

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Análise quimiometabólica e biomolecular da musculatura
esquelética desnervada de ratos submetidos ao tratamento com o
aminoácido leucina**

Carolina Barbosa Ribeiro

2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolina Barbosa Ribeiro

**ANÁLISE QUIMIOMETABÓLICA E
BIOMOLECULAR DA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA DESNERVADA DE RATOS
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O
AMINOÁCIDO LEUCINA**

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: Plasticidade Neuromuscular e Desenvolvimento Neuromotor: Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

PIRACICABA
2010

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Unimep
Bibliotecária: Rosangela Aparecida Lobo CRB-8/ 7500

R484a Ribeiro, Carolina Barbosa.
Análise quimiometabólica e biomolecular da musculatura
esquelética de ratos submetidos ao tratamento com aminoácido
leucina / Carolina Barbosa Ribeiro. – Piracicaba, SP: [s.n.], 2010
75 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) – Universidade Metodista
de Piracicaba, Faculdade de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

1. Desnervação. 2. Glicogênio. 3. Leucina. I. Silva, Carlos Alberto
da. II. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Flavio José Ribeiro e Carlinda Barbosa Ribeiro por tudo, sempre!

E a todos que me ouviram falar sobre, pela dedicação e paciência...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pela participação ativa e direta neste caminho de muitos desafios e realizações, curiosidades e descobertas, de crescimento científico e profissional, meu eterno agradecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, da Universidade Metodista de Piracicaba, onde tive a oportunidade de dar um importante rumo ao crescimento pessoal e profissional.

As pessoas que passaram e participaram de partes importantes desta realização. Aos técnicos de laboratórios, de fisiologia e química, que estavam sempre presente para os pequenos detalhes, que sem estes não ocorreriam às grandes descobertas.

Aos amigos e colegas de profissão, que estavam presentes, de forma ativa, no dia a dia dos experimentos, aos muitos feitos para que este trabalho fosse concluído, e o mais valioso, as conversas, trocas de experiências e as muitas risadas.

A todas as pessoas que fizeram parte de forma direta ou indireta, contribuindo para realização deste trabalho, meu agradecimento. E não podia deixar de lembrar, as grandes amizades conquistadas durante este caminho, e tenho certeza que ficaram guardadas na memória e no coração.

Meus agradecimentos a todos!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

RESUMO

A musculatura esquelética exerce um papel importante no controle glicêmico, sendo assim, a homeostasia metabólica das fibras musculares pode ser comprometida por diferentes fatores como desnervação. O objetivo do estudo foi investigar no músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação, os eventos ligados ao tratamento com o aminoácido leucina, por meio de análise bioquímica, biomolecular e dos indicadores do status metabólico. Foram utilizados ratos Wistar, divididos: grupo controle (C), desnervado (D), controle tratado com o aminoácido leucina (C+L) e desnervado tratado com aminoácido leucina (D+L), nas doses 5mM; 1,25mM e 0,30mM, durante 7 dias. O glicogênio foi analisado no fígado e nos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e gastrocnêmio vermelho, por meio do método fenol sulfúrico. Análise da proteína foi realizada no sóleo, pelo método colorimétrico, por um kit laboratorial. Análise biomolecular, foi através do Western Blot. Foi realizado um estudo de anestésico e também foram avaliados: constante de decaimento da glicemia, comportamento, perfil eletrocardiográfico e estado de saúde. Análise estatística foi pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, ANOVA: one way e Tukey. Resultados, na análise do glicogênio muscular e do fígado, foi verificada redução no grupo 5 mM (L5); e aumento no 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30), comparadas com C, e aumento de L1,25 comparado a L5. Nos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, ocorreu redução de L5 e L1,25 comparado com C, e em L5 comparado a L1,25. Por outro lado, houve aumento no L0,30, comparado com as demais doses, e somente para sóleo se comparado com o C. No desnervado tem-se diminuição do glicogênio dos músculos gastrocnêmios para o C, e no fígado e nos músculos analisados se comparado com C+L. O desnervado suplementado 0,30mM obteve diminuição para todas as amostras se comparado com os demais grupos, menos no músculo sóleo do grupo D e D+L, não houve diferença estatística. O conteúdo de proteína muscular no sóleo desnervado diminuiu quando comparado ao C, no animal suplementado (L0,30) e desnervado/suplementado (DL0,30), apresentaram aumento significativo comparado com o D, quanto as demais comparações não foram estatisticamente significantes. O padrão dos sistemas enzimáticos indicadores do "status" metabólico das fibras musculares indicou redução no AMPK do C+L e D+L. Por outro lado no D foi observada elevação na fosforilação. Na enzima AKT houve elevação no D; e se comparado ao C e D observa-se elevação dos grupos C+L e D+L. Para mTOR houve redução no D. Nos grupos C+L e D+L ocorreu elevação se comparados com C e D, respectivamente. Por fim, em ACC houve elevação no D e redução dos grupos tratados. Sendo assim, altas doses de leucina podem comprometer a homeostasia do funcionamento bioquímico do organismo e possivelmente levar na prática clínica, a algumas possíveis complicações. O contrário, baixas doses podem auxiliar num melhor funcionamento do sistema insulínico, exercendo um papel anti-catabólico.

Palavras-chave: desnervação, glicogênio, leucina.

Abstract

The skeletal muscle plays an important role in glucose control, so the metabolic homeostasis of muscle fibers can be compromised by various factors such as denervation. The aim was to investigate the skeletal muscle of rats subjected to denervation, the events related to treatment with the amino acid leucine, through biochemical, biomolecular and indicators of metabolic status. Wistar rats were divided: the control group (C), denervated (D), control treated with the amino acid leucine (CL) and denervated treated with amino acid leucine (DL) in 5mM, 1.25 mM and 0.30 mM for 7 days. Glycogen was analyzed in liver and soleus, white gastrocnemius and red, using the phenol sulfuric method. Protein analysis was performed in the soleus, the colorimetric method by a laboratory kit. Biomolecular Analysis was by Western Blot. We conducted a study of anesthetic and were also evaluated: glucose decay constant, behavior, electrocardiographic profile, and health status. Statistical analysis was by the normality test of Shapiro-Wilk test, ANOVA: one way and Tukey. Results, analysis of liver glycogen was observed reduction of 5 mM (L5) and increased at 1.25 mM (L1, 25) and 0.30 mM (L0, 30), compared with C, and increased L1, 25 as compared to L5. In the soleus, gastrocnemius white and red, reduction of L5 and L1,25 compared with C, compared to L5 and L1, 25. Moreover, there was an increase in L0, 30, compared to other doses and only for soleus compared with C. In denervated has decreased the glycogen of the gastrocnemius muscles to C, and liver and muscles examined compared with C L. The denervated supplemented with 0.30 mM had decreased for all samples when compared with other groups, less in the soleus muscle of group D and DL, which was not statistically different. The protein content in soleus muscle denervated had decreased compared to C, in animals supplemented (L0,30), and denervated / supplemented (DL0, 30), increased significantly compared with the D, as the other comparisons were not statistically significant. The pattern of enzyme systems indicators of the status of metabolic muscle fibers showed a reduction in AMPK CL and DL. Moreover the increase in D was observed fosforilação. Na AKT enzyme was elevated in D, and compared to C and D there is elevation of groups CL and L. D For mTOR decreased in D. In CL and DL groups had elevated compared with C and D, respectivamente. Por end, there was an increase in ACC and reduction of the D groups. Thus, high doses of leucine may compromise the homeostasis of the biochemical functioning of the body and possibly lead in clinical practice, some possible complications. The contrary, low doses may help in better functioning of insulin, playing a anti-catabolic.

Key words: denervation, glycogen, leucine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE DESNERVAÇÃO	12
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O AMINOÁCIDO LEUCINA	14
1.3 RELAÇÕES FISIOLÓGICAS ENTRE A INDUÇÃO E OS AJUSTES METABÓLICOS	16
2. OBJETIVO	
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	19
3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDO LEUCINA	20
3.3 ANESTÉSICO	20
3.4 DESNERVAÇÃO	21
3.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	
3.5.1 CAMPO ABERTO	21
3.5.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA	22
3.6 ELETROCARDIOGRAMA	22
3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	
3.7.1 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA	23
3.7.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	23
3.8 GLICOGÊNIO MUSCULAR	24
3.9 PROTEÍNA TOTAL	24
3.10 FRAGILIDADE OSMÓTICA	25
3.11 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA SECRETÓRIA DA INSULINA.	25
3.12 AVALIAÇÃO BIOMOLECULAR	26
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS	
5.1 ANÁLISE DE SELEÇÃO DO ANESTÉSICO	28
5.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DO ANIMAL SUPLEMENTADO COM LEUCINA	30

5.3 AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRAFICA DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA	31
5.4 PROVA DE FUNÇÃO PANCREÁTICA E SENSIBILIDADE À INSULINA NA PRESENÇA DE LEUCINA	32
5.5 PERFIL METABÓLICO FRENTE Á DIFERENTES DOSES DE LEUCINA	35
5.6 ANÁLISE DO CONTEÚDE DE GLICOGÊNIO DO MÚSCULO DESNERVADO E SUPLEMENTADO COM AMINOÁCIDO LEUCINA NA DOSE 0,30 mM	36
5.7 AVALIAÇÃO DO ESTADO DE SAÚDE DOS ANIMAIS	38
5.8 RELAÇÕES ENTRE A SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDO LEUCINA NA INTERFACE ANABOLISMO/CATABOLISMO	39
5.9 AVALIAÇÃO BIOMOLECULAR EO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA	40
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

Para melhor compreender a plasticidade do tecido muscular, vários estudiosos optaram por utilizar modelos experimentais desenvolvidos e aplicados em ratos, os quais promovem uma perturbação na homeostasia da junção neuromuscular, quer seja por meio da desnervação muscular ou pela imobilização, induzindo o quadro de hipotrofia (Henriksen et al, 1997). Nesse contexto, as buscas por estratégias que permitam a melhora do metabolismo muscular, podem auxiliar no entendimento do restabelecimento funcional da musculatura esquelética após o desuso.

Vários estudos abordam parâmetros histofisiológico de músculos desnervados, mas a literatura é escassa sobre o efeito do aminoácido leucina no músculo submetido à desnervação, bem como o papel desta substância sobre os parâmetros quimiometabólicos destas fibras musculares. Infelizmente não há tratamento eficaz para prevenir os eventos deletérios inerentes ao desuso muscular, porém, com a identificação de algumas vias de sinalização relacionada à hipotrofia muscular e concomitante ao avanço das pesquisas, novos tratamentos podem ser propostos com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios promovidos pelas alterações no controle motor ou funcional. Dentre as diversas substâncias plausíveis de utilização, destaca-se o aminoácido leucina que interage tanto com as vias anabólicas quanto com as vias anti-catabólicas da musculatura esquelética, locus das principais alterações desenvolvidas pela limitação funcional.

Fraturas ósseas, rupturas ligamentares, lesões musculares, doenças degenerativas e articulares, podem exigir, no pré e pós cirúrgico ou no tratamento conservador, imobilização dos membros afetados (Halar e Kathleen, 2002), bem como, as lesões nervosas periférica, que ocorrem comumente na prática clínica, levarem ao desuso da musculatura esquelética.

Na literatura há diversos trabalhos abordando os modelos de desuso muscular, como a desnervação, tenotomia, suspensão de membro, repouso prolongado em leito e imobilização articular (Musacchia et al., 1988). Este trabalho optou pelo modelo de desuso induzido pela desnervação muscular,

através da secção do nervo isquiático, pois melhor representa e de forma drástica os efeitos deletérios inerentes a este processo.

A plasticidade histofisiológica das fibras musculares esqueléticas permite que estas sejam capazes de adaptar constantemente sua funcionalidade deflagrando mudanças no seu tamanho ou na tipagem. Múltiplos estímulos podem promover estas mudanças, merecendo destaque as ações hormonais, o status nutricional, a estimulação elétrica neuromuscular, dentre outros (Salvini, 2000).

Neste sentido, sabe-se que a hipotrofia muscular induzida por desuso ocorre em associação com várias desordens ortopédicas como na osteoartrite crônica, frente à imobilização no tratamento de fraturas, tratamento com glicocorticóides ou ainda em situações de manutenção por repouso prolongado, assim, tem sido demonstrado que o desuso muscular induz uma gama de desarranjos estruturais e quimiometabólicos, tais como a proliferação do tecido conjuntivo intramuscular, hipotrofia muscular, redução da densidade dos capilares, dos sarcômeros em série, da força e resistência à fadiga (Reardon et al., 2001; Polacow et al., 2003).

O desuso muscular crônico, produzido por condições de inatividade prolongada, desnervação do membro ou microgravidade, induz resistência à insulina potencializando o estado catabólico em músculos esqueléticos de humanos e ratos, fibrose intramuscular, redução da extensibilidade muscular, além de limitação da liberdade de movimento articular (Reardon et al., 2001).

Apesar do desuso muscular crônico e da desnervação serem condições que diminuem a captação de glicose estimulada pela insulina, ainda não está claro o mecanismo pelo qual há alteração nas vias sinalizadoras da insulina (Hirose et al., 2000). Tem sido relatado que a redução na atividade da junção neuromuscular provocada pela inatividade forçada ou desnervação muscular, promove redução na efetividade das vias sinalizadoras da insulina, na população de GLUT 4, bem como na sua expressão gênica, comprometendo a homeostasia energética, acelerando o desenvolvimento do quadro de resistência à insulina (Fushiki et al., 1991; Henriksen et al., 1997).

Nesse contexto, tem-se caracterizado a hipotrofia muscular, como um processo com intensidade diferente para cada tipo de músculo (Castro, et al.

1999). Dessa maneira as fibras do tipo I possuem menor adaptação em relação às fibras do tipo II, sendo conseqüentemente mais afetadas pelo desuso (Talmadge, 2002). Em 1996, Caiozzo e colaboradores sugeriram que músculos cuja ação é anti-gravitacional possuem maior grau de hipotrofia em situações de desuso. Kasper (2002) observou maior susceptibilidade à hipotrofia em fibras lentas oxidativas e Tanaka et al. (2004), observaram no músculo sóleo maior comprometimento em situações de desuso por ser predominantemente formado por fibras do tipo I, ao passo que, o extensor longo dos dedos que possui predomínio de fibras do tipo II foi menos comprometido.

Tem-se observado que as fibras lentas em situação de desuso apresentam marcantes alterações histo-fisiológicas como irregularidades no retículo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas, condensação e fragmentação da cromatina nuclear, e redução de sarcômeros em paralelo (Lu, Huang e Carson 1997; Smith et al., 2000; Kasper, 2002).

Hilder et al. (2003), estudaram ratos com suspensão de membros posteriores e demonstraram que a resistência à insulina acompanha o processo de atrofia muscular induzida pelo desuso em músculos esqueléticos de contração lenta, como o músculo sóleo. Simultaneamente, esses autores também observaram redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados e a correlacionaram com a degradação da proteína IRS-1, evidenciando redução na efetividade da sinalização insulínica. Além disso, observaram também uma redução na atividade da enzima Akt.

1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE DESNERVAÇÃO

As lesões de nervos periféricos acontecem comumente na prática clínica, no qual além das alterações no padrão funcional do sistema nervoso central e periférico, os tecidos por este inervados acabam por ser comprometidos, pelo desuso. No caso de interrupção completa da inervação motora, observa-se a perda imediata da ação voluntária deste tecido bem como sua ação reflexa, proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, diminuição ou perda na

capacidade de gerar força, fatores esses, que de forma associada podem levar a atrofia muscular (Henriksen et al., 1997; Dow et al., 2006).

Tal processo envolve mudanças quantitativas e qualitativas na expressão de genes específicos do músculo, sendo o tecido músculo esquelético, um tecido que possui a maior capacidade de adaptação diante as diferentes condições impostas (Goldspink, 2002).

Desta forma, muitos estudos apontam as mudanças significativas que ocorrem no tecido muscular periférico após uma secção completa de um nervo, merecendo destaque a resistência periférica insulínica, devida a diminuição na concentração de fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) ligada ao receptor insulínico, diminuição na população de GLUT 4 e na expressão gênica do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do GLUT 4, fatores associados que convergem para a diminuição nas reservas energéticas além de proteólise no tecido afetado, predispondo a atrofia (Sowell et al., 1991; Coderre et al., 1992; Henriksen et al., 1997; Forti et al., 2004).

No estudo realizado por Nunes e Mello (2005), em músculo sóleo de ratos desnervados durante os períodos de 3, 7 e 28 dias, foi demonstrado redução na captação de glicose pelo músculo sóleo da pata desnervado após 7 dias, em relação ao grupo controle, os demais grupos, 3 e 28 dias, não foram diferentes em relação ao o grupo controle. Além disso, na avaliação da oxidação da glicose só obtiveram significância estatística no grupo 7 dias em relação ao controle. Em relação à síntese de glicogênio, houve uma diminuição nos animais desnervados em todos os grupos analisados em relação ao controle. A constante de remoção da glicose sanguínea (Kitt), após 28 dias de desnervação foi significativamente superior aos animais do controle e após 3 e 7 dias. No fígado descreveram aumento no conteúdo de glicogênio somente nos grupos desnervado 3 e 7 dias em relação aos animais controle.

Na análise histofisiológica, estudos com animais desnervados separados em grupos: controle, desnervado, desnervado/eletroestimulado diariamente, e desnervado/eletroestimulado em dias alternados, avaliados após 20 e 30 dias, foram encontradas alterações na distribuição da densidade de área do tecido conjuntivo, mas evidenciada no perimísio, onde os grupos desnervados e desnervados/eletroestimulado em dias alternados apresentaram maior densidade de área de tecido conjuntivo, quando comparado ao grupo controle,

na análise de 20 dias. Os animais avaliados após 30 dias, foi encontrado maior densidade de área de tecido conjuntivo do grupo tratado comparado com o grupo controle e desnervado/eletroestimulado diariamente (Caierão et al., 2008).

