

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**O efeito da suplementação com aminoácido de cadeia ramificada no
músculo sóleo imobilizado e desnervado e da valina isoladamente
em músculos desnervados de ratos**

Camila Limongi Pacheco

2011

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMILA LIMONGI PACHECO

**O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM
AMINOÁCIDO DE CADEIA RAMIFICADA NO
MÚSCULO SÓLEO IMOBILIZADO E
DESNERVADO, E DA VALINA
ISOLADAMENTE EM MÚSCULOS
DESNERVADOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do Título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Intervenção fisioterapêutica. Linha de pesquisa: Dosimetria e convalidação de recursos fisioterapêuticos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza O. Polacow

PIRACICABA
2011

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª. Maria Luiza Ozores Polacow - Professora orientadora

Prof. Dr. João Luiz Quagliotti Durigan - Professor examinador - UFSCAR

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva - Professor examinador - UNIMEP

SUPLENTES:

Profª Drª. Marlene Moreno - Professora suplente - UNIMEP

Profª Drª. Vivian Cristine Calegari - Professora suplente - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

A Deus, que como Salomão, me presenteou com a sabedoria.

Aos meus amados e incansáveis pais, Marco Antônio Godoy Pacheco e Maria de Fátima C. Limongi Pacheco, que com amor me ensinaram a batalhar pelos objetivos e me proporcionaram este sonho.

Ao meu noivo Rafael M. Licco que com paciência compreendeu os momentos difíceis.

A orientadora e amiga Maria Luiza Ozores Polacow que nos momentos delicados soube me ajudar, nos momentos de erro soube ensinar, nos momentos de acerto soube elogiar, e nos momentos de comemoração soube vibrar. Obrigada!

Ao “Pai” Carlos Alberto da Silva que transformava horas e horas dentro do laboratório, em momentos de descontração, aprendizagem, lição de vida, companheirismo, e o mais importante nos ensinou que educar é mostrar o encanto da possibilidade.

Aos amigos do mestrado pelos momentos maravilhosos e pela amizade que levaremos para o resto da vida, e em especial ao amigo Almir V. Dibai Filho pelas horinhas me ajudando com a estatística.

“ E peço isso: que a vossa caridade abunde mais e mais em ciência e em todo o conhecimento” Fp 1:9

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse um milagre”

Albert Einstein

RESUMO

O aminoácido de cadeia ramificada (BCAA), composto por leucina, isoleucina e valina, promove o anabolismo proteico muscular, auxilia na secreção de insulina, na redução de danos musculares. E é largamente metabolizado nos tecidos periféricos, principalmente no músculo esquelético. O objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente o músculo sóleo imobilizado e desnervado de ratos suplementados com BCAA e analisar bioquimicamente o comportamento de músculos desnervados tratado com valina. Os animais foram divididos para análise histológica em 6 grupos: controle (C), desnervado (D), imobilizado (I), suplementado BCAA 7 dias (BCAA), desnervado suplementado com BCAA 7 dias (D+BCAA), imobilizado (I+BCAA). Para análise bioquímica os animais foram divididos em 4 grupos: controle (C), desnervado (D), tratado com valina 7 dias (V), desnervado tratado com valina 7 dias (D+V). A análise estatística incluiu o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados, seguido do teste não paramétrico Kruskal-Wallis post hoc Dunn para os dados histológicos, o teste T pareado para os dados bioquímicos, análise de variância e o teste post hoc Newman-Keuls para os elementos radioativos e para o teste ITT a variável analisada foi à porcentagem de decaimento (KITTT). A suplementação com BCAA aumentou a secção transversa da fibra muscular em 74,94% no grupo I+BCAA e 90,37% no grupo D+BCAA, aumentou em 97,21% a densidade de área de tecido conjuntivo no grupo C, porém diminuiu em 34,44% no grupo D+BCAA, e se manteve no grupo I+BCAA. A valina elevou as reservas de glicogênio, a sensibilidade tecidual à insulina, a captação, metabolização e oxidação da glicose, não alterou células beta pancreáticas e não apresentou toxicidade neste modelo experimental. Podendo ser utilizados em situação de desuso.

Palavras-chave: Aminoácido de Cadeia Ramificada, valina, músculo, imobilização, desnervação

ABSTRACT

The branched-chain amino acid (BCAA), composed of leucine, isoleucine and valine, promotes muscle protein anabolism, assists in insulin secretion, reduce muscle damage. It is extensively metabolized in peripheral tissues, mainly in skeletal muscle. The objective of this study was to evaluate histologically the soleus muscle immobilized and denervated rats supplemented with BCAA and biochemical behavior of denervated muscles treated with valine. The animals were divided for histological analysis in 6 groups: control (C), denervated (D), immobilized (I), 7 days supplemented BCAA (BCAA), denervated 7 days supplemented with BCAA (BCAA + D), immobilized (I + BCAA). For biochemical analysis the animals were divided into four groups: control (C), denervated (D), treated with 7 days valine (V), denervated treated with 7 days valine (V + D). Statistical analysis included the Shapiro-Wilk test to assess the normality of the data, followed by the nonparametric Kruskal-Wallis post hoc Dunn for the histological data, the paired t test for biochemical data, analysis of variance and post hoc Newman -Keuls test for radioactive elements and the ITT test the variable analyzed was the percentage of decay (KITT). BCAA supplementation increased muscle fiber cross-section of 74.94% in group I and 90.37% + BCAA group D + BCAA, increased by 97.21% areal density of connective tissue in group C, but decreased by 34.44% in group D + BCAA, and stayed on I + BCAA. The valine increased the reserves of glycogen, the tissue sensitivity to insulin, the uptake, metabolism and oxidation of glucose did not alter pancreatic beta cells and showed no toxicity in this experimental model. It can be used in situations of disuse.

Keywords: Branched chain amino acid, valine, muscle, immobilization, denervation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Procedimento cirúrgico da desnervação. Figura A: membro posterior tricotomizado; B: nervo ciático em destaque; C: comprimento do nervo seccionado; D: incisão suturada 30
- Figura 2** - 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° 31
- Figura 3** - Músculo Sóleo controle (C), e Músculo Sóleo controle suplementado com o aminoácido bcaa (BCAA) por um período de 7 dias 40
- Figura 4** - Músculo Sóleo desnervado (D), e Músculo Sóleo desnervado suplementado com o aminoácido bcaa por um período de 7 dias (D+BCAA) 41
- Figura 5** - Músculo Sóleo imobilizado por um período de 7 dias (I) e Músculo Sóleo imobilizado e suplementado com o aminoácido bcaa por 7 dias (I+BCAA) 42
- Figura 6** - Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção mista (GM) do grupo controle (C), desnervado (D), tratados com valina (V) e desnervados tratados com valina (DV). Os valores correspondem à média±dpm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao desnervado; ~ p<0,05 comparado ao desnervado tratado com valina 44

Figura 7 - Peso do músculo sóleo (mg) do grupo controle (SC), desnervado (SD), tratados com valina (SV) e desnervados tratados com valina (SDV). Os valores correspondem à média±dpm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle 45

Figura 8 - Conteúdo hepático de glicogênio (mg/100mg) do grupo controle (C), desnervado (D), tratados com valina (V) e desnervados tratados com valina (DV). Os valores correspondem à média±dpm, n=6, p<0,05 46

Figura 9 - Constante de decaimento da glicemia (%/min) dos grupos controle e tratados com valina (7 dias). Os valores correspondem à média ± dpm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle 47

Figura 10 - Área sob a curva (concentração de glicose/120 min) dos grupos controle e tratados com valina (7 dias). Os valores correspondem à média ± dpm, n=6 48

Figura 11 - Captação de 2-deoxiglicose (umol/g.h) no músculo sóleo de animais controle (C), tratados com valina (V), desnervado (D) e desnervado tratado com valina (DV). Os valores correspondem à média ±dpm, n=4. * p<0,05 comparado ao controle; # p<0,05 comparado ao tratado com valina; ~ p<0,05 comparado ao desnervado 49

Figura 12 - Oxidação de glicose (umol/g.h) no músculo sóleo de animais controle (C), tratados com valina (V), desnervado (D) e desnervado tratado com valina (DV). Os valores correspondem à média ±dpm, n=4. * p<0,05 comparado ao controle; # p<0,05 comparado ao tratado com valina; ~ p<0,05 comparado ao desnervado 50

Figura 13 - Incorporação de glicose ($\mu\text{mol/g.h}$) no músculo sóleo de animais controle (C), tratados com valina (V), desnervado (D) e desnervado tratado com valina (DV). Os valores correspondem à média \pm dpm, $n=4$. * $p<0,05$ comparado ao controle; # $p<0,05$ comparado ao tratado com valina; ~ $p<0,05$ comparado ao desnervado

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição dos ratos em grupos experimentais para análise histológica (n=5) 28
- Tabela 2** - Distribuição dos ratos em grupos experimentais para análise bioquímica (n=5) 28
- Tabela 3** - Média \pm dpm da área (μm^2) da secção transversa de fibras do músculo sóleo nos diferentes grupos experimentais 38
- Tabela 4** - Porcentagem de área do tecido conjuntivo nos diferentes grupos experimentais. Os valores correspondem à média \pm dpm, n=5 *diferentes do controle (p<0,05) # diferentes do controle (p<0,05) 39
- Tabela 5** - Perfil bioquímico de ratos controle, suplementados com valina 0,25mM/100g, e suplementados com BCAA 0,5ml/dia, durante 7 dias. Os valores correspondem às médias \pm dpm, n=6 43

LISTA DE ABREVIATURAS

μm – Micrômetro

cm – Centímetro

μm^2 - Micrômetros quadrado

α – Alfa

SIRT1 – Enzima sirtuína

ITT – Teste de tolerância à insulina

GTT – Teste de tolerância à glicose

g – Gramas

h – Horas

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

ml/dia – Mililitros por dia

mMol/g – Milimol por grama

mg/kg – Miligramas por kilograma

KOH – Hidróxido de Potássio

rpm – Rotação por minuto

mg/mg – miligrama por miligrama

U/Kg – Unidade por kilograma

g/Km – Grama por kilograma

mg – Miligrama

mL – Mililitros

mM – Milimol

$U^{14}C$ – Carbono 14

mCi/mL – micro kirri por mililitro

$\mu M/mL$ – Micromol por mililitro

μL – Microlitro

p – Valor de probabilidade

dpm – Desvio padrão da média

\leq - Menor ou igual

$<$ - Menor

$\mu mol/g.h$ – unidade mol por grama por hora

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO GERAL	25
2.1 Objetivo Específico	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 ANIMAIS	27
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.2.1 Análise Histológica	27
3.2.2 Análise Bioquímica	28
3.3 PROCEDIMENTOS	29
3.3.1 Suplementação com BCAA	29
3.3.2 Suplementação com Valina	29
3.3.3 Anestesia	29
3.3.4 Desnervação	29
3.3.5 Imobilização	30
3.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	31
3.4.1 Processamento das Amostras do Tecido Muscular	31
3.4.2 Análise da Secção Transversa da Fibra Muscular	32
3.4.3 Análise da Densidade de Área de Tecido Conjuntivo Intramuscular	32
3.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA	33
3.5.1 Análise do Perfil Metabólico dos Animais	33
3.5.2 Determinação do Glicogênio Muscular e Hepático	33
3.5.3 Análise do Peso Muscular	34

3.5.4 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	34
3.5.5 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)	34
3.5.6 Captação de 2-Deoxiglicose	35
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS	38
6. DISCUSSÃO	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9. ANEXO	79

1. INTRODUÇÃO

O músculo estriado esquelético é o maior tecido do corpo, está envolvido com a locomoção, postura, movimentos respiratórios e homeostasia. Suas fibras são multinucleadas e os núcleos estão localizados na região periférica, abaixo do sarcolema. O diâmetro das fibras pode ser, em média, de 10 a 100 μm e o comprimento pode chegar até 30 cm no homem, sendo variável, na dependência da arquitetura do músculo. O diâmetro da fibra é importante, porque está relacionado com sua força e também sugere o grau de funcionamento (LIEBER, 2002).

As fibras musculares podem ser divididas basicamente, quanto às propriedades estruturais e fisiológicas, em fibras do tipo I e II. As identificadas como do tipo I, de contração lenta, tem menor capacidade de manipular o cálcio, e a principal fonte energética é o sistema aeróbico, possuindo um grande número de mitocôndrias e capilares por fibra, baixa atividade de miosina ATPase, é extremamente resistente à fadiga. As fibras do tipo II, de contração rápida podem ser subdivididas em vários grupos, mas especialmente em tipo IIa e IIb. A fibra do tipo IIb, são de contração rápida, por ter maior velocidade de liberação e captação de cálcio. Tem maior força de contração e menor resistência a fadiga, com alta atividade de miosina ATPase, e baixo número de mitocôndrias e mioglobina, gerando energia basicamente pelo sistema anaeróbico. A fibra do tipo IIa tem como fonte energética o sistema aeróbico e o anaeróbico, sendo uma fibra intermediária entre tipos I e IIb (ZIERATH e HAWLEY, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

O músculo estriado esquelético é constituído por um conjunto de fascículos e é envolvido pelo epimísio, camada de tecido conjuntivo, de onde partem os septos que se dirigem ao interior do músculo, denominado perimísio, que por sua vez separam os fascículos. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida por uma camada fina constituída pela lâmina basal da fibra muscular e por fibras reticulares do endomísio (OKITA et al., 2004).

