

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos propõem que a prática regular de exercícios e uma maior aptidão física estão associadas a uma menor mortalidade e melhor qualidade de vida em adultos e idosos. Os efeitos benéficos do exercício físico, principalmente do exercício de força, já estão bem estabelecidos na literatura. Estudos vêm demonstrando que o exercício de força regular promove efeitos positivos como ganho de força e massa muscular, diminuição da porcentagem de gordura corporal, aumento da densidade mineral óssea, melhora na homeostase de glicose e do perfil lipídico. Além disso, existe um consenso na literatura sobre os benefícios para redução dos fatores de risco ligados a doenças cardiovasculares (RIQUE et al., 2002), ao Diabetes Melitus Tipo 2 (CASTANEDA et al., 2002), à Osteoporose (HURLEY; ROTH, 2000), bem como para manutenção da massa magra (RENNIE et al., 2003), melhoria do equilíbrio e preservação da capacidade funcional (HURLEY; ROTH, 2000).

O ganho de massa muscular induzido pelo exercício de força é um fenômeno complexo que depende de diversos sistemas fisiológicos e vias de sinalização. O estímulo mecânico é amplamente conhecido por induzir adaptações na musculatura esquelética modulando as vias de sinalização celular envolvidas na maquinaria de síntese e degradação proteica (SPIERING et al., 2008; BURD et al., 2010). Diversas evidências têm apontado que a via de sinalização da proteína quinase chamada *mammalian target of rapamycin* (mTOR) é a maior reguladora da síntese proteica muscular. As alterações ocasionadas pelo estímulo mecânico se devem, em parte, ao aumento ou inibição na quantidade de proteína sintetizada por molécula de RNA mensageiro (mRNA), refletindo no produto total (cronicamente) ou aumento da fosforilação (agudamente) da proteína sintetizada. Particularmente com o exercício de força, a tradução do sinal mecânico em biológico se dá pelo processo chamado de “mecanotransdução”, onde proteínas de membrana sensíveis à sobrecarga mecânica sinalizam às vias de tradução proteica. A eficácia da tradução proteica se dá majoritariamente no processo de iniciação onde ocorre a ligação da maquinaria de tradução (subunidades ribossomais) ao mRNA. De um modo funcional, essas alterações levam a célula a um balanço proteico positivo e, consequentemente,

resultam em aumento de material contrátil (hipertrofia) e ganho de força (SPIERING et al., 2008; BURD et al., 2010; TERZIS et al., 2010).

Do ponto de vista nutricional, sabe-se que a ingestão ou infusão de aminoácidos estimula o aumento na síntese proteica muscular após o exercício de força. Os aminoácidos essenciais (EAA) são considerados os principais responsáveis pela estimulação da síntese proteica muscular, sem necessidade aparente dos aminoácidos não essenciais. (SMITH et al., 1998; TIPTON et al. 1999; BORSHEIM et al. 2002; VOLPI et al. 2003). Diversos estudos vêm demonstrando que dentre esses aminoácidos, os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), em particular a leucina, são os mais potentes, por apresentarem potencial anabólico estimulando o início do processo de tradução proteica e da sinalização celular via cascata da mTOR (ANTHONY et al. 2000; DREYER et al., 2006). Alguns autores descrevem que os BCAA também possuem efeitos na atenuação da degradação proteica muscular via modulação do sistema ubiquitina-proteassoma. Estudos recentes vêm postulando que a suplementação de BCAA também poderia ter efeitos sobre o remodelamento muscular por, possivelmente, ser capaz de modular indiretamente o balanço inflamatório de humanos (NICASTRO; DA LUZ et al., 2012). Os BCAA poderiam modular indiretamente o estado inflamatório da célula muscular através da produção de glutamina e consequentemente afetar a via de sinalização mTOR através de proteínas envolvidas nas etapas iniciais da tradução (SANDRI, 2008). Adicionalmente, a suplementação de leucina poderia ainda atenuar o processo de oxidação proteica (catabolismo), uma vez que ofertando tal aminoácido há aumento do produto de sua transaminação, o metabólito alfa-ceto-isocaproato (α -KIC). O α -KIC é amplamente conhecido por inibir a atividade enzimática do complexo de desidrogenação dos ceto-ácidos de cadeia ramificada (BCKDH), o qual aumenta a oxidação dos BCAA. Assim, a suplementação de leucina também poderia exercer efeito sobre o *turnover* proteico por diminuir a oxidação e favorecer a sarcomerogênese muscular (CYNOBER, 2006; HARRIS et al., 2005; HUTSON et al., 2005). Contudo, há relatos recentes na literatura em humanos, demonstrando que a suplementação isolada de leucina pode causar um desbalanço na concentração de aminoácidos plasmáticos, sugerindo então um possível efeito antagônico sobre a aminoacidemia. Alguns autores especulam que esse efeito poderia influenciar os

processos de síntese proteica muscular. Porém, não há estudos que comprovem os efeitos do possível desbalanço na concentração de aminoácidos sobre as vias de síntese e degradação proteica e sobre os ganhos de massa e força muscular (VERHOEVEN et al., 2009; LEENDERS et al., 2011; NICASTRO et al., 2011).

Tendo em vista que ambas as estratégias apresentam potencial anabólico e anti-proteolítico, a suplementação de BCAA poderia apresentar efeito potencial sinérgico ao exercício de força sobre as vias de síntese proteica. Ainda, considerando que indivíduos não engajados em um programa de exercício de força sofrem aumento na expressão dos marcadores celulares de degradação proteica após a primeira sessão de exercício (MASCHER et al., 2008), a suplementação poderia atenuar o quadro catabólico de modo a favorecer o remodelamento muscular. Uma vez que o processo inflamatório apresenta forte relação com tais vias e desempenha papel fundamental na adaptação morfológica e funcional da musculatura esquelética, é digno de nota investigar se a suplementação possui efeito sobre tal resposta. Embora a suplementação de leucina tenha sido amplamente investigada, uma vez que a sua taxa anabólica é maior quando comparada a isoleucina e valina, a suplementação isolada tem demonstrado efeitos antagônicos sobre a concentração plasmática de aminoácidos (especialmente de isoleucina e valina). Assim, o uso deste aminoácido dentro do composto BCAA poderia exercer uma melhor ação sobre as vias de remodelamento muscular em comparação a administração isolada (VERHOEVEN et al., 2009; LEENDERS et al., 2011; NICASTRO et al., 2011).