A análise da área das fibras musculares, depois de 20 dias, os grupos desnervados, desnervados/eletroestimulados diariamente e em dias alternados, apresentaram diminuição em relação ao controle. O que demonstra a não efetividade da eletroestimulação na prevenção da atrofia, pois não obteve diferença em relação ao grupo desnervado. No período de 30 dias, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Caierão et al., 2008).

Em 2006 um estudo de Lima, avaliou a ação da estimulação elétrica sobre a expressão gênica da MyoD, atrogina-1 e miostatina, onde foi observado que o estímulo elétrico promoveu eventos ligado a miogênese mostrando-se eficiente no processo de recuperação muscular.

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O AMINOÁCIDO LEUCINA

Nos dias atuais é muito comum, por atletas e praticante de atividade física, a utilização de substâncias que auxiliem o ganho de massa muscular e aumentem as reservas energéticas, visando melhorar o desempenho físico. Dentre as diferentes opções tem-se frequentemente utilizado a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (ACR, BCAA, do inglês: Branched Chain Amino Acids) representado pelos seguintes aminoácidos essenciais: valina, leucina e isoleucina, os quais são liberados pelo fígado durante a atividade física (Lancha, 2004).

Em indivíduos adultos, ACR são relevantes para a manutenção da proteína corporal além de ser fonte de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina. Existem evidências demonstrando o papel fundamental dos ACR – especialmente a leucina – na regulação de processos anabólicos que envolveram tanto a síntese quanto a degradação protéica muscular. Além disso, ACR apresentam potenciais terapêuticos, uma vez que esses aminoácidos podem atenuar a perda de massa magra durante a redução de massa corporal; favorecer o processo de cicatrização; melhorar o balanço

protéico muscular em indivíduos idosos; e propiciar efeitos benéficos no tratamento de patologias hepáticas e renais (Shimomura et al., 2006; Tom e Nair, 2006).

Estudos demonstraram que a leucina é o aminoácido de maior impacto quando se visa o aumento da síntese protéica muscular, diminuição no catabolismo e melhora nas reservas energéticas. Para Li e Jeferson (1978), o efeito da mistura dos três ACR sobre a síntese protéica muscular pode ser atribuído especialmente ao aminoácido leucina, uma vez que, em estudo com músculo esquelético perfundido (*in vitro*), foi verificado que o fornecimento de leucina isoladamente estimula a síntese protéica muscular tão efetivamente como a mistura dos três.

Dessa forma, os aminoácidos de cadeia ramificada podem substituir a glicose nas vias geradoras de energia (Sizer e Whitney, 2003). No final dos anos 70, os aminoácidos de cadeia ramificada foram sugeridos como o terceiro combustível para a musculatura esquelética, após os carboidratos e as gorduras (Gleeson, 2005). Contudo, efeitos ergogênicos da sua suplementação não costumam ser verificados, particularmente quando comparados com os que ocorrem na suplementação de carboidratos, uma escolha mais natural, quando a intenção é fornecer energia e poupar glicogênio (Williams, 1999).

Esses aminoácidos atuam de forma diferenciada para cada tipo de fibras musculares. A concentração na proteína muscular humana é de 59,5 de leucina; 43,5 isoleucina e 41,9 mmol/100g de valina, sendo 20-30 % maior em fibras de contração lenta em comparação aquelas de contração rápida. Os ACR correspondem cerca de 35 % dos aminoácidos essenciais em proteínas musculares e, uma vez que a massa muscular de humanos é de cerca de 40-45 % da massa corporal total, verifica-se que grande quantidade de ACR está presente em proteínas musculares (Wagenmakers et. al, 1991).

Tem sido descrito importantes relações funcionais entre o metabolismo do aminoácido leucina e o processo secretório da insulina, sendo proposta a existência de duas vias de transaminação da leucina, formando o substrato α -cetoisocaproato (KIC) ou ativando enzimas alostérica da glutamatodesidrogenase (GDH), levando à oxidação do glutamato em α -cetoglutarato, ambas as vias originam os intermediários do ciclo de Krebs,

gerando ATP, conseqüente há um maior controle do influxo de cálcio modulando a intensidade da secreção da insulina (Changhong et al., 2008).

Temos que considerar que os produtos do metabolismo da leucina, em células β pancreáticas, podem ativar fatores regulatórios da tradução e como conseqüência ativar importantes sistemas reguladores das vias anabólicas, com destaque a mTOR (Xu et al., 2001; Lewis et al., 2006; Kimball et al., 2006).

No que tange ao sinergismo entre o metabolismo da leucina e da glicose, sabe-se que o aminoácido pode gerar sinais comparáveis aos da glicose, como bloquear os canais de potássio da membrana celular, induzir aumento na concentração de cálcio e ativar a expressão gênica promovendo ajustes nas funções nucleares. Este sinergismo entre os produtos do metabolismo deste aminoácido e da hexose pode permitir o controle na expressão gênica, principalmente do gene c-myc, além de modular ações nucleares e sinais reguladores das concentrações de cálcio (Aspimwall et al., 2000; Quesada et al., 2002; Viard et al., 2004 Harrington, Frindlay e Lamb, 2005).

É possível que haja uma inter-relação entre os sinais metabólicos gerados pela leucina e glicose e, possivelmente, pela insulina liberada por estes agentes insulíntricos trazendo como resultado a modulação dos sinais insulínicos nos tecidos periféricos (Araujo et al., 2004).

1.3 RELAÇÕES FISIOLÓGICAS ENTRE A INDUÇÃO ANESTÉSICA E OS AJUSTES METABÓLICOS

Os modelos de experimentação animal são fundamentais para a pesquisa por mimetizarem características elementares e favorecerem a compreensão de ajustes funcionais, assim reduzem o número de variáveis oferecendo maior grau de controle, fatos associados que permitem o desenvolvimento de terapias eficazes.

Na rotina experimental constantemente utiliza-se da anestesia para realização dos procedimentos, no entanto, tal prática merece extrema atenção no que se refere à escolha da técnica e do fármaco ideal a ser utilizado (Jevtovic-Todorovic e Carter, 2005; Carregaro, Castro e Martins, 2005). Deve-se considerar ainda, que inúmeros fatores podem influenciar na anestesia, merecendo destaque o status alimentar, principalmente o jejum, idade,

nutrição, o grau de estresse, espécie animal, temperatura corporal, temperatura ambiental, procedimentos invasivos, duração, etc.

Durante o procedimento de anestesia devem-se observar alguns sinais clássicos que indicam as condições homeostáticas da espécie, como por exemplo, sinais de calafrio que indicam perda de calor, por efeito do comprometimento do metabolismo basal pelo anestésico, e relação da massa corpórea e ambiente; depressão direta dos centros de termorregulação gerando mioclonia na tentativa do organismo gerar energia para compensar a hipotermia (Weissman e Hollinger, 1988).

Drogas e técnicas anestésicas podem influenciar nas respostas metabólicas, principalmente por estimular respostas autonômicas. Considerando ainda que qualquer fator externo possa alterar a homeostase é fundamental aguardar o tempo suficiente para a ação finalizada do fármaco, evitando que uma manipulação incorreta possa implicar em desequilíbrio de funções orgânicas (Oyama e Wakayama, 1988).

Um status anestésico pode indiretamente promover um estado hipercatabólico, com elevadas concentrações plasmáticas de hormônios com atividade catabólica como o cortisol, glucagon, catecolaminas, além de liberação de hormônios tróficos pelo hipotálamo, os quais estimulam a liberação pela hipófise de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio do crescimento, prolactina, endorfinas e hormônio antidiurético (ADH). Conseqüentemente há diminuição ou liberação alterada dos hormônios anabólicos, insulina e testosterona (Charmandari et al., 2005; Beardsall et al., 2006).

Estas alterações resultam em glicogenólise, lipólise e gliconeogênese, induzindo à hiperglicemia, retenção de sódio e água e levando a um estado catabólico, com balanço nitrogenado negativo. Estes ajustes têm por finalidade a mobilização de reservas de substratos, de modo que os tecidos não fiquem privados de seu suprimento metabólico (Nesse e Young, 2000).

Aârimaa e colaboradores na década de 70 observaram que durante e após processos cirúrgicos ocorriam alterações tanto na tolerância a glicose quanto na responsividade à insulina, sendo este fato atribuído a condição estressora imposta no processo de anestesia. Posteriormente Allisson et al.

(1996), sugeriram que a secreção de insulina era suprimida durante a anestesia, sendo suas ações antagonizadas no período pós-operatório.

Cabe destacar que, estudos de cunho metabólico devem preconizar a escolha de um anestésico ideal, tendo como norte as mínimas alterações na homeostasia energética que a molécula possa promover.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo norteador deste trabalho foi investigar no músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação, os eventos ligados ao tratamento com o aminoácido leucina, por meio de análise bioquímica, biomolecular e dos indicadores do status metabólico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo específico foi estudar a ação do tratamento com o aminoácido leucina em músculo esquelético de ratos submetidos à desnervação, pela secção do nervo isquiático, obedecendo aos seguintes índices de análise:

- 1) Realizar um estudo direcionado à seleção de anestésico, buscando identificar o fármaco que exerça o menor comprometimento sobre os sistemas reguladores do metabolismo;
- 2) Avaliar as reservas glicogênicas dos músculos do membro posterior de ratos controles e submetidos à desnervação durante 7 dias, além do efeito do tratamento com diferentes doses do aminoácido leucina, 5 mM; 1,25 mM e 0,30 mM;
- 3) Acompanhar o perfil eletrocardiográfico de ratos controle e tratados com leucina;
- 4) Realizar uma análise comportamental dos animais controle tratados com o aminoácido leucina;
- 5) Avaliar a dinâmica secretória de insulina em ratos tratados com leucina; e aplicar o teste de tolerância à insulina (ITT) e o teste de tolerância à glicose (GTT) para avaliar o índice de decaimento da glicemia e a responsividade das ilhotas pancreáticas;

- 6) Avaliar o estado de saúde dos animais tratados com a leucina;
- 7) Avaliar o conteúdo de proteínas totais dos músculos sóleo normal e submetido à desnervação, além do efeito do tratamento com o aminoácido leucina na dose 0,30 mM, nessas condições;
- 8) Avaliar o padrão de fosforilação das principais enzimas reguladoras dos processos metabólicos da musculatura esquelética nas diferentes condições experimentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Procedência e manutenção: Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 3 a 4 meses de idade pesando de 200 a 300 gramas adquiridos junto à empresa ANILAB® (Paulínia). Os animais permaneceram em gaiolas coletivas contendo 4 animais recebendo água e alimentação *ad libitum* sendo mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas. Antes de iniciar o período experimental, os animais permaneceram por 48 horas em adaptação às condições do biotério de pesquisa, e posteriormente foram distribuídos segundo a tabela 1. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo protocolo 011/2006. (Projeto Mãe: Influência de fármacos e agentes de suplementação no perfil metabólico de músculos desnervados ou imobilizados).

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

Grupos experimentais

Controle

Desnervado 7 dias

Controle Tratado com aminoácido Leucina 5 mM, durante 7 dias

Controle Tratado com aminoácido Leucina 1,25 mM, durante 7 dias

Controle Tratado com aminoácido Leucina 0,30 mM, durante 7 dias

Desnervado Tratado com aminoácido Leucina 0,30 mM, durante 7 dias

* sempre que necessário os grupos experimentais foram duplicados

3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDO LEUCINA

A leucina foi administrada nas doses de 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM/100g, diluída no volume de 2 mL/rato. A substância foi introduzida no aparelho digestório através de um tubo esofágico ou estomacal, pelo método conhecido como gavagem. O tubo flexível e curvado com a ponta arredondada foi introduzido na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estomago. Foi preciso muita cautela para assegurar que tubo não penetrasse indevidamente na traquéia, o que levaria a morte do animal, neste caso não houve perda amostral. Os animais tratados com aminoácido leucina foram suplementados uma vez por dia, durante sete dias e as análises realizadas no oitavo dia, quando desnervado o músculo esquelético, os animais eram suplementados logo após a cirurgia e o retorno da condição anestésica, uma vez por dia, durante sete dias e as análises realizadas, como o grupo controle suplementado, no oitavo dia (figura 1).



Figura 1: suplementação pela via orogástrica.

3.3 SELEÇÃO DO ANESTÉSICO

Os animais foram anestesiados, de acordo com a necessidade e propriedades farmacológicas da molécula, através da via intramuscular (im) ou da via intraperitoneal (ip), dependendo da via de ação de cada anestésico. Na administração intramuscular, a substância foi injetada no músculo esquelético, de grande superfície, como os da pata posterior traseira. Na administração

intraperitoneal, o anestésico foi injetado na cavidade peritoneal, na metade posterior do abdome com o animal contido pelo dorso. As agulhas utilizadas possuíam o tamanho de 25 X 5 G e volume máximo de 0,5 ml por sítio de administração. Os anestésicos utilizados para análise e comparação foram: Tiopental sódico (40 mg/kg peso, ip), Zoletil (50 mg/kg peso, ip) e Ketamina-Xilasina (35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso, im).

3.4 DESNERVAÇÃO

Os ratos foram anestesiados, a pata posterior esquerda foi tricotomizada e uma porção do nervo isquiático (1 cm) foi seccionado e retirado, segundo a proposta de Coderre et al., 1992 (figura 2).

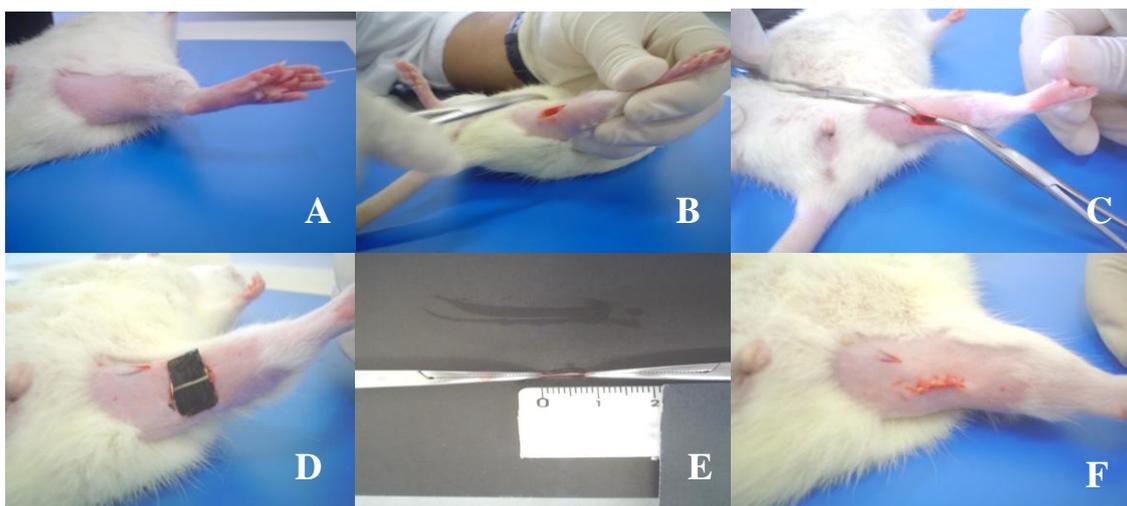


Figura 2. Procedimento cirúrgico da desnervação. A: exposição do membro posterior tricotomizado; B: incisão para localização da inervação; C: nervo ciático isolado; D: nervo ciático em destaque; E: comprimento do nervo seccionado; F: incisão suturada.

3.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

3.5.1 CAMPO ABERTO

Os animais analisados foram do grupo controle e dos grupos controle suplementados nas doses de 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM, após o sétimo dia de suplementação foram colocados em uma caixa aberta dividida internamente

em nove quadrados uniformes, onde os animais permaneciam durante 3 minutos sendo contado cada espaço percorrido pelo animal, através dos limites entre cada quadrado, foi considerado um campo explorado quando o mesmo ultrapassa-se o quadrado com pelo menos 3 patas, o teste foi realizado no período noturno, após as 19:30 horas, devido a maior atividade da espécie, conforme protocolo descrito por Cruz e Graeff, (1994).

3.5.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADA

Os animais analisados foram do grupo controle e dos grupos controle suplementados nas doses de 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM, no sétimo dia de suplementação, foram colocados numa plataforma elevada em formato de cruz, composta de um corredor fechado e outro aberto e seus limites de cruzamento, o período experimental de observação foram de 5 minutos, realizado no período noturno, após as 19:30 horas, devido a maior atividade da espécie, onde foram cronometrado o tempo de permanência do animal em cada estação, conforme o modelo descrito por Pellow et al., (1985).

3.6 ELETROCARDIOGRAMA (ECG)

Para a avaliação das ondas e intervalos eletrocardiográficos os animais analisados foram do grupo controle e dos grupos controle suplementados nas doses de 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM, após o sétimo dias de suplementação, os animais foram anestesiados e colocados em posição supina, com respiração espontânea para registro do ECG. Os eletrodos foram conectados aos canais do computador (Heart Ware System) e registradas três derivações bipolares (DI, DII e DIII) e nas três derivações amplificadas (aVR, aVL e aVF) com sensibilidade 2 N e velocidade de 50 mm/segundo. O intervalo QT foi medido em dez batimentos consecutivos, do início do complexo QRS ao ponto de retorno da onda T isoeétrica definido como segmento TP. O intervalo QT foi corrigido pela frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR}$) e posteriormente foi calculada a dispersão do intervalo QTc, subtraindo o intervalo QTc mais curto do QTc mais longo ($QTcd = QTc \text{ Max} - QTc \text{ min}$). As

análises foram feitas por um único avaliador para minimizar as divergências na medida da dispersão (Costa, 2008).