O tecido conjuntivo tem como função manter as fibras musculares unidas, preservando as suas propriedades físicas durante contração e permitindo que a força gerada por cada fibra individualmente atue sobre todo o músculo. É também responsável por fornecer suporte estrutural às fibras musculares, vasos sanguíneos, e nervos durante o crescimento no músculo normal, e pelo comportamento elástico deste tecido (JÓZSA et al., 1988; JARVINEN et al., 2002; OKITA et al., 2004).

Experimentalmente, inúmeros estudos de imobilização e desnervação foram realizados para aperfeiçoar o conhecimento dos eventos deflagrados pelo desuso, fundamentado em diferentes técnicas como a desnervação (MARQUES, 1992; FERNANDES et al., 2005), tenotomia (JAKUBIEC-PUKA et al., 1992; ABRAMS et al., 2000), fixação da articulação por meio de pinos e bloqueio químico da junção neuromuscular (HIROSE et al., 2000), suspensão do corpo (MOREY et al., 1979; TANAKA et al., 2003), órtese de tecido de algodão (COUTINHO et al., 2002), talas de gesso (HESLINGA et al., 1995) e mais atualmente a órtese de resina acrílica (SILVA et al., 2006).

A imobilização, qualquer que seja o modelo, é muito comumente utilizada na prática médica, no tratamento de fraturas ósseas, rupturas ligamentares, doenças degenerativas, lesões musculares e articulares, e

também após cirurgias. Esta, por sua vez, ocasiona desuso muscular, induzindo uma gama de efeitos deletérios, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, fibrose intramuscular, redução da densidade dos capilares, da extensibilidade muscular, e da limitação da mobilidade articular (KANNUS et al., 1998; JÓZSA et al., 1990; REARDON et al., 2001).

O desuso muscular compromete a homeostasia da musculatura induzindo à resistência a insulina, à redução das reservas de glicogênio, afetando a síntese de proteínas da miofibrila, contratilidade dinâmica assim como a eficácia do sinal metabólico, redução de força e resistência a fadiga (HENRIKSEN et al., 1991; SILVA et. al., 2006).

O modelo de imobilização proposto por Silva et. al. (2006) utilizando órtese de resina acrílica, proporciona uma imobilização na articulação do tornozelo em angulação de 90°, permite deambulação com descarga de peso no membro imobilizado, uma vez que o modelo deixa livre parte da pata do animal, além de permitir mobilidade das articulações do joelho e quadril.

A desnervação, por sua vez, promove alterações que podem ser observadas pela diminuição do trofismo, aumento do tecido gorduroso e do tecido conjuntivo, diminuição da taxa de síntese e aumento da taxa de degradação das proteínas miofibrilares no músculo acometido (KERN et al., 2002; MITCHELL e PAVLATH, 2001). Esta pode ser obtida por meio da secção ou esmagamento do nervo, eliminando a comunicação do músculo com o nervo, impedindo a ocorrência de reflexos musculares (MUSACCHIA et al., 1988).

A lesão nervosa periférica foi classificada por Seddon (1943) em 3 tipos: neuropraxia (tipo I), axoniotmese (tipo II) e neurotmese (tipo III).

Neuropraxia é a lesão nervosa periférica mais leve, não envolve perda da continuidade nervosa e causa perda funcional transitória, não havendo processo de degeneração Walleriana.

A lesão do tipo axoniotmese ocorre quando há interrupção completa do axônio e mielina, no entanto o epineuro e perineuro, estão preservadas. Ocorre perda da continuidade axonal no nível da lesão, com preservação do tubo endoneural, mas com degeneração Walleriana distalmente à lesão.

A neurotmese é o grau de lesão nervosa periférica mais grave. Envolve desconexão nervosa, com perda funcional e prognóstico de recuperação funcional ruim. O tratamento deste tipo de lesão é cirúrgico, na tentativa de evitar-se a formação de cicatriz e direcionar o crescimento axonal por meio do guia mesenquimal.

Para a conservação das propriedades e plasticidade dos diferentes tipos de fibras musculares a inervação é fundamental (SCHIAFFINO et al., 1999). A ausência do estímulo nervoso ocasiona a diminuição da isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, aumentando a cadeia pesada de miosina rápida (BALDWIN e HADDAD, 2002; PETTE e STARON, 2001). Além desta alteração, ocorre também a atrofia, decorrente da diminuição ou ausência de síntese protéica, aumento da proteólise miofibrilar, aumento de proteases lisossomais e de cálcio intracelular, e aumento da densidade do tecido conjuntivo principalmente no endomísio e perimísio (IJKEMA-PAASSEN et al., 2004; ENGEL e FRANZINI-ARMSTRONG, 1994; FERNANDES et al., 2005).

Na imobilização o estímulo nervoso é mantido, porém não há resposta muscular, gerando efeitos semelhantes ao da desnervação, porém menos expressivos.

Nos dois modelos experimentais são encontradas as seguintes alterações nas células satélites: diminuição do tamanho da célula, do núcleo, da densidade de cromatina e da atividade celular, diminuindo assim a capacidade de regeneração muscular (KUJAWA et al., 2005).

A recuperação da função muscular pós-desnervação depende não somente da regeneração nervosa, mas também das condições do músculo no momento da reinervação, tais como trofismo muscular, tamanho da área de fibrose e capacidade miogênica das células satélites (DOW et al., 2004).

O BCAA - aminoácidos de cadeia ramificada, ou AACR é composto por valina, leucina e isoleucina. Considerados aminoácidos essenciais, pois não são produzidos endogenamente, sendo necessária a ingestão destes através de dieta (HENDLER e RORVIK, 2001).

Os BCAA correspondem a cerca de 35% dos aminoácidos essenciais em proteínas musculares. A concentração destes aminoácidos difere em relação ao tipo de fibra muscular, sendo 20-30% maior em fibras de contração lenta (tipo I) em comparação àquelas de contração rápida (tipo IIb) (ROGERO e TIRAPGUI, 2008).

Juntamente com o aspartato e o glutamato, os BCAA representam o conjunto de aminoácidos oxidados diretamente no tecido muscular. Eles são transaminados inicialmente pelo complexo enzimático BCAA aminotransferase (BCAAT), gerando os cetoácidos correspondentes e glutamato. A leucina é degradada a alfa-cetoisocaproato, que por sua vez origina o acetil-CoA; a

isoleucina é degradada em succinil-CoA e também origina acetil-CoA. Já a valina, é degradada em isobutiril-CoA, que por sua vez origina o succinil-CoA (CHAMP et al., 1998).

Os BCAA atuam na manutenção da proteína corporal, como fontes de nitrogênio, onde auxiliam a síntese de alanina e glutamina. Principalmente a leucina auxilia no processo de anabolismo, na regulação de processos anabólicos envolvendo tanto a síntese quanto a degradação protéica muscular. Estes apresentam também um potencial efeito terapêutico, uma vez que esses aminoácidos podem minimizar a perda de massa magra durante a redução de massa corporal e favorece o processo de regeneração após lesão provocada por exercícios exaustivos (SHIMOMURA et al., 2006).

Pesquisadores acreditam que os BCAA são capazes de promover o anabolismo protéico muscular, auxiliando na secreção de insulina, redução do fator de necrose tumoral- α (SOLERTE et al., 2008) e, principalmente, na diminuição de lesão muscular ocasionada pela prática de atividade física de alta intensidade. Eles são pouco oxidados pelo fígado, e desta forma grande parte é metabolizado nos tecidos periféricos, principalmente no músculo esquelético (SHIMOMURA e HARRIS, 2006).

Durante a atividade física prolongada, os BCAA são captados da corrente sanguínea para o músculo, onde serão oxidados. Logo, a ingestão de BCAA, por fornecer ao músculo substratos, poderia implicar numa melhora do desempenho diminuindo a necessidade da quebra de glicogênio (OTHANI et al., 2006).

A queda da concentração plasmática de BCAA seria uma causa de fadiga, permitindo então, um maior influxo de triptofano livre no cérebro, sendo

este um 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 TIRAPÉGUI, 2000; CHEVRONT et al., 2004; WATSON et al., 2004).

Assim, a suplementação com o BCAA tem sido aludida como um meio de limitar a entrada de triptofano no sistema nervoso central, diminuindo a taxa de síntese de serotonina e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de realização do exercício (CHEVRONT et al., 2004; WATSON et al., 2004; OTHANI et al., 2006).

Outros estudos ainda sugerem que o BCAA pode também ser um potencial candidato em promover a longevidade (ALVERS et al., 2009; FUCHS et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que a suplementação com BCAA aumenta a longevidade média de camundongos machos. Este resultado foi acompanhado por um aumento da biogênese mitocondrial e uma expressão de SIRT1, enzima que regula o sistema de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (ROS), com redução do dano oxidativo, tanto na musculatura esquelética, quanto cardíaca de camundongos (D'ANTONA et al., 2010).

A revisão feita por Valerio e colaboradores (2011), aponta que a suplementação com BCAA exerce uma variedade de efeitos benéficos tanto em animais quanto em humanos, indicando um possível papel deste aminoácido no metabolismo energético e na longevidade de várias espécies, desde seres unicelulares até mamíferos. Este mesmo estudo propõe que tal suplementação pode ser uma boa estratégia para promover a sobrevivência de pacientes idosos.

Os efeitos da ingestão de BCAA tem sido investigada em inúmeros modelos de doenças, incluindo obesidade e doenças metabólicas, doenças do fígado, imunidade comprometida, atrofia muscular, câncer e uma variedade de lesões (trauma, pós-operatório, queimaduras e sepse) (CYNOBER, 2006). Em relação a seu efeito com a obesidade, em particular a leucina, aumenta a secreção da leptina do tecido adiposo (LYNCH et al., 2006), diminuindo a ingestão de alimentos e o peso corporal através da sinalização da via mTOR (COTA et al., 2006), e melhora captação muscular de glicose e o seu no corpo inteiro (SHE et al., 2007).

Pesquisas foram realizadas para investigar a relação das altas doses de BCAAs, o que é amplamente utilizado entre os atletas como constituintes de regimes dietéticos (FERNSTROM, 2005), e a degeneração neuronal em modelos vivos, utilizando culturas de neurônios de cérebro de ratos, na tentativa de verificar se o BCAA pode induzir ou exacerbar a toxicidade celular. Os resultados mostraram que, em neurônios, tanto a valina, quanto a mistura dos aminoácidos (BCAA) em grandes concentrações, aumentavam significativamente a excitotoxicidade e são também tóxicos para os neurônios (CONTRUSCIERE et al., 2010).

No cérebro, o glutamato liberado é captado pelos astrócitos e transformado em glutamina, consumindo amônia livre. A glutamina é então liberado para o espaço extracelular e captado pelos neurônios, onde é convertida de volta para o glutamato, produzindo amônia livre. O amônio utilizado nessas reações devem ser translocado de volta para os astrócitos para desintoxicação e síntese de glutamina. A existência de um serviço de transporte de nitrogênio baseado em BCAAs tem sido proposta como um

sistema para permitir essa troca de nitrogênio entre astrócitos e os neurônios (YUDKOFF et al., 1996; YUDKOFF, 1997; BIXEL et al., 1997; LIETH et al., 2001; HUTSON et al., 2005). A amônia em neurônios é transaminada para formar o BCAAs cognatos, que são exportados para astrócitos. Sugerindo que o excesso de substratos em qualquer uma dessas etapas pode perturbar o sistema, criando armazenamento de produtos intermediários (HUTSON et al., 2005).

A valina, como um dos aminoácidos que compõe o BCAA, não é produzida endogenamente, portanto as importantes fontes são farinha de soja, queijo, peixe, grãos, cogumelos, amendoim, carnes e legumes (ETZEL, 2004).

Na carência deste aminoácido observa-se redução da função muscular e perda de equilíbrio durante a locomoção, alteração da saúde mental, anorexia, insônia e hipersensibilidade cutânea (HUTCHISON et al., 1983; GOTO et al., 2010).

A valina de forma isolada participa na desintoxicação de amônia e trabalha junto com o alfa-cetoglutarato e pode ser um aminoácido importante na prevenção da toxicidade da amônia em idosos que estão hospitalizadas (BIXEL et al., 1997; YUDKOFF et al., 1996; YUDKOFF, 1997; HUTSON et al., 2005; LIETH et al., 2001).

Apesar de os efeitos anabólicos dos aminoácidos sobre a síntese protéica e função celular serem reportados há aproximadamente 25 anos, até poucos anos atrás não eram conhecidas as bases moleculares do seu mecanismo de ação. Agora se sabe que os aminoácidos participam em vias de transdução de sinal, ativando em determinadas células algumas das cascatas

sinalizadoras comuns à insulina, por exemplo, principalmente a leucina (HUTSON e HARRIS, 2001).

De acordo com Biesek, Alves e Guerra (2005), o BCAA tem os seguintes efeitos ergogênicos: auxiliam na hipertrofia muscular, possuem ação anti-catabólica, retardam a fadiga central, economizam os estoques de glicogênio muscular, aumentam os níveis plasmáticos de glutamina após exercício intenso, de forma que melhora o sistema imunológico, não há na literatura muitos relatos explorando seu efeito sobre músculos imobilizados ou desnervados.

Segundo Watanabe (2010) a suplementação com BCAA foi efetiva em manter o status nutricional dos músculos imobilizados, demonstrando uma ação anti-catabólica, fator este que pode favorecer uma reabilitação acelerada na fase pós- imobilização. No entanto, não foi realizado um estudo morfométrico nos músculos imobilizados.