A partir dos dados supracitados, o objetivo do presente estudo é comparar os efeitos da suplementação de BCAA e leucina isolada sobre as vias de síntese proteica musculares no exercício de força mensurando fatores sistêmicos, teciduais, e moleculares. A ação destes aminoácidos sobre a sinalização celular poderia contribuir no balanço proteico favorecendo assim a adaptação tecidual e funcional do músculo esquelético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EFEITOS DO EXERCÍCIO DE FORÇA NAS VIAS CELULARES DE REMODELAMENTO MUSCULAR

A musculatura esquelética é conhecida como o maior tecido corporal representando aproximadamente 50% do peso corporal total (NADER et al., 2001; SANTOS et al., 2004). O músculo esquelético é um tecido altamente “plástico”, capaz de se adaptar a condições adversas e diversos estímulos. Tal característica intrínseca de adaptação é fundamental e assegura a sobrevivência de muitas espécies, uma vez que um vasto número de imposições ambientais pode ser superado por meio de tais respostas adaptativas. As duas principais alterações promovidas pelo estímulo mecânico são o remodelamento muscular (alteração na massa/volume do tecido muscular) e mudanças na maquinaria molecular da célula muscular (alterações de fenótipo na expressão das isoformas de miosina de cadeia pesada, importantes constituintes do músculo esquelético). Tais respostas permitem ao tecido muscular se adaptar as propriedades contráteis e sofrer ganhos funcionais em força e potência musculares (BOOTH; BALDWIN, 1966).

As células musculares adultas não são susceptíveis ao processo de divisão celular por mitose. Em vista disso, os mecanismos adaptativos que induzem o acúmulo de proteínas miofibrilares, por meio da síntese aumentada ou da degradação diminuída nas fibras pré-existentes, são os mais prováveis candidatos no controle do remodelamento muscular. A hipertrofia muscular esquelética é conhecida pelo aumento da área de secção transversa do músculo esquelético a partir da biossíntese de novas estruturas envolvidas na contração muscular, sendo uma das principais adaptações geradas no músculo em decorrência do treinamento físico (GOLDSPINK et al., 1992; GLASS et al., 2005). O crescimento muscular é um fenômeno complexo que ocorre por meio de uma cascata sequencial que envolve: ativação muscular; eventos de sinalização resultantes da deformação mecânica das fibras musculares, hormônios, e respostas imunes; síntese de proteína devido ao aumento dos processos de transcrição e tradução; e hipertrofia das fibras musculares (SPIERING et al., 2008).

A deformação mecânica das fibras musculares causadas pela contração estimula várias vias de sinalização muscular independente da liberação de fatores de crescimento e hormônios. Em particular, a deformação mecânica ativa as vias da proteína quinase B (proteína quinase regulada por fosfatidilinositol, Akt, também conhecida como PKB), a proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* -mTOR), proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (SPIERING et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a via da mTOR possui papel fundamental no controle do tamanho célula muscular, uma vez que o processo de remodelamento em resposta ao estímulo mecânico pode depender de sua atividade (BODINE et al., 2001; HORNBERGER et al., 2003; PALLAFACCHINA et al., 2002; REYNOLDS et al., 2002). Digno de nota, a proteína mTOR parece não modular a composição de fibras do músculo esquelético, demonstrando seu papel específico no controle de massa/volume da célula muscular (PALLAFACCHINA et al., 2002).

A via da mTOR controla os mecanismos de síntese proteica por meio da capacidade e eficiência do processo de tradução. Isso se dá pelo aumento da tradução de mRNAs específicos, levando a fibra muscular ao aumento de tamanho/volume. Sua ativação ocorre por meio da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3k), que é considerada crucial para a ativação de Akt (STOKOE et al., 1997), culminando na ativação dos seus efetores: a proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDa (p70s6k), do fator de iniciação da tradução eucariótico 4E (eIF4E) e da proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1). Tal processo ocorre em condições de sobrecarga (BODINE et al., 2001; DELDICQUE et al., 2005). Dessa forma, embora os mecanismos ainda não sejam completamente elucidados, o exercício de força é capaz de estimular a via mTOR (PI3k/Akt/mTOR/p70s6k e 4E-BP1).

Embora a deformação mecânica seja capaz de ativar as vias de sinalização de forma independente, sabe-se que os fatores autócrinos/parácrinos liberados pelo músculo esquelético em resposta ao exercício de força representam forte estímulo para o processo de hipertrofia por meio da via mTOR (SCOTT et al., 1998; NAVE et al., 1999; ROMMEL et al., 2001; OHANNA et al., 2005). Entretanto, estes fatores tais como o fator de crescimento similar a insulina (IGF-1) e o fator de crescimento

mecânico (MGF), parecem ser responsáveis pela resposta tardia da ativação da via (HADDAD; ADAMS, 2002; RENNIE; WACKERHAGE, 2003). Em contraste, a via da mTOR parece ser ativada imediatamente após o exercício de força (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL; 2004). Assim, a ativação mediada pelo estímulo mecânico parece ser mais complexa em decorrência dos fatores de crescimento, uma vez que elementos dentro da via mTOR podem responder de modo não linear (por exemplo, não necessariamente via PI3k/Akt/mTOR/p70s6k) de acordo com as variáveis do exercício (volume, intensidade, número de exercício, tipo de contração, intervalo de repouso). Assim, os mecanismos imediatos de sinalização celulares induzidos pelo exercício de força *per se* também são alvos de regulação do remodelamento muscular (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL; 2004).

Outro mecanismo um tanto quanto divergente na literatura é a ativação da proteína quinase Akt pelo próprio estímulo mecânico e/ou por fatores de crescimento. A investigação da ativação desta proteína é digna de nota uma vez que além de modular a síntese via mTOR, também atua no controle da degradação proteica muscular. A sinalização da Akt inibe o fator de transcrição FoxO (*forked head o box*), o qual inibe o aumento na transcrição dos atrogenes atrogina-1 e MuRF-1 (*muscle ring finger 1*) que, dentre inúmeras funções, atuam como ubiquitinas ligases marcando proteínas miofibrilares para serem degradadas pela estrutura multicatalítica denominada proteassoma (SPIERING et al., 2008; MASCHER et al., 2008). Entretanto, em resposta ao exercício de força agudo, a importância dos mecanismos dependentes de PI3k/Akt para ativação de mTOR é um tanto quanto controverso. Hornberger et al. (2003) demonstraram que a ativação de mTOR em resposta ao exercício de força pode ocorrer independentemente das proteínas PI3k/Akt. Desse modo, a ativação da proteína mTOR em resposta ao exercício de força pode ocorrer com ou sem ativação das proteínas PI3k/Akt dependendo das características estímulo mecânico aplicado. Por exemplo, a variável intensidade parece ser determinante na ativação de Akt. Embora não seja consenso, alguns estudos observaram que o exercício de força de alta intensidade promove ativação significativa desta proteína (SAKAMOTO et al., 2002; ATHERTON et al., 2005; DREYER et al., 2006). Outra explicação está no fato que a manipulação das variáveis intensidade e duração do exercício pode promover respostas

divergentes no nível de insulina plasmática que pode, em parte, interferir na ativação de Akt (SAKAMOTO et al., 2002).

