a elevação foi de 23% se comparado ao controle, como se observa na figura 11. Neste ínterim, o peso do músculo S também foi analisado não sendo observado alteração se comparado ao grupo controle, apresentando $135,71 \pm 2,3$ mg no grupo controle e $129 \pm 1,7$ mg no grupo EE.

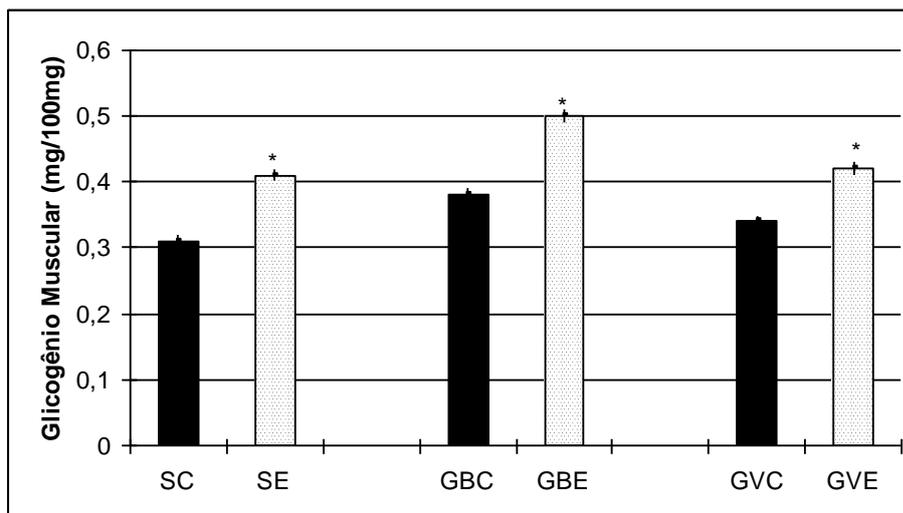


Figura 8 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S, GB e GV de ratos controle (C) e tratados com EENM (E). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *p<0,05 comparado ao grupo controle.

5.5 Efeitos da EENM durante a imobilização

Os efeitos da EENM foram avaliados durante o período de imobilização, no intuito de se observar às respostas metabólicas ligadas às reservas de glicogênio muscular. Deste modo, observamos aumento de 37% no músculo S, 38% no GB e 37% no GV, indicando uma importante e significativa ação da terapia, como pode ser observado na figura 13. Com relação ao peso do músculo S observamos que o grupo imobilizado e estimulado eletricamente apresentou-se 5% maior, sendo observado $86,6 \pm 1,9$ mg no imobilizado e $92 \pm 2,2$ mg no grupo imobilizado estimulado.

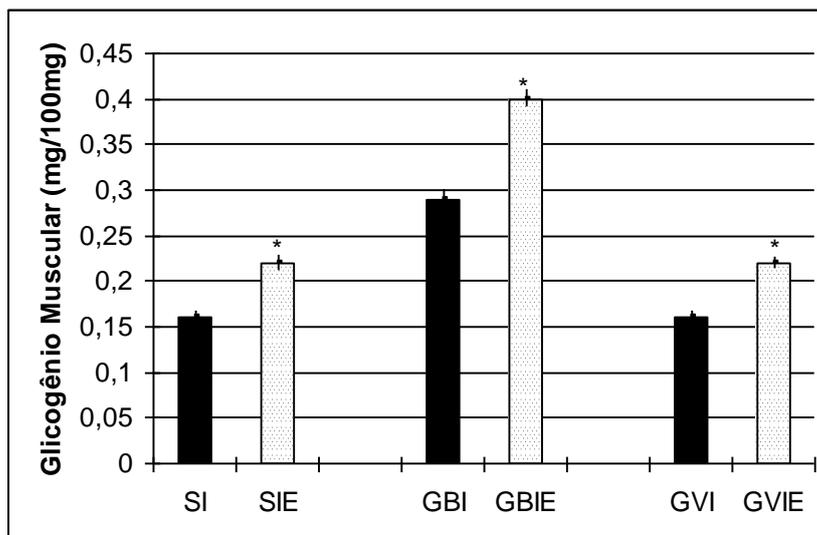


Figura 9 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S , GB e GV de ratos imobilizados (I) e imobilizados e tratados com EENM (IE). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *p<0,05 comparado ao grupo imobilizado.