Diante do exposto, por conhecer o efeito bioquímico do BCAA, a hipótese que se levanta é que a suplementação com BCAA possa atenuar as alterações morfológicas deletérias provocadas pela imobilização e desnervação.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações morfológicas do músculo sóleo de ratos submetidos à desnervação, imobilização e suplementados com BCAA (aminoácido de cadeia ramificada), bem como caracterizar o perfil metabólico desencadeado pela suplementação com o aminoácido valina em músculos de ratos desnervados.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar os efeitos ligados ao tratamento com o complexo de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) em músculos esqueléticos imobilizados e desnervados, bem como o aminoácido valina isoladamente em músculo esquelético desnervado de ratos, obedecendo aos seguintes parâmetros de análise:

1) Avaliar histologicamente, a densidade de área de tecido conjuntivo e a área de secção transversa das fibras do músculo sóleo submetido à desnervação e suplementado com BCAA, bem como o músculo sóleo imobilizado e suplementado com o BCAA;

2) Realizar um estudo bioquímico buscando identificar o estado de saúde dos animais tratados tanto com BCAA, quanto com valina.

3) Avaliar através do teste de tolerância à insulina (ITT) e do teste de tolerância à glicose (GTT) tanto a responsividade das ilhotas pancreáticas a glicose quanto à sensibilidade de tecidos periféricos á insulina, em ratos tratados com valina.

4) Avaliar as reservas glicogênicas dos músculos do membro posterior de ratos controles e submetidos à desnervação (7 dias), além do efeito do tratamento com o aminoácido valina em ambas as condições;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar*, com idade entre 3 a 4 meses, pesando de 250 a 300g, permanecendo em condições controladas de biotério, submetidos a ciclo foto periódico de 12 h claro/escuro sob condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\pm 2$ °C), alimentados com ração e água *ad libitum*, sendo tratados segundo recomendações do Guide for Care Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996).

Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação animal (CEEAA) da UFSCAR, protocolo nº 010/2006 (Anexo 1).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Análise Histológica

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos ratos em grupos experimentais para análise histológica (n=5)

Grupos experimentais
Controle
Desnervado
Imobilizado
Suplementados com BCAA 7 dias
Desnervado suplementado com BCAA 7 dias
Imobilizado suplementado com BCAA 7 dias

3.2.2 Análise Bioquímica

Para esta análise 20 animais foram divididos em 4 grupos (n=5)
(Tabela 2)

Tabela 2 - Distribuição dos ratos em grupos experimentais para análise bioquímica (n=5)

Grupos experimentais
Controle
Desnervado
Suplementado com Valina 7 dias
Desnervado suplementado com Valina 7 dias

3.3 PROCEDIMENTOS

3.3.1 Suplementação com BCAA

Os grupos suplementados receberam o complexo de aminoácidos BCAA (Nutristore®) na concentração de 0,5 ml/dia através da via orogástrica por gavagem durante 7 dias (KOBAYASHI et al., 2006).

3.3.2 Suplementação com Valina

Os grupos suplementados com Valina receberam a substância na dose de 0,25 mM/100g, administrada na água dos animais (MORTIMORE et al., 1987; BLOMMAART et al., 1995).

3.3.3 Anestesia

Para desnervação e imobilização, foi utilizado a associação Ketamina/Xilasina (35 mg/kg e 4 mg/kg peso) e para a análise bioquímica foi utilizado Tiopental sódico (40 mg/kg peso).

3.3.4 Desnervação

Os ratos foram anestesiados, a parte posterior da coxa esquerda tricotomizada e uma porção do nervo ciático (1 cm) foi seccionado e retirado (CODERRE et al., 1992) (Figura 1).

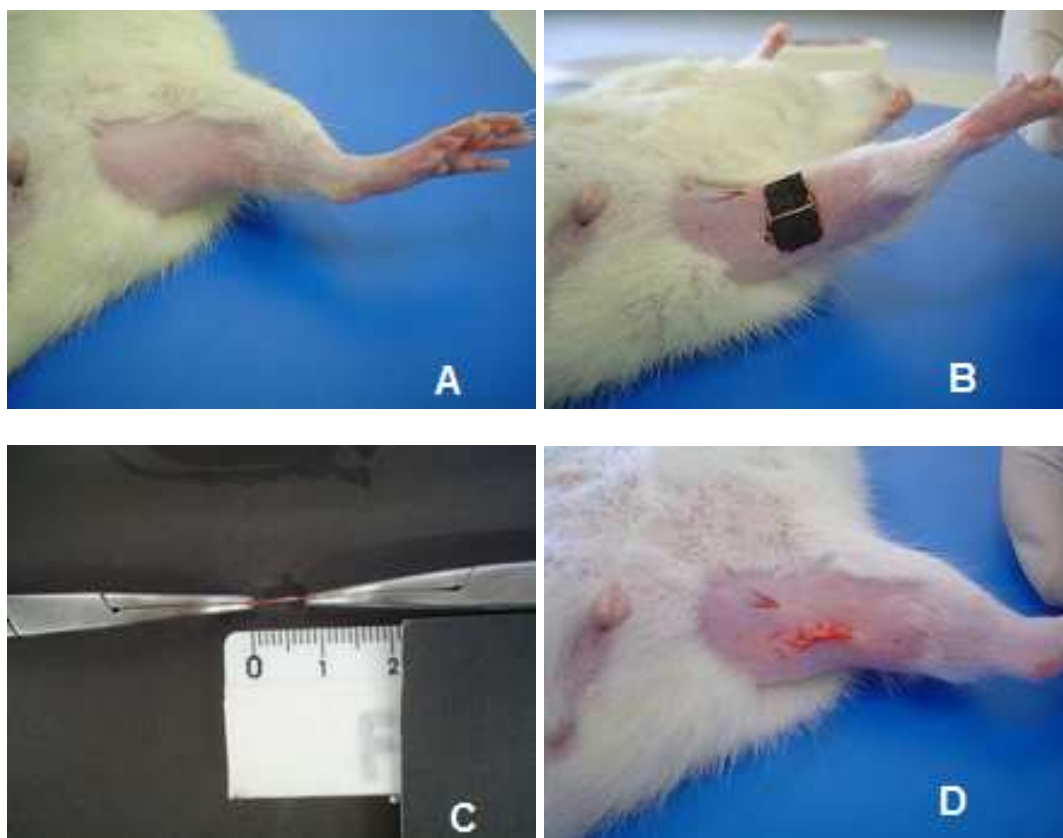


Figura 1 - Procedimento cirúrgico da desnervação. A: membro posterior tricotomizado; B: nervo ciático em destaque; C: comprimento do nervo seccionado; D: incisão suturada.

3.3.5 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 2, 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 2 - 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°.

3.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

3.4.1 Processamento das amostras do tecido muscular

Os animais foram decapitados, o músculo sóleo retirado e pesado, sua porção ventral foi colocada em solução tamponada de formol 10% para fixação.

Após 48h, as peças passaram por desidratação em álcool etílico,

diafanização em xilol e incluídas em paraplast. Cortes transversais de 7 μm não seriados foram obtidos e corados em Hematoxilina-Eosina (H:E).

3.4.2 Análise da secção transversa das fibras musculares

Foram selecionados 5 cortes e para cada um deles foram escolhidas 5 áreas, para a captação e análise das imagens, utilizando um *software* Image Pró-plus[®] 4.0, e uma câmara digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com uma objetiva 10x, sendo que o *software* permitiu visualizar as imagens em uma área da tela (área de frame) de 190.464,12 μm^2 . Para a análise da secção transversa das fibras foi utilizado uma tela quadriculada, composta por 80 quadrados, com 63 intersecções de retas. A intersecção de retas que coincidia na fibra muscular, esta era delimitada e o programa gerava um número correspondente à área da fibra, sendo analisadas 15 fibras por área em cada corte, totalizando 375 fibras por animal, de forma aleatória.

3.4.3 Análise da densidade de área do tecido conjuntivo intramuscular

A densidade de área de tecido conjuntivo (em %) foi obtida por meio da planimetria por contagem de pontos (MATHIEU et al, 1981; MANDARIN DE LACERDA, 1994), que através do *software* Image Pró-Plus[®] 4.0, proporcionou a visualização em uma tela quadriculada, composta por 165 quadrados, com 140 intersecções de retas. A intersecção de retas que coincidiam sobre o

tecido conjuntivo foram contados e a porcentagem de área foi calculada segundo a fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de intersecções que coincidiam sobre o tecido conjuntivo}}{\text{N}^\circ \text{ total de intersecções}} \times 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ total de intersecções} = 140$$

3.5 ANALISE BIOQUÍMICA

3.5.1 Análise do perfil metabólico dos animais

Por se tratar de uma linha experimental onde o metabolismo dos carboidratos torna-se alterado em detrimento da técnica ou da suplementação, optou-se por direcionar a avaliação no sentido de quantificar as principais reservas glicogênicas com destaque ao tecido muscular e hepático, bem como, avaliar a sensibilidade periférica à insulina, hormônio que atua tanto na interface ligada a reserva quanto a efeitos anabólicos/anticatabólicos.

3.5.2 Determinação do glicogênio muscular e hepático

As amostras dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho e fígado 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/100mg de peso úmido. Somente para este parâmetro foram

avaliados os músculos sóleo, gastrocnêmio branco, gastrocnêmio porção mista e fígado.

3.5.3 Análise do peso muscular

O músculo sóleo dos grupos controle, desnervado, tratado com valina, desnervado tratado com valina foram cuidadosamente isolados, dissecados e pesados individualmente em balança analítica (Bel Engineering, UMark®-210A).

3.5.4 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Para o ITT os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso) 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® 1 U/Kg de peso e novas amostras coletadas nos tempos 2,5; 5; 10 e 20 minutos e a glicemia avaliada pelo glicosímetro (Accu-check®).

3.5.5 Teste de tolerância a glicose (GTT)

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) e após 10 minutos da indução anestésica foi realizado um corte na cauda do animal por onde uma alíquota de sangue foi coletada e a glicemia avaliada através de fita usada em glicoteste determinando o tempo zero. A seguir foi

administrado glicose (2 g/Kg) seguido de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e a glicemia novamente avaliada glicosímetro (Accu-check[®]).

3.5.6 Captação de 2-Deoxiglicose

Após anestesia, o músculo sóleo foi isolado com o mínimo de lesão possível e fatias longitudinais pesando em torno de 25-35 mg foram primeiro incubadas por 30 minutos a 37°C em banho Maria de Dubinoff (FANEN, Modelo 145) dentro de frasco de vidro de cintilação contendo 1,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonato (NaCl 0,6%, HEPES 6,64 mM, KCL 0,032%, CaCl₂ 1,14 mM, KH₂PO₄ 0,015%, NaHCO₃ 0,19%, MgSO₄ 0,03%) equilibrado com a mistura de 95% O₂-5%/CO₂, pH 7,4. Após este período as fatias musculares foram transferidas para um novo frasco de cintilação de vidro (frasco externo) contendo 1,5 mL de tampão Krebs-bicarbonato enriquecido com glicose 5,5 mM, contendo [U¹⁴C] glicose, 0,25 mCi/mL e [3H+] 2-deoxiglicose (2 DG, 0,5 mCi/mL) e insulina (100 µM/mL). Dentro do frasco externo foi colocado outro frasco de vidro em formato de concha com uma haste central voltada para cima, (frasco interno) contendo 700 µL de hiamina 10-x. O frasco interno foi fixado pela haste a uma membrana de borracha redonda através de uma pequena abertura nesta última. O frasco externo foi fechado por esta borracha e por uma tampa plástica, de forma que o frasco interno ficou suspenso a cerca de 1 cm do fundo do frasco externo.

O sistema contendo as fatias musculares foi incubado em banho Maria e Dubinoff por 60 minutos. Após este período, as fatias musculares foram

retiradas do contato com as soluções. A liberação do CO₂ foi estimulada pela injeção de 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 25% no frasco externo e CO₂ foi captado pela hiamina 10-x do frasco interno durante mais 3 horas de incubação a 37°C. A captação da 2-deoxiglicose foi avaliada na fase alcalina obtida pela mensuração da radioatividade do 3H+. Toda mediação da radioatividade foi feita em contador PACKARD Tricab 2100 utilizando-se TRITON X-100 com líquido de cintilação à base de tolueno.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise morfométrica dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade, onde o grupo controle não apresentou distribuição normal, portanto aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis post hoc Dunn.

Na análise dos parâmetros ligados aos elementos radioativos, foi realizado a Análise de Variância e quando necessário foi utilizado o teste "post hoc" de Newman-Keuls para comparação entre grupos. Na análise estatística dos demais dados, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk sendo observado normalidade nos dados, aplicando o teste t pareado.

Para o teste ITT a variável analisada foi a porcentagem de decaimento (KITTT), 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" ($p < 0,05$).

Em todos os cálculos foi fixado um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Em relação a análise morfológica do músculo sóleo, as médias de área da secção transversa das fibras apresentadas na Tabela 3, e Figuras 3, 4, e 5, mostram que no grupo imobilizado houve redução significativa de 52,70%, e no grupo desnervado de 66,55% em relação ao grupo controle.

Quando se compara o grupo tratado com BCAA com o grupo controle, observa-se que a média da área das fibras não diferiu entre eles. Já no grupo imobilizado+BCAA houve um aumento significativo de 74,94% em relação ao imobilizado, não diferindo do grupo controle.