No tocante a degradação proteica muscular, Léger et al. (2006) observaram que indivíduos cronicamente exercitados apresentam não só aumentos na fosforilação da proteína quinase Akt, mas também uma marcante diminuição na expressão proteica do referido fator de transcrição FoxO. Tal resultado foi confirmado por Mascher et al. (2008), que não observaram alteração na expressão gênica de atrogina-1 após 2 sessões de exercício de força. Em contrapartida, a expressão do gene MuRF-1 aumentou significativamente após a primeira sessão de exercício e diminuiu em 30% após a segunda sessão. Portanto, o exercício de força agudo parece promover aumento na expressão de alguns componentes da maquinaria proteolítica e a repetição do estímulo mecânico parece exercer um efeito protetor sobre o processo catabólico (efeito da carga repetida). Entretanto, estudos realizados em modelo animal encontraram comportamento distinto da expressão gênica dos atrogenes (HADDAD et al., 2006; ZANCHI et al., 2009). Tal diferença pode ser atribuída as variáveis do estímulo mecânico aplicado, diferença entre as espécies e, principalmente, aos modelos não voluntários de exercício para modelo animal.

No entanto, para que esses processos ocorram é essencial que, além do estímulo mecânico, uma interpretação biológica ocorra. Juntos, esses eventos são chamados de “mecanotransdução”. O músculo esquelético é um tecido intrinsecamente responsivo ao estímulo mecânico sendo, portanto, chamada de “mecanócito” (GOLSPINK; BOOTH, 1992). Isso sugere que mediadores sensitivos ao exercício são passíveis de promover processos de transdução de sinal, mediando o remodelamento celular e as respostas metabólicas adaptativas na maquinaria contrátil. Assim, a mecanotransdução pode ser definida como o mecanismo pelo qual a célula muscular converte o sinal mecânico em resposta biológica (HORNBERGER; CHIEN, 2006).

Nesse contexto, uma das substâncias capazes de ativar a proteína mTOR é o ácido fosfatídico (PA), um segundo mensageiro lipídico que atua em diversos sistemas de sinalização celular (mitogênese, processos secretórios, reorganização do citoesqueleto celular). A ativação do PA depende da enzima fosfolipase D (PLD), a qual hidrolisa a fosfatidilcolina em PA e colina (HONG et al., 2001). Uma vez

sintetizado, o PA se liga ao domínio FRB da proteína mTOR e estimula a atividade da proteína p70s6k (FANG et al., 2003). Vários sistemas de mecanotransdução também utilizam proteínas/receptores de membrana sensíveis ao estímulo mecânico, convertendo-o em eventos moleculares (INGBER, 2006). No músculo esquelético, estruturas conhecidas como costâmeros desempenham importante papel na transmissão de força (BLOCH; GONZALES-SERRATOS, 2003; ERVASTI, 2003). Especificamente, os costâmeros são compostos por diversas proteínas estruturais que são expressas em intervalos regulares dentro da fibra muscular. Considerando o papel central da matriz celular na transmissão de força nos tecidos, as estruturas que a conectam com a membrana da célula muscular são consideradas mecanoreceptores (INGBER, 2006). Uma classe de proteínas que constituem os costâmeros e ligam elementos da matriz extracelular na membrana celular são as integrinas, descritas por participarem da ativação da proteína mTOR em resposta ao exercício de força. Além disso, as integrinas estão envolvidas na preservação estrutural do músculo esquelético, exercendo ação protetora a danos crônicos causados pelo exercício de força (PHILLIPS et al., 2002; MAYER, 2003).

O exercício de força também pode iniciar uma resposta inflamatória, caracterizada pelo acúmulo de macrófagos e neutrófilos na célula muscular que podem influenciar o processo de hipertrofia por meio da fagocitose, produção de radicais livres, citocinas e fatores de crescimento (KOH; PIZZA, 2009). Algumas citocinas produzidas por macrófagos e neutrófilos amplificam a resposta inflamatória. Estas citocinas/interleucinas (IL) podem agir como pró-inflamatórias (IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), fator de crescimento transformante- β (TGF- β)) ou anti-inflamatórias (IL-4, IL-6, IL-10) (KOH; PIZZA, 2009). A ação destas citocinas sobre o remodelamento muscular é evidente, uma vez que o estado pró-inflamatório pode gerar um quadro de resistência à ação do hormônio insulina por meio de menor ativação da proteína Akt, o que levaria a menor resposta anabólica e desibinição parcial da maquinaria de degradação (DAN; BALDWIN, 2008). Em quadros catabólicos (sepse, câncer, caquexia) citocinas são conhecidas por contribuir substancialmente para perda de massa muscular (MURTON et al., 2008). Adicionalmente, as citocinas pró-inflamatórias têm sido associadas com mediadores da proteólise dependente do sistema ubiquitina-proteasoma (GARCIA-MARTINEZ et al., 1995; JANSSEN et al., 2005). Embora, o

dano muscular e os processos inflamatórios caracterizados pelo aumento das concentrações de TNF- α possam inibir a sinalização celular via Akt, estudos vem demonstrando que o exercício a longo prazo poderia suprimir a expressão de TNF- α no músculo, promovendo um ambiente anabólico. Adicionalmente, estudos recentes têm demonstrado que a resposta inflamatória pode ser necessária para o reparo e adaptação musculares uma vez que ativa as células satélites (LAPOINTE et al., 2002; TRAPPE et al., 2002; BONDESEN et al., 2004; SHEN et al., 2005; SOLTOW et al., 2006). Portanto, o entendimento da interação das vias inflamatórias com as de síntese e degradação proteica é de vital importância para favorecer as adaptações musculares e, conseqüentemente, adequar o estímulo mecânico aplicado.

2.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE BCAA NAS VIAS CELULARES DE REMODELAMENTO MUSCULAR

Os BCAA são três dos nove aminoácidos que não podem ser sintetizados pelo organismo, devendo, portanto, ser obtidos pela dieta. Contemplam de 35-40% da ingestão diária de aminoácidos essenciais e correspondem cerca de 35% dos aminoácidos essenciais em proteínas musculares (MARCHINI et al., 1998; WAGENMAKERS, 1998). A concentração plasmática média de leucina, valina e isoleucina, são de 120, 220 e 63 $\mu\text{mol/L}$; concentração intramuscular na forma livre média de 133, 253 e 68 $\mu\text{mol/L}$ de água intracelular; e concentração na proteína muscular humana de 59,5, 43,5 e 41,9 mmol/100 g de proteína. Estudos recentes realizados tanto em ratos como em humanos verificaram a existência de uma relação entre a dose-resposta e concentração plasmática de aminoácidos (particularmente a leucina) e o balanço proteico muscular. Esses estudos concluem que em condições normais, uma única refeição parece promover efeitos máximos na síntese proteica uma vez que a concentração plasmática de leucina pode dobrar após a refeição (0,1 mM para 0,2 mM). Esse valor parece ser capaz de promover aumentos máximos na síntese proteica e na saturação do sistema (DIVINO FILHO et al., 1997; DARDEVET et al., 2000; BOHÉ et al., 2003). Até meados de 2012 os estudos não demonstravam nenhum efeito colateral nem valores de limite de ingestão máxima tolerável para suplementação de BCAA e leucina. Estudos recentes demonstraram que doses acima de 550 mg/kg de peso corporal/dia ou 39

g/dia podem demonstrar um risco a saúde (CYNOBER et al., 2012; PENCHARZ; ELANGO; BALL, 2012).