3.7 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) e TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Os testes foram realizados em dois momentos diferentes no estudo, primeiramente foi realizado para seleção do anestésico, e melhor compreender o papel dos fármacos no perfil metabólico dos animais, sendo assim, obter a melhor escolha, ou seja, que a molécula do fármaco não interferisse na análise quimiometabólica. Os anestésicos utilizados foram: Tiopental sódico (40 mg/kg peso, ip), Zoletil (50 mg/kg peso, ip) e Ketamina-Xilasina (35 mg/kg peso e 4 mg/kg peso, im). No segundo momento, os testes foram utilizados para analisar a influencia da suplementação com diferentes doses do aminoácido leucina 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM, no padrão funcional das células β pancreáticas e do tecido periférico.

3.7.1 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

Para a realização do ITT, os ratos foram anestesiados 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 insulina (2 U/Kg/ip - Biohulin) seguido de coleta de sangue nos tempos 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min e a glicemia novamente avaliada (Rafacho et al., 2007).

3.7.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Para avaliação do GTT, os animais foram anestesiados 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/ip) seguido de coleta de sangue nos tempos 15 min, 30 min, 60 min, 90 min e 120 min e a glicemia novamente avaliada (Rafacho et al., 2007).

3.8 GLICOGÊNIO MUSCULAR

Para a determinação do conteúdo de glicogênio muscular, dos grupos controle, controle suplementado com as doses de 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM, desnervado e desnervado suplementado com as doses de 0,30 mM, os animais após sete dias de suplementação foram decapitados, o fígado e os músculos sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, foram retirados para análise. As amostras 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 15 minutos. O glicogênio precipitado foi submetido à hidrólise ácida na presença de fenol, segundo a proposta de Siu et al., (1970). Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

3.9 PROTEÍNA TOTAL (PT)

Para a determinação da proteína total, foi utilizado o kit laboratorial Prototal da Laborlab. Neste procedimento, depois de sete dias de suplementação, os animais eram decapitados, as amostras do músculo sóleo foram retiradas e embebidas em uma solução de ácido perclórico e posteriormente digeridas em politrom e o extrato obtido foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos, após este período, foram homogeneizado e incubado durante 15 minutos à 37 °C. Retirados do banho, depois de resfriados, o conteúdo foi transcrito através de colorimetria em espectrofotômetro a 540 nm. Os grupos analisados foram: controle, controle suplementado com 0,30 mM, desnervado e desnervado suplementado 0,30 mM.

3.10 FRAGILIDADE OSMÓTICA

A análise da fragilidade osmótica eritrocitária foi realizada no período máximo de 24hs após a coleta do sangue, dos animais controle e suplementado na dose 0,30 mM após sete dias, onde foi mensurada a estabilidade dos eritrócitos em solução de cloreto de sódio nas concentrações variando de 0,85 a 0 % e que permitiu definir três parâmetros: a resistência eritrocitária mínima, que representa a concentração em que se inicia a hemólise; a resistência máxima, ou seja, a concentração de Na^+Cl^- correspondente a hemólise total (100 %); e a fragilidade corpuscular média, que corresponde à concentração de Na^+Cl^- em que se observa a hemólise de 50 %. (Parpart apoud Jain, 1986)

3.11 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, Delatre e Santos (1984).

Em cada experimento, foram sacrificados de um a três animais por concussão cerebral e decapitados para sangria, neste caso foram utilizados os animais controle e suplementado com a dose de 0,30 mM. 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 um fluxo retrógrado, a divulsão do tecido acinoso. O pâncreas foi retirado, transferido para um tubo de ensaio (12 x 2 cm) e incubado por aproximadamente de 18 min a 37 °C.

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) depois de 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 quatro grupos experimentais, foram coletadas alternadamente em placa de polietileno com 24 poços contendo, em cada poço, 0,5 ml de solução tampão Krebs-Ringer suplementada com albumina bovina, a qual 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.

Procedeu-se uma nova incubação durante 90 min, nas condições acima referidas. Ao término deste período, as placas foram devidamente colocadas no freezer (-20 °C) por 10 min e, o sobrenadante de cada poço, transferido para tubos de polietileno e conservado 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).

3.12 AVALIAÇÃO BIOMOLECULAR (Western Blot)

Após sete dias de suplementação, os animais controle, controle suplementados com leucina na dose 0,30 mM, desnervado e desnervado suplementado com leucina 0,30 mM, foram anestesiados em câmara de CO₂, e em seguida decapitados, o músculo sóleo foi rapidamente retirado, lavado em solução salina e alocado em tampão de extração.

O material extraído foi submetido à homogeneização em tampão de extração (100 mM Trisma base, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF diluído em álcool etílico, 1% Triton X-100 e 0,1 mg/ml aprotinina), à 4 °C, utilizando-se para isso um homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os fragmentos celulares foram então centrifugados (15.500 x g, 20 minutos, 4 °C) para remoção do material insolúvel e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método fotocolorimétrico de Biureto (Bradford, 1976), enquanto que a outra parte foi submetida ao Western Blot. Os reagentes para determinação das proteínas totais (Biureto), SDS/PAGE e Western Blot foram

obtidos da Bio-Rad (Richmond, CA, USA). As membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham Corp. (Aylesbury, UK). O kit de quimioluminescência foi adquirido da empresa Pierce Endogen (Rockford, IL). Os demais materiais utilizados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, ao sobrenadante foi acrescentado tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), contendo 100 mM de DTT, e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (75 μ g) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 120 minutos à 120 V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, como descrito por Towbin, Staehelin e Gordon, 1979. A ligação dos anticorpos à proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 120 minutos com tampão de bloqueio à temperatura ambiente (5 % BSA dissolvido em solução basal). A membrana de nitrocelulose foi incubada, *overnight*, com anticorpos específicos: os anti-pSer473AKT (#4058), anti-pAMPK (#2537), anti-pmTOR (#2971) e anti-pACC (#3661) foram obtidos da empresa Cell Signaling Technology (Beverly, MA), diluídos em solução para anticorpo (3 % BSA dissolvido em solução basal), e então, lavada por 15 minutos com solução basal (150 mM NaCl, 10 mM Trisma base e 0.02 % Tween 20). A detecção do complexo antígeno-anticorpo fixo à membrana de nitrocelulose foi obtida por quimioluminescência, utilizando-se *kit* comercial da Amersham e seguindo as orientações do fabricante. Para controle interno da amostra foi utilizado a β -Actinan. Após a revelação das auto-radiografias, as bandas identificadas foram quantificadas por meio de densitometria óptica enquanto parceria realizada com o laboratório de Receptores de Insulina da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da aplicação da análise de variância ANOVA: one way e do pós-teste de Tukey, com relevância estatística de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE SELEÇÃO DO ANESTÉSICO

No que se refere ao presente estudo, por se tratar de avaliação de cunho metabólico, optou-se por iniciar o desenvolvimento experimental selecionando o anestésico mais adequado e com menor reflexo no perfil metabólico. Iniciou-se pelo teste de tolerância à glicose em animais controle submetido à anestesia com três tipos de fármacos, e como pode ser observado na figura 3 a associação ketamina-xilazina promoveu elevação de 38 % na área sob a curva, se comparado a curva descrita pelo tiopental e 51 % se comparado ao zoletil, indicando redução na responsividade das células β pancreáticas.

A seguir, foi realizado o teste de tolerância a insulina em grupos experimentais similares aos citados anteriormente, buscando informações sobre a responsividade dos tecidos periféricos, sendo observado que a associação ketamina-xilazina promoveu redução de 80 % na constante de decaimento da glicemia, não sendo observado diferença entre o comportamento glicêmico na presença de tiopental ou zoletil (figura 4)

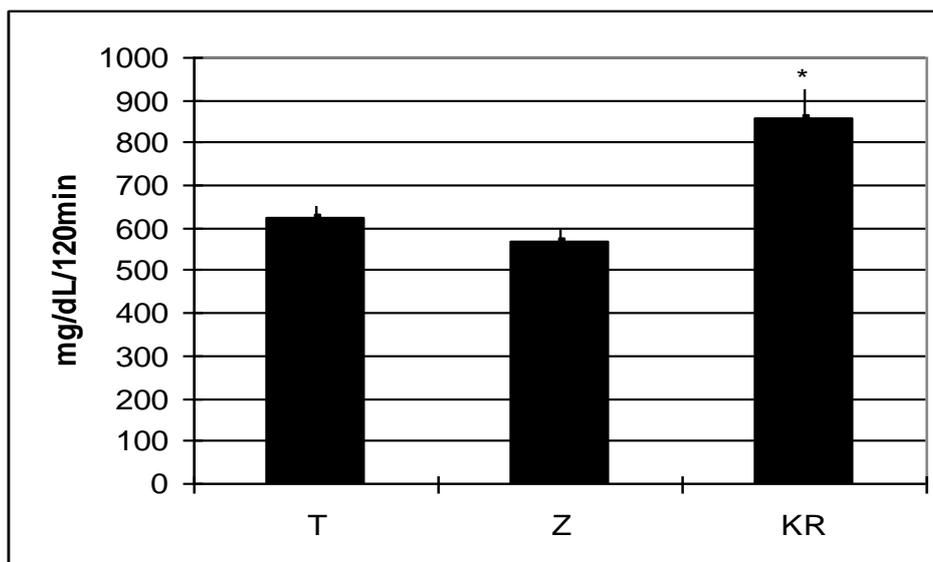


Figura 3. Área sob a curva após o teste de tolerância a glicose em ratos submetidos a três formas de anestesia: tiopental (T, 40 mg/Kg); zoletil (Z, 50 mg/Kg); associação ketamina-xilasina (KR, 35 mg/kg peso e 4 mg/kg). Os valores correspondem à média \pm epm, n=4. * $p < 0,05$ se comparado com o anestésico tiopental.

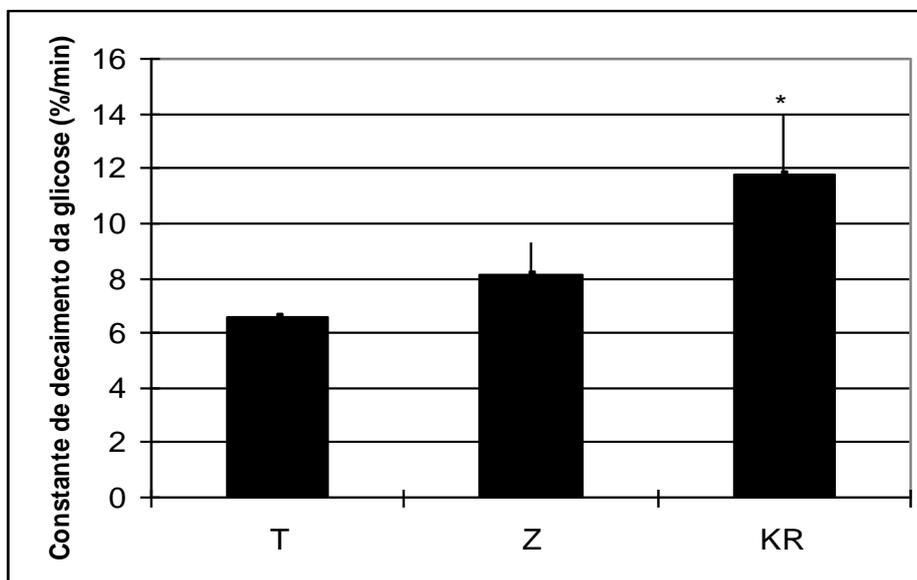


Figura 4. Constante de decaimento de glicose (KITT; % min) de ratos submetidos a três formas de anestesia: tiopental (T, 40mg/Kg); zoletil (Z, 50mg/Kg); ketamia-xilasina (KR, 35 mg/kg peso e 4 mg/kg). Os valores correspondem à média \pm epm, n=4. * $p < 0,05$ se comparado com o anestésico tiopental.

Desta forma é possível perceber que o anestésico tiopental não interferiu no perfil metabólico do animal, o contrario ocorreu quando o animal foi anestesiado com ketamia-xilasina. Sendo então, o anestésico tiopental selecionado para os experimentos do estudo, por não interferir nas análises quimiometabólicas realizadas.

5.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DO ANIMAL SUPLEMENTADO COM LEUCINA

Na avaliação do comportamento exploratório foi observado que os ratos suplementados com leucina 0,30 mM não diferiram do grupo controle, por outro lado, o grupo suplementado com a dose de leucina 1,25 mM (que corresponde a 4 vezes a menor concentração), foi observado redução de 34 % no deslocamento exploratório. Na avaliação do grupo suplementado com leucina 5 mM (correspondendo a 16 vezes a menor concentração) foi observado a maior redução no comportamento, atingindo valores 70 % menores (figura 5).

A seguir, foi avaliado o comportamento dos ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado sendo observado que o grupo controle permaneceu 88 % do tempo no braço fechado (BF), 10 % no braço aberto (BA) e 2 % na interface dos braços do aparelho que determina o índice de risco (IR). Ao avaliar os demais grupos experimentais foi observado que o grupo suplementado com leucina 0,30 mM permaneceu em 82 % no BF e 15 % no BA, o que representa valores 13 % maiores em BF e 50 % maiores no BA, não diferindo do controle quanto ao índice de risco. O grupo suplementado 1,25 mM permaneceu 79 % no BF e 19 % no BA, ou seja, permaneceu por um tempo 10 % menor no braço fechado e 20 % maior no braço aberto se comparado ao controle, também não diferiu quanto ao índice de risco.

Por fim, foi avaliado o grupo suplementado com leucina 5 mM sendo observado que permaneceu 6 % do tempo no BA e apesar de além de se submeter ao fator de risco por um tempo 400 % maior que os demais grupos, permaneceu o maior tempo no BF atingindo 94 % do tempo.

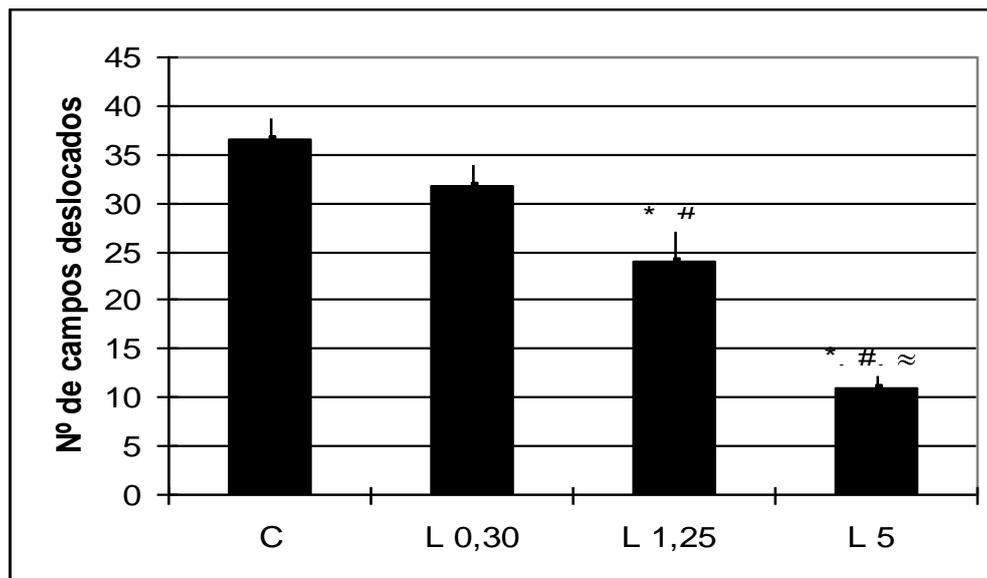


Figura 5. Número de campos deslocados no teste de campo aberto obtidos nos grupos controle (C), e tratados com leucina na diferentes doses 0,30 mM (L0,30), 1,25 mM (L1,25), 5 mM (L5). * $p < 0,05$ se comparado ao controle; # $p < 0,05$ se comparado a L0,30mM; $\approx p < 0,05$ se comparado a L1,25 mM.

5.3 AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA

Nesta fase, a avaliação foi direcionada ao perfil eletrocardiográfico frente a diferentes doses de suplementação: 5 mM (L5), 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30), visando compreender o efeito do aminoácido leucina no perfil cardiovascular. Os resultados apresentados pela tabela 2 mostram que não houve diferença estatística significativa em nenhum intervalo do registro eletrocardiográfico ao comparar-se os grupo controle e tratados com leucina nas doses 5 mM; 1,25 mM e 0,30 mM.

Tabela 2: Intervalos QRS, QTC (m/segundos) e FC (bat/min) do eletrocardiograma dos grupos controle (C); e tratados com o aminoácido leucina nas doses de 5 mM (L5); 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30). Valores expressos em média \pm epm, n=6.

(m/s)	Controle	L5 mM	L1,25 mM	L0,30 mM
QRS	98 \pm 12	104 \pm 12	80,7 \pm 9	91,2 \pm 8
QTC	426 \pm 39	343,2 \pm 48	290,2 \pm 17	327,6 \pm 20
FC	207,5 \pm 3	160,8 \pm 24	177 \pm 25	185,2 \pm 14

5.4 PROVA DE FUNÇÃO PANCREÁTICA E SENSIBILIDADE À INSULINA NA PRESENÇA DE LEUCINA

A seguir, passou-se a avaliar se o tratamento com o aminoácido leucina estaria modificando a velocidade de captação de glicose por tecidos periféricos, através do teste de tolerância a insulina que expressa a ação através da constante de decaimento da glicemia (KITT). Como pode ser verificado na figura 6, os valores no grupo L5 e L1,25 foram 26 % menores que o controle; por outro lado, no grupo L0,30 os valores foram 25 % maiores se comparado ao controle.