No grupo desnervado+BCAA a média da área das fibras apresentou aumento significativo de 90,37% em relação ao grupo desnervado, mas manteve-se diferente do controle, com redução de 36,31%.

Tabela 3 – Média \pm dpm da área (μm^2) da secção transversa de fibras do músculo sóleo nos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Média \pm dpm
Controle	2791,75 \pm 487,48
Imobilizado	1320,30 \pm 164,19 * #
Desnervado	933,83 \pm 279,47 * ∞
BCAA	3000,75 \pm 347,36
Imobilizado + BCAA	2309,80 \pm 424,78 #
Desnervado + BCAA	1777,79 \pm 145,63 * ∞

* diferentes do Grupo Controle ($p \leq 0,05$)

diferentes do Grupo Imobilizado ($p \leq 0,05$)

∞ diferentes do Grupo Desnervado ($p \leq 0,05$)

A Tabela 4 mostra em %, a densidade de área de tecido conjuntivo nos diferentes grupos experimentais, onde se pode observar aumento significativo de 263,75% no músculo imobilizado e 270,90% no desnervado em relação ao grupo controle.

Em relação ao tratamento com BCAA, houve aumento significativo de 97,21% na densidade de área de conjuntivo quando comparado ao grupo controle. No grupo imobilizado tratado com BCAA não foi alterado, mas nota-se um ligeiro aumento (não significativo) de 6,46% em relação ao grupo imobilizado. Já o grupo desnervado tratado com BCAA apresentou redução significativa de 34,44% quando comparado com o grupo desnervado.

Tabela 4 – Porcentagem de área do tecido conjuntivo nos diferentes grupos experimentais. Os valores correspondem à média \pm dpm, n=5

Grupos experimentais	%
Controle	8,25 \pm 0,003
Desnervado	30,60 \pm 0,019 *
Imobilizado	30,01 \pm 0,014 *
BCAA	16,27 \pm 0,006 *
Desnervado + BCAA	20,06 \pm 0,015 * #
Imobilizado + BCAA	31,95 \pm 0,008 *

*diferentes do Grupo Controle ($p \leq 0,05$)

diferentes do Grupo Desnervado ($p \leq 0,05$).

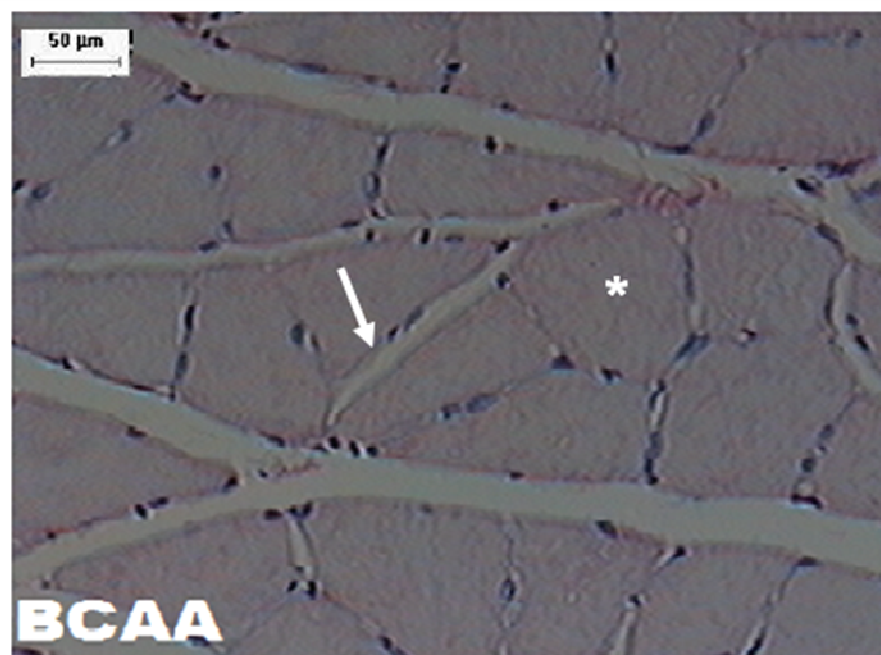
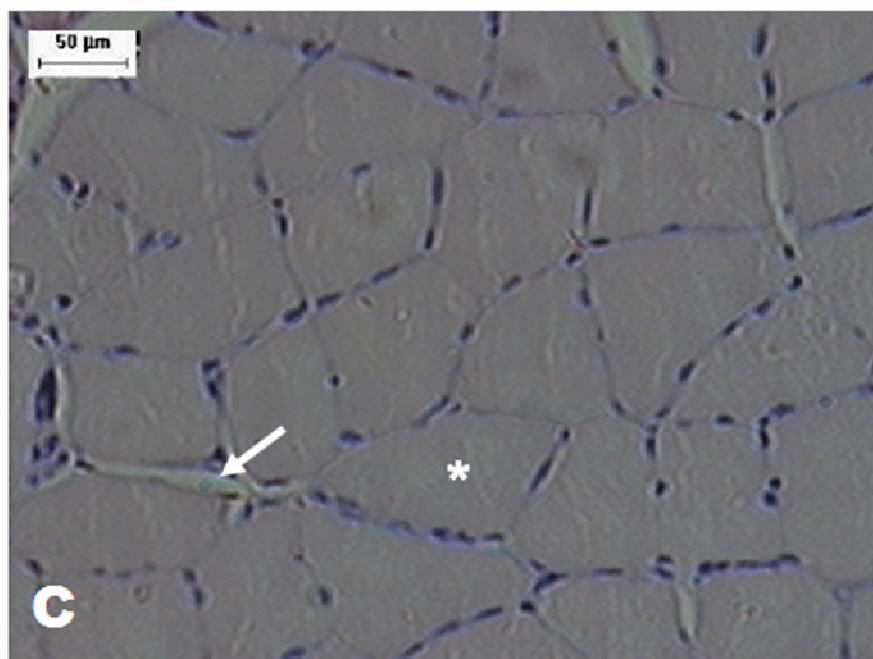


Figura 3 - Músculo Sóleo controle (C), e Músculo Sóleo controle suplementado com o aminoácido bcaa (BCAA) por um período de 7 dias. Tecido Conjuntivo – seta, Fibra Muscular - * (barra=50 μm)

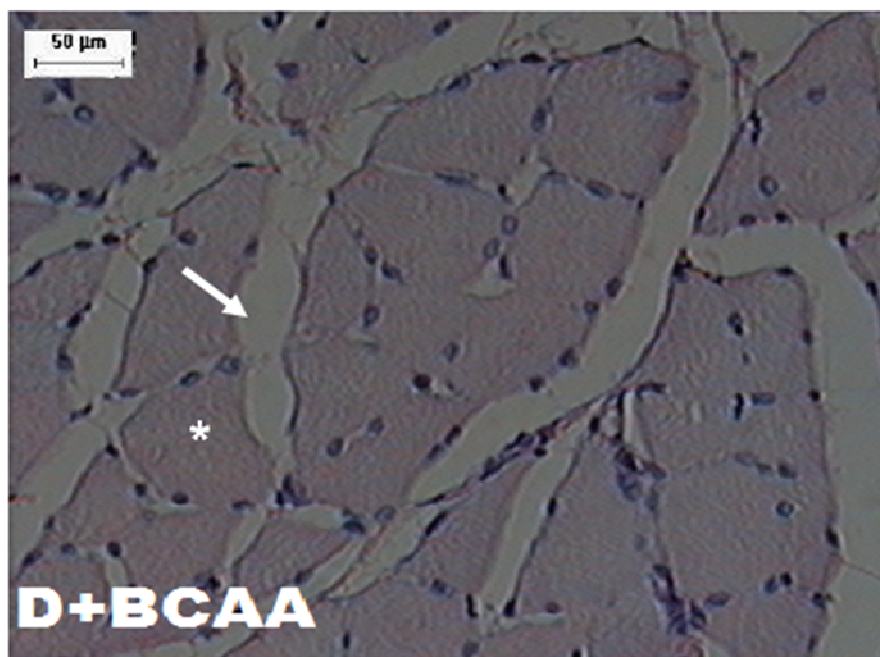
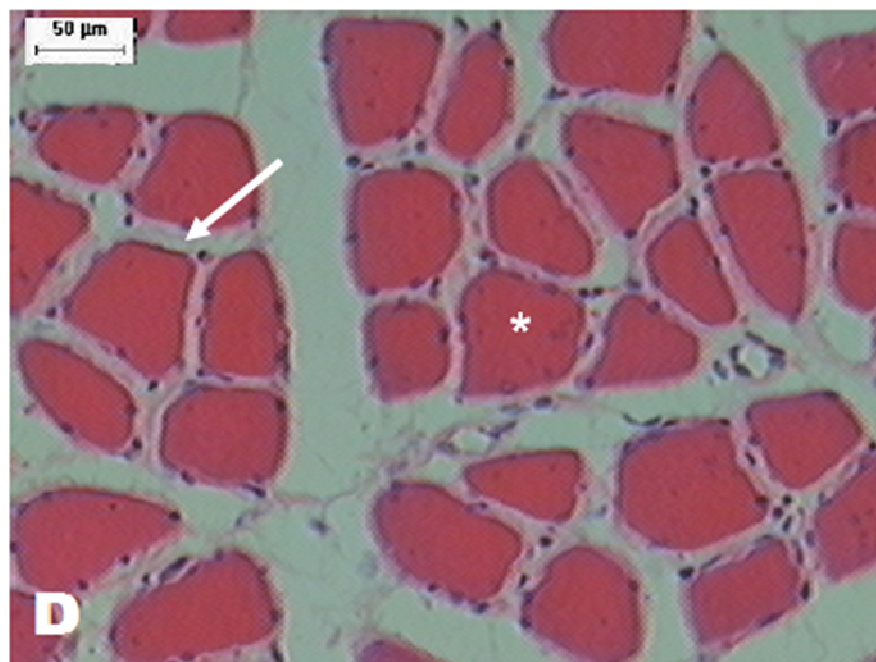


Figura 4 - Músculo Sóleo desnervado (D), e Músculo Sóleo desnervado suplementado com o aminoácido bcaa por um período de 7 dias (D+BCAA). Tecido Conjuntivo – seta, Fibra Muscular - * (barra=50 μm)

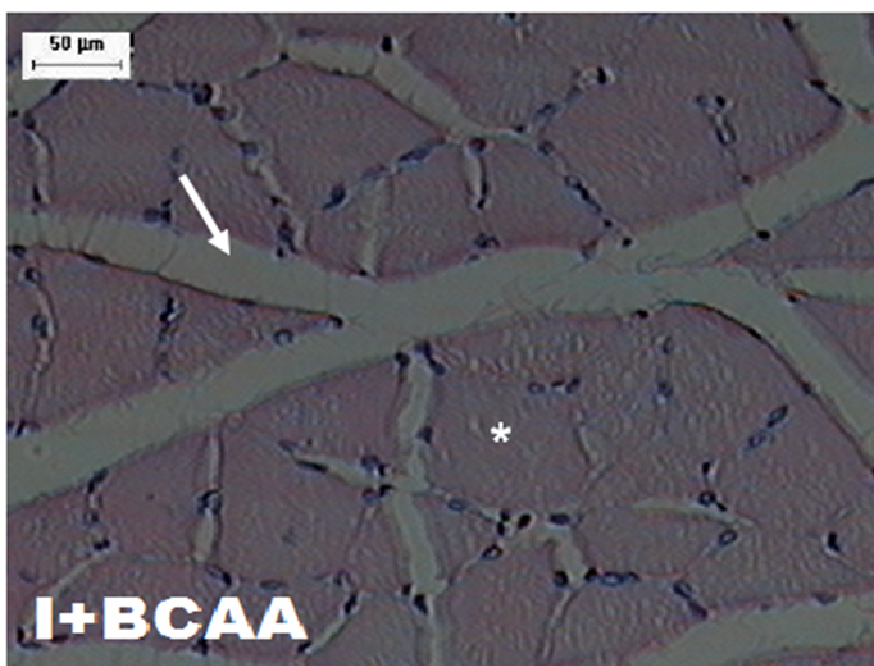
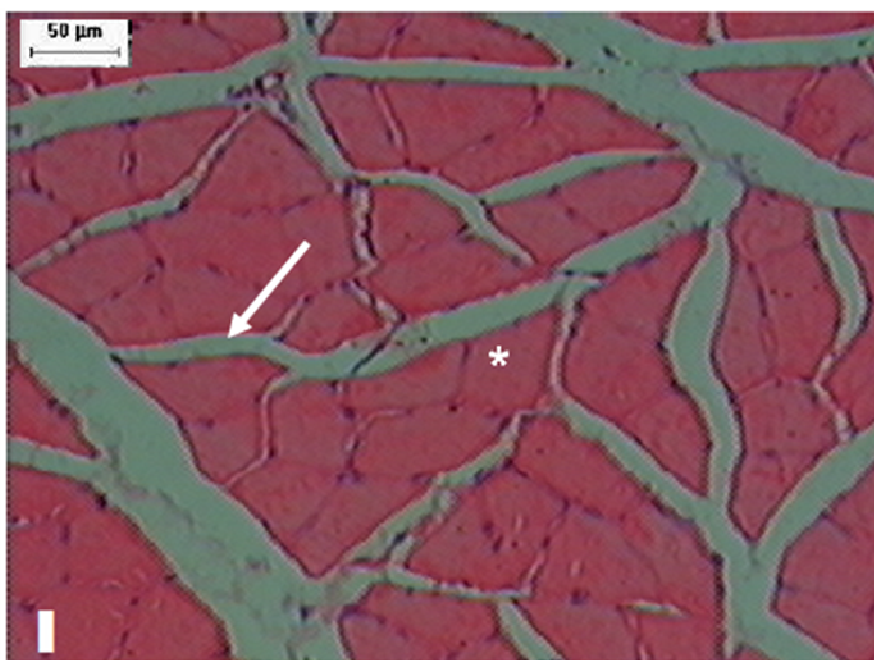


Figura 5 - Músculo Sóleo imobilizado por um período de 7 dias (I) e Músculo Sóleo imobilizado e suplementado com o aminoácido bcaa por 7 dias (I+BCAA). Tecido Conjuntivo – seta, Fibra Muscular - * (barra=50 μm).