Já vem sendo amplamente demonstrado na literatura que em indivíduos adultos os BCAA apresentam papel fundamental na regulação de processos anabólicos, envolvendo tanto as vias de síntese quanto as de degradação proteica muscular. Adicionalmente, estudos recentes vêm relacionando o uso desses aminoácidos com alguns efeitos terapêuticos, uma vez que possivelmente possuem efeitos na atenuação da perda de massa muscular durante a redução de peso corporal; melhoram o balanço proteico muscular em idosos; e propiciam efeitos benéficos no tratamento de patologias hepáticas e renais (SHIMOMURA et al., 2006a; TOM; NAIR, 2006). No âmbito esportivo, os BCAA são frequentemente utilizados por atletas com a finalidade de promover anabolismo proteico muscular, atenuar a fadiga central, estimular a secreção de insulina, melhorar os processos imunológicos e atenuar a lesão muscular induzida pelo exercício (DA LUZ et al., 2012; SHIMOMURA et al., 2006a) .

No que concerne o metabolismo dos BCAA, vale ressaltar que diferentemente dos outros aminoácidos, o sistema enzimático mais ativo para a oxidação encontra-se no músculo esquelético ao invés do fígado. Apesar do fígado não poder diretamente catabolizar os BCAA, o mesmo apresenta um sistema muito ativo para a degradação dos cetoácidos de cadeia ramificada oriundos da primeira reação envolvida no catabolismo desses aminoácidos (SHIMOMURA et al., 2006a; SHIMOMURA et al., 2006b; SHIMOMURA; HARRIS, 2006).

Durante o exercício físico os BCAA são preferencialmente oxidados e a primeira reação envolvida no catabolismo consiste na reação de transaminação pelas isoenzimas BCAT (*branched-chain amino acid transaminase* - enzimas dependentes de vitamina B6), onde os aminoácidos são convertidos em seus respectivos cetoácidos, sendo o cetoácido da leucina o alfa-ceto-isocaproato (α -KIC). Os cetoácidos formados podem sofrer reações de descarboxilação oxidativa e/ou serem liberados na corrente sanguínea podendo ser captados por diferentes tecidos aonde são ressintetizados à BCAA ou oxidados. O grupamento amina do BCAA pode ser incorporado ao alfa- cetoglutarato (α -KG) produzindo glutamato através da ação da enzima glutamato desidrogenase (GDH). O glutamato pode perder o grupamento amina para o oxalacetato (OAA) produzindo aspartato que pode ser utilizado no ciclo

para regeneração da adenosina monofosfato (AMP) a partir do ácido inosínico. O glutamato formado também pode ser metabolizado pela enzima glutamina sintetase produzindo glutamina (HARPER; MILLER; BLOCK, 1984; NICASTRO; DA LUZ et al., 2012). Desse modo, a transaminação dos BCAA fornece mecanismos para transferir o nitrogênio dos BCAA de acordo com a necessidade do tecido por glutamato e outros aminoácidos não-essenciais. (HARRIS et al., 2005; CYNOBER; HARRIS, 2006; HUTSON; SWEATT; LANOUE, 2005). Posteriormente à segunda etapa do catabolismo dos BCAA, os produtos dessa reação – derivados de acil-CoA de cadeia ramificada – sofrem oxidação por meio de diferentes desidrogenases. Após essa etapa, as vias catabólicas de cada um dos BCAA passam a ser distintas. A leucina é considerada cetogênica, uma vez que forma acetil-CoA e acetoacetato. A valina é considerada glicogênica, devido ao fato de ser convertida a um intermediário do Ciclo de Krebs, o succinil-CoA. A isoleucina é considerada glicogênica e cetogênica, por ser convertida a acetoacetato e a succinato via metilmalonil-CoA. (HARPER; MILLER; BLOCK, 1984; BROSNAN; BROSNAN, 2006).

Dentre os BCAA, a leucina tem sido amplamente investigada, uma vez que a sua taxa de oxidação é maior quando comparada a isoleucina e valina e por possuir a capacidade de estimular a síntese proteica muscular. Ainda, sua suplementação é relacionada com a liberação de precursores gliconeogênicos como a alanina a partir do tecido muscular. A leucina também exerce os seus efeitos em nível pós-traducional durante a fase de iniciação da tradução do mRNA em proteína, sendo o mecanismo relacionado ao fato da ativação da proteína quinase mTOR e também por meio de três proteínas regulatórias chaves: p70S6k, 4E-BP1 e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (MERO, 1999; ANTHONY et al., 2002; CYNOBER & HARRIS, 2006; HARRIS et al., 2004; HARRIS et al., 2005; HUTSON et al., 2005; SHIMOMURA et al., 2006a; SHIMOMURA et al., 2006b; SHIMOMURA; HARRIS, 2006).

A via de sinalização regulada pela proteína com atividade serina/treonina quinase mTOR é considerada de extrema importância no controle da síntese proteica muscular (ZANCHI; LANCHÁ JUNIOR, 2008). Após a ingestão do aminoácido leucina a síntese proteica sofre incremento paralelamente à ativação/fosforilação da proteína p70s6k (GARLICK, 2005). Em adição, outros

efetores da via mTOR são ativados em resposta à estímulos anabólicos, como a suplementação com aminoácidos. Entre estes, pode-se destacar o aumento na fosforilação de 4EBP-1, o qual ativa o processo de síntese proteica através da liberação do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), favorecendo a formação do complexo eIF4F e a conseqüente interação do mRNA com a subunidade ribossomal 40S, dando início ao processo de tradução (TEE; BLENIS, 2005). Dessa forma, a ativação da via mTOR parece ser fundamental no controle da síntese proteica quando estimulada por BCAA (ANTHONY et al., 2002; GARLICK, 2005; ZANCHI ; LANCHÁ JUNIOR, 2008).

Já vem sendo amplamente demonstrado que a leucina possui um papel importante na homeostase de glicose por exercer efeitos agudos e crônicos nas células β pancreáticas, músculo, fígado e tecido adiposo. A leucina é considerada um potente secretagogo de insulina, pois é capaz de estimular agudamente a secreção de insulina nas células β pancreáticas servindo de combustível metabólico e ativador alostérico da enzima glutamato desidrogenase (YANG et al., 2010). Estudos vêm demonstrando que a administração oral de leucina produz um aumento transitório na concentração de insulina plasmática cerca de 40 a 60 minutos após a ingestão (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL; 2004; ANTHONY et al., 2002, POWER et al., 2009). A insulina é considerada um hormônio anabólico que possui efeito sinérgico à ingestão de leucina no controle da síntese proteica muscular. Porém, vale ressaltar que a insulina de modo isolado não é suficiente para estimular a síntese proteica muscular no estado pós-absortivo, sendo necessária a ingestão de proteínas ou de aminoácidos para estimular as taxas de síntese proteica. Estudos vêm propondo que o efeito da insulina no estímulo da síntese proteica muscular esteja relacionado ao papel desse hormônio em potencializar o sistema de tradução de proteínas, ao invés de regular diretamente tal processo (NORTON; LAYMAN, 2006).