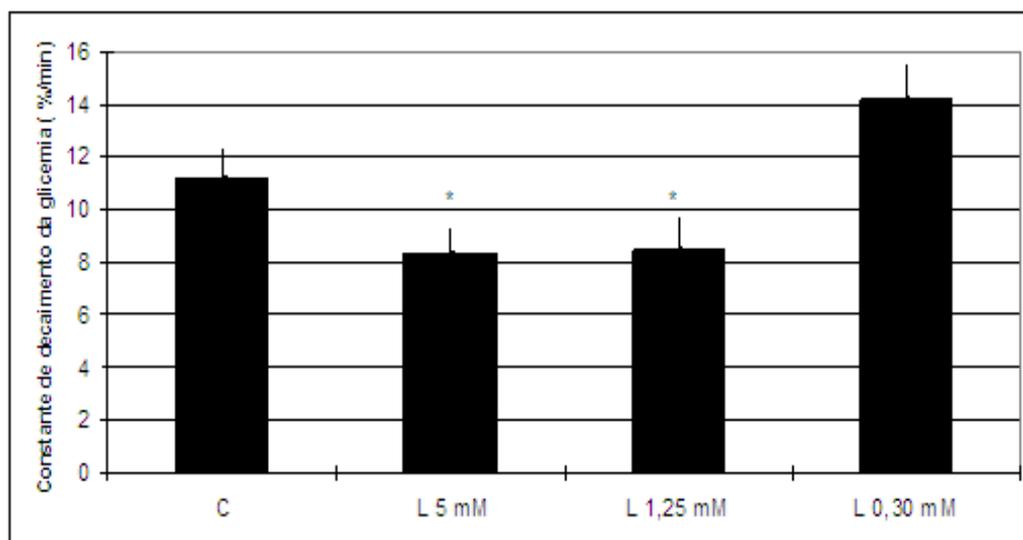


Figura 6. Velocidade de decaimento da glicemia obtido através do teste de tolerância a insulina (KITT) em ratos controle (C), e tratados com leucina na diferentes doses 5 mM (L5), 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30). Os valores correspondem à média \pm epm, n=4. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

Dentro do mesmo contexto de análise, passou-se a avaliar a sensibilidade pancreática, utilizando o teste de tolerância à glicose, onde foi verificado que as doses de 5 mM e 1,25 mM mostraram-se sensibilizadoras das células β pancreáticas promovendo uma menor área sob curva, atingindo respectivamente 44 % e 66 %. Por outro lado, na dose de 0,30 mM não houve mudança na resposta das células β ao “bolus” de glicose, não diferindo estatisticamente do controle (figura 7).

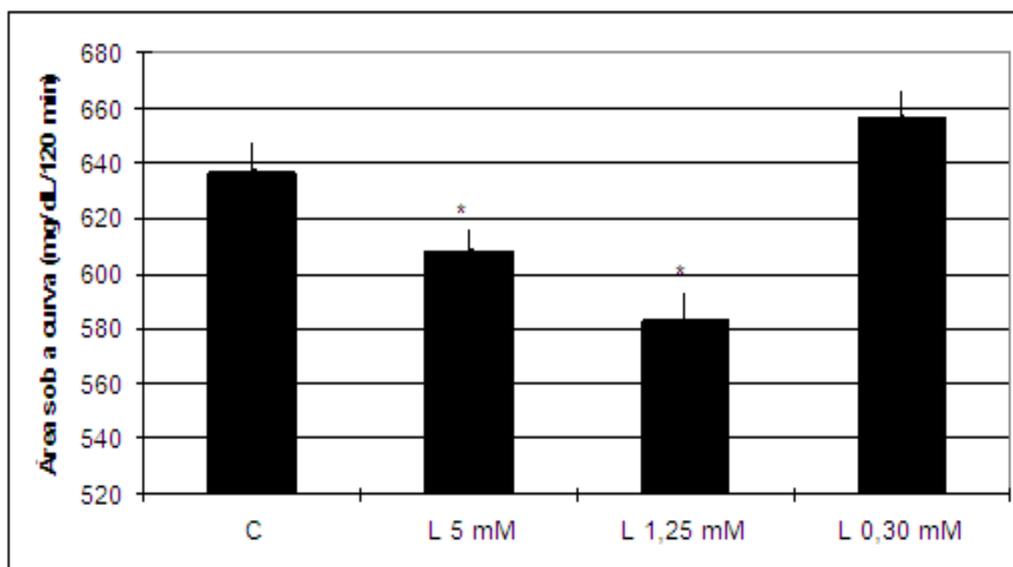


Figura 7. Área sob a curva obtida através do teste de tolerância a glicose (GTT, mg/dL/120min) em ratos controle (C), e tratados com leucina na diferentes doses 5 mM (L5), 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30). Os valores correspondem à média \pm epm, n=4. * $p < 0,05$ comparado ao controle.

Um ponto que merece destacar é o comportamento da glicemia plasmática no tempo zero, onde não há diferença significativa entre o controle e os demais grupos L5, L1,25 e L0,30mM, uma vez que, todas mantêm um padrão dentro da normalidade para a espécie, variando entre 80 e 100 mg/dL, como visto na figura 8.

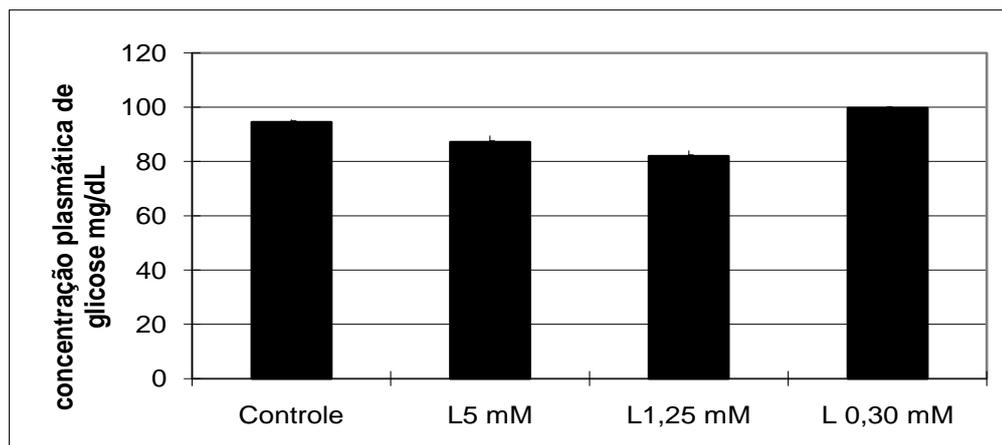


Figura 8. Concentração plasmática de glicose (mg/dL) no tempo zero, em ratos controle (C), e tratados com leucina na diferentes doses 5 mM (L5), 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30). Os valores correspondem à média \pm epm, n=4.

Tendo em vista as mudanças na responsividade insulínica, optou-se por quantificar esta alteração na presença de leucina 0,30 mM, por ser a dose que obteve melhor resposta no perfil metabólico. Foram avaliadas ilhotas pancreáticas de ratos controle e tratados com leucina durante 7 dias, as quais foram isoladas e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose. Observou-se 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 durante 7 dias apresentou uma elevação significativa de 17 % na resposta secretória quando comparado ao grupo controle. Este comportamento também foi observado nas concentrações de glicose 8,3 mmol/L e 16,7 mmol/L manifestando elevação na secreção de insulina atingindo 10 % no tratamento durante 7 dias (figura 9).

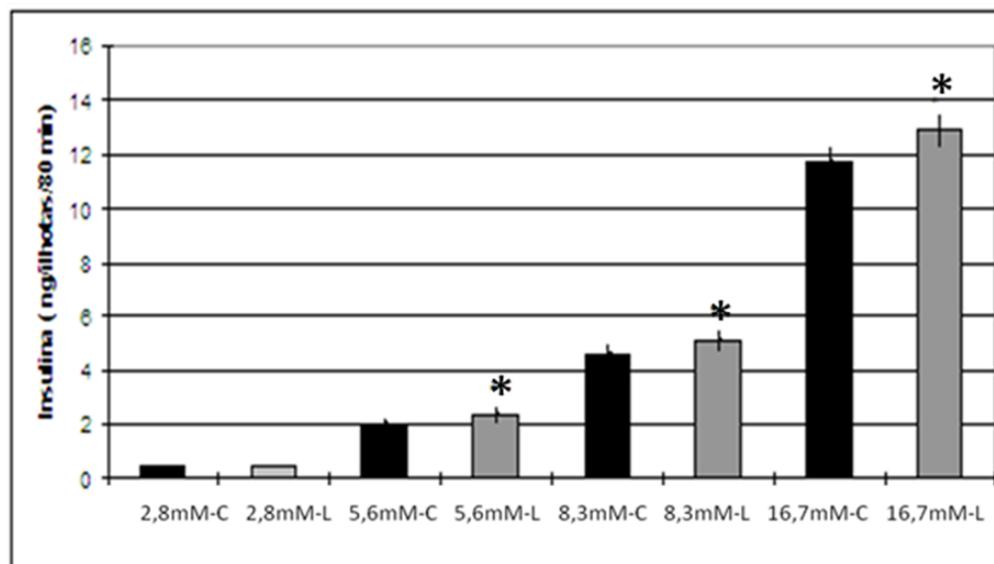


Figura 9. Secreção de insulina por ilhota pancreática isolada de ratos controle (C) e de ratos tratados com Leucina (L0,30 mM/dia) durante 7 dias e incubadas na presença de diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6; 8,3; 16,7 mmol/L). Os valores estão expressos em ng/ilhota/80min, n=6. *p<0,05 comparado ao controle.

5.5 PERFIL METABÓLICO FRENTE À DIFERENTES DOSES DE LEUCINA

Para melhor compreender a ação quimiometabólica da leucina na musculatura esquelética, os animais foram suplementados com diferentes doses do aminoácido, ou seja, 5 mM (L5), 1,25 mM (L1,25) e 0,30 mM (L0,30) e posteriormente realizado a avaliação do conteúdo muscular de glicogênio.

A tabela 3 mostra o conteúdo de glicogênio do fígado e dos músculos sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho de ratos submetidos à suplementação com diferentes doses do aminoácido leucina. Pode-se verificar que no fígado houve redução de 30 % na dose L5; e aumento de 26 % e 62 % nas doses L1,25 e L0,30, se comparadas com o controle. Ao comparar a dose L5 com a dose L1,25 observou-se reservas 26 % maiores na dose L1,25. No que tange ao sóleo observou-se redução significativa de 43 % na dose L5 em comparação com o grupo controle e redução de 30 % na dose L1,25. Por outro lado, houve aumento de 38 % no grupo tratado com a dose L0,30. No músculo gastrocnêmio branco a concentração glicogênica apresentou redução de 45 %

e 33 % nas doses L5 e L1,25, respectivamente, se comparado ao controle. Por sua vez, na dose L0,30 não foi observado diferença do controle.

No que se refere ao conteúdo de glicogênio do gastrocnêmio vermelho, pode-se verificar redução de 51 % e 23 %, nos grupos L5 e L1,25 em relação ao controle, respectivamente, não havendo diferença do controle e da dose L0,30mM.

Tabela 3: Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) do fígado (F) e dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV) de ratos controle e submetidos à suplementação com diferentes doses do aminoácido leucina (L). Valores expressos como média \pm epm, n=6.

Glicogênio	Controle	L5 mM	L1,25 mM	L0,30 mM
F	2,83 \pm 0,30	1,97 \pm 0,12	3,57 \pm 0,45 [#]	4,60 \pm 0,313 ^{*,#}
S	0,42 \pm 0,04	0,24 \pm 0,04 [*]	0,28 \pm 0,02 [*]	0,58 \pm 0,04 ^{*,#,\approx}
GB	0,49 \pm 0,02	0,27 \pm 0,17 [*]	0,33 \pm 0,05 [*]	0,50 \pm 0,02 ^{*,\approx}
GV	0,51 \pm 0,03	0,25 \pm 0,01 [*]	0,39 \pm 0,04 [*]	0,45 \pm 0,02 ^{*,\approx}

*p<0,05 em relação ao controle;

p<0,05 do tratado com dose de 5 mM em relação as demais doses;

\approx p<0,05 do tratado com 1,25 mM em relação á dose de 0,30 mM.

5.6 ANÁLISE DO CONTEÚDE DE GLICOGÊNIO DO MÚSCULO DESNERVADO E SUPLEMENTADO COM AMINOÁCIDO LEUCINA NA DOSE 0,30 mM

Neste e nos próximos estudos utilizamos o músculo sóleo, por ser uma musculatura predominantemente composta por fibras lenta oxidativa, ou seja, do tipo I, que é a mais afetada pelo processo de desuso (Kasper, 2002; Tanaka et al., 2004). Optamos por utilizar o aminoácido na dose de 0,30 mM, apoiados tantos em estudos que relatam a dose fisiológica de leucina, entre 0,20 a 0,40 mmol/L quanto em observações iniciais de estudos realizados (Xu et al., 2001).

Como mostra a tabela 4, é possível perceber um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de glicogênio do fígado e do músculo sóleo do grupo controle suplementado com leucina 0,30 mM se comparado com o controle atingindo 62 % e 38 %, respectivamente. Observou-se ainda uma diminuição significativa do glicogênio do grupo desnervado e desnervado tratado com leucina em comparação com o controle, de 64 % e 73 % para o músculo gastrocnêmio branco e vermelho desnervados, 53 %, 64 %, 22% e 25 % do fígado, sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho respectivamente, do grupo desnervado suplementado com aminoácido leucina.

No grupo desnervado é possível verificar uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle tratado com leucina, para o fígado em 63 % e nos músculos sóleo 53 %, gastrocnêmio branco de 64 % e gastrocnêmio vermelho com 88 %.

Já o grupo desnervado suplementado com aminoácido leucina obteve diminuição significativa no conteúdo de glicogênio se comparado com o grupo controle leucina e desnervado, ou seja, 32 % no fígado, e para os músculos sóleo 46 %, gastrocnêmio branco 22 % e gastrocnêmio vermelho 31 % se comparado ao controle leucina. Na comparação com o grupo desnervado foi possível verificar diminuição de 51 % no fígado, 34 % e 35 % nos músculos gastrocnêmio branco e vermelho, respectivamente. No músculo sóleo não foi observado alteração estatística significativa nos grupos desnervado suplementado se comparado com o somente desnervado.

Tabela 4: Conteúdo de glicogênio (mg/100mg) do fígado (F) e dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio branco (GB) e vermelho (GV) de ratos controle (C) e submetidos à desnervação (DL 0,30 mM) e suplementação com o aminoácido leucina na dose 0,30 mM (L0,30 mM). Valores expressos como média \pm epm, n=6.

	Controle	C 0,30mM	Desnervado	DL 0,30mM
F	2,83 \pm 0,30	4,60 \pm 0,31 [*]	2,90 \pm 0,14 [#]	1,50 \pm 0,15 ^{*,#,\$}
S	0,42 \pm 0,04	0,58 \pm 0,04 [*]	0,31 \pm 0,03 [#]	0,27 \pm 0,03 ^{*,#}
GB	0,49 \pm 0,02	0,50 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02 ^{*,#}	0,11 \pm 0,01 ^{*,#,\$}
GV	0,56 \pm 0,01	0,45 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01 ^{*,#}	0,14 \pm 0,003 ^{*,#,\$}

*p<0,05 em relação ao controle;

p<0,05 em relação a L0,30 mM;

\$ p<0,05 em relação ao desnervado.

5.7 AVALIAÇÃO DO ESTADO DE SAÚDE DOS ANIMAIS

A proposta de avaliar o estado de saúde dos animais esta pautada na necessidade de realizar um diagnóstico bioquímico, no intuito de observar se a suplementação com leucina promove alterações que possam afetar a normalidade do estado de saúde dos animais. Neste sentido, a tabela 5 mostra índices do grupo controle e suplementado com leucina 0,30 mM onde pode-se observar que o grupo suplementado não diferiu do controle.

Tabela 5: Padrão Bioquímico de ratos controle e suplementados com leucina 0,30 mM. Os valores correspondem às médias \pm epm, n=6.

	Aspartatoamino transferase AST (U/L)	Alaninaamino transferase ALT (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Gamaglutamil transferase (U/L)	AGL (mmol/L)	GLICEMIA (mg/dL)
Controle	114 \pm 2,9	64,5 \pm 4,1	36,8 \pm 2,7	0,58 \pm 0,04	0,41 \pm 0,04	0,4 \pm 0,08	98,2 \pm 7,3
Leucina	113 \pm 3,8	62 \pm 3,5	39 \pm 2,4	0,53 \pm 0,06	0,45 \pm 0,05	0,3 \pm 0,05	95,5 \pm 2,7

*p<0,05 comparado ao controle.

Um segundo ponto importante está ligado à manutenção da homeostasia eritrocitária, visto a importância destas células no equilíbrio de distribuição de oxigênio. Assim, para contemplar esta abordagem foi avaliada a fragilidade osmótica. Neste sentido, a figura 10 mostra a resposta osmótica de

eritrócitos coletados de ratos controle e suplementados com leucina 0,30 mM onde pode-se observar que o tratamento não modifica o status de resistência frente a variação na concentração plasmática.

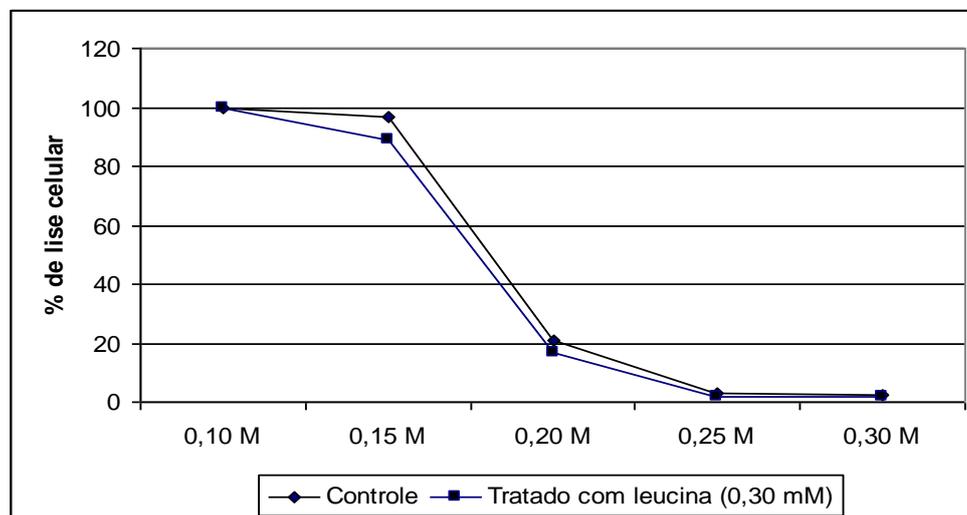


Figura 10. Curva de fragilidade osmótica de eritrócitos coletados de ratos controle e tratados com leucina (0,30 mM). Os valores representam a média \pm epm, n=6.