O diagnóstico bioquímico foi elaborado por meio de parâmetros importantes enquanto indicativo do estado de saúde dos animais. Neste sentido, a Tabela 5 mostra que o grupo controle não difere do grupo suplementado com valina. Observa-se que na presença da associação de aminoácidos (BCAA) os valores também não diferem do grupo controle.

Tabela 5 - Perfil bioquímico de ratos controle, suplementados com valina 0,25mM/100g, e suplementados com BCAA 0,5ml/dia, durante 7 dias. Os valores correspondem às médias \pm dpm, n=6.

Grupos	Aspartatoamino transferase AST (U/L)	Alaminoamino transferase ALT (U/L)	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Gamaglutamil transferase (U/L)
Controle	109 \pm 1,6	59,8 \pm 3,0	33 \pm 1,3	0,50 \pm 0,02	0,40 \pm 0,02
Valina	111 \pm 3,1	63 \pm 5,0	34 \pm 3,9	0,47 \pm 0,04	0,43 \pm 0,01
BCAA	122,80 \pm 6,8	56 \pm 11	39 \pm 2,7	0,63 \pm 0,06	0,45 \pm 0,04

Pode-se observar na Figura 6 que a desnervação promoveu diminuição nas reservas de glicogênio atingindo 20% no músculo sóleo, 30% na porção branca do gastrocnêmio e 43% no gastrocnêmio porção mista em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). A mesma análise aplicada nos grupos tratados com valina comparados com o grupo controle mostraram elevação nas reservas atingindo 7% no músculo sóleo, 6% na porção branca do gastrocnêmio e 5% no gastrocnêmio porção mista, indicando uma pequena

ação em músculos íntegros.

Em relação as reservas glicogênicas dos músculos desnervados tratados com valina foi observado que, se comparado ao grupo não tratado, as reservas apresentaram-se 16% maior no músculo sóleo, 18% na porção branca do gastrocnêmio e 20% no gastrocnêmio porção mista, mostrando que o aminoácido interferiu nas vias citosólicas responsáveis pela glicogênese que foram comprometidas pela desnervação.

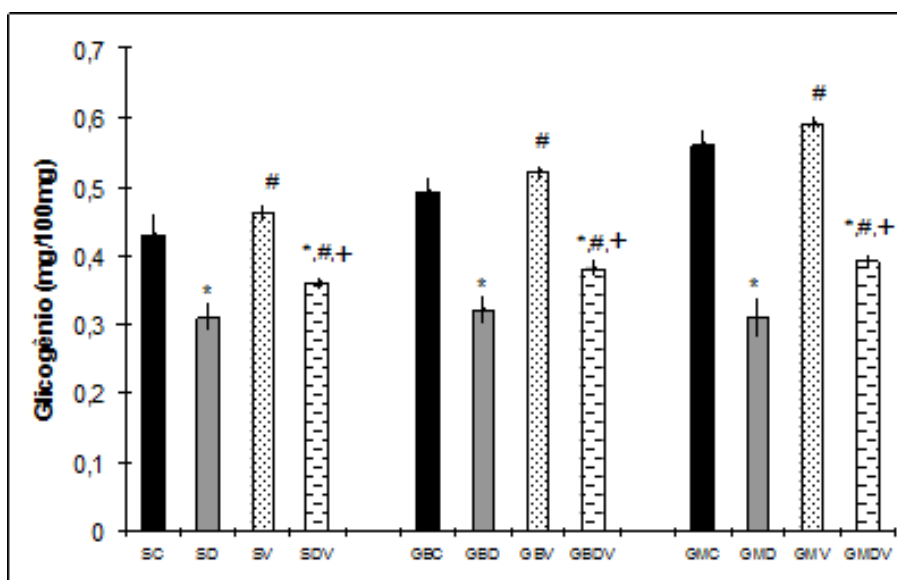


Figura 6. Conteúdo de glicogênio (mg/100 mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção mista (GM) do grupo controle (C), valores correspondem à média±dpm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle; #p<0,05 comparado ao desnervado; + p<0,05 comparado ao desnervado.

A ação da valina sobre o peso do músculo sóleo pode ser observado na Figura 7, onde não houve diferença entre os grupos controle e tratados. No

mesmo sentido, destaca-se que com a desnervação houve redução de 22% na massa, condição que não foi modificada na presença da valina.

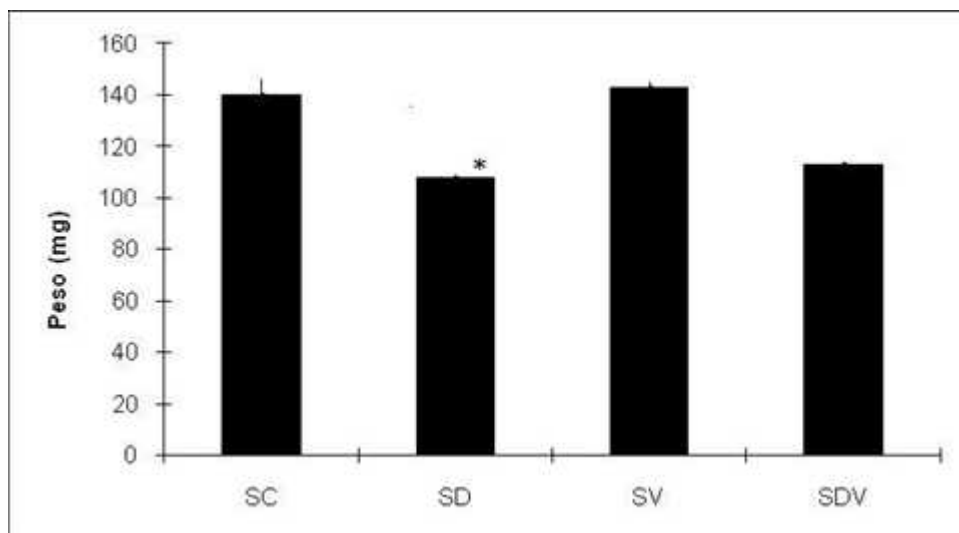


Figura 7. Peso do músculo sóleo (mg) do grupo controle (SC), desnervado (SD), tratados com valina (SV) e desnervados tratados com valina (SDV). Os valores correspondem à média±dpm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Foram avaliadas as reservas hepáticas de glicogênio e não foi observado alteração entre os diferentes grupos experimentais (Figura 8).

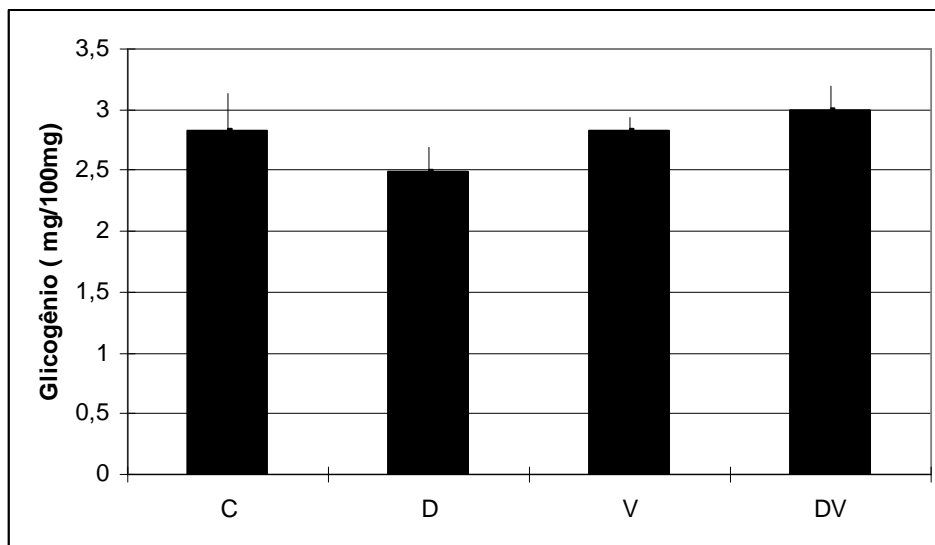


Figura 8. Conteúdo hepático de glicogênio (mg/100mg) do grupo controle (C), desnervado (D), tratados com valina (V) e desnervados tratados com valina (DV). Os valores correspondem à média \pm dpm, n=6, $p<0,05$.

Tendo em vista alterações nas reservas energéticas teciduais, avaliou-se a sensibilidade tecidual à insulina sendo observado que na presença da valina a captação periférica foi elevada em 18% como mostra a Figura 9.

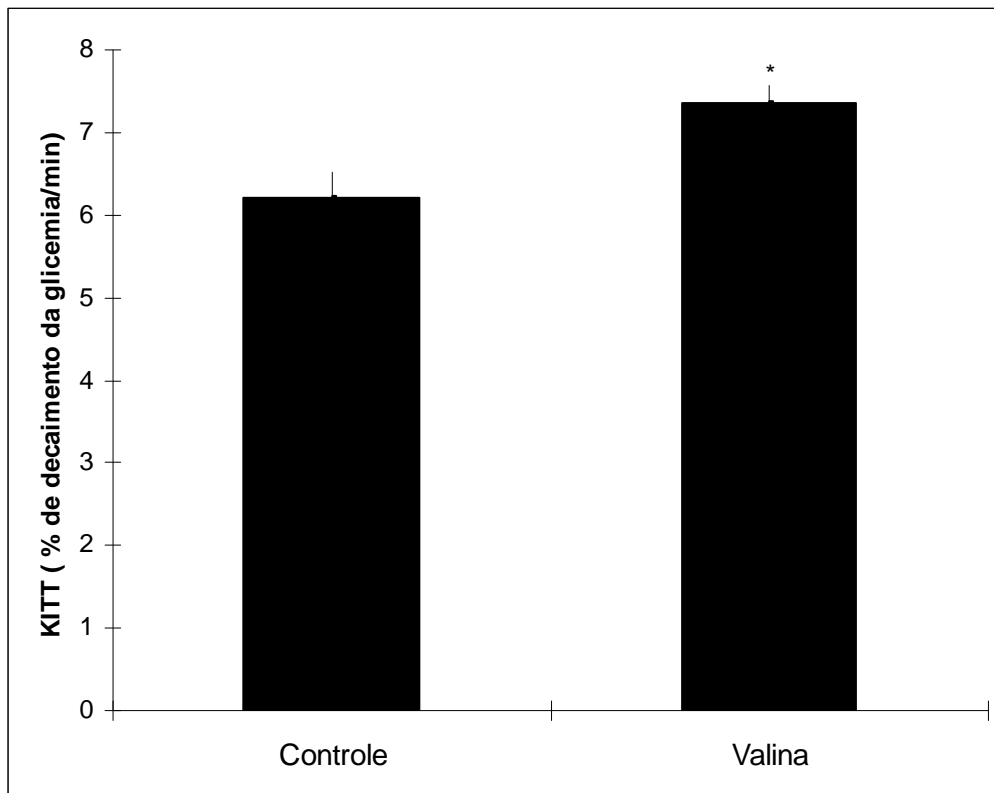


Figura 9. Constante de decaimento da glicemia (%/min) dos grupos controle e tratados com valina (7 dias). Os valores correspondem à média \pm dpm, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

Como pode ser observado na Figura 10 o tratamento com a valina não interferiu na sensibilidade das células beta pancreáticas frente a uma sobrecarga de glicose, uma vez que a área sob a curva não diferiu entre os grupos.