5.6 Efeito da associação do tratamento com BCAA e a EENM

O efeito da associação do suplemento BCAA com a EENM também foi avaliado (vide figura 15). Nesta fase experimental, observamos um aumento significativo nas reservas de glicogênio no grupo suplementado e estimulado, sendo de 14% no S; no músculo GB esse aumento foi ainda mais significativo, atingindo 23% quando comparado os grupos tratado e tratado estimulado. No músculo GV que recebeu o suplemento associado à EENM, não houve diferença quando comparado aos demais grupos. Com relação ao peso do músculo S observamos um aumento de 11% comparado ao grupo estimulado tratado com a associação BCAA com EENM.

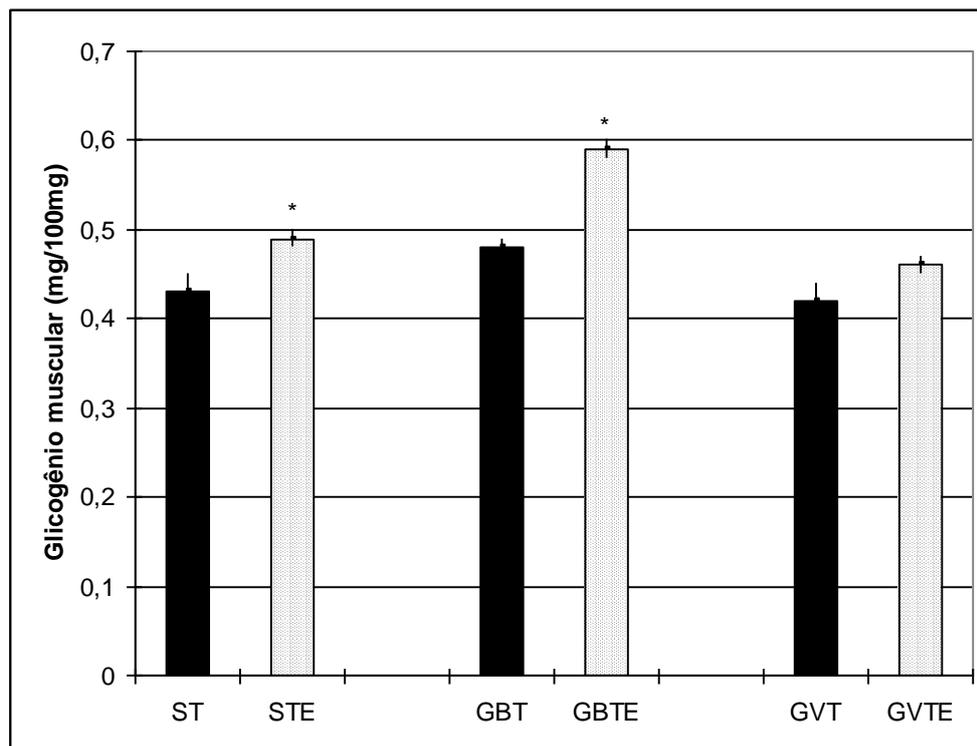


Figura 10 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S, GB e GV de ratos tratados (T) e tratados e estimulados (TE). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *p<0,05 comparado aos grupos tratados e estimulados.

5.7 Efeito da associação do tratamento com BCAA e a EENM durante a imobilização

Durante o período de imobilização foram avaliados os efeitos da associação do suplemento BCAA com a EENM no intuito de analisar as respostas metabólicas nas reservas de glicogênio muscular, sendo observadas alterações significativas, assim representadas, no músculo S do grupo imobilizado tratado e estimulado houve um aumento de 32% em relação ao S imobilizado tratado e 21% em relação ao S imobilizado estimulado. Entretanto, no músculo GB imobilizado tratado estimulado, ocorreu um aumento de 3% quando comparado ao GB imobilizado tratado, mas não estimulado. Já no GV imobilizado tratado

estimulado observamos um aumento de 36% e 21%, respectivamente relacionados aos grupos GV imobilizado tratado e GV imobilizado estimulado, assim como pode ser verificado na figura 17.

A análise do peso do músculo S também foi realizada nestas condições e foi constatado um aumento significativo no grupo imobilizado tratado e estimulado atingindo valores 21% maiores se comparado ao grupo imobilizado e tratado com o BCAA, e ainda foi 23% maior comparado ao grupo imobilizado estimulado, apresentando o valor de $92\pm 2,2$ mg no grupo imobilizado estimulado, $93,7\pm 2,2$ mg no grupo imobilizado tratado e $119,7\pm 0,7$ mg no grupo imobilizado tratado estimulado.