Além de estimular as vias de sinalização de síntese proteica muscular, a leucina também possui efeitos na modulação dos processos de degradação proteica muscular, por possivelmente inibir a atividade da subunidade 20S do sistema ubiquitina-proteassoma. Estudos recentes têm demonstrado que a atividade do proteassoma é importante no controle de qualidade da célula muscular, o que confere maior funcionalidade tecidual. Dessa forma, uma estratégia interessante na

atenuação da perda de massa muscular estaria na menor expressão dos atrogenes (atrofina-1 e MURF-1) os quais são responsáveis pela marcação de proteínas miofibrilares para degradação. Em contrapartida, há autores que defendem a teoria de que os atrogenes podem contribuir para o remodelamento muscular na incorporação de isoformas de miosina. Borgenvik et al. (2012) foi o primeiro estudo a demonstrar que a suplementação de BCAA possui efeitos tanto na estimulação das vias de síntese mas também exerce efeitos nas vias de degradação proteica muscular. Os autores demonstraram que a suplementação aguda de BCAA após uma sessão de exercício de força teve efeitos sobre a expressão dos atrogenes, reduzindo a expressão do mRNA de atrofina e atenuando o aumento na expressão de MURF-1 em indivíduos jovens. Porém, em humanos há escassez de dados demonstrando os efeitos da suplementação de BCAA na expressão dos atrogenes e da atividade do proteassoma no músculo esquelético e a consequência da inibição deste sistema sobre o remodelamento celular.

Estudos recentes vêm postulando que os BCAA também poderiam ter efeitos sobre o remodelamento muscular por, possivelmente, ser capaz de modular indiretamente o balanço inflamatório de humanos. Os BCAA poderiam modular indiretamente o estado inflamatório da célula muscular através da produção de glutamina em condições caracterizadas por um consumo de glutamina elevado e/ou diminuição na concentração de glutamato. Já vem sendo amplamente demonstrado na literatura que a disponibilidade de glutamina influencia a produção de citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 10 (IL-10) e interferon gama (IFN- γ). Estudos demonstraram que as concentrações de glutamina também possuem um papel importante na via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B possui ação semelhante ao fator de transcrição FoxO, que modula expressão gênica de MURF-1 promovendo a degradação proteica pela ação do sistema ubiquitina-proteassoma e também modulando a expressão gênica de diversas citocinas. Estudos demonstraram que existe uma correlação significativa das concentrações de IL-1 β com a área de secção transversa da musculatura esquelética podendo, portanto, ser considerada como um modulador atrofico (LI et al., 2009). O NF- κ B também possui efeitos sobre a transcrição da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS), que pode levar à um quadro de resistência à insulina através nitrosilação do receptor de insulina (IR) (FOUAD et al., 2004; YASUKAWA et al.,

2005). Sob tais condições, a via de tradução mTOR pode ter seu sinal prejudicado através de proteínas envolvidas nas etapas iniciais da tradução, tais como substratos do receptor de insulina (IRS), Akt, e 4E-BP1 (SANDRI, 2008). Portanto, a inflamação pode modular o remodelamento muscular através tanto das vias sintéticas como catabólicas.

2.3 EFEITOS DO EXERCÍCIO DE FORÇA E DA SUPLEMENTAÇÃO DE BCAA NAS VIAS CELULARES DE REMODELAMENTO MUSCULAR EM HUMANOS

Estudos recentes demonstraram os efeitos da suplementação aguda de BCAA sobre as vias de remodelamento muscular. Karlsson et al. (2004) realizaram um estudo randomizado, duplo-cego e *cross-over* com o objetivo de investigar o efeito do treinamento de força isolado ou combinado com a suplementação de BCAA na fosforilação de proteínas envolvidas na síntese proteica muscular. O protocolo de exercício de força consistia de 4 séries de 10 repetições a 80% de 1RM no *leg press* em duas ocasiões. O protocolo de suplementação consistia em ofertar 150 mL de solução placebo (água com sabor) ou BCAA (45% de leucina, 30% de valina e 25% de isoleucina) totalizando 100 mg/kg de BCAA. Os sujeitos consumiram o suplemento antes do aquecimento, imediatamente antes do protocolo de exercício, durante o exercício, imediatamente após, 15, 30, 60 e 90 minutos no período de recuperação. O exercício gerou um aumento significativo na fosforilação de p70S6k^{Ser424} e p70S6k^{Thr421} o qual persistiu até 2 horas após o término da sessão de exercício. A suplementação de BCAA aumentou este padrão de fosforilação em 3,5 vezes no período de recuperação, sendo que a fosforilação de p70S6k^{Thr389} aumentou somente no grupo suplementado com BCAA.

O mesmo grupo de pesquisa realizou um estudo randomizado, duplo-cego e *cross-over* com o objetivo de distinguir a influência do exercício de força e da suplementação de BCAA na expressão de proteínas envolvidas na regulação da síntese proteica. Os voluntários realizaram duas sessões de exercício de força unilateral separadas por um intervalo de 1 mês. O protocolo de exercício foi

realizado em *leg press* e consistia em 4 séries de 10 repetições a 80% de 1RM, seguida de 4 séries de 15 repetições a 65% de 1RM, com intervalo de 5 minutos entre as séries. Os sujeitos ingeriram 150 mL de uma solução contendo uma mistura de BCAA (45% de leucina, 30% de valina e 25% de isoleucina) totalizando 85 mg/kg de BCAA ou uma solução de água com sabor antes do aquecimento, imediatamente antes do protocolo de exercício, após a quarta série de exercício, imediatamente após, 15 e 45 minutos no período de recuperação. Os autores observaram que independente da suplementação, a fosforilação de mTOR^{Ser2448} aumentou significativamente em ambas as pernas após o exercício. A fosforilação de p70s6k^{Thr389} aumentou somente com a suplementação de BCAA cerca de 11 e 30 vezes imediatamente e 1 hora após a sessão de exercício em relação à perna não exercitada. Surpreendentemente, a fosforilação de p70S6k^{Thr389} na perna não exercitada aumentou 5 e 16 vezes imediatamente e 1 hora após a sessão de exercício em relação ao repouso. A fosforilação do fator de alongamento eucariótico 2 foi atenuado 1 hora após a sessão de exercício tanto na perna controle (10-40%) como na perna exercitada (30-50%) em ambas condições (APRO; BLOMSTRAND, 2010).