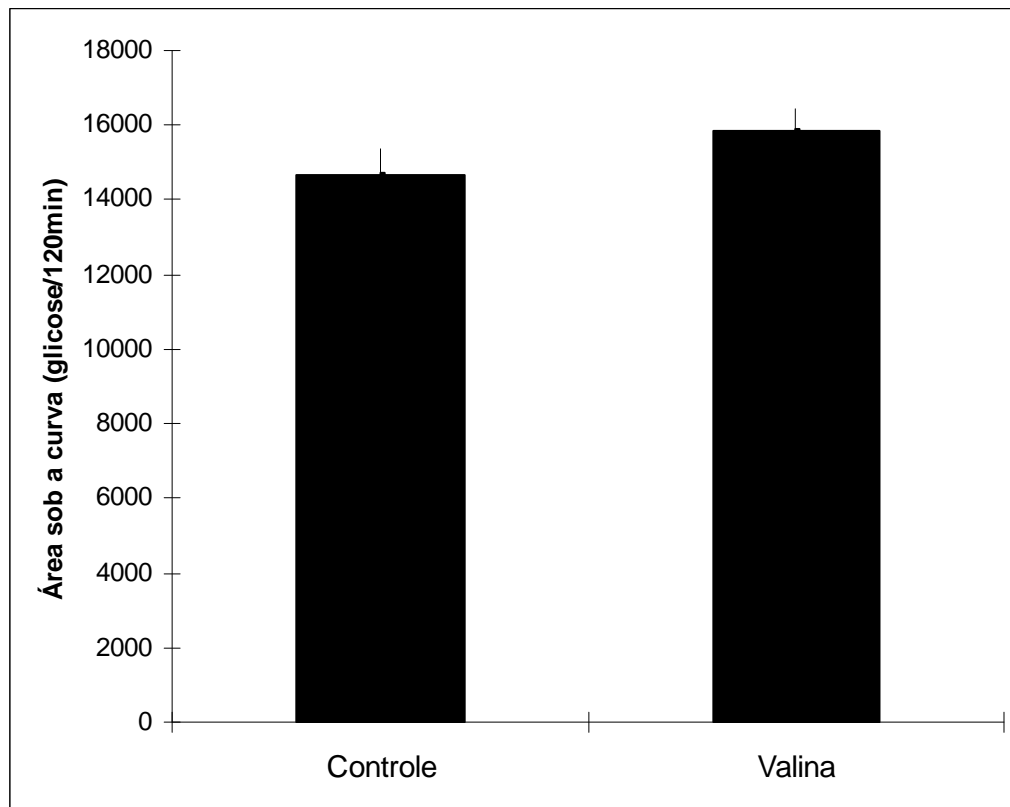


Figura 10. Área sob a curva (concentração de glicose/120 min) dos grupos controle e tratados com valina (7 dias). Os valores correspondem à média \pm dpm, n=6.

Os resultados mostram que houve elevação estatisticamente significativa que equivale a 14% na taxa de captação da 2-deoxiglicose no sóleo tratado com o aminoácido valina. No mesmo sentido, observa-se que no músculo desnervado houve redução de 25% na captação, indicando comprometimento no aporte da 2-deoxiglicose. Por outro lado, no músculo desnervado tratado com valina foi observado valores 54,6% maiores se comparado ao desnervado e 15% se comparado ao controle como pode ser observado na Figura 11.

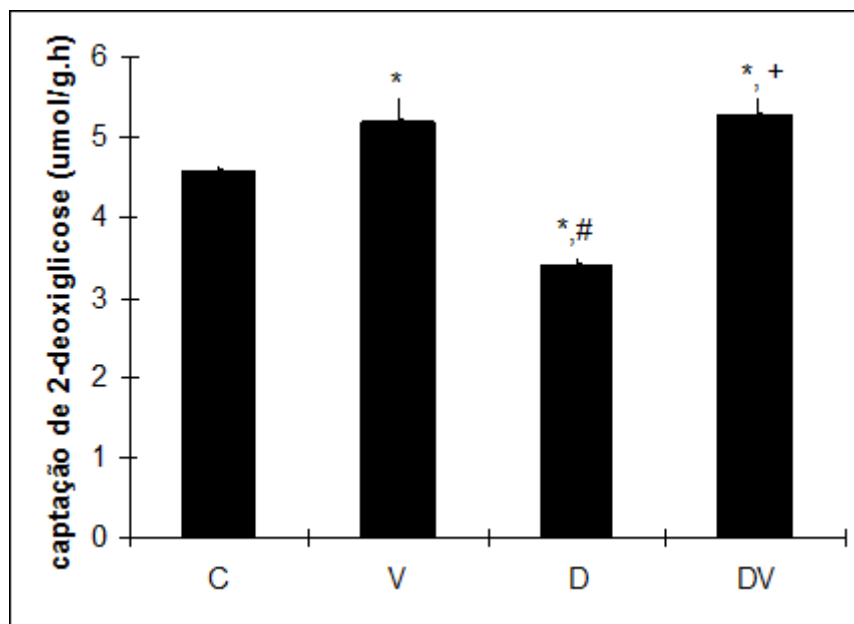


Figura 11. Captação de 2-deoxiglicose (umol/g.h) no músculo sóleo de animais controle (C), tratados com valina (V), desnervado (D) e desnervado tratado com valina (DV). Os valores correspondem à média \pm dpm, n=4. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao tratado com valina; + $p < 0,05$ comparado ao desnervado.

A seguir foi avaliada a oxidação da glicose no músculo sóleo e os resultados mostram que o grupo tratado com valina não se diferencia do controle, por outro lado, no músculo desnervado houve redução de 37%. No músculo desnervado tratado com valina foi observado valores 26% maiores se comparado ao desnervado, porém, ainda permanece 22% menor que a oxidação observada no grupo controle (Figura 12).

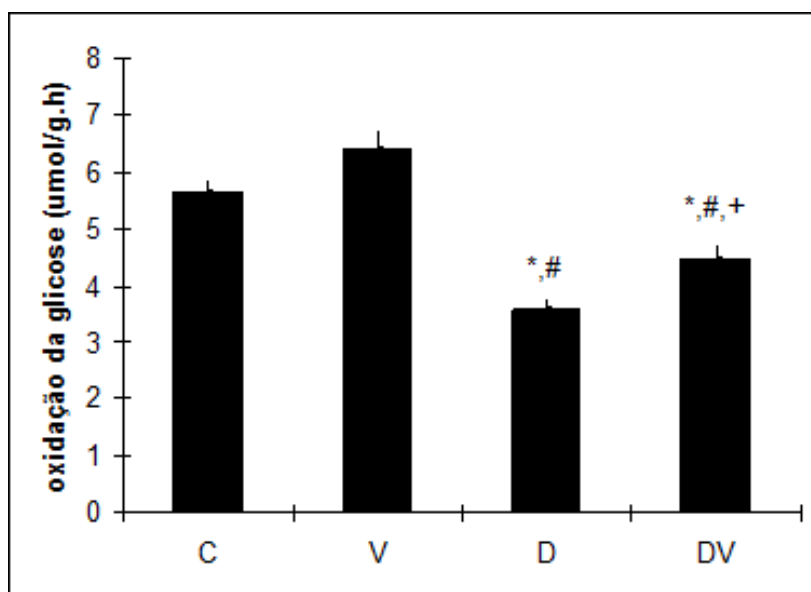


Figura 12. Oxidação de glicose (umol/g.h) no músculo sóleo de animais controle (C), tratados com valina (V), desnervado (D) e desnervado tratado com valina (DV). Os valores correspondem à média \pm dpm, n=4. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao tratado com valina; + $p < 0,05$ comparado ao desnervado.

Quanto a incorporação da glicose nas reservas glicogênicas verificou-se que a valina promoveu elevação de 94,5% no músculo normal comparado ao controle e 72% no músculo desnervado com relação ao desnervado não tratado, cuja incorporação apresentava-se reduzida em 11% (Figura 13).

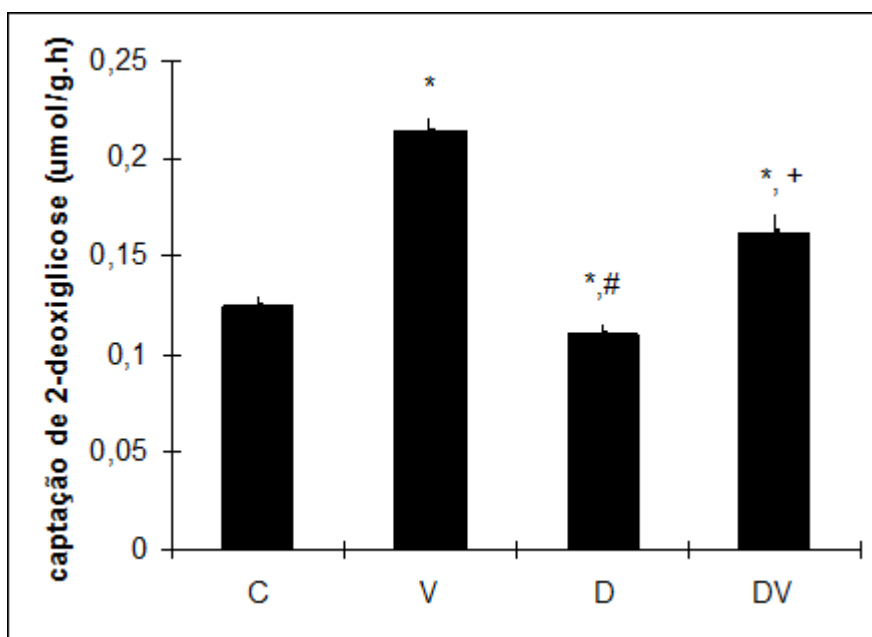


Figura 13. Incorporação de glicose (umol/g.h) no músculo sóleo de animais controle (C), tratados com valina (V), desnervado (D) e desnervado tratado com valina (DV). Os valores correspondem à média \pm dpm, n=4. * $p < 0,05$ comparado ao controle; # $p < 0,05$ comparado ao tratado com valina; + $p < 0,05$ comparado ao desnervado.

6. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que o BCAA alterou o músculo em todas as condições estudadas; no grupo controle aumentou a porcentagem de tecido conjuntivo, no grupo imobilizado aumentou secção transversa da fibra, no grupo desnervado diminui tecido conjuntivo e aumentou secção transversa. E a valina nas condições estudadas não apresentou toxicidade renal, nem hepática, aumentou reserva de glicogênio, sensibilidade tecidual a insulina, captação, metabolização e oxidação da glicose, realizando assim uma manutenção das condições energéticas.

Pelo fato de ter predominantemente fibras lentas (tipo I) o músculo sóleo foi utilizado para o estudo morfométrico. Além disto a arquitetura deste músculo, com fibras paralelas ao seu longo eixo (LIEBER, 2002), facilita este tipo de análise. Outro fator que condicionou esta escolha é que a concentração de BCAA difere em relação ao tipo de fibra muscular, sendo 20-30% maior em fibras de contração lenta em comparação àquelas de contração rápida (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008).

De acordo com a literatura os valores normais para secção transversa da fibra do músculo sóleo é de 2084 a 3500 μm^2 (DELP e DUAN, 1996; COUTINHO et al., 2002; GOMES et al., 2004). Neste estudo a média do grupo controle foi de 2791,75 μm^2 , mostrando que a metodologia de análise aqui foi adotada é confiável.

Dependendo do músculo avaliado, a literatura mostra valores que variam de 1 a 10% de tecido conjuntivo intramuscular (TRAPPE et al., 2002; JARVINEN et al., 2002). No presente trabalho, observou-se um valor de 8,66%

no músculo sóleo do grupo controle, demonstrando estar dentro dos valores de referência.

Em relação a ação dos BCAA no músculo sóleo, os resultados aqui apresentados não mostraram diferença significativa em relação a área de secção transversa da fibra. Este resultado corrobora o trabalho de Holm et al. (2010), que relataram que a taxa de síntese de proteínas miofibrilares são dependentes da intensidade de contração e não da alimentação isoladamente. Revelam ainda que somente quando a contração utilizando cargas são conduzidas é que as vias do complexo MAPK e mTOR I-dependentes são ativadas.

Neste trabalho foi encontrado aumento na densidade de área de tecido conjuntivo dos animais tratados BCAA. Babraj et al. (2005), mostraram que a síntese de colágeno em músculo esquelético e em pele de humanos não se altera com a alimentação, em situação de repouso. Do mesmo modo, Holm et al. (2010) mostraram que fibroblatos do músculo esquelético em humanos aumenta o *turnover* do tecido conjuntivo em grande parte influenciada pelo estresse mecânico, independente da intensidade de exercício e não varia com a disponibilidade de alimento. Com a matriz extracelular não se restringe ao colágeno, proteína abordada nos trabalhos citados, é possível que a ingestão do BCAA tenha alterado a síntese ou o *turnover* de outros componentes, como proteínas ou glicosaminoglicanas. Outro fato pelo qual pode-se considerar que este aumento seja devido à proteínas e glicosaminoglicanas hidrofílicas, é que não houve coloração das mesmas por Eosina, corante utilizado neste estudo e que evidencia colágeno.

A imobilização, comumente utilizada na prática clínica, promove efeitos deletérios no sistema músculo esquelético, e alguns fatores como o tipo de fibra e a posição de imobilização podem influenciar os resultados desta prática.

Na década de 70 e 80 estudos que avaliavam as respostas musculares à imobilização eram contraditórios quanto ao tipo de fibra mais susceptível à atrofia (BOOTH e KELSO, 1973; JAFE et al., 1978; SAVOLAINEN et al., 1988). Mais recentemente, os trabalhos mostram que músculos antigravitacionais e músculos com predominância de fibras lentas têm um maior grau de susceptibilidade à atrofia (APPEL, 1990; LIEBER, 2002; TANAKA et al., 2004).

Além do tipo de fibra muscular, o outro fator importante a se questionar é a posição de imobilização. Neste estudo foi adotada a posição de 90° de tornozelo, pois a posição encurtada, é a que provoca maiores alterações como: redução das reservas de glicogênio, atrofia, diminuição de sarcômeros em série, proliferação de tecido conjuntivo, bem como diminuição da força muscular (YANG et al. 1997, GOMES et al., 2004, CANCELLIERO et al., 2005).