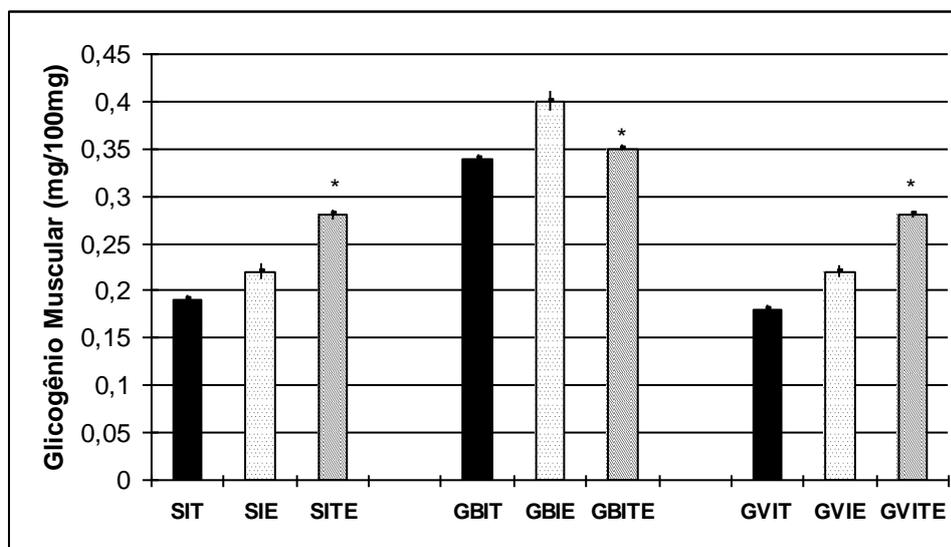


Figura 11 - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos S, GB e GV de ratos imobilizados tratados (IT), imobilizados e estimulados com EENM (IE) e em ratos imobilizados tratados e estimulados (ITE). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. *p<0,05 comparado aos grupos tratados e estimulados.

5.8 Análise da relação PT/DNA durante os diferentes tratamentos

Ao constatarmos alterações químio-metabólicas concomitantes ao desuso optamos por avaliar a relação PT/DNA, que indica alterações no número de miofibrilas. Ao comparar-se o grupo controle com o imobilizado observamos redução de 23% no músculo S, 26% no GB e 16% no GV. Neste mesmo aspecto, foi avaliado o grupo de ratos suplementados com BCAA e não foi observada diferença se comparado ao controle.

A seguir a avaliação foi direcionada ao grupo imobilizado e suplementado com BCAA sendo observada uma relação mais positiva preservando as miofibrilas, uma vez que, se comparado ao grupo somente imobilizado os valores apresentam-se 17% no S; 7,5% no GB e 9% no GV.

No intuito de avaliar a relação entre a EE e a relação PT/DNA iniciamos pelo estudo do grupo normal submetido à eletroterapia e não foi observada diferença se comparado ao grupo controle não estimulado. Por outro lado, quando a mesma análise foi aplicada ao grupo imobilizado submetido à estimulação elétrica observamos diferenças significativas representada por valores 16% maiores no S, 23% no GB e 13% no músculo GV, se comparado ao grupo somente imobilizado.

Dentro da proposta foi avaliada a associação entre a estimulação e a suplementação sendo verificados valores 12% maiores no S e GV e 16% no GB. Neste perfil de análise foi avaliado o grupo imobilizado submetido à associação das terapias, ou seja, suplementação e estimulação elétrica sendo observados valores 40 % maiores no S, 49% no GB e 20% maiores no GV, se comparado ao imobilizado. Ao compararmos o grupo imobilizado submetido à associação das

terapias com o grupo imobilizado suplementado observamos que na terapia associada os valores são 11% maiores no S, 20% no GB e 4% no GV. Como demonstra a tabela 3.

Tabela 3- Relação PT/DNA do músculo S, GB e GV de ratos controle (C), imobilizados (I), estimulados eletricamente (E), tratados com BCAA (T), imobilizados tratados com BCAA (IT) e imobilizados estimulados eletricamente e tratados com BCAA (IET). Os valores correspondem à média±epm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle, #p<0,05 comparado ao imobilizado, ≈ p<0,05 comparado ao tratado.