Embora estes dois estudos tenham apresentado resultados que indiquem um possível aumento na massa muscular em longo prazo, a evidência é indireta uma vez que não foram mensurados padrões funcionais, ou seja, a síntese proteica dinâmica. Em estudo recente realizado por Dreyer et al (2008) com voluntários do sexo masculino e sedentários, 2 grupos foram randomizados (controle e aminoácidos essenciais mais carboidrato) a fim de investigar os mecanismos de aumento de síntese proteica muscular observados com a ingestão de nutrientes no período pós exercício. A solução de carboidrato e aminoácidos essenciais continha 35% de leucina, 8% de isoleucina, 10% de valina e 0,5 g/kg de massa magra de sacarose. Os indivíduos receberam a suplementação 1 hora após a sessão de exercício. O protocolo de exercício em cadeira extensora consistia em 10 séries de 10 repetições a 80% de 1RM com intervalo 3 minutos entre as séries. Os autores observaram que a síntese proteica muscular dinâmica estava elevada em ambos os grupos 1 hora após a sessão de exercício na mesma magnitude. Porém, com 2 horas após a sessão de exercício a síntese encontrava-se mais elevada no grupo suplementado. Esse aumento foi associado com maior fosforilação de mTOR^{Ser2448} e

S6K1. A fosforilação de Akt^{Ser473} aumentou 1 hora após o exercício e retornou aos níveis basais 2 horas após no grupo controle, mas manteve-se elevada no grupo suplementado. Da mesma forma, a fosforilação de 4E-BP1^{Thr37/46} se manteve elevada somente no grupo suplementado.

Recentemente, Churchward-Venne et al. (2012) avaliaram agudamente se a suplementação de leucina (3,0 g) seria um fator limitante no estímulo da síntese proteica muscular no repouso e após o exercício de força. Para tanto, 3 protocolos de suplementação foram avaliados: *whey protein* (25 g com 3 g de leucina), leucina (6,25 g de *whey protein* com 3,0 g de leucina) e aminoácidos essenciais (6,25 g de *whey protein* com 0,75 g de leucina). Os autores observaram que, no repouso, a síntese proteica muscular apresentou comportamento similar em resposta as três intervenções (aumento no período de 1-3 horas e retorno aos níveis basais no período de 3-5 horas). Já em associação ao exercício de força, ambas as intervenções apresentaram similaridade no estímulo da síntese proteica no período de 1-3 horas. Porém, somente a suplementação de *whey protein* manteve tal incremento na síntese muscular no período de 3-5 horas. Estes dados confirmam resultados prévios que descrevem o músculo esquelético como refratário (resistente) a aminoácidos. Ou seja, a oferta de 25 g de *whey protein* é capaz de saturar os mecanismos de síntese proteica muscular por pelo menos 5 horas. Entretanto, com a oferta de leucina este efeito parece não existir uma vez que a síntese proteica retorna aos níveis basais no período de 3-5 horas. Portanto, a suplementação de leucina em combinação ao exercício de força estimula a síntese proteica na mesma magnitude que um composto protéico de alto valor biológico. Porém, o tempo de latência deste efeito é menor, o que exige que o consumo seja fracionado ao longo do dia.

3. JUSTIFICATIVA

Embora a suplementação de BCAA sobre o remodelamento da musculatura esquelética tenha sido investigada, há escassez de estudos bem controlados que comparem a suplementação de BCAA e da leucina isolada como sinérgicos ao exercício de força. Adicionalmente, a literatura não correlaciona os efeitos destes compostos sobre as vias inflamatórias com a síntese proteica muscular em humanos.

Como hipótese central, a suplementação de BCAA poderia promover efeito distinto da leucina isolada sobre as vias de remodelamento e sinalização celular no músculo esquelético em associação ao exercício de força, uma vez que não ocasionaria antagonismos sobre a aminoacidemia. Dessa forma, as vias de síntese proteica poderiam ser estimuladas. Considerando que esta intervenção pode promover melhor adaptação muscular em termos de balanço proteico, benefícios poderiam ser proporcionados àqueles que iniciariam programas de treinamento físico de força.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o efeito da suplementação de BCAA e leucina isolada sobre as vias de síntese proteica muscular no exercício de força mensurando fatores sistêmicos, teciduais e moleculares.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Efeito do exercício físico de força agudo sobre a expressão de proteínas envolvidas nas vias de síntese proteica e inflamação muscular e sistêmica;

b) Efeito do exercício físico de força agudo e da suplementação de BCAA sobre a expressão de proteínas envolvidas nas vias de síntese proteica e inflamação muscular e sistêmica;

c) Efeito do exercício físico de força agudo e da suplementação de leucina isolada sobre a expressão de proteínas envolvidas nas vias de síntese proteica e inflamação muscular e sistêmica;

Com tais objetivos pretende-se avaliar:

- Expressão de marcadores celulares de síntese proteica;
- Expressão de marcadores e sistêmicos e celulares de inflamação (citocinas);

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Este projeto foi conduzido como um estudo aleatorizado, duplo-cego e controlado por placebo. O estudo foi inscrito no banco de ensaios aleatorizados norte-americano Clinical Trial (www.clinicaltrial.gov) sob o protocolo NCT01305018.

Antes de participarem da intervenção os sujeitos passaram por avaliação com o intuito de verificar os critérios de elegibilidade. Posteriormente, os sujeitos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: 1) Aminoácidos de Cadeia Ramificada (BCAA), 2) Leucina (LEU) e 3) Placebo (PLA).

Os voluntários foram submetidos a sessões de familiarização ao exercício de extensão de joelho até que a medida de força máxima (1RM) estivesse estabilizada. Após isso, os voluntários foram solicitados a realizar recordatório alimentar de 3 dias não consecutivos (incluindo pelo menos 1 dia do final de semana) e exame de composição corporal. Após a randomização os voluntários foram submetidos a 1 sessão de exercício de força e suplementação BCAA (leucina, isoleucina e valina), leucina ou placebo de forma isonitrogenada.

No período basal (pré), imediatamente antes, imediatamente após, 30, 60, 90 e 120 minutos após o término da sessão os voluntários realizaram coletas de sangue. Adicionalmente, os voluntários foram submetidos a biópsias musculares para análises de expressão proteica no período basal (pré), 60 e 120 minutos após o término da sessão. Para todas as coletas, os voluntários foram solicitados a comparecer ao laboratório pela manhã após 12 horas de jejum. A figura 1 ilustra o protocolo experimental do estudo.

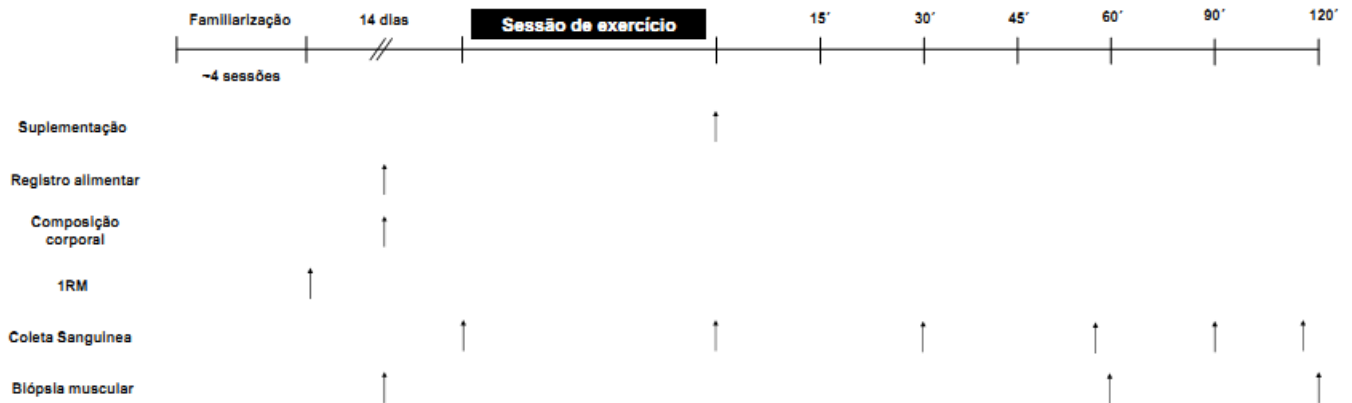


Figura 1 – Delineamento experimental do estudo. Legenda: 1RM = 1 repetição máxima.