O período de imobilização relatado na literatura varia. Há trabalhos que utilizam duas ou três semanas em posição de encurtamento (WILLIAMS e GOLDSPINK, 1978; CARVALHO, 2002; GOMES et al., 2004), enquanto que outros, apontam para alterações musculares entre 1 e 7 dias de imobilização (JARVINEN et al., 1992, AHTIKOSKI et al., 2003). Foi adotado neste estudo 7 dias de imobilização pois segundo Lima et al. (2007), este período é suficiente para provocar adaptações de sarcômero, na morfometria, assim como

alterações nas propriedades mecânicas, utilizando o mesmo modelo experimental.

Qin et al. (1997) afirmam que a imobilização por diferentes períodos acarreta uma atrofia muscular variando de 15 a 70%, dependendo da fibra avaliada. Durigan (2006) relatou redução de 30,92% na área da fibra do músculo sóleo imobilizado em posição encurtada por 3 dias, uma redução de 44,14% imobilizado por 7 dias , e uma redução de 36,92% imobilizado por 15 dias, nas mesmas condições experimentais do presente trabalho. Neste estudo obteve-se uma redução de 52,70% na área da fibra do músculo sóleo imobilizado em posição encurtada por 7 dias, utilizando o mesmo modelo experimental.

A imobilização, independente do modelo de desuso muscular (imobilização, tenotomia, ou desnervação) tem um aumento do tecido conjuntivo variando de 50 a 700% (JÓZSA et al., 1988; JÓZSA et al., 1990). Corroborando com este estudo Durigan (2006) notou um aumento de 216% com 7 dias de imobilização, e este estudo observou um aumento de 263,75% nos mesmos 7 dias de imobilização.

De maneira geral, o processo de imobilização reduz os componentes da matriz extracelular em 40% o ácido hialurônico, e em 30% a condroitina-4-sulfato e condroitina-6-sulfato, bem como reduz a massa de colágeno na ordem de 10% e aumenta a renovação (“turnover”) do colágeno, com degradação e síntese acelerados (AKESON et al., 1987). Segundo Andrews et al., (2005) com a imobilização há redução do conteúdo de água e de GAG (glicosaminoglicanas), redução da matriz extracelular, associada com diminuição na lubrificação entre as ligações cruzadas das fibras colágenas,

aumentando o ritmo de renovação (renovação e síntese) de colágeno. Como não há forças fisiológicas atuando sobre este conjuntivo, isto impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas, responsáveis pela fibrose (AMIÉL et al., 1982).

Em relação a média da secção transversa do sóleo do grupo imobilizado+BCAA houve um aumento significativo de 74,94% em relação ao imobilizado, não diferindo do grupo controle. Isto se deve, muito provavelmente, a ação da leucina, presente na suplementação utilizada neste trabalho. É sabido que os produtos do metabolismo da leucina, em células β pancreáticas, podem ativar fatores reguladores da tradução e como consequência ativar importantes sistemas reguladores das vias anabólicas, com destaque a mTOR (XU et al., 2001; LEWIS et al., 2006; KIMBALL et al., 2006)

O modelo de desnervação empregado neste trabalho foi o da neurotmesa, segundo Coderre et al. (1992), onde o segmento distal fica desprovido de irrigação arterial, pelo fato de ter seccionado por completo o nervo, não havendo possibilidade de crescimento axonal, não recupera sua funcionalidade (LUNN et al., 1990), e acarreta alterações morfológicas, como diminuição da massa muscular (JAKUBIEC-PUKA et al., 1992, ZERNICKA et al., 2002), da área de secção transversa das fibras (DECHERCHI, et al., 2003, ASMUSSEN et al., 2003), bem como aumento do tecido conjuntivo no endomísio (LU et al., 1997, SCHMALBRUCH e LEWIS, 2000; POLACOW et al., 2003).

Os resultados do presente estudo vêm corroborar os vários trabalhos encontrados na literatura. Mostrado redução de 66,55% na área de

secção transversa nas fibras do músculo sóleo após 7 dias de desnervação. Já com o tratamento com BCAA a média da área das fibras foi 90% maior comparada com o músculo desnervado, mas manteve-se diferente do controle com redução de 36,31%.

Tem sido demonstrado que, com a desnervação também ocorrem modificações relacionadas ao metabolismo de carboidratos, principalmente a resistência à insulina, desencadeada pela redução na atividade das enzimas reguladoras das vias metabólicas ligadas à interface pós-receptor da insulina; redução na população do GLUT4 (transportador de glicose tipo 4); redução na concentração citosólica do RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) do GLUT 4; redução na expressão gênica dos transportadores GLUT 1 (transportador de glicose tipo 1) e GLUT 4; redução na atividade das enzimas participantes da glicólise e da enzima glicogênio sintetase bem como redução na habilidade da insulina em ativá-la (CODERRE et al., 1992). Esses eventos associados, participam das alterações metabólicas que predispõem as fibras musculares à hipotrofia. Estudos têm demonstrado as relações funcionais entre a inervação motora e a homeostasia metabólica das fibras musculares, em que há um consenso de que a redução de reservas de glicogênio, induzida pela desnervação, pode ser minimizada por fármacos como metformina (GUIRRO et al., 2004), clenbuterol (CANCELLIERO et al., 2004), bem como suplementos energéticos como glutamina (FORTI, et al., 2004) e CGT - creatina-glutamina- taurina (CANCELLIERO et al., 2004).

Os BCAAs melhoram o metabolismo da glicose no músculo esquelético, tecido adiposo, e no fígado, no entanto, os mecanismos moleculares em cada órgão são diferentes. No músculo esquelético, os BCAAs

promovem a captação de glicose através da ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da proteína quinase C e posteriormente translocação do transportador de glicose (GLUT) 1 e GLUT4 para a membrana plasmática (NISHITANI et al., 2002; NISHITANI et al., 2005) no tecido adiposo, a leucina induz a melhora da fosforilação de insula pela Akt na Ser473 e Thr308 e mTOR em Ser2448, em última instância aumentando a captação de glicose (HINAULT et al., 2004). O presente estudo vem confirmar estes efeitos também em músculos desnervados e imobilizados.

As definições das doses aqui adotadas foram definidas de acordo com Mortimore et al. (1987) e Blommaert et al. (1995), onde compararam a concentração de leucina, isoleucina e valina no plasma basal e na concentração destes aminoácidos na veia porta de animais alimentados, sendo estas concentrações no valor de 0.4 mM, 0.4 mM e 0.25 mM respectivamente.

O excesso de BCAAs poderia resultar em uma maior disponibilidade de glutamato, podendo resultar numa toxicidade advinda de uma estimulação excessiva dos receptores NMDA, que são os receptores de glutamato principais responsáveis pela excitotoxicidade causando a morte celular neuronal (CHOI, 1988). Em consonância com essa hipótese verificou-se que a toxicidade da valina é revertido na presença de MK-801, um bloqueador dos canais específicos NMDA (BAK et al., 2007).

O Aminoácido de Cadeia Ramificada (BCAA) estimula a síntese protéica muscular, pois este aminoácido induz hiperfosforilação da 4E-BP1, promovendo a formação do complexo eIF4F, causando hiperfosforilação da p70^{S6k}. Esses fatos permitem relacionar a resposta anabólica sobre a síntese protéica muscular induzida pela ingestão de proteínas, por meio da capacidade

do mTOR detectar alterações na concentração intracelular principalmente da leucina (SHAH et al., 2000; KIMBALL, JEFFERSON, 2006a; KIMBALL, JEFFERSON, 2006b;).

Os BCAAs também são amplamente utilizados em pacientes com cirrose, com o objetivo de preservar ou restabelecer a massa muscular e melhorar a encefalopatia hepática. Com esta intervenção não há relatos de efeitos colaterais, como doenças neurológicas. No entanto, a concentração plasmática de BCAA nestes pacientes são menores do que em indivíduos normais (SCHULTE-FROHLINDE et al., 2007), assim é questionável se o cérebro de pacientes com cirrose podem ser expostos a altos níveis de BCAA. Uma vez que os erros genéticos no metabolismo de BCAA, indicam claramente que a desregulação das vias catabólicas podem resultar em toxicidade para o SNC.

No que se refere a participação da valina dentro do complexo de aminoácidos presente no BCAA, sabe-se que os aminoácidos (isoleucina, leucina e valina) comportam-se de forma integrada, porém com sítios de especificidade. A valina, após ser captada pela fibra muscular, é rapidamente submetida a transformação em uma cascata bioquímica cuja convergência está ligada a ação glicogênica, o que a difere da isoleucina e da leucina que apresentam um forte potencial cetogênico. Desta forma, as ações observadas nos grupos tratados com valina mostram que a manutenção das condições metabólicas prepondera sobre as vias anticatabólicas (BROSNAN e BROSNAN, 2006; ROGERO e TIRAPEGUI, 2008;). Os resultados aqui apresentados da captação de 2-deoxiglicose, da oxidação e da incorporação da glicose no músculo sóleo corroboram estes dados da literatura.

Neste trabalho foi avaliado o perfil bioquímico de ratos tratados com valina (0,25 mMol/100g) e o complexo de BCAA (0,5 mL/dia) durante 7 dias, utilizando marcadores para lesões hepáticas (Aspartato aminotransferase e Alaminaoamino transferase) e marcadores para lesões renais (Uréia, creatinina e gamaglutamil transferase), sendo que estes não apresentaram toxicidade por não diferirem do controle. A dosagem utilizada neste estudo está dentro dos padrões fisiológicos citados na literatura (MORTIMORE, 1987; BLOMMAART et al., 1995).

Cabe ressaltar que a ação da valina, na manutenção das condições metabólicas, manifestou-se neste trabalho um potencial ativador das vias citosólicas comprometidas pelo desuso (desnervação). Este fato associado a não toxicidade reitera sua participação na manutenção do equilíbrio quimiometabólico das fibras musculares.

Embora este estudo tenha mostrado alterações interessantes nas características morfológicas e bioquímica em músculo desnervados e em imobilizados, aponta também para várias limitações. O tempo de 7 dias pode ter sido muito curto para se avaliar efetivamente a toxicidade do BCAA. Aliado a isto, seria muito importante avaliar alterações no peso dos animais, bem como alterações comportamentais, imunológicas e hormonais, na ingesta de alimentos e água. Estas considerações poderão ser exploradas em futuros trabalhos, o que certamente contribuirá para maior conhecimento e segurança sobre a utilização deste recurso.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições experimentais deste trabalho a suplementação com BCAA alterou a morfologia do músculo sóleo em todas as condições estudadas, controle, imobilizado, desnervado.

No músculo sóleo controle suplementado com BCAA não foi observado alteração na secção transversa da fibra, no entanto, houve aumento no tecido conjuntivo.

A suplementação provocou aumento da área de secção transversa do músculo sóleo tanto no desnervado quanto no imobilizado. Porém, com relação ao tecido conjuntivo observou-se uma redução no grupo desnervado e uma manutenção da mesma porcentagem no imobilizado.

O aminoácido valina na concentração administrada não gerou toxicidade hepática, nem renal.

Houve uma redução do peso e das reservas de glicogênio dos músculos desnervados. Porém, quando suplementados com valina estes obtiveram um aumento significativo na reserva, mas não houve diferença no peso do músculo. E quando avaliou-se o conteúdo de glicogênio hepático este também não demonstrou alteração.

Na presença da valina a sensibilidade tecidual à insulina apresentou-se elevada na captação periférica tecidual, e não na sensibilidade das células beta pancreáticas.

Na avaliação das dinâmicas de captação e metabolização da glicose obteve-se elevação no músculo tratado com valina, redução no músculo desnervado e aumento no músculo desnervado tratado com valina. Quanto a

oxidação da glicose no músculo houve diferença, representado por redução frente a desnervação, por outro lado no músculo desnervado tratado com valina houve aumento na oxidação. Já na incorporação da glicose nas reservas glicogênicas, foi observado uma elevação na presença da valina tanto no músculo normal, quanto desnervado.

Pode-se concluir que este é um recurso que pode ser utilizado em situação de desuso muscular visto também que não apresenta toxicidade no tempo estudado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams RA, Tsai AM, Watson B, Jamali A, Lieber RL. Skeletal muscle recovery after tenotomy and 7- days delayed muscle length restoration. *Muscle Nerve*. 2000; 23(5): 707-714.

Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanem P, Kovanen V, Risteli J, Takala TES. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(4):473-81.

Akeson WH, Amiel D, Abel MF, Garfin SR, Woo SL. Effects of immobilization on joints. *Clin Ortho Relat Res*. 1987; (219): 28-37.

Alvers AL, Fishwick LK, Wood MS, Hu D, Chung HS, Dunn WA, Aris JP. Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 2009; (8): 353-369.

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

Andrew JR Harrelson GL, Wilk KE. *Reabilitação física do atleta*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

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

Asmussen G, Schmalbruch I, Soukup T, Pette D. Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive Japanese waltzing mice. *Exp Neurol*. 2003; 184(3): 758-766.

Babraj JA, Cuthbertson DJ, Smith K, Langberg H, Miller B, Krogsgaard MR, et al. Collagen synthesis in human musculoskeletal tissues and skin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; (289): E864-869.

Bak LK, Johansen ML, Schousboe A, Waagepetersen HS. Among the branched-chain amino acids, only valine metabolism is up-regulated in astrocytes during glutamate exposure. *J Neurosci Res*. 2007; (85): 3465-3470.

Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil*. 2002; 81(11): 40-50.

Biesek S, Alves L, Guerra I. Estratégias de Nutrição e Suplementação no Esporte. São Paulo: Manole; 2005. p. 151-168.