SC	175,3±3.3	GBC	120,63±1.1	GVC	124,7±2.3
SI	134,2±1.7*	GBI	90,8±1.5*	GVI	112,58±1.6
ST	191,58±1.2 [#]	GBT	125,12±1.1 [#]	GVT	143,69±1.1 [#]
SIT	169,04±0.8 [#]	GBIT	113,99±6.4 [#]	GVIT	129,6±1.3 [#]
SE	180,7±2.4 [#]	GBE	133,24±1.3	GVE	145,98±2.7 [#]
SIE	156,42±4.1 *, [#]	GBIE	112,1±4.5*	GVIE	127,13±3.6 [#]
SET	195,85±2.1*, [#]	GBET	140,07±2.8 *, [#]	GVET	139,94±1.3*, [#] ,≈
SIET	188,19±1.1 *, [#]	GBIET	135,69±1.7*, [#] ,≈	GVIET	135,09±1.1*, [#] ,≈

6 DISCUSSÃO

A literatura científica mostra inúmeros fatores que regulam a secreção de insulina destacando-se os hormônios, os íons, vários fármacos, os co-fatores metabólicos e principalmente os nutrientes, como a glicose e alguns aminoácidos. Com relação ao processo secretório da insulina, a glicose é o principal secretagogo, a qual, uma vez metabolizada gera mudanças do estado elétrico das células β , alteração na concentração citosólica de cálcio culminando com extrusão dos grânulos de insulina (Boschero, 1996; Koster et al., 2000). Neste sentido, nosso estudo inicia mostrando a sensibilidade das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos normais submetidas à incubação em diferentes concentrações de glicose e os dados mostram que os valores obtidos acompanham recentes publicações, indicando a qualidade das ilhotas utilizadas neste estudo (Ferreira et al., 2002).

Na seqüência foi avaliada a sensibilidade secretória das ilhotas pancreáticas isoladas de ratos suplementados durante 3 dias com BCAA. Neste experimento observamos que a secreção de insulina foi maior do que nas ilhotas controle e pode refletir elevação na sensibilidade secretória. Este resultado pode ter relação com a presença de maiores concentrações circulantes dos aminoácidos leucina e isoleucina, proveniente da suplementação diária. Neste sentido, já foi relatado que a leucina é um forte secretagogo em condições de normalidade de alimentação, fato que reitera nossos dados, uma vez que, os ratos tinham livre acesso ao alimento. Um ponto interessante se refere à ação da leucina enquanto secretagogo da insulina, visto que tem sido relatado que a acrofase do processo secretório ocorre somente após uma hora da administração e nossos dados mostram hipersensibilização após três dias (Nair e Short, 2005;

Floyd et al., 1996). E ainda, é conhecida a ação regulatória exercida pela leucina na síntese de diferentes proteínas envolvida no metabolismo celular, tendo em vista que este aminoácido modula a expressão gênica de proteínas envolvidas na proliferação das células β (Xu et al., 2001).

Na seqüência experimental foi avaliada a sensibilidade periférica à insulina, através do KITT e constatamos que o grupo suplementado durante 3 dias apresentou redução na captação da hexose, fato que pode refletir ajustes na população dos receptores de insulina em detrimento das mudanças na secreção insulínica induzida pelo suplemento (Delattre, 2004). Esta mudança na sensibilidade tecidual é de suma importância no conjunto das adaptações inerentes ao controle glicêmico, existindo um estudo demonstrando mudanças na atividade de vias bioquímicas em decorrência da elevação na disponibilidade de aminoácidos, com efetiva manifestação mesmo em insulinemia basal (Nigren e Nair, 2003).

Com relação à presença da valina no suplemento, tem-se que considerar que este aminoácido exerce uma ação discreta no processo secretório da insulina (Nigren e Nair, 2003). Por outro lado, merece destacar que leucina e valina são aminoácidos que apresentam estruturas similares e no suplemento administrado a valina representa um terço da totalidade dos aminoácidos, assim, o efeito observado pode ser a resultante da ação conjunta dos compostos que constituem o suplemento.

A seguir, analisou-se a resposta secretória de insulina em ilhotas isoladas após 7 dias de suplementação com BCAA e não observamos diferença do controle, sugerindo que haja uma reprogramação na função das células β , onde as células estariam ajustando a taxa de secreção de insulina de acordo com

a disponibilidade de secretagogos circulantes e assim, diretamente modulando a sensibilidade dos tecidos periféricos, para que o suprimento de substratos metabolizáveis esteja dentro dos padrões endócrinos de ajustes de multisinais (Mandoki et al., 2004). Cabe ressaltar que o KITT realizado nesta condição também não mostrou diferença na taxa de captação da hexose, se comparado ao controle.

Durante o período de imobilização na posição de 90°, observamos redução nas reservas de glicogênio dos músculos imobilizados, sendo essa redução mais proeminente no S e no gastrocnêmio fibras vermelha, ou seja, músculos predominantemente de fibras do tipo I. O peso do músculo S imobilizado nesta posição também se apresentou reduzido quando comparado ao controle.