5.8 RELAÇÕES ENTRE A SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDO LEUCINA NA INTERFACE ANABOLISMO/CATABOLISMO

Pode-se observar na figura 11, uma diminuição significativa de 30% no conteúdo de proteína muscular no sóleo desnervado se comparado com o controle. Por outro lado, o sóleo do animal que foi suplementado com aminoácido leucina 0,30 mM (L0,30) e aquele que foi desnervado e posteriormente suplementado com a mesma dose de leucina (DL0,30), apresentaram um aumento significativo de 424 % e 349 % no conteúdo de proteína muscular, se comparado com o músculo somente desnervado; quanto as demais comparações não foram estatisticamente significantes. Sugerindo assim o papel anti-catabólico do aminoácido leucina.

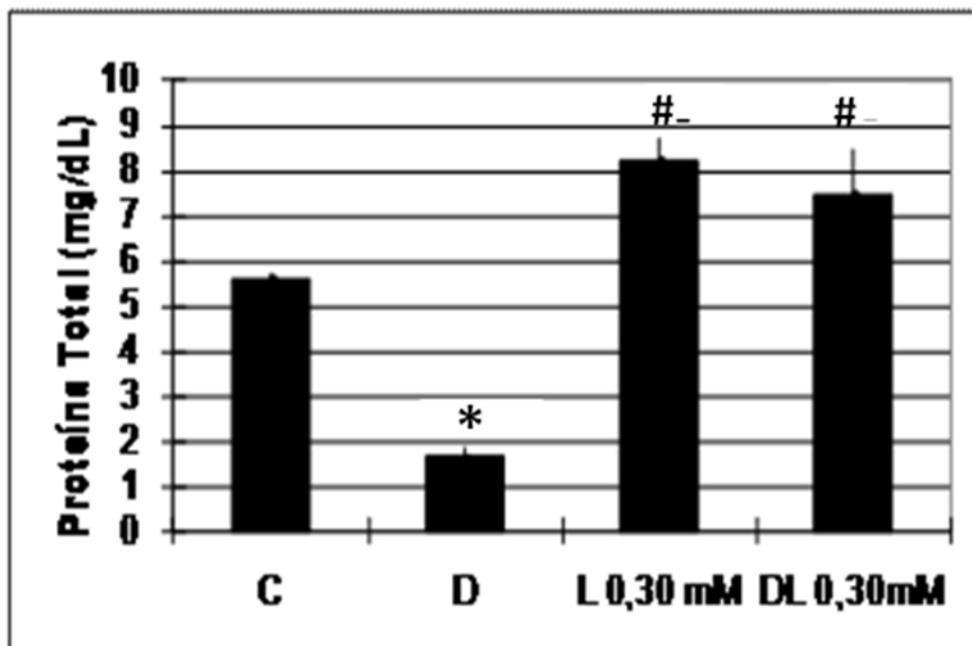


Figura 11. Conteúdo de proteína total do músculo Sóleo (mg/dL) nos grupos controle (C), desnervado (D), suplementados com leucina 0,30 mM/100g (L0,30) e desnervado e suplementado com leucina 0,30 mM/100g (DL0,30). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado ao controle; # $p < 0,05$ se comparado o desnervado.

5.9 AVALIAÇÃO BIOMOLECULAR E O EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA

Este estudo foi direcionado a avaliação do padrão dos sistemas enzimáticos indicadores do “status” metabólico das fibras musculares. Iniciou-se pela avaliação da fosforilação da enzima AMPK (5' AMP-activated protein kinase), enzima que ocupa um papel central na homeostasia energética celular. Nesta análise, foi constatado redução na fosforilação na presença da leucina, sendo observado que no grupo tratado (C+L) valores 16% menores, enquanto nos músculos desnervados tratados (D+L) onde os valores apresentaram-se 68% menores. No grupo desnervado (D) foi observado uma significativa elevação de 24% na fosforilação (vide figura 12 e a representação dos Blots).

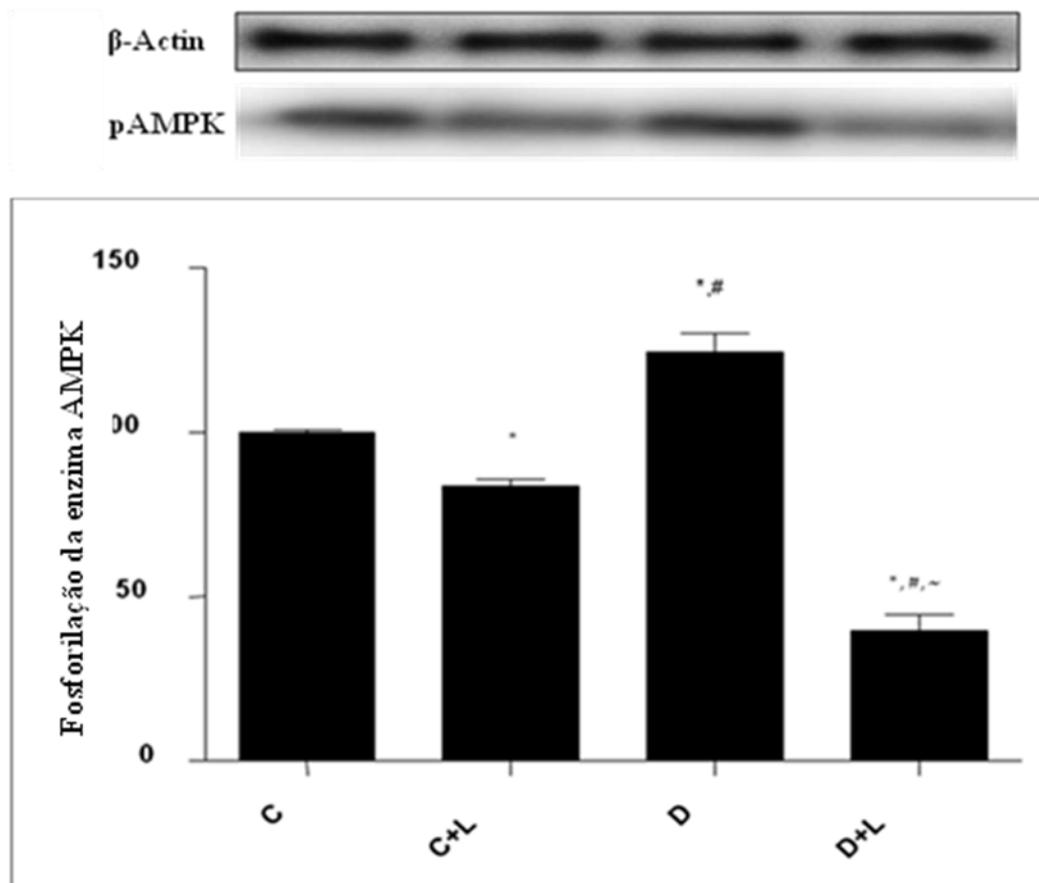


Figura 12. Porcentagem de fosforilação da enzima AMPK no grupo controle (C), tratado com leucina (C+L), desnervado (D) e desnervado tratado com leucina (D+L). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado a C; # $p < 0,05$ comparado ao CL; ~ $p < 0,05$ comparado ao D.

A seguir foi avaliado a fosforilação da enzima AKT (proteína com ação centrada na sinalização celular) sendo observado que no grupo D houve elevação de 65 %. Por outro lado, no grupo C+L, a fosforilação foi elevada em 98 % enquanto no grupo D+L a elevação foi de 146 % se comparado ao C e 49 % maior do que o D (figura 13 e representação dos Blots).

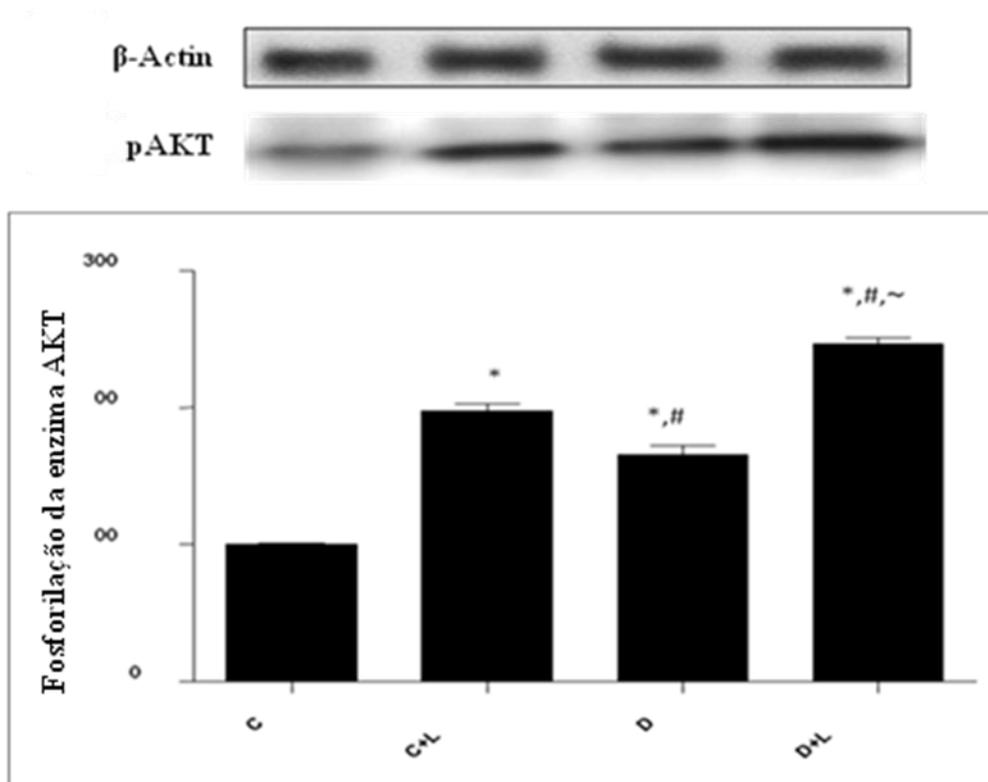


Figura 13. Porcentagem de fosforilação da enzima AKT no grupo no grupo controle (C), tratado com leucina (C+L), desnervado (D) e desnervado tratado com leucina (D+L). Os valores correspondem a média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado a C; # $p < 0,05$ comparado ao CL; ~ $p < 0,05$ comparado ao D.

Baseado na integração entre sistemas homeostáticos passou-se a avaliar a porcentagem de fosforilação da enzima mTOR (proteína alvo/sensível a rapamicina) sendo observado redução de 29 % em decorrência da desnervação. Com relação aos grupos tratados com o aminoácido leucina foi observado elevação de 49 % no grupo C+L se comparado ao C e elevação de 154 % no D+L se comparado ao grupo somente D (vide figura 14 e Blots anexos).

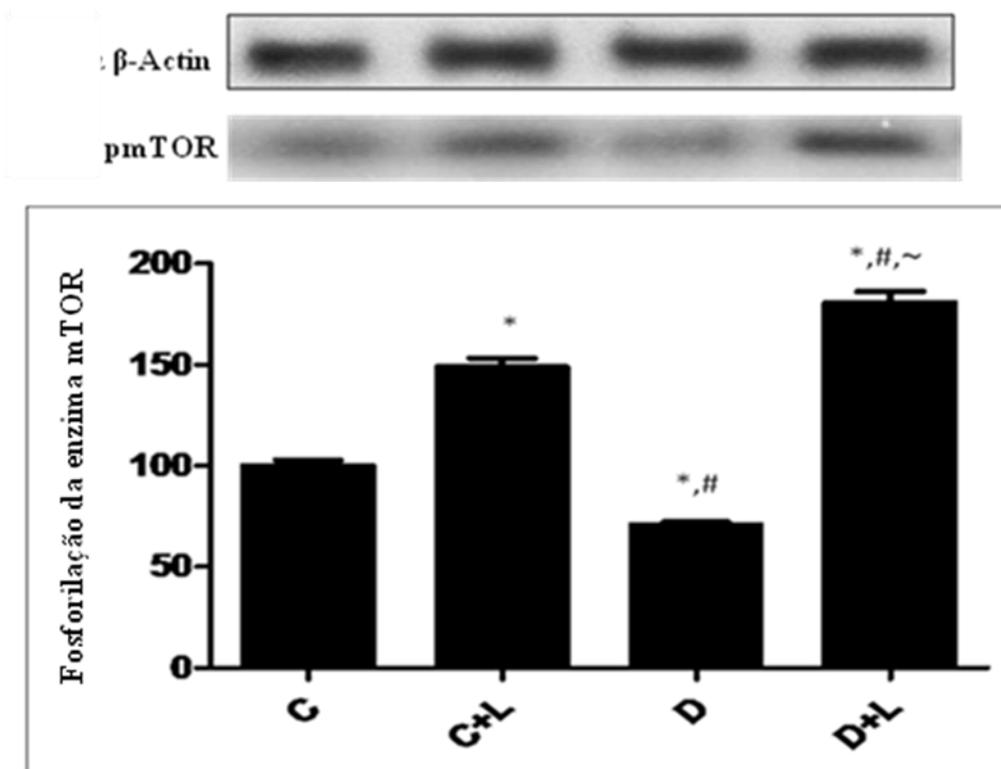


Figura 14. Porcentagem de fosforilação da enzima mTOR no grupo no grupo controle (C), tratado com leucina (C+L), desnervado (D) e desnervado tratado com leucina (D+L). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado a C; # $p < 0,05$ comparado ao CL; ~ $p < 0,05$ comparado ao D.

Por fim, optou-se por avaliar a fosforilação da enzima ACC (acetil -CoA carboxilase) cuja função é fornecer o substrato malonil-CoA para a síntese de ácidos graxos. Nesta avaliação foi constatado elevação de 16 % em decorrência da desnervação. Por sua vez, nos grupos tratados foi observado redução de 22 % no grupo C e 50 % no grupo D+L, como pode ser observado na figura 15 e Blots em anexo.

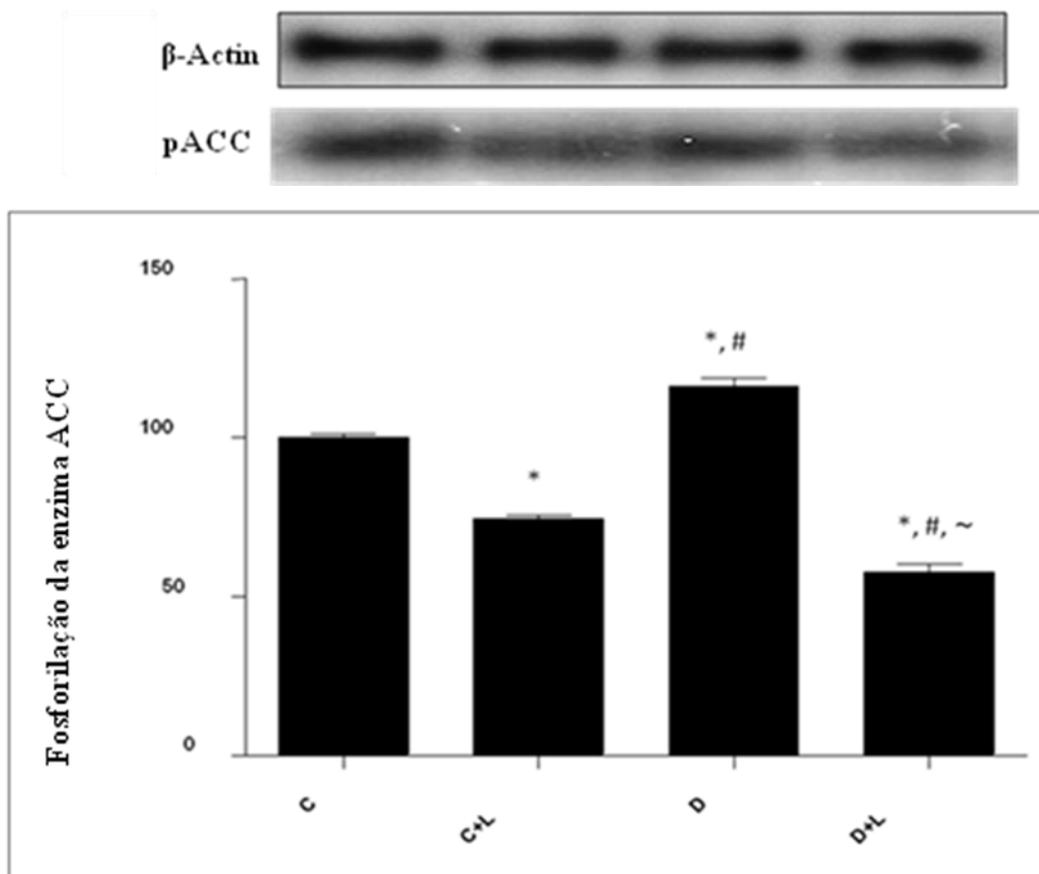


Figura 15. Porcentagem de fosforilação da enzima ACC no grupo no grupo controle (C), tratado com leucina (C+L), desnervado (D) e desnervado tratado com leucina (D+L). Os valores correspondem à média \pm epm, n=6. * $p < 0,05$ se comparado a C; # $p < 0,05$ comparado ao CL; ~ $p < 0,05$ comparado ao D.