Bixel MG, Hutson SM, Hamprecht B. Cellular distribution of branched-chain amino acid aminotransferase isoenzymes among rat brain glial cells in culture. *J Histochem Cytochem*. 1997; (45): 685-694.

Blommaart EF, Luiken JJ, Blommaart PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*.. 1995; (270): 2320-2326.

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

Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: Enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006; (136): 207-211.

Cancelliero KM, Barros FG, Menezes RCLC, Silva CA. Efeito do CGT e do Clenbuterol no perfil metabólico do músculo esquelético desnervado. *Revista de Ciências Médicas.* 2004; 13(4): 327-35.

Cancelliero KM, Dias CKN, Silva CA, Guirro RRJ. Imobilização altera o conteúdo de glicogênio e peso muscular de acordo com o período e a posição articular. *Rev bras fisioter.* 2005; 9(2): 173-9.

Carvalho CMM, Shimano AC, Volpon JB. Efeitos da imobilização e do exercício físico em algumas propriedades mecânicas do músculo esquelético. *Rev Bras Eng Biomed.* 2002; 18(2): 65-73.

Champ M, Molis C, Flourié B, Bornet F, Pellier P, Colonna P, et al. Small intestinal digestion of partially resistant corn starch in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1998; (68): 705-710.

Chevront 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.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988; (1): 623-634.

Cynober L, Harris RA. Symposium on branched-chain amino acids: conference summary. *J Nutr.* 2006; (136): 333S-336S.

Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinology Springfield.* 1992; 131(4): 1821-5.

Coutinho EL, Gomes AR, França CN, Salvini TF. A new model for the immobilization of the rat hind limb. *Braz J Med Biol Res.* 2002; (35): 1329-1332.

Contruscieri V, Paradisi S, Matteucci A, Malchiodi-Albedi F. Branched-Chain Amino Acids Induce Neurotoxicity in Rat Cortical Cultures. *Neurotox Res.* 2010; (17): 392-398.

Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, et al. Hypothalamic mtor signaling regulates food intake. *Science.* 2006; (312): 927-930.

D'Antona G, Ragni M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, Bruttini F, et al. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab.* 2010; (12): 362-372.

Decherchi P, Dousset E, Marqueste T, Berthelin F, Hug F, Jammes Y, et al. Électromyostimulation et recuperation fonctionnelle d'un muscle dénervé. *Science & Sports.* 2003; (18):253-263.

Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIa, IIb/x, and IIb fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol*. 1996; (26): 261-270.

Dow DE, Cederna PS, Hasset CA, Kostrominova TY, Faulkner JA. Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2004; 30(1): 77-86.

DURIGAN JLQ. Estudo morfométrico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização associada à estimulação elétrica neuromuscular. [dissertação de mestrado]. Piracicaba: Brasil, Universidade Metodista de Piracicaba, 2006.

Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology*. 2nd ed. Philadelphia: McGRAW-HILL inc, 1994.

Etzel MR. Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions. *J Nutr*. 2004; 134(4): 996s-1002s.

Fernandes KC, Fuentes CB, Campos GE, Somazz MC, Polacow ML, Guirro RR, et al. Análise morfométrica dos tecidos muscular e conjuntivo após desnervação e estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisiot*. 2005; 9(2): 235-241.

Fernstrom JD. Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr*. 2005; 135(6): 1539s-1546s.

Forti F, Cancelliero KM, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*. 2004; 18(3): 273-81.

Fuchs S, Bundy JG, Davies SK, Viney JM, Swire JS, Leroi AM. A metabolic signature of long life in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol.* 2010; (8): 14.

Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med Biol Res.* 2004; (37): 1473-1480.

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

Goto S, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Nakahara K, Kangawa K, et al. Anorexia in rats caused by a valine-deficient diet is not ameliorated by systemic ghrelin treatment. *Neuroscience.* 2010; (166): 333-340.

Guirro RRJ, Silva CA, Forti F, Cancelliero KM. Análise do músculo esquelético desnervado tratado com metformina e/ou estimulação elétrica de baixa frequência. *Rev Bras Fisioter.* 2004; 8(1): 21-7.

Hendler SS, Rorvik D. PDR for nutritional supplements. Medical Economics, 2001.

Henriksen EJ, Roodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 1991; (70): 2322-2327.

Heslinga HJ, Kronnie G, Huijing PA. Growth and immobilization affects on sarcomeres: a comparison between gastrocnemius and soleus muscle of the adult rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995; (70): 49-57.

Hinault, C.; Mothe-Satney, I.; Gautier, N.; Lawrence, J.C., Jr.; Van Obberghen, E. Amino acids and leucine allow insulin activation of the PKB/mTOR pathway in normal adipocytes treated with wortmannin and in adipocytes from db/db mice. *FASEB J.* 2004; (18): 1894-1896.

Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; (279): 1235-1241.

Holm L, van Hall G, Rose AJ, Miller BF, Doessing S, Richter EA, Kajer M. Contraction intensity and feeding affect collagen and myofibrillar protein synthesis rats differently in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; (298): E257-E269.

Hutchison SN, Zarghami NS, Patrick K, Cusick PK, John B, Longenecker JB, et al. The Effect of Valine Deficiency on Neutral Amino Acid Patterns in Plasma and Brain of the Rat. *J Nutr.* 1983; (113): 2164-2171.

Hutson SM, Harris RA. Symposium: Leucine as a Nutritional Signal. Introduction. *J. Nutr.* 2001; (131): 839S-840S.

Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *J Nutr.* 2005; 135(6): 1557s-1564s.

Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials.* 2004; 25(9): 1583-1592.

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

Jakubiec-Puka A, Catani C, Carraro U. Myosin heavy-chain composition in striated muscle after tenotomy. *Biochem J.* 1992; 15(282): 237-242.

Jarvinen TA, Józsa L, Kannus P, Jarvinen TL, Jarvinen M. Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Moti.* 2002; (23): 345-354.

Józsa L, Thoring J, Jarvinen M, Kannus P, Lehto M. Quantitative alterations in intramuscular connective tissue following immobilization: an experimental study in the rat calf muscles. *Experimental and Molecular Pathology.* 1988; 48(2): 267-278.

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): 293-297.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 11ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kannus P, Józsa L, Jarvinen TLN, Kvist M, Vieno T. Free immobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology.* 1998; 84(4): 1418-1421.

Kern H, Hofer C, Modlin M, Forstner C, Raschka-Hogler D, Mayr W, et al. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used

functional electrical stimulation training protocols. *Artif Organs*. 2002; 26(3): 216-218.

Kimball SR, Jefferson LS. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006a; 83(2): 500S-507S.

Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 2006b; (136): 227S-231S.

Kjaer M. Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical Loading. *Physiol Rev.* 2003; (84): 649-698.

Kobayashi H, Kato H, Hirabayashi Y, Murakami H e Suzuki H. Modulations of Muscle Protein Metabolism by Branched-Chain Amino Acids in Normal and Muscle-Atrophying Rats. *J. Nutr.* 2006; (136): 234S-236S.

Kujawa M, Baran W, Jankowska-Steifer E. Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilization after soleus muscle denervation. *Exp. Mol. Pathol.* 2005; 78(1): 78-85.

Lewis MI, Bodine SC, Kamangar N, Xu X, Da X e Fournier M. Effect of severe short -term malnutrition on diaphragmmus clesignal transduction pathway influencing protein turnover. Article in press *J Appl Physiol*. 2006; Doi:10.1152.

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

Lieth E, Lanoue KF, Berkich DA, Xu B, Ratz M, Taylor C, et al. Nitrogen shuttling between neurons and glial cells during glutamate synthesis. *J Neurochem.* 2001; (76): 1712-1723.

Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silava CA, Minamoto, et al. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2007; 11(4): 297-302.

Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.* 1997; (248): 355-365.

Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience.* 1990; 35(1): 157-165.

Lynch CJ, Gern B, Lioyd C, Hutson SM, Eicher R, Vary TC. Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; (291):E621-630.

Mandarim de Lacerda, C. A. Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Alometria, Estereologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Cébio; 1994. 83p.

Marques MJ. Estudo ultra-estrutural da junção neuromuscular após regeneração nervosa no interior de próteses tubulares [tese doutorado], São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1992.

Mathieu O. et al. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *Journal of Microscopy*. 1981; (121): 75-88.

Mitchell PO, Pavlath GK. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Cell Physiol*. 2001; (281): 1706-1715.

Morey ER, Sabelman EE, Turner RT, Baylink DJ. A new rat model simulating some aspects of space flight. *Physiologist*. 1979; (22): 523-524.

Mortimore GE, Poso AR, Kadowaki M, Wert Jr JJ. Multiphasic control of hepatic protein degradation by regulatory amino acids: general features and hormonal modulation. *J Biol Chem*. 1987; (262): 16322-16327.

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

Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; (299): 693-696.

Nishitani S, Takehana K, Fujitani S, Sonaka I. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005; (288): G1292-1300.

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): 159-166.

Pette D, Staron RS. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* 2001; 115(5): 359-372.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RRJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo desnervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Res bras fisioter.* 2003; (7): 77-84.

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

Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle & Nerve.* 2001; 24(7): 893-899.

Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2008; 44(4): out./dez.

Salonen V, Leht M, Kalimo M, Penttinen R, Aro H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve.* 1985; 8(2): 125-131.

Savolainen J, Vaananen K, Puranen J, Takala TE, Komulainen J, Vihko V. Collagen Synthesis and proteolytic activities in rats skeletal muscle: effect of

cast-immobilization in the lengthened and shortened positions. *Arch Phys Med Rehabil.* 1988; (69): 964-969.

Schiaffino S, Murgia M, Serrano AL, Calabria E, Pallafacchina G. How is muscle phenotype controlled by nerve activity? *Ital J Neurol Sci.* 1999; 20(6): 409-412.

Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and degenerated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000; (23): 617-626.

Schulte-Frohlinde E, Wagenpfeil S, Willis J, Lersch C, Eckel F, Schmid R, et al. Role of meal carbohydrate content for the imbalance of plasma amino acids in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; (22): 1241-1248.

Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* 1943; (66): 237-288.

Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS. 4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 279(4): E715-E729.

She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; (293): E1552-1563.

Shimomura Y, Harris RA. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. *J. Nutr.* 2006; (136): 232-233.

Shimomura Y, Yakemoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N, Kobayashi H, Mawatari K. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J. Nutr.* 2006; 136(2): 529-532.

Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Durigan JLQ. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(18): 979-985.

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

Solerte SB, Gazzaruso C, Bonacasa R, Rondanelli M, Zamboni M, Basso C, et al. Nutritional supplements with oral amino acid mixtures increases whole-body lean mass and insulin sensitivity in elderly subjects with sarcopenia. *Am J Cardiol.* 2008; (101): 69E-77E.

Tanaka T, Kariya Y, Hoshin, Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. *J Orthop Sci.* 2004; (9): 76-85.

Trappe TA, Carrithers JA, White F, Lambert CP, Evans WJ, Dennis RA. Titin and nebulin content in human skeletal muscle following eccentric resistance exercise. *Muscle nerve.* 2002; (25): 289-292.

Valerio A, D'Antona G, Nisoli E. Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: na evolutionary perspective. *Aging J.* 2011; 3(5): 1-15.

Watanabe RCT. As ações do bcaa associado à estimulação elétrica

neuromuscular em músculos imobilizados de ratos [dissertação de mestrado], Piracicaba (Brasil): Universidade Metodista de Piracicaba; 2010.

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 in immobilized muscle. *J Anat.* 1978; 127(3): 459-68.

Xu G, Kwon G, Cruz WS, Marshall CA, McDaniel ML. Metabolic Regulation by Leucine of Translation Initiation Through the mTOR-Signaling Pathway by Pancreatic β -cell. *Diabetes.* 2001; (50): 353-360.

Yang H, Alnaqeeb M, Simpson H, Goldspink G. Changes in muscle fiber type, muscle mass and IGF-I gene expression in rabbit skeletal muscle subjected to stretch. *J Anat.* 1997; (190): 613-22.

Yudkoff M. Brain metabolism of branched-chain amino acids. *Glia.* 1997; (21): 92-98.

Yudkoff M, Daikhin Y, Nelson D, Nissim I, Erecin´ska M. Neuronal metabolism of branched-chain amino acids: flux through the aminotransferase pathway in synaptosomes. *J Neurochem.* 1996; (66): 2136-2145.

Zernicka E, Smol E, Langfort J, Gorecka M. Time course of changes in lipoprotein lipase activity in rat skeletal muscles during denervation-reinnervation. *J Appl Physiol.* 2002; 92(2): 535-540.


Zierath JR, Hawley JA. Skeletal muscle fiber type: Influence on contractile and metabolic properties. *Plos Biology*. 2004; (10): 337-348.

9. ANEXOS

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 5351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 015/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 7ª. Reunião, ocorrida em 20/06/2006, APROVOU o trabalho intitulado Estudo Metabólico, morfométrico e mecânico do músculo sóleo de ratos submetidos à imobilização associado à estimulação elétrica e a tratamentos farmacológicos, elaborado por Profa. Dra. Maria Luiza Ozores Polacow, procedente da Universidade Metodista de Piracicaba/Departamento de Fisioterapia. Protocolo CEEA nº 010/2006.
São Carlos, 30 de agosto de 2006.


Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Adendo de 17/02/2009 – APROVA inserção dos seguintes protocolos: 1) Desnervação muscular. 2) Suplementação com BCAA ou componentes.