As alterações histo-fisiológicas induzidas pelo desuso muscular têm sido demonstrada por diversos autores, no entanto os resultados são contraditórios descrevendo graus diferenciados de susceptibilidade à hipotrofia. Já houve relatos que durante a imobilização as fibras brancas (tipo II) são as mais comprometidas com a hipotrofia (Jaffe et al., 1978; Mcdougall et al.,1980).

Em contra partida há estudos demonstrando que as fibras musculares lentas (tipo I) possuem maior vulnerabilidade à atrofia que as fibras musculares rápidas (tipo II), devido a diferenças em seu metabolismo (Heslinga et al.;1995), seguindo a observação de que as enzimas oxidativas respondem por meio de sua atividade durante a imobilização, sugeriu-se que as fibras musculares que possuem um metabolismo predominantemente oxidativo (tipo I), foram mais susceptíveis a atrofia muscular (Appel, 1990). Nossos estudos corroboram com esses achados, onde as reservas musculares durante o período de imobilização

foram significativamente reduzidas pelo desuso atingindo valores 48% menores no S, 24% no GB e 53% no músculo GV.

Além dos efeitos metabólicos, outro fator que influencia para que as fibras tipo I sejam as mais afetadas durante a imobilização são suas características posturais. Ploug et al. (1995) relacionaram a maior susceptibilidade do S à atrofia por inatividade devido ser um músculo postural e assim possuir uma atividade basal maior do que os não posturais.

Estudos relatam que os músculos considerados antigravitacionais, os uniarticulares e os que possuem maior proporção de fibras lentas são os mais vulneráveis a atrofia induzida pelo desuso muscular (Lieber, 2002).

Segundo Qin et al, (1997) a imobilização por diferentes períodos resulta em atrofia variando de 15% a 70%, dependendo dos animais utilizados e das fibras avaliadas. Gomes et al. (2004), observaram redução de 43% da área da fibra do músculo S imobilizado durante 3 semanas. Kanus et al., (1998), relataram redução de 69% da área das fibras desse músculo imobilizados por meio de aparelho gessado durante 3 semanas.

Este estudo demonstrou que o peso do músculo S de ratos com imobilização do tornozelo na posição de 90° apresentou uma redução de 36% durante 7 dias de imobilização, concordando com o estudo de Durigan et al. (2005), onde a imobilização do músculo durante 15 dias promoveu uma redução de 7,2% do peso do músculo S, 35% de redução na área das fibras musculares e um aumento de 160% do tecido conjuntivo e redução nas reservas de glicogênio muscular, demonstrando uma inter-relação entre a atividade contrátil com a homeostasia energética e a morfologia e a morfologia da fibra muscular, indicando para o quadro de hipotrofia muscular.

Além destes achados outros autores como Józsa et al. (1990), Williams e Goldspink, (1984), Okita et al. (2004), Amiel et al. (1982); relataram proliferação de tecido conjuntivo, desarranjo das fibras de colágeno, redução no comprimento dos sarcômeros e da amplitude articular no músculo S de ratos imobilizados na posição encurtada de tornozelo.

Devidos aos fatores deletérios provocados pela imobilização optou-se por utilizar o suplemento BCAA, sob a hipótese de que ele promova melhora nas condições metabólicas do músculo durante o período de imobilização.

A suplementação com BCAA em músculos normais proporcionou um aumento nas reservas glicogênicas, assim como no peso muscular do S e provavelmente no número de miofibrilas. Corroborando com os estudos de Shimomura et al. (2006), Norton e Layman, (2006), onde demonstraram que a suplementação com aminoácidos especialmente a leucina, apresenta um papel importantíssimo no metabolismo de proteínas, auxiliando a recuperação muscular.

Durante o período de imobilização a suplementação com BCAA foi devesas importante, pois apresentou um aumento significativo nas reservas de glicogênio muscular, assim como no peso do músculo S e manteve uma relação mais positiva quanto ao número de fibras musculares, sugerindo que o tratamento com BCAA, possa manter o trofismo muscular durante o período de imobilização.

Nos estudos de Durigan et al. (2005), a EENM mostrou ser eficaz em minimizar o aumento da densidade da área de tecido conjuntivo, bem como a redução na área das fibras musculares do S submetido à imobilização durante 15 dias.

Avramids et al. (2003), descreveram a importância da estimulação elétrica com objetivos de recuperar a força muscular, reduzir a proliferação do

tecido conjuntivo intramuscular, reduzir o tempo de reabilitação e prevenir a atrofia muscular.