6. DISCUSSÃO

Avaliações de cunho metabólico devem estar vinculadas a constante busca de aprimoramento dos parâmetros que possam indiretamente alterar as condições e dinâmicas de equilíbrio funcional. Assim, a presente discussão foi integrada às subseqüentes ações experimentais na busca do entendimento das relações ligadas a suplementação com leucina.

O estudo foi iniciado com suporte na literatura que sugerem a inter-relação entre o anestésico e o comportamento metabólico. Baseado no fato das reservas energéticas serem afetadas pelo tipo do fármaco e frente à necessidade de optar por um sistema norteador do estudo direcionou-se a

análise ao papel do sistema insulínico, cuja atividade integra as vias metabólicas que ajustam a disponibilidade à demanda.

Desde a década de 80, tem sido descrito que a insulina é o único hormônio capaz de diminuir a concentração de glicose no sangue, por esta razão, déficit no processo de liberação de insulina produz severas desordens metabólicas. A insulina é liberada da célula β de ilhotas de Langerhans, um complexo de células endócrinas onde, 65 a 90 % da população são constituída por células β , secretoras de insulina. Os secretagogos de insulina, ou iniciadores são capazes de estimular a secreção de insulina e incluem nutrientes que são metabolizados pela célula β , (como: glicose, leucina, isoleucina, arginina) substâncias que estimulam o metabolismo de substratos endógenos e agentes farmacológicos. (Ashroft,1988).

No estudo, avaliou-se a resposta quimiometabólica predominante na presença de diferentes anestésicos, sendo observado que, frente ao teste de tolerância a glicose, que é aplicado na avaliação do comportamento secretório da célula β pancreática, a associação ketamina-xilazina promoveu elevação na área sob a curva, estatisticamente significativa se comparado a curva descrita pelo tiopental ou zoletil, indicando que a responsividade das células β foi expressivamente reduzida e mostra a interferência da molécula do fármaco no equilíbrio funcional do sistema secretor de insulina.

A seguir, foi realizado o teste de tolerância a insulina buscando informações sobre a responsividade dos tecidos periféricos. O teste mostrou que a associação ketamina-xilazina promoveu redução na constante de decaimento da glicemia, estatisticamente significativa se comparado com o tiopental, fato indicativo de comprometimento na sensibilidade periférica, podendo indicar um status de resistência insulínica periférica, que contrapõe a proposta do estudo.

Desta forma, este estudo acompanha Kobayashi et al. (2006), onde sugeriram que, a opção anestésica ketamina-xilasina enfraquece a responsividade secretória da insulina frente ao seu papel fundamental no controle glicêmico, fazendo desta opção anestésica não plausível no perfil de análise realizado.

Uma segunda opção de anestésico é a utilização do dissociativo, composto de tiletamina/zolazepam (Zoletil®), que é utilizado por reconhecidos grupos de pesquisa. Dentro do mesmo perfil de análise, foi observado que a responsividade insulínica descrita no teste de tolerância à glicose (GTT) diferiu da associação de anestésicos, porém não diferiu do tiopental.

A seguir, aplicou-se o teste de tolerância a insulina (ITT) e foi verificado uma diferença do comportamento se comparado a associação e uma tendência a elevação se comparado ao tiopental, ressalta-se ainda que, mesmo não existindo diferença estatística, sugere mudança na sensibilidade, fato que pode ser esclarecido em estudo posterior com um maior número de amostragem (Andersen et al., 2004).

A preocupação com o entendimento das diferentes nuances que compõe a anestesia, tem sido alvo de ação de muitos profissionais em áreas correlatas. Cardoso (2004) realizou um estudo comparando os anestésicos tiopental, pentobarbital e éter, no sistema sinalizador insulínico em tecidos correlatos a este estudo, como o fígado e tecido muscular, e descreveu que não houve diferença estatística significativa entre a ação dos anestésicos nos parâmetros da glicemia, na atividade dos receptores insulínicos, na atividade da AKT e na fosforilação de ERK, do fígado e muscular. Cabe ressaltar que esses achados estão diretamente relacionados às condições experimentais lotadas nas observações do autor, mais recentemente o estudo de Silva et al., (2005) demonstrou que o tiopental tem influência direta na despolarização da membrana da ilhotas pancreáticas, estimulando assim a secreção de insulina, independente da presença de glicose sanguínea, tendo em vista que a estrutura molecular do anestésico tem similaridades com o ATP.

A avaliação realizada com o tiopental mostrou três importantes fatores indicativos de sua escolha, enquanto opção anestésica, ou seja, a glicemia foi mantida dentro dos parâmetros de normalidade, a área sob a curva do GTT mostrou-se com variação dentro do tempo de responsividade estipulado para a espécie e a porcentagem de decaimento do KITT, acompanhando o retorno a normoglicemia, indicando não interferir no equilíbrio metabólico do organismo.

Desta forma, é possível perceber pelo presente estudo, que a escolha detalhada do anestésico permite estabelecer o real efeito das substâncias

escolhidas para o desenvolvimento do estudo, fazendo o tiopental uma ferramenta farmacológica de melhor escolha.

Após esta fase de compreensão e entendimento do melhor anestésico a ser utilizado em experimentos de cunho metabólico, antes mesmo da avaliação quimiometabólica das amostras analisadas neste experimento, dos grupos controle, suplementado, desnervado e desnervado suplementado, nas várias doses do aminoácido leucina, buscamos conhecer a influência da suplementação com as diferentes doses da leucina, 5 mM; 1,25 mM e 0,30 mM no padrão comportamental dos animais, o que pode indicar alterações no equilíbrio funcional do sistema nervoso central.

O eixo norteador da proposta está embasado em estudos que apontam a existência de um sistema controlador do desenvolvimento de fadiga central representado pela competição do aminoácido com funções serotoninérgica cerebral propiciando a aquisição de fadiga (Gomes e Tirapegui, 2000; Jin et al., 2009).

Este tipo de fadiga seria causado por mudanças nas relações entre a disponibilidade de aminoácidos de cadeia ramificada e a captação do triptofano na barreira hematocefálica, sendo descrito competição entre os aminoácidos, de forma que, aquele que estiver em maior concentração é transportado preferencialmente para o interior do líquido cefalorraquidiano e conseqüentemente elevando a disponibilidade ao encéfalo (Kazapi e Tramonte, 2003; Newsholme e Blomstrand, 2006).

Neste sentido, existem modelos para avaliação comportamental do animal, utilizados neste estudo como: campo aberto (CA), relacionados com a frequência de amostragem, a resolução espacial, a relação entre o tamanho do animal e a área do aparato experimental, a distância do deslocamento, o tempo de permanência em cada região do campo e a velocidade do movimento (Rousseau et al., 1998); e o labirinto em cruz elevado (LCE) que se baseia na medida de todas as categorias comportamentais que refletem o conflito resultante da tendência dos animais de explorar ambientes desconhecidos e evitar situações potencialmente perigosas, sendo um dos testes mais empregados no estudo da ansiedade (Pellow et al., 1985).

Têm sido construídas várias teorias acerca de índices comportamentais de animais, sendo considerado como comportamento exploratório a expressão

comportamental da curiosidade espontânea nos animais (Rousseau et al., 1988; Martinez e Morato, 2004). Neste estudo, a análise do comportamento de ratos controle submetidos ao campo aberto mostrou uma grande atividade exploratória quando expostos ao meio e se refere à atividade de redes neurais inatas que coordenam as estratégias comportamentais permitindo aos animais interagirem com mudanças contínuas no ambiente e aprendizagem topográfica independente de recompensa (Zangrossi e File, 1992).

Muitas teorias foram propostas para explicar o comportamento exploratório dos ratos, dentre elas há referências que partem de conceitos simplistas ligados à existência de um impulso exploratório nato da espécie até teorias homeostáticas que se fundamentam no fato dos ratos explorarem em detrimento de necessidades de atingir níveis energéticos adequados a sobrevivência, para tal, diferentes sensações são desencadeadas no intuito de obter maiores informações acerca do ambiente (Renner e Seltzer, 1991).

No que tange ao perfil de suplementação clínica, sabe-se que a leucina é utilizada em grandes doses no tratamento de encefalopatias hepáticas, esta condição tem como finalidade gerar competição no processo de captação de aminoácidos promovendo melhora no estado mental (Fischer et al., 1976; Pardridge e Choi, 1986; Maio et al., 2000; Deshpande et al., 2007; Koivusalo et al., 2008)

Diversos cientistas avaliaram a atividade de áreas do sistema nervoso central frente à variação na disponibilidade plasmática de aminoácidos e observaram redução no padrão de ingesta em animais alimentados com altas doses de leucina (Davis et al., 2000; Beretich, 2005; Cota et al., 2006). Cabe considerar que, existe uma grande competição entre os sistemas de captação de aminoácidos na barreira hematocefálica, devido ao baixo Km dos transportadores sendo observado que o excesso na disponibilidade plasmática de leucina resulta na redução no conteúdo de serotonina e dopamina (Ramanamurthy e Srikantia, 1970; Peng et al., 1973; Harper et al., 1984; Choi et al., 2009). Neste sentido, como já foi descrito por outro pesquisador, estes eventos não foram observados na presença de isoleucina ou valina (Wu, 2009).

Os resultados do comportamento do grupo tratado com leucina 5mM quando submetido ao campo aberto mostraram redução significativa no comportamento exploratório nato da espécie e pode ter relações com o sistema

de inibição comportamental constituído pela formação septo hipocampal, junto com outras estruturas cerebrais como, por exemplo, os córtices pré frontal e cingulado, tálamo ântero-ventral e corpos mamilares. Este sistema responde a estímulos novos através da supressão do comportamento. As ativações destes sistemas resultam na inibição de qualquer atividade que o animal esteja exercendo, levando, no extremo, à imobilidade tensa ou congelamento (Papez, 1937). Assim, nossos resultados sugerem que a inibição comportamental é acompanhada de aumento de vigilância e da atenção, para perigos potenciais e pode refletir nas alterações da neurotransmissão dopaminérgica ou serotoninérgica em detrimento da redução na disponibilidade do triptofano.

No grupo tratado com leucina na dose de 1,25 mM também houve redução no índice exploratório, porém, em menor intensidade se comparado a dose 5 mM indicando um efeito intermediário, sem descartar sua potencialidade em promover redução no âmbito comportamental. Eventos estes que não foram observados na dose de 0,30 mM. Assim, este estudo de forma pioneira sugere que a suplementação com leucina na dose de 0,30 mM possa propiciar resultados significativos quanto se pretende melhorar o perfil energético ou realizar ação anti-catabólica sem interferência na homeostasia do sistema nervoso central.

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um método considerado como um instrumento útil e válido para medir ansiedade, investigações de aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (Graeff et al. 1994; Anseloni et al., 1997). No que tange ao LCE, foi observado que o grupo tratado com leucina 5 mM permaneceu o maior tempo no braço fechado. É sabido que a tendência em permanecer nos braços fechados do labirinto é aumentada por estímulos e substâncias ansiogênicas, que aumentam a aversão aos braços abertos, possivelmente este comportamento possa indicar um evento que acompanha as altas doses de leucina (Harper et al., 1984; Pellow et al., 1985).

Cabe ressaltar que a redução na porcentagem de tempo nos braços abertos indica ansiedade e reflete dois sistemas neurais que medeiam à reação dos animais: o sistema cerebral de defesa, acionado em situações de conflito ou de perigo iminente e o sistema de inibição comportamental, sistemas ligados a neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica.

Outra possibilidade que possa explicar a mudança no comportamento pode estar fundamentado na proposta de Rohlfs et al. (2005), onde sugere que mudanças na neurotransmissão podem ser o elemento responsável pelo componente cognitivo das emoções e diretamente modificar a expressão de ação dos núcleos da base e suas relações com componentes motor ou comportamental elaborando as manifestações neurovegetativas e endócrinas das emoções.

Nas doses menores 1,25 mM e 0,30 mM, os componentes comportamentais também se manifestaram, porém, houve maior exploração do campo aberto e de acordo com a proposta de Cruz et al. (1994) o tempo que o animal fica no braço fechado e o número de vezes em que o animal chega ao final do braço aberto é inversamente proporcional ao seu nível de ansiedade, indicando nesta condição, menor ansiedade, e conseqüentemente pode refletir em menores comprometimentos na neurotransmissão serotoninérgica. Por outro lado, a avaliação de risco que é um comportamento de conflito do animal medido pelo número de vezes que o animal se dirige ao centro do labirinto, mas não entra em outro braço, está diretamente relacionada com o nível de ansiedade. Com base nestes parâmetros foi observado que os grupos tratados com leucina na concentração de 1,25 e 0,30 mM não diferiram entre si e se comparado ao controle, e nos leva a considerar que dentro de uma vertente da análise neurofisiológica, as doses não geraram mudanças comportamentais significativas com visibilidade no teste do labirinto em cruz elevado.

Nesta próxima etapa experimental, procuramos no eletrocardiograma, que é um método efetivo no diagnóstico de alterações cardíacas, conhecer a ação do aminoácido leucina no padrão cardiovascular, uma vez que, diferentes estados nutricionais, como a suplementação com leucina, podem levar a alterações funcionais refletindo em mudanças na propagação do potencial de ação no músculo cardíaco alterando as ondas do eletrocardiograma (ECG) ou os respectivos intervalos.

Dentre as principais alterações classicamente observadas, encontram-se modificações na amplitude e tempo de duração das ondas ou ainda aumento nos intervalos que podem estar fundamentado em anormalidades nos canais de sódio ou potássio, distúrbios metabólicos ou anormalidades elétricas

ocasionadas por modificações anatomofisiológicas. Enquanto o intervalo PR mostra o tempo de condução nas câmaras atriais, o intervalo QT corresponde ao tempo necessário para a completa excitação elétrica e a recuperação dos ventrículos, sendo, portanto, a medida da duração da sístole “elétrica”, ou seja, é a duração total da atividade elétrica ventricular. O intervalo QT varia inversamente com a frequência cardíaca (FC), de modo que quanto maior a FC, menor o QT, e vice-versa. Assim, ele deve ser corrigido em relação à FC, gerando o QTc, que é preferencialmente usado para detecção da heterogeneidade da repolarização ventricular, um marcador de arritmogênese sendo provocado por tempos de repolarização não homogêneos (Silva et al., 2008).

A análise do perfil eletrocardiográfico dos animais tratados com diferentes doses de leucina (5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM) não mostrou diferença do perfil de normalidade, sugerindo que a suplementação não modifica as dinâmicas elétricas que comandam a funcionalidade do coração, reiterando assim, a eficiência da suplementação (Henkens et al., 2008, a,b).

Baseado em uma possível ação da leucina enquanto secretagogo da insulina, o estudo convergiu para a aplicação de testes de sensibilidade, nas doses suplementadas de 5 mM; 1,25 mM e 0,30 mM, no intuito de entender se há uma integração funcional. No teste de tolerância a insulina (KITT), foi observado que a velocidade de captação de glicose se apresentou estatisticamente menor nos grupos suplementados com leucina nas doses de 5 mM e 1,25 mM, sendo observado valores 1,3 vezes menores do que o controle, respectivamente. Cabe ressaltar que a dose 0,30 mM não diferiu do controle.

No mesmo perfil de análise aplicamos o teste de tolerância à glicose (GTT), e observamos que a dose de 1,25 mM mostrou-se sensibilizadora das células β pancreáticas promovendo elevação na secreção de insulina e concomitante menor área sob curva, evento que ocorreu de forma mais efetiva na dose de 0,30 mM. Na dose de 5 mM não houve mudança na resposta das células β ao bolus de glicose. Quanto ao comportamento da concentração plasmática de glicose no tempo zero, não se observou diferença significativa entre o controle e as diferentes doses estudadas (5 mM, 1,25 Mm e 0,30 mM), sendo mantida a normoglicemia.

Frente à responsividade do sistema insulínico a leucina, buscou-se uma interface que se corrobora no entendimento dos achados no presente estudo. É sabido que a leucina estimula a liberação de insulina em células β pancreáticas por um processo que envolve o aumento do metabolismo mitocondrial através da ação de GDH e aumento da produção de ATP por transaminação de leucina para α - ketoisocaproate e subseqüente aumento na via de entrada do ciclo TCA pela acetil-CoA (Newsholme et al., 2005).

Xu et al. (2001) complementaram o entendimento das relações entre a leucina e as células β pancreáticas demonstrando que o locus de ação está nas mitocôndrias, inicialmente através da transaminação para α -ketoisocarpórico (KIC) e posteriormente por decarboxilação oxidativa do KIC para acetil-CoA. Sendo descrito ainda a ação do aminoácido leucina na presença de glutamina, como precursor para o glutamato, que serve como substrato para a glutamato desidrogenase (DGH), aumentando significativamente o metabolismo das células β sugerindo que o metabolismo mitocondrial é importante para a leucina ativar p70^{s6k}.

Recentemente Filiputti et al. (2009), estudaram a suplementação com aminoácido leucina em ratos com dieta de restrição protéica e observaram um aumento significativo nas concentrações de insulina se comparados com os ratos que receberam uma dieta normal.

Alguns estudos realizados com humanos mostram também um aumento significativo na concentração de insulina plasmática na suplementação de leucina isoladamente (Kalogeropoulou, 2008). Em outra pesquisa realizada com seres humanos Rieu et al. (2006), já haviam demonstrado que as concentrações plasmáticas de insulina eram semelhantes no período basal e aumentaram em ambos os grupos, que receberam dietas balanceadas suplementadas ou não com o aminoácido leucina, após a ingestão da primeira refeição. As concentrações de insulina aumentaram durante as primeiras 2 h e estacionaram após 3 h. O incremento de insulina após a alimentação tende a ser maior no grupo suplementado com leucina, mas a resposta à insulina, durante 5 h do período de alimentação não foi diferente entre os dois grupos.