5.2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo sob o protocolo 2011/37.

5.3 SELEÇÃO E RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS

Os candidatos elegíveis obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

- Indivíduos do gênero masculino;
- Faixa etária de 18 a 30 anos;
- Sedentários;
- Não fumantes;
- Não usuários de suplementos alimentares;
- Não relatar dificuldades em deglutir cápsulas;
- Sem acometimentos que comprometam a participação no estudo, tais como distúrbios do aparelho locomotor;

Os sujeitos selecionados foram informados sobre todos os detalhes do projeto. Além disso, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tiveram acompanhamento de educadores físicos e nutricionistas durante o projeto.

5.4 PROTOCOLO DE SUPLEMENTAÇÃO

Os suplementos foram providenciados conforme o modelo duplo-cego. Os sujeitos receberam doses de 8 g de BCAA (3,3 g leucina + 2,4 g de isoleucina + 2,4 g de valina- grupo BCAA), 3,2 g de leucina + 4,8 g de alanina (grupo LEU) ou 8 g de alanina (grupo PLA) (Ethika[®] Suplementos) entregues em cápsulas. O uso da alanina como placebo se justifica no fato que este aminoácido não estimula a síntese proteica miofibrilar e fornece a mesma carga de nitrogênio dos demais grupos. Cada sujeito consumiu a dose de suplemento conforme o protocolo experimental apresentado na figura 1. Os sujeitos consumiram o suplemento imediatamente após o término da sessão de exercício. Ao final do estudo, os sujeitos foram inquiridos acerca do suplemento ingerido. A porcentagem de acerto foi comparada entre os grupos como forma de assegurar a eficiência do vendamento.

5.5 PROTOCOLO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE FORÇA

Os sujeitos realizaram sessões de familiarização ao exercício de extensão de joelho em cadeira extensora até que a medida de força máxima (1RM) fosse estabilizada. As sessões de familiarização foram realizadas em intervalos de 48 horas. No início de todas as sessões de familiarização, os sujeitos realizaram um aquecimento de cinco minutos de corrida em esteira ergométrica (Movement[®], Bruden, São Paulo) a 9,0 km/h, seguidos de cinco minutos de alongamentos de membros inferiores e superiores.

No início de todas as sessões de familiarização, os sujeitos realizaram aquecimento com 5 a 10 repetições com carga leve (40% a 60% da percepção de 1RM). Após 1 minuto de intervalo, foi realizada uma nova série composta de 3 a 5 repetições com carga moderada (60% a 80% da percepção de 1RM).

O protocolo de exercício de força utilizado consistiu em 8 séries de 8-10 repetições máximas com intervalo de repouso de 2 minutos entre as séries. O protocolo foi iniciado a 85% 1RM e a cada série foi realizada uma redução de 5% da carga inicial. Todo procedimento acima descrito foi realizado no Laboratório de Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

5.6 FORÇA DINÂMICA MÁXIMA (1RM)

Todos os sujeitos realizaram sessões de familiarização ao exercício de extensão de joelho até que a medida de força máxima (1RM) estivesse estabilizada com um intervalo de 48 horas entre as sessões. Após as sessões de familiarização foi realizada a mensuração da força dinâmica máxima pelo teste de 1 repetição máxima (1RM) em cadeira extensora no período basal (pré). Os voluntários realizaram aquecimento com 5 a 10 repetições com carga leve (40% a 60% da percepção de 1RM). Após 1 minuto de intervalo, foi realizada uma nova série composta de 3 a 5 repetições com carga moderada (60% a 80% da percepção de 1RM). Após 2 minutos de intervalo, foram realizadas 4 a 5 tentativas para estimar a carga máxima, com 3 a 5 minutos de repouso entre cada tentativa. Os voluntários receberam constante incentivo verbal durante o teste. A realização do teste foi no Laboratório de Adaptações Neuromusculares ao Treinamento de Força da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

5.7 ANTROPOMETRIA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

A avaliação da composição corporal foi realizada no período basal.

5.7.1 Peso e estatura

Os sujeitos foram pesados em balança digital. A estatura foi determinada na posição em pé, com auxílio de estadiômetro. Essas medidas foram utilizadas na realização do índice de massa corporal (IMC), o qual foi calculado pela fórmula:

$$\text{IMC (kg/m}^2\text{)} = \text{Peso (kg)} / \text{estatura}^2\text{(m)}$$

5.8 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Os sujeitos foram orientados a não alterar seu consumo alimentar habitual durante a participação no estudo. O diário foi preenchido no período basal (pré) em 3 dias não consecutivos incluindo 1 dia de final de semana. Os diários foram conferidos no momento de sua devolução e, caso alguma inconsistência fosse notada, o sujeito era indagado. Todos os sujeitos foram treinados para o

preenchimento do diário alimentar, segundo protocolo já testado pelo nosso grupo de pesquisa (SCAGLIUSI et al., 2008). Os sujeitos receberam uma cartilha com instruções e exemplos sobre como preencher o diário e 38 ilustrações bidimensionais em preto e branco, em tamanho real, de medidas caseiras e porções de alimentos.

Os diários foram tabulados com auxílio do programa AVANUTRI[®]. Foi calculado o consumo habitual de calorias, macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos).

5.9 COLETA SANGUÍNEA

Para as coletas sanguíneas, os sujeitos compareceram ao laboratório pela manhã em jejum noturno de 12 horas. Foram coletados 15 ml sangue da veia antecubital para posterior análise de insulina, glicemia, perfil lipídico e citocinas. As amostras foram coletadas em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e mantidas em isopor com gelo. Imediatamente após a coleta as amostras foram centrifugadas a 1800 g durante 10 minutos a 4°C. O plasma foi pipetado e dispensado em microtubos (alíquotas), que foram congelados a -80°C para as subsequentes análises.

5.10 INSULINEMIA E GLICEMIA

A concentração de insulina foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) conforme recomendação do fabricante (Cell Signaling[®], Boston, MA- EUA). A glicemia foi dosada com auxílio de espectrofotômetro, utilizando-se Kit de glicose enzimático colorimétrico (Glicose Líquido Estável, Bioclin[®], Belo Horizonte).