Qin et al. (1997) utilizaram estimulação elétrica com frequência de 50Hz aplicada diariamente por 30 minutos, 5 vezes por semana no músculo tibial anterior de coelhos e observaram que o recurso foi efetivo na prevenção da atrofia muscular minimizando a redução da área de secção transversal, fibrose intersticial e deficiência de suprimento sanguíneo. Polacow et al. (2003), também demonstraram que a estimulação elétrica (f:10Hz, T: 3ms, pulsos quadráticos bifásicos, ON/OFF de 2:2 segundos, 20 minutos) promoveu redução da densidade da área do tecido conjuntivo nos músculos S desnervados por 15 dias, apontando para a possível redução da fibrose, e aumento da quantidade de grânulos de glicogênio.

Guirro et al. (2004) descreveram resultados semelhantes, onde a EENM elevou os níveis das reservas de glicogênio nos músculos da pata posterior de ratos submetidos à desnervação por um período de trinta dias.

A elevação do conteúdo de glicogênio nos músculos imobilizados e que receberam a EENM se deve a maior captação de glicose pela população de GLUT4, insensível a insulina, que são externalizados, e também pela ativação dos sistemas enzimáticos citosólicos envolvidos na glicogênese (Goodyear et al. 1992).

Segundo Silva et al. (1999) e Guirro et al. (2004), a estimulação elétrica promove a elevação na atividade contrátil das fibras musculares e assim a dinâmica da captação e metabolismo da glicose e a atividade das vias metabólicas celulares são aumentadas.

Hamada et al. (2003), observaram que a captação de glicose corporal em ratos é agudamente aumentada em resposta a 20 minutos de EE e este aumento perdura por pelo menos 90 minutos após o término da aplicação deste recurso.

Deste modo nossos resultados demonstram que a estimulação elétrica durante períodos de imobilização é um ótimo recurso, sugerindo que seu uso associado com outras técnicas possa ser ainda mais benéfico para melhorar o metabolismo muscular e diminuir os efeitos deletérios da imobilização.

Gomes e Tirapegui, 2000, Othani et al.2006, relatam que durante a atividade motora o músculo capta BCAA da corrente sanguínea para oxidá-los, fato que poderia resultar no aumento do desempenho por oferecer ao músculo substratos que diminuíssem a quebra de glicogênio. Estes dados demonstram uma relação funcional entre a formação de reservas glicogênicas e sua mobilização, *locus* em que a estimulação elétrica pode ter contribuído de forma facilitadora para a melhora do status energéticos da musculatura submetida ao desuso.

7 CONCLUSÃO

A suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) foi efetiva em manter o status nutricional dos músculos imobilizados, fato ainda mais evidenciado na presença da EENM, indicando que esta associação contribuiu de maneira eficaz, mantendo os músculos em melhores condições energéticas, além de demonstrar uma ação anti-catabólica, fatores estes que podem favorecer uma reabilitação acelerada na fase pós- imobilização.

8 REFERENCIAS*

Aas, V., Torbla, S., Andersen, M. H., Jensen, J., Rustan, A.C. Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell models of hyperglycemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 967: 506-515.

Akima H, Hotta N, Sato K, Ishida K, Koike T, Katayama K. Circle ergometer exercise to counteract muscle atrophy during unilateral lower limb suspension. *Aviat Space Environ Med* 2009; 80:652-6.

Amiel D, Woo SLY, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical-biomechanical correlation. *Acta orthop scan* 1982; 53: 325-332.

Appell HJ. Muscular atrophy following immobilization. *Sports Med* 1990; 7: 42-58.

Appell, H. J. Skeletal muscles atrophy during immobilization *Int. J. Sports Med.* 1986; 7: 1-5.

Avramidis K, Strike PW, Taylor PN, Swain ID. Effectiveness of electric stimulation of the vastus medialis muscle in the rehabilitation of patients after total knee arthroplasty. *Arch Phys Med Rehabil* 2003; 84: 1850-53.

Booth FW, Kelso JR. Effect of hind-limb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Plurgers Arch.* 1973; 342: 231-338.

Booth FW, Seider, MJ. Recovery of skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J. Appl. Physiol.* 1979; 47: 974-977.

Boschero AC, Delattre E, Santos M.L. Inhibition of insulin release by the aminoglycoside antibiotic sisomicin. *Horm. Metab. Research.* 1984; 13(9): 531-532

Boschero AC. Acoplamento excitação-secreção nas células B pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1996; 40: 149-55.