Classicamente pode-se perceber que diferentes doses de leucina podem agir de forma diferente tanto no que tange a secreção de insulina por células β pancreáticas quanto no processo de captação de glicose por células alvos,

onde destaca-se que altas doses de leucina podem interferir no funcionamento deste ciclo tanto na origem, diminuindo a secreção de insulina, ou gerando resistência insulínica periférica.

De forma contrária, a suplementação com doses baixas do aminoácido leucina podem aumentar tanto a via de secreção insulínica quanto a captação de glicose pelas células musculares, levando a um melhor funcionamento do sistema insulínico/glicolítico. Outros pesquisadores não encontraram alteração estatisticamente significativa no que diz respeito a secreção insulínica em baixas doses de leucina, utilizando a base de 54 g L-leucina/L e suplementando os animais com 5, 10, 25, 50 e 100%, onde o contrário ocorreu com a dose elevada, em que houve aumento de insulina após 30 minutos e pode refletir as condições inerentes a experimentação (Crozier et al., 2005).

Após o entendimento da atuação do aminoácido leucina nas várias vertentes acima expostas, passamos a direcionar o estudo ao perfil energético, através do conteúdo de glicogênio, do fígado e da musculatura esquelética, de sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho, dos ratos nos grupos controle, suplementado, desnervado e desnervado suplementado, com as diferentes doses do aminoácido leucina, 5 mM; 1,25 mM e 0,30 mM.

Na literatura observa-se um crescente interesse por agentes aplicados na suplementação, na busca da melhora nas condições energéticas teciduais e nesse sentido, tem sido revelado que o aminoácido leucina ocupa uma posição de destaque enquanto um dos componentes na associação dos aminoácidos de cadeia ramificada ACR, no entanto, não há consenso com relação à dose efetiva deste aminoácido.

No intuito de dirimir esta dúvida, o estudo foi direcionado a avaliação de diferentes doses do aminoácido. Para contemplar esta proposta, o estudo foi direcionado a avaliação das reservas glicogênicas por ser alvo tanto da ação insulínica quanto do sistema contra-regulador. Os dados demonstraram uma diminuição significativa no conteúdo de glicogênio dos músculos e do fígado no grupo tratado com as doses de 5 mM e 1,25 mM de leucina, se comparados ao controle. Por outro lado, na dose 0,30 mM foi observado elevação nas reservas hepáticas e no músculo sóleo, não havendo diferença para os demais músculos.

Frente a esta observação passou-se a buscar fundamentos que auxiliassem o entendimento dos resultados, assim, estes podem ter relação com a ação multifatorial exercida pelo aminoácido, no qual, inicialmente possa auxiliar com o status de atividade do músculo, onde Lancha (2004) sugeriu que os aminoácidos de cadeia ramificada são estimulados à sua funcionalidade como ativadores de síntese protéica e reservas energéticas musculares após esforços intensos, neste caso os grupos que foram suplementados não realizaram nenhum tipo de atividade após a aplicação das doses, corroborando com a sugestão.

Outro ponto de destaque se refere ao músculo sóleo (fibra tipo I) cuja tipagem se caracteriza pela maior responsividade insulínica e por ser alvo de ação da leucina, em maior intensidade do que músculos de outra tipagem, assim, suas reservas foram elevadas possivelmente devido ao reflexo de uma ação enquanto secretagogo, e indiretamente possa ter influenciado neste reservatório. Em suma, os aminoácidos de cadeia ramificada também participam das vias geradoras de energia (Sizer e Whitney, 2003). O que não foi observado no grupo desnervado e desnervado suplementado com leucina, pois não manteve o status energético da musculatura esquelética, podendo sugerir que a manutenção do perfil energético muscular, esta diretamente ligada ao comando neural que exerce ação tanto no trofismo quanto no controle da sensibilidade a captação/reserva/metabolização de substratos geradores de energia, neste caso interrompido.

Tem sido descrito que, os aminoácidos de cadeia ramificada podem ser inseridos enquanto o terceiro tipo de substrato energético de suporte nutricional para a musculatura esquelética, após os carboidratos e as gorduras (Gleeson, 2005). Contudo, efeitos ergogênicos ligados a sua suplementação não costumam ser verificados, particularmente quando comparados com o que ocorre com a suplementação com carboidratos, uma escolha mais natural, quando a intenção é fornecer energia e poupar glicogênio (Williams, 1999).

Na busca de um consenso, diversos autores demonstraram que as doses utilizadas nos diversos experimentos podem ser excessivas, ocasionando a chamada resistência insulínica periférica, levando a um declínio significativo nas reservas de glicogênio muscular nos grupos tratados, como

ocorreu em nosso estudo com as doses utilizadas de 5 mM e 1,25 mM. Contrariamente ao citado anteriormente, nosso estudo demonstrou que doses baixas como a dose de 0,30 mM, pode ser um potencializador das reservas de glicogênio muscular, ou seja, um instrumento de manutenção das reservas energéticas em casos de forte depleção como observado na desnervação ou imobilização muscular, ou ainda na prática esportiva.

Um ponto a se considerar está ligado ao estudo de Deshmukh et al. (2009), onde foi demonstrado que a dose 5 mM, deve ser considerada como supra-fisiológica, e por esta razão pode ter comprometido a homeostasia das reservas aqui relatadas. Cabe ressaltar a mudança na sensibilidade insulínica decorrente da suplementação com doses elevadas de aminoácidos, revelando o *status quo* da resistência periférica insulínica, cujo locus de ação é a inibição do transportador de glicose e da fosforilação da glicose-6-fosfato, como pode ocorrer através da sinalização excessiva do eixo S6K1 ao longo do caminho do mTOR (Schwenk e Haymond, 1987; Krebs et. al, 2002; Krebs, 2005).

Com relação às doses citadas, 0,30 mM promoveu um aumento significativo nas reservas de glicogênio se comparado as demais, e pode-se sugerir um efeito com perfil dose dependente, uma vez que, a diminuição da dose possa ter amenizado a ação supracitada, ou ainda pode ter uma relação direta com o tipo de fibra muscular, sendo o músculo sóleo contendo 84 % fibras de tipo I; o músculo gastrocnêmico branco 92 % tipo IIB; e o músculo gastrocnêmico vermelho 51 % fibras tipo I e 35 % fibras tipo IIA (Delp e Duan, 1996). Cabe ressaltar que a leucina atua preferencialmente em fibras de contração lenta. Como observado no grupo desnervado e desnervado tratado com aminoácido leucina, pois estes mantiveram o conteúdo de glicogênio muscular do músculo sóleo, quando comparados entre si.

Outro ponto a ser aventado se refere a uma possível ação indireta, uma vez que, o aminoácido leucina exerce ação insulínica e pode ter promovido indiretamente a dessensibilização dos tecidos alvo, já que as respostas ligadas a sensibilidade insulínica são ajustadas de acordo com a intensidade do estímulo.

É indiscutível que a leucina exerce uma ação anabólica e possivelmente deva suprimir a atrofia e proteólise muscular devido propriedades

anticatabólicas nas condições *in vivo* e *in vitro*, como sugerido em estudos de fundo metabólico realizados com concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas em humanos e roedores (Buse e Reid, 1975; Vary, Jefferson e Kimball, 1999).

Em concordância com o tecido muscular, o tecido hepático que representa o maior reservatório da hexose, também acompanhou o perfil de mobilização indicando que existe uma expressão das respostas que acomete os tecidos periféricos.

Com base nas respostas encontradas no padrão comportamental, no controle insulínico e no perfil metabólico, das doses de 5 mM; 1,25 mM e 0,30 mM do aminoácido leucina, optou-se por utilizar nas demais análises experimentais a dose de 0,30 mM como ideal (Xu et al., 2001). A princípio foi analisado o padrão de toxicidade do aminoácido e sua ação sob a homeostasia dos eritrócitos.

A manutenção do perfil quimio-metabólico do organismo tem relações diretas com a integridade das funções hepáticas e da eficiência na dinâmica renal. Neste aspecto, foi observado que o grupo tratado com leucina 0,30 mM não apresentou diferença significativa na concentração das principais enzimas envolvidas na dinâmica funcional do fígado ou dos rins indicando que não há toxicidade ligada a suplementação como sugerido por Chida et al. (2003). Cabe ressaltar que dentro do perfil da disponibilidade de substratos metabolizáveis as concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres e glicose, também não foram alteradas reiterando a eficiência da suplementação.

Outro importante aspecto se refere às propriedades funcionais das hemácias, uma vez que, modificações nas propriedades físicas ou químicas podem afetar a fluidez das membranas e o comportamento hemolítico em resposta a choque hipotônico (Agree, 2006). Apoiado neste contexto realizamos o teste de fragilidade osmótica onde foi observado que não houve alteração na fragilidade celular, uma vez que os eritrócitos coletados dos ratos suplementados com leucina responderam similar ao choque hipovolêmico (Aldrich e Saunders, 2006).

Tendo em vista o papel do aminoácido leucina na interface anabolismo/catabolismo, a análise da proteína total e das principais enzimas

reguladoras de tal processo, passaram a ser o fundamento principal neste momento do presente estudo.

Autores como Buse e Reid 1975, descreveram o papel do aminoácido leucina na regulação do turnover protéico das células musculares, inibindo a degradação protéica do músculo e promovendo a síntese de proteína muscular.

Ao avaliarmos o conteúdo de proteínas totais de músculos desnervados foi verificada diminuição estatisticamente significativa do conteúdo de proteína muscular no sóleo, no entanto, em contra partida, o músculo sóleo do animal que recebeu o suplemento do aminoácido leucina 0,30 mM e aquele que foi desnervado e posteriormente suplementado com a mesma dose de leucina, apresentaram um significativo aumento no conteúdo de proteína muscular se comparado com o desnervado. Assim, nossos resultados corroboram com a literatura onde foi sugerido que a síntese protéica muscular é elevada em 25 % com a suplementação de leucina isoladamente, indicando que a mesma atua aumentando a síntese protéica através da estimulação do transporte de (¹⁴C)Lisina ou ainda como relatado por Crozier et al. (2005), estudando diferentes doses do aminoácido leucina, relataram que a modulação do eIF4F e a formação do complexo como sendo um mecanismo de baixas doses do aminoácido leucina e pode afetar a síntese protéica muscular (Buse e Reid 1975).

Escobar et al. (2006), apresentaram em seu estudo que a leucina aumenta a fosforilação do S6K1 e rpS6 em músculos glicolíticos, como longo dorsal, e não em músculos oxidativos como o masseter. O que confirma a ação do aminoácido leucina no músculo sóleo desnervado e o seu papel na manutenção protéica da musculatura esquelética, como efeito anticatabólico observado nos resultados deste estudo.

Os mesmos autores descreveram que o aumento fisiológico de leucina plasmática, resultou em um aumento na fosforilação de 4E-BP1 no Thr⁷⁰ e de gama-isoforma, com concomitante redução de 4E-BP1 complexo eIF4E e aumento de eF4G complexo e IF4E em músculo esquelético.

Combaret et al. (2005), utilizou no seu estudo uma dieta com 5 % de leucina, durante 10 dias observou uma inibição do processo lisossomal dependente de Ca²⁺, desde a inibição proteolítica de PP, da proteólise *in vitro*

de músculo, foi ainda detectada a presença de inibidores como catepsinas e calpains.

Para melhor compreender a ação intramuscular do aminoácido leucina e suas vias sinalizadoras, esta fase do estudo foi direcionado a análise dos sistemas enzimáticos indicadores do “status” metabólico das fibras musculares, iniciando pela avaliação da fosforilação da enzima AMPK (5' AMP-activated protein kinase, enzima que ocupa um papel central na homeostasia energética celular) sendo constatado aumento na fosforilação nos grupos desnervado; tratado com leucina e desnervados tratados com o aminoácido leucina.

Na avaliação da enzima AKT (proteína com ação centrada na sinalização celular) foi observado elevação da fosforilação nos grupos tratados, com maior evidência no grupo desnervado trata com leucina.

Baseado na integração entre sistemas homeostáticos passou-se a avaliar a porcentagem de fosforilação da enzima mTOR (proteína alvo/sensível a rapamicina) sendo observado redução em decorrência da desnervação. Com relação aos grupos tratados com o aminoácido foi observado elevação no grupo controle tratado se comparado ao não tratado, e do grupo desnervado tratado se comparado ao grupo somente desnervado.

Por fim, optou-se por avaliar a fosforilação da enzima ACC (acetil –CoA carboxilase) cuja função é fornecer o substrato malonil-CoA para a síntese de ácidos graxos sendo observado elevação em decorrência da desnervação. Por sua vez, nos grupos tratados com o aminoácido leucina, houve redução.

Em estudos cujo foco foi avaliar a ação do aminoácido leucina na sinalização intracelular e síntese protéica realizado em diferentes tecidos como: músculo, coração, fígado e rins, foi sugerido um efeito tecido específico da leucina caracterizado pelo aumento a síntese de proteínas através de um mecanismo que é independente da ativação do mTOR onde os aminoácidos regulam a síntese da proteína através de vias sensíveis da rapamicina (por exemplo, o mTOR, S6K1 e 4E-BP1) e vias de rapamicina não-sensível. Sendo assim, relataram que a leucina pode ser capaz de regular a síntese protéica aguda através de uma via rapamicina não-sensível (Rogerio e Tirapegui, 2008). Neste sentido cabe reiterar que a capacidade de leucina de promover a fosforilação de p70^{S6k} está bloqueada por rapamicina, um inibidor de mTOR, e um inibidor da fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K) (Xu et al., 2001).

Nos resultados aqui apresentados descreve-se a correlação existente entre o processo de desnervação, levando a uma alteração da homeostasia quimiometabólica da musculatura esquelética, com uma diminuição significativa da mTOR, enzima proteica, e um aumento estatisticamente significativo nas vias metabólicas de reajuste como a AKT, ativação da mTOR, e principalmente AMPK e ACC, que são ativadas quando o tecido está suprimido energeticamente, ou seja com baixa concentração de ATP.

Autores sugerem que p70^{S6K} controla a sinalização de AMPK e que afetam o estado de energia intracelular, representado pela relação AMPK/ATP. Embora ainda acreditem na possibilidade de que a leucina afeta a AMPK/ATP razão, e propõe que a leucina pode modificar a sinalização mTOR/p70^{S6K}, por si só e/ou resultante de eventos metabólicos que podem levar a um aumento na fosforilação da AMPK, sem uma grande mudança no status de energia na contração músculo esquelético (Iwanaka et al., 2010).

A fosforilação basal de AMPK não foi alterada pela leucina, mas de forma significativa a leucina aumentou a fosforilação em 27 % com estimulação elétrica muscular. Em paralelo com o transporte 3-MG, o efeito estimulatório da contração na presença do aminoácido leucina na fosforilação AMPK foi abolida na presença da rapamicina. O efeito inibitório da leucina sobre o transporte de glicose estimulada pela insulina foi bloqueada na presença da rapamicina (Iwanaka et al., 2010).

Por outro lado, os animais que foram suplementados com o aminoácido leucina, obtiveram um aumento significativo em AKT e mTOR, e uma diminuição estatisticamente significativa em AMPK e ACC, sugerindo assim a via de ação da leucina e o seu papel anabólico e anticatabólico na musculatura esquelética.

Filiputti et al.(2009) estudaram em ilhotas isoladas de ratos tratados com diferentes dietas, os eventos ligados a suplementação com leucina e verificaram que a leucina promoveu ativação 2,5 vezes maior na mTOR no grupo dieta com restrição de 6 % de proteína e normais suplementado com leucina. A concentração da proteína ribossomal S6K-1 foi reduzida em ambos os grupos de dieta de restrição proteica, suplementados ou não com o aminoácido leucina, em comparação com ilhotas dos demais grupos, os quais receberam alimentação normal. Os pesquisadores sugerem que os resultados

indicam que a PI-3K e mTOR podem estar envolvidos na secreção de insulina observada em ratos com dieta de restrição protéica e suplementados com leucina.

Tem sido descrito que a leucina diminuiu em 14 % a relação de estimulação entre a insulina e a fosforilação da Akt, mas este efeito não foi evidente na presença da rapamicina, por outro lado, a contração muscular por si só, também aumentou significativamente a fosforilação da Akt Ser⁴⁷³ (Iwanaka et al., 2010). A estimulação de leucina (5 mM) durante 20 min mostrou uma tendência à diminuição da estimulação da insulina na fosforilação de AKT, e este efeito foi mais evidente 2 h de exposição à leucina. Já a enzima S6K1 impediu que a leucina levasse a uma deficiência na ação da insulina ao nível de fosforilação de AKT (Deshmukh et al., 2009).

Por fim, é importante gerar uma hipótese sobre as relações implícitas na interface ativação/inibição enzimática dentro do perfil que caracteriza a ação da leucina, ou seja, a enzima AKT quando ativada induz a ação da mTOR ligada as vias de sobrevivência celular, síntese de glicogênio e translocação de GLUT4. Sendo esta ativada quando existe nutrientes como glicose na geração de ATP, no organismo.

A enzima AMPK só é ativada quando há baixo conteúdo de ATP, como ocorreu no músculo desnervado. Estando em ação, esta induz a ativação da enzima ACC envolvida no metabolismo de ácidos graxos. Deve-se ressaltar que a ACC fosforilada pela AMPK torna-se inibida. Pelos resultados obtidos neste trabalho, podemos verificar que não há razão para que ambas estejam ativadas, pois estas vias são contra-regeladoras.

Se o músculo está desnervado, há baixa quantidade de energia, ou seja de ATP, o que leva à ativação de AMPK, inibição da AKT e conseqüentemente, bloqueio da via da mTOR. Na suplementação com leucina, que é um aminoácido secretagogo de insulina, as vias de sinalização deste hormônio estarão ativadas (IRS-PI3k-AKT), fornecendo energia para organismo (entra glicose na célula). Desta forma, suponhamos que as vias da AMPK e ACC não sejam significativamente ativadas, mas sim AKT e mTOR preservando as fibras musculares por um efeito anticatabólico.