5.11 PERFIL LIPÍDICO

O colesterol total, HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade), LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e os triglicerídeos (TG) plasmáticos foram dosados no momento pré por meio de método enzimático colorimétrico (BioTécnica[®], São Paulo, SP – Brasil). A partir do resultado de TG plasmáticos foi

calculada a concentração de VLDL-colesterol (lipoproteína de densidade muito baixa), de acordo com a equação de Friedewald et al. (39):

$$\text{VLDL-colesterol (mg/dl)} = \text{TG} / 5$$

5.12 CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas foram dosadas nas amostras de plasma e no músculo nos momentos pré, 60 e 120 minutos após. Foram avaliadas as concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 e IL-10 utilizando a Tecnologia Luminex™ xMAP (Millipore®, Billerica, MA - EUA). Neste sistema, microesferas de látex são coradas com dois fluoróforos. Os kits LINCOplex™ foram desenvolvidos com estas microesferas e se fundamentam no imunoensaio. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados as microesferas através de ligações covalentes não reversíveis. Depois que o analito (amostra) se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita através de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina ligada ao anticorpo de detecção. O resultado final é um ensaio “sanduíche” realizado através de microesferas. O equipamento Luminex 100 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (código de cor para o ensaio) e o segundo quantifica o sinal de reporte em cada microesfera. As concentrações plasmáticas de cada citocina foram expressas em pg/ml.

5.13 BIÓPSIA MUSCULAR POR AGULHA DE SUCÇÃO.

O procedimento de biópsia muscular foi realizado nos períodos pré, 60 e 120 minutos após a sessão de exercício de força. Foi extraída uma pequena amostra (aproximadamente 60-100 mg) da porção lateral e mais volumosa do vasto lateral somente do membro exercitado. O local aproximado da extração foi entre o ponto médio da patela e do trocânter maior, utilizando uma agulha de sucção especialmente desenvolvida para extrair pequenas amostras de músculo.

Para a realização do procedimento, o sujeito se manteve deitado em uma maca, mantendo os joelhos estendidos e a musculatura relaxada. Após a assepsia do

local, o médico responsável administrou 3 ml de xilocaína a 1% para anestesiá-lo localmente.

Após assepsia e anestesia, foi feita a incisão para a entrada da agulha de biópsia no tecido muscular. Para tanto, o médico responsável utilizou uma lâmina de bisturi nº11, esterilizada, individual e descartável para realizar a incisão de aproximadamente 0,5 cm de extensão. A agulha de biópsia, esterilizada e de uso individual, foi então inserida pelo médico responsável através do pequeno orifício gerado pela incisão. Após uma sucção, aplicada na extremidade superior externa da agulha por uma seringa de 120 ml, um pequeno pedaço de músculo foi sugado para o interior da agulha e cortado pela sua lâmina interna.

O sujeito foi sempre informado dos procedimentos que tomaram sequência, e após a retirada da agulha, foi aplicada pressão sobre o ponto de incisão para prevenir sangramento. A incisão foi fechada com bandagem esterilizada e coberta com uma sutura estéril para prevenir o seu desprendimento e uma faixa foi envolvida na coxa, aplicando pressão contínua, a fim de evitar qualquer edema local. O sujeito foi instruído a manter a bandagem por 24 horas e a manter a incisão limpa e seca pelo período de 72 horas.

O tecido coletado foi imediatamente dividido e congelado a -80°C para as subsequentes análises.

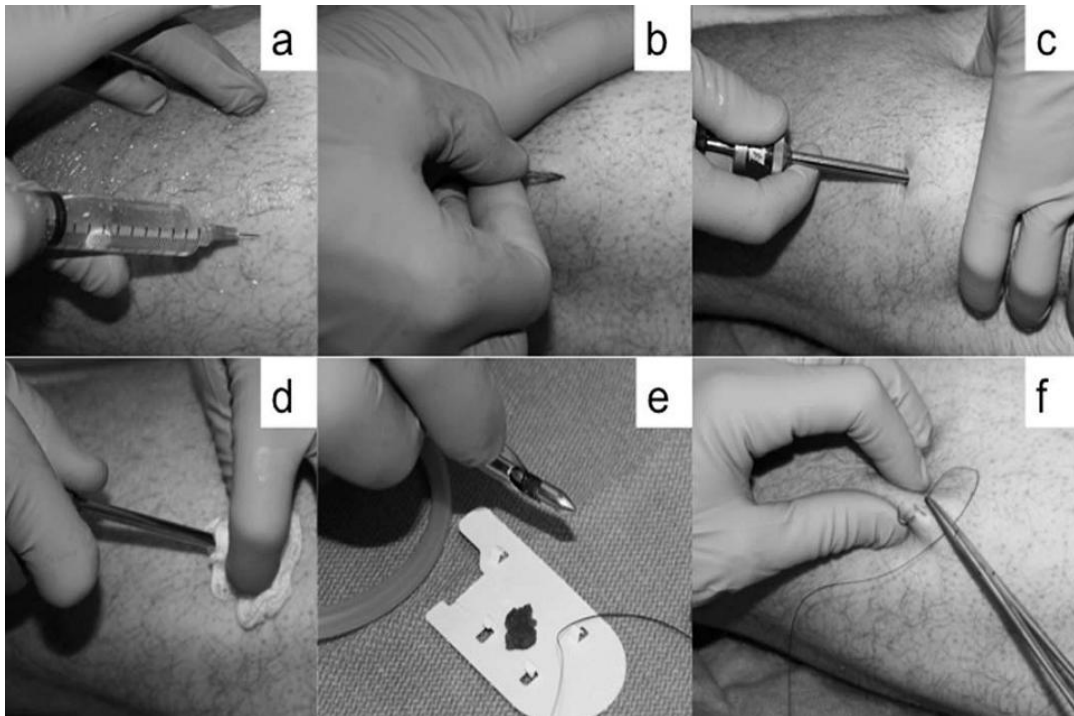


Figura 2 – Biópsia muscular com agulha de Bergstrom. (A) a pele e o tecido subcutâneo são anestesiados com xilocaína; (B) é feita uma incisão de 4-5 mm para romper a fáscia muscular; (C) a agulha é inserida no músculo, a sucção é realizada e a agulha é então fechada; (D) a agulha é removida; (E) o tecido muscular é removido da agulha e congelado a -80°C para posterior análise; (F) a sutura é realizada. Extraído de Tarnopolsky et al. (136).

5.14 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MUSCULARES

5.14.1 Expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de síntese proteica muscular

A expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de síntese proteica nas amostras musculares dos sujeitos foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) conforme recomendação do fabricante (Cell Signaling[®], Boston, MA- EUA). Foi avaliada a expressão total das proteínas p-p70S6K^{Thr389}, p-4E-BP1^{Thr37/46} e p-eIF4E^{Ser209}. As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise na concentração de 2x (20 mM de Tris-HCl (pH7,5), 150 mM de NaCl, 1 mM de Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM de pirofosfato de sódio, 1 mM de β -glicerofosfato, 1mM Na₃VO₄ e 1 $\mu\text{g/ml}$ de

leupeptina) e centrifugadas a 1800 g por 10 minutos à 4°C para remoção dos debris. O sobrenadante foi recolhido e armazenado à -80°C para dosagem. A dosagem de proteína total foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). As amostras foram diluídas no tampão de