Boyes, G.; Johnston, J. Muscle fiber composition of rat vastus intermedius following immobilization at different muscle lengths. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 1979; 381: 195-200.

Cardoso AR, Carvalho CR, Velloso LA, Brenelli SL, Saad MJ, Carvalheira JB. Effect of thiopental, pentobarbital and diethyl ether on early steps of insulin action in liver and muscle of the intact rat. *Life Sci.* 2005; 76(20): 2287-9

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors- Grupo de Vancouver; 2005. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. FEBS Lett 2001; 500: 119-24.

Carvalho JB, Ribeiro EB, B. GR, Telles MM, Velloso LA, Gontijo JA, Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. Diabetes 2002a; 51: A41.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. Arq Bras Endocrinol Metab 2002b; 46(4): 419-425

Chevrant SN, Carter R, Kolka MA, Lieberman HR, Kellog MD, Sawka MN. Branched-chain amino acids supplementation and human performance when hipohydrated in the heat. J. Appl. Physiol. 2004; 97: 1275-1282.

Clark BC. In vivo alterations skeletal muscle form and function after disuse atrophy. Medicine e Science in Sports e Exercise; 2009; 41: 1869-1875.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia. Arq Bras Endocrinol Metab 1992; 46 (4): 30-36. São Paulo

Coombes JS, Mcnaughton LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine Kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. J. Sports Med. Phys. Fitness. 2000; 40: 240-246.

Crowe MJ, Weatherson JN e Bowden BF. Effects of dietary leucine supplementation on exercise performance. Eur. J. Appl. Physiol. 2006; 97: 664-672.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 1995; 378: 785-9.

Delattre E. Ritmos hormonais do pâncreas endócrino: dos fundamentos cronobiológicos às implicações clínicas. Medicina. 2004; 37: 51- 64.

Durigan JLD, Cancelliero KM, Polacow, ml O, Silva CA, Guirro, RRJ. Modelos de desuso muscular e EENM: aspectos pertinentes à reabilitação. Fisio Mov 2005; 18(4): 53-62.

Durigan JLD. Estudo morfométrico do músculo S de ratos submetidos à imobilização associado à EENM. Tese de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia – UNIMEP, 2006.

Edgerton VR, Barnard RJ, Peter JB, Maier A, Simpson DR. Properties of immobilized hind-limb muscle of the *galago senegalensis*. Exp Neurol. 1975; 46: 115-131.

Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppglia LF, Araujo E, Delghingaro-Augusto V, Latorraca MQ, Toyama M, Boschero AC, Carneiro EM. Decreased cholinergic

stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinaseC α expression. *J. Nutri.* 2002; 133: 695-699.

Floyd JC, Fajans SS, Conn JW, Knoff RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids in dogs. *J. Clin Invest.* 1996; 45: 1487-1502.

Franch J, Aslesen R, Jensen J. Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Biochem. J.* 1999; 344: 231-235.

Giles KW, Myers. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1965, 206(4979): 93-94.

Gomes MR, Tirapegui J. Relação de alguns suplementos nutricionais e o desempenho físico. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2000; 50: 317-329.

Goodyear LJ, Hirshman MF, Valyou PM, Horton ES. Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes* 1992; 41: 1091-1099.

Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do musculoesquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter* 2004; 8: 21-27.

Hamada T, Sasaki H, Hayashi T, Moritani T, Nakao K. Enhancement of whole body glucose uptake during and after human skeletal muscle low-frequency electrical stimulation. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2107-2112.

Hilder TL, Tou JC, Grindeland RE, Wade CE, Graves LM. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.* 2003; 553: 63-67.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(6): 1235-41.

Jaffe DM, Terry RD, Spiro AJ. Disuse atrophy of skeletal muscle. A morphometric study using image analysis. *J. Neurol. Sci.* 1978; 35:189-200.

Jaffe, L. F.; Stern, C. D. Strong electrical currents leave the primitive streak of chick embryos. *Science.* 1979; 206(4418): 569-71.

Järvinen MJ, Einola SA, Virtanen EO. Effect of position of immobilization upon tensile properties of rat gastrocnemius muscle. *Arch Phys Med Rehab.* 1992; 73: 253-257.

Józsa L, Kannus P, Thoring J, Reffy A, Jarvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilization on intramuscular connective tissue. *J Bone Joint Surg* 1990; 72: 293-7.

Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TL, Kvist M, Vieno T, Jarvinen TA, et al. Free mobilization and low- to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol*. 1998; 84(4): 1418-24.