7. CONCLUSÃO

A análise de seleção do anestésico mostrou maior eficácia na utilização do tiopental sódico, se comparado com os demais, pois a molécula do fármaco não interferiu no perfil metabólico do animal.

O experimento demonstra que altas doses de leucina podem comprometer a homeostasia dos processos formadores das reservas de glicogênio muscular e hepático, afetando o funcionamento bioquímico do organismo e possivelmente levando na prática clínica, a algumas possíveis complicações, pelo uso de forma incorreta deste suplemento. De forma contrária, baixas doses podem auxiliar tanto a via de secreção insulínica pelas células β pancreáticas, quanto à captação de glicose pelas células musculares, levando a um melhor funcionamento do sistema insulínico.

O estudo sugere a existência de alterações fisiológicas e comportamentais ligadas a suplementação com altas doses do aminoácido leucina. Estas alterações são caracterizadas pela redução na atividade exploratória e desenvolvimento de ansiedade, fatos que certamente alteram o comportamento e o desempenho de indivíduos que utilizem tal suplemento. Sugere-se ainda que a suplementação com baixas doses de leucina pode ser efetivamente aplicada sem interferir no aspecto comportamental/emocional.

Outros fatores que merecem destaque são: o padrão eletrocardiográfico e o estado de saúde dos animais que foram suplementados com o aminoácido leucina, e não se modificaram indicando a eficácia sem comprometimentos fisiológicos e/ou estruturais em sistemas vitais, como no caso das principais enzimas envolvidas na dinâmica funcional do fígado ou dos rins indicando que não há toxicidade, fato sugestivo e indicativo que a suplementação com leucina não altera o equilíbrio homeostático.

Destaca-se também que a suplementação com baixas doses do aminoácido leucina foi eficiente em prevenir os efeitos deletérios do processo de desuso da musculatura esquelética, exercendo papel anti-catabólico, mantendo o padrão anabólico e ao mesmo tempo minimizando o catabolismo, através de uma ação direta sobre a efetividade das enzimas como: AMPK, AKT e mTOR, podendo assim auxiliar em muitas práticas clínicas bem como na

área desportiva, como nos processo de lesões ósseas, tendíneas e musculares, seguidas de imobilização, repouso prolongado, pré-cirúrgico, etc.

REFERÊNCIAS

Aârimaa M, Slati P e Jeglinsky B. Glucose tolerance and insulin response during and after elective skeletal surgery. *Ann Surg.* 1974; 179: 926-929.

Agree P. The aquaporin water channels. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 2006; 3 (1): 5-13.

Aldrich K e Saunders DK. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. *Journal of Thermal Biology.* 2006,26: 179 - 182.

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Nagalhães LE e Tufik S. Projeto CEPID (processo 98/14303-3). Princípios Éticos e Práticos do uso de animais experimentais. Unifesp.2004.

Allison AP, Tomlin PJ e Chamberlain MJ. Some effects of anaesthesia and surgery on carbohydrate and fat metabolism, *BrJ Anaesth.*1996;41 :588- 591.

Anseloni VZ E Brandão ML. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology.*1997; 8: 533-540.

Araujo EP, Amaral MEC, Filiputti E, Souza CT, Laurito TL, Augusto VD et al. Restoration of insulin secretion in pancreatic islets of protein-deficient rats by reduce expression of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Journal of Endocrinology.* 2004;181:25-38

Ashroft FM. Adenosine 5-triphosphate sensitive potassium channels.*Rev. Neurosci.*1988;11:97-135.

Aspinwall CA, Quian WJ, Roper MG, Kulkarni RN, Kahn CR e Kennedy RT. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca^{++} stores in insulin-stimulated insulin secretion in B-cells. *JBC*.2000; 125: issue 29, 22331-22338.

Beardsall K, Yuen K, Williams R e Dunger D. Applied Physiology of glucose control. *Current Pediatric* 16: 434-438, 2006.

Beretich GR e Jr. Do high leucine/low tryptophan dieting foods (yogurt, gelatin) with niacin supplementation cause neuropsychiatric symptoms (depression) but not dermatological symptoms of pellagra? *Med Hypotheses*. 2005; 65(3):628-9.

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

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72, 248-54.

Buse M e Reid SS. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J. Clin. Invest.*1975; 56, 1250-1261.

Caiozzo VJ, Haddad F, Baker MJ, Henrick RE, Pritto N e Baldwin KM. Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. *J Appl Physiol*.1996;81(1)123-32.

Caierão QM, Betini J, Teodori RM e Minamoto V. The effect of time interval between electrical stimulation on the denervated rat muscle. *Rev Bras Fisioter*. 2008;12(2)143-148.

Cardoso AR. Efeito do Tiopental Sódico, do Pentobarbital Sódico e do Eter Dietílico nas Vias da Sinalização da Insulina em Ratos [Tese]. Campinas:UNICAMP;2004.

Carregaro AB, Castro MB e Martins FS. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.2005; 57(2).

Castro MJ, Apple DF, Staron RS, Campos GE e Dudley GA. Influence of complete spinal cord injury on skeletal muscle within 6 mo of injury. *J Appl Physiol*. 1999;86:350-58.

Changhong Li, Habiba N, Yevgeny D, Ilana BN, Heather WC, Marc Y et al. Regulation of Leucine-stimulated Insulin Secretion and Glutamine Metabolism in Isolated Rat Islets. 2008, 278 (5): 2853–2858.

Chamandari E, Tsigos C e Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology*.2005;67/259-84.

Chida VV, Moreira MB, Leme LFP, Fagundes DJ, Ramalho CEB, Novo NF e Montero EFS. Estudo da função hepática de ratos espontaneamente hipertensos submetidos a diferentes pressões de pneumoperitônio com CO₂. *Acta Cir.Bras*. 2003;18(1) 51-53.

Choi S, Disilvio B, Fernstrom MH e Fernstrom JD. Meal ingestion, amino acids and brain neurotransmitters: effects of dietary protein source on serotonin and catecholamine synthesis rates. *Physiol Behav*.2009;4;98(1-2):156-62.

Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowshi TG, Ruderman NB et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and Messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinol*.1992;131(4):1821-1825.

Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch M, Béchet D, Taillander D et al. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 2005; 569(2):489-499.

Costa ECS. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc em ratos diabéticos. *Arq. Brás. Cardiol*. 2008;90(4):254-260.

Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC e Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 2006;12;312(5775):927-30.

Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC e Jefferson LS. Oral Leucine Administration Stimulates Protein Synthesis in Rat Skeletal Muscle. *Am Soc Nutrition*. 2005, 376-382.

Cruz APM e Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 49:171-176.

Davis JM, Alderson NL e Welsh RS. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72 (2):573S-578S.

Deshpande G, Adachi N, Liu K, Motoki A, Mitsuyo T, Nagaro T e Arai T. Recovery of brain dopamine metabolism by branched-chain amino acids in rats with acute hepatic failure. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2007;19(4):243-8.

Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, IIB fibers and citrate cinthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol*. 1996, 80 (1): 261-270.

Deshmukh A, Salehzadeh F, Metayer-Coustard S, Fahlman R, Nair KS e Al-Kahalili L. Post-transcriptional gene silencing of ribosomal protein S6 kinase 1

restores insulin action in leucine-treated skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009; 66(8):1457-1466.

Dow DE, Carlson BM, Hassett CA, Dennis RG e Faulkner JA. Electrical stimulation of denervated muscle of rats maintains mass and force, but not recovery following grafting. *Restor Neurol Neurosci*. 2006; 24 (1): 41-54.

Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS e Davis TA. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290: E612-E621.

Filiputti E, Rafacho A, Araujo EP, Silveira LR, Trevisan A, Batista TM, et al. Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2009 1-10.

Fischer JE, Rosen HM, Ebeid A, James JH, Kenane JM e Soeters PB. The effect of normalization of plasma aminoacids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery*. 1976;80: 77-97.

Forti, F, Guirro RRJ e 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): 273-281.

Fushiki T, Kano T, Inoue K, Sugimoto E. Decrease in muscle glucose transporter number in chronic physical inactivity in rats. *Am J Physiol*. 1991; 260.

Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J. Med. Biol. Res*. 1994; 27 (4): 811-829.

Gleeson M. Interrelationship between physical activity and branched-chain amino acids. *J Nutr.*2005;135:1591-1595.

Goldspink G. Gene expression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans.* 2002; 30(2): 285-90.

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

Halar EM e Kathleen RB. Imobilidade. *In: DeLISA, J. A., et al. Tratado de Medicina e Reabilitação: Princípios e práticas, São Paulo Manole.* 2002; 2(2)1067-1087.

Harper AE, Miller RH e Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Ann. Rev Nutr.*1984; 4:409-454.

Harrington LS, Frindlay GM e Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signaling goes back to the membrane. *TRENDS in Biomechanical Sciences.*2005;30(1):35-42.

Henkens IR, Mouchaers KT, Vonk-Noordegraaf A, Boonstra A, Swenne CA, Maan AC. Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular pressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging., *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294:H2150-7.(A).

Henkens IR, Scherptong RWC, Van KKW, Said SAM e Vliegen HW. Pulmonary hypertension: the role of the Electrocardiogram. *Neth Heart J.* 2008; 16:250-4. (B).

Heriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE e Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol.*1997; 70, 2322-2327.

Hilder TL, Tou JC, Grindeland RE, Wade CE e 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 e Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*2000;279:1235-1241.

Iwanaka N, Egawa T, Satoubu N, Karaike K, Ma X, Masuda S e Hayashi T. Leucine modulates contraction and insulin-stimulated glucose transport and upstream signaling events in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.*2010;108: 274-282.

Jain NC. Schalm`s veterinary hematology. Philadelphia : Lea & Febiger.1986; 4:1221.

Jevtovic-Todorovic V e Carter LB. The anesthetics nitrous oxide and ketamine are more neurotoxic to old than young rat brain. *PubMed.* 2005; 26(6)947- 56.

Jin G, Kataoka Y, Tanaka M, Mizuma H, Nozaki S, Tahara T, Mizuno K et al. Changes in plasma and tissue amino acid levels in an animal model of complex fatigue. *Nutrition.* 2009; 25(5):597-607.

Kalogeropoulou D, LaFave L, Schweim K, Gannon MC e Nuttall FQ. Leucine, when ingested with glucose, synergistically stimulates insulin secretion and lowers blood glucose. *Metabolism Clinical and Experimentak.*2008; 57:1747-1752.

Kasper CE, Talbot LA e Gaines JM. Skeletal muscle damage and recovery. *AACN Clin Issues.*2002;13(2)237-47.

Kazapi IAM e Tramonte VLCG. Nutrição do atleta. Florianópolis: Editora da UFSC.2003.

Kimball S R e Jefferson. New functions for aminoacids: effects on gene transcription and translation. Am J Clin Nutr.2006;83(suppl): 500S-7S.

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.

Koivusalo AM, Teikari T, Höckerstedt K e Isoniemi H.Albumin dialysis has a favorable effect on amino acid profile in hepatic encephalopathy. Metab Brain Dis.2008;23(4):387-98.

Krebes M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Martin N, et al. Mechanism of Amino Acid-Induced Skeletal Muscle Insulin Resistance in Humans. Diabetes.2002; 51,599-605.

Krebes M. Amino acid-dependent modulation of glucose metabolism in humans. Eur. J. Clin. Invest.2005; 35,351-354.

Laemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature.1970; 227:680-6855.

Lancha Jr AH. Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora. São Paulo: Atheneu; 2004.

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.

Li JB e Jefferson LS. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. Biochim Biophys Acta. 1978;1;544(2):351-9. 1978.

Lima SC. A estimulação elétrica na expressão gênica do músculo gastrocnêmio desnervado de ratos. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em fisioterapia – UNIMEP, 2006, 54p.

Lu DX, Huang SK e Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. *Anatomic Recourses*.1997;248(3)355-365.

Lynch CJ, Patson BJ, Anthony J, Vaval A, Jefferson LS e Vary TC. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adpose tissue. *Am J Physiol End Metab*.2002; 283: E503-E513.

Maio R, Dichi JB e Burini RC. Conseqüências nutricionais das alterações metabólicas dos macronutrientes na doença hepática crônica. *Arq. Gastroenterol*. 2000;37: 52- 57.

Martinez RT e Morato S. Tigmotatismo e exploração em ratos adultos e filhotes. *Rev. Etol*.2004; 6(1): 1-6.

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

Nesse RM e Young EA. Evolutionary origins and functions of the stress response. In FINK G. (Ed): *Encyclopedia of Stress*. San Diego. Academic Press. 2000;2:79-84.

Newsholme P, Brennan L, Rubi B e Maechler P. New insight into amino acid metabolism β -cell fuction and diabetes. *Clin. Sci*. 2005;185-194.

Newsholme EA e Blomstrand E. Branched-Chain Amino Acid and central fatigue. *J. Nutr*.2006; 136: 274-276.

Nunes WMS e Mello MAR. Glucose Metabolism in Rats Submitted to Skeletal Muscle Denervation. *Brazilizn Archives of Biology and Technology*.2005;48(4)541-548.

Oyama T, Wakayama S. The endocrine responses to general anesthesia. *Int Anesthesiol Clin.* 1988; 26:176-181.

Papez JW. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol of Psychiatry.* 1937;38: 725-743.

Pardridge WM e Choi TB. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *Fed. Proc.* 1986;45: 2073-2078.

Pellow S, Chopin P, File S e Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. *J. Neurosci. Meth.* 1985;14:49-167.

Peng Y, Gubin J, Harper AE, Vavich MG e Kemmerer AR. Food intake regulation: Amino acid toxicity and changes in rat brain and plasma amino acid. *J. Nutr.* 1973; 103: 608-617.

Polacow MLO, Silva CA, Guirro RJ, Campos MR e Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. *Rev Bras Fisioter.* 2003; 7(1) 57-64.

Quesada I, Rovira JM, Martin F, Rovhe E, Nadal A e Soria B. Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca(2+) transients that modulate nuclear function, *PNAS.* 2002; 99(14): 9544-9.

Rafacho A, Roma LP, Tabaga SR, et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007; 85:536-45.

Ramanamurthy OS e Srikantia SG. Effects of leucine on brain serotonin. *J. Neurochem.* 1970;17 27-32.

Renner MJ e Seltzer CP. Characteristics of exploratory and investigatory behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comparative Physiol.* 1991;1051: 326-339.

Rerdon KA, Fracp BS, Davis J, Kapsa RMI, Choong P, Fracs MD e Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle . Nerve.* 2001; 24: 893-899.

Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol.* 2006; 575: 305-315.

Rogero MM e Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008; 44 (4): 563-575.

Rohlf's ICPM, Mara LS, Lima WC e Carvalho T. Relação da síndrome do excesso de treinamento com estresse, fadiga e serotonina. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 2005;11 (6): 367-372.

Rousseau JBI, Gispen WH e Spruijt BM. A comparison of various analysis parameters of locomotion patterns of rats in an open field. 2nd International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research. Gainingen, Netherlands. 1998;1-2.

Salvini TF. Plasticidade e adaptação dos músculos esqueléticos. In: MARQUES, A.P. Cadeias musculares. Um programa para ensinar avaliação fisioterapêutica global. São Paulo: MANOLE, 2000.

Schwenk WF e Haymond MW. Decreased uptake of glucose by human forearm during infusion of leucine, isoleucine, or threonine. *Diabetes*.1987; 36:199-204.

Scott AM, Atwater I e 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.

Shimomura Y, Yamamoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N et al. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J. Nutr.*2006;136(2)529S-532S.

Silva CA, Guirro RRJ, Cancelliero KM e Forti F. Tiopental Bloqueia os Canais de K⁺ ATP nas Células β Pancreáticas. *Rev. Ciênc. Méd., Campinas*.2005;14(1):33-42.

Silva ECC, Gonçalves AA, Áreas MA e Morgabel RGB. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos diabéticos. *Arq. Bras. Cardiol.* 2008; 90 (4): 254-260.

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

Sizer FS e Whitney EN. *Nutrição: conceitos e controvérsias*. São Paulo: Manole; 2003.

Smith J, Goldsmith C, Ward A e Ledieu R. IGF-II ameliorates the dystrophic phenotype and coordinately down-regulates programmed cell death. *Cell Death Differ.*2000; 7: 1109–1118.

Sowell MO, Borggs KP, Robinson KA, Dutton SL e Buse MG. Effects of insulin and phospholipase C in control and denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1991; 260(2 PT1):E247-56.

Talmadge RJ. Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. *J Appl Physiol.* 2002; 93(4): 1487-97.

Tanaka T, Kariya Y e Hashini 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.

Tom A e Nair KS. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. *J. Nutr.* 2006 ;136 :324S-330S.

Towbin H, Staehelin T e Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 1979; 76: 4350-4354.

Vary TC, Jefferson LS e Kimball SR. Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1999; 277: E1077-E1086.

Viard P, Butcher AJ, Halet G, Davies A, Nurnberg B, Heblich F e Dolph AC. PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the membrane. *Nature Neuroscience,* 2004; 7(9):939-946.

Wagenmakers AJM, Beckers EJ, Brouns F, Kuipers H, Soeters PB, Van Der Vusse GJ e Saris WHM. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *American Journal of Physiology.* 1991;260:883-90.

Weissmen C e Hollinger I. Modifying systemic responses with anesthetic techniques. *Anesth Clin N Am.* 1988; 6:221-235.

Williams MH. Facts and fallacies of purported ergogenic amino acid supplements. *Clin Sports Med.* 1999; 18(3):633-49.

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.

Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 2009;37(1):1-17.

Zangrossi HJR e File SE. Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Res Bull*. 1992;29(3-4): 381-388.