Kobayashi HK, Kato H, Hirabayashi Y, Murakami H, Suzuki H. Modulation of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. *J. Nutr*. 2006; 136:234S-236S.

Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive k⁺ channel (katp) connection. *Diabetes*. 2000; 54(11): 3065-3072.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, and plasticity, the physiological basis of rehabilitation. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, 2002.

Mandoki JJ, Mendoza-Patino N, Molina-Guarneros JA, Jiménez-Orozco FAJ, Velasco-Velázquez JA, Jiménez-Orozco FA, Velasco-Velázquez MA, García Mandrogón MJ. Hormone multifunctionalities: a theory of endocrine signaling, command and control. *Progress in Biophysics e Molecular Biology*. 2004; 86: 353-377.

Mcdougall JD, Elder GCB, Sale DC, Moroz JR e Sutton JR. Effects of strength training and immobilization on human muscle fibers. *Eur. J. Appl. Physiol*. 1980; 43: 25-34.

Mussachia XJ, Stefen JM, Fell RD. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. *Exerc. Sport Sci. Rev*. 1988; 16: 61-87.

Nair KS, Short KR. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J. Nutr*. 2005; 135: 1547-1552.

Nigren J, Nair KSD. Differential regulation of protein dynamics in splanchnic and skeletal muscle beds by insulin and aminoacids in health humans subjects. *Diabetes*. 2003; 52:1377-1385.

Norton LE e Layman DK. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *J. Nutr*. 2006; 136: 533S-537S.

Okita M, Yoshimura T, Nakano J, Motomura M, Eguchi K. Effects of reduced joint mobility on sarcomere length, collagen fibril arrangement in the endomysium, and hyaluronan in rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2004; 25:159-66.

Othani M, Sugita M, Maruyama K. Amino acid mixture improves training efficiency in athletes. *J. Nutr*. 2006; 136: 538S-543S.

Ploug T, Ohkuwa T, Handberg A, Vissing J, Galbo H. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995; 268: 980-986.

Polacow ml O, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfológico do músculo S denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisioter* 2003; 7: 77-84.

Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch Phys Med Rehabil* 1997; 78: 512-7.

Saad MJA. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Braz. J. Med. Biol.Res.* 1994; 27: 941-957.

Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1839-49.

Sakakima H, Yoshida Y, Sakae K, Morimoto M. Different frequency treadmill running in immobilization-induced muscle atrophy and ankle joint contracture of rats. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2004; 14: 186-192.

Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1981; 21: 470-475.

Seki K, Taniguchi Y, Narusawa M. Alterations in contractile properties of human skeletal muscle induced by joint immobilization. *J. Physiol.* 2001; 530.30: 521-532.

Shimomura Y, Yakemoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N, Kobayashi H, Mawatari K. Nutritional effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J. Nutr.* 2006; 136: 529-532.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow ml O, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Br. J. Med. Biol. Res.* 2006; 39: 979-85.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow ml O, Silva HC, Tanno AP, Rodrigues D. Efeito da metformina e estimulação elétrica sobre as reservas de glicogênio do músculo S normal e denervado. *Rev Bras Fisiot* 1999; 3: 55-60.

Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 1970; 28(2): 234-236.

Urso ml .Disuse Atrophy of Human Skeletal Muscle: Cell Signaling and Potential Interventions. *Med Sci Sports Exerc.* 2009 (2); 41: 1860-1868.

Thomas G, Hall MN. TOR signaling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 782-7.

Watson P, Shirreffs SM, Maughan RJ. The effect of acute branched-chain amino acids supplementation on prolonged exercise capacity in a warm environment. *Eur.J. Appl. Physiol.* 2004; 93: 306-314.

Williams PE, Goldspink G. Changes in sarcomere length and physiological properties of immobilized muscle. *J. Anat. (London).* 1978; 127: 459-468.

Williams PE, Goldspink G. Connective tissue changes in immobilized muscle. *J Anat* 1984; 138: 343-504.

Williams PE, Goldspink G. The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibers. *J. Anat.*1973; 116: 45-55.

White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998; 182: 3-11

White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40: S2-S17.

Xu G, Kwom G, Cruz WS, Marshall CA, Mcdaniel ml . Metabolic regulation by leucine of translation initiation through the m-TOR signaling pathway by pancreatic beta cells. *Diabetes.* 2001; 50: 353-360.

Yoshida, N. et al. Electrical stimulation prevents deterioration of the oxidative capacity of disuse-atrophied muscle in rats. *Aviat Space Environ Med.* 2003; 74 (3): 207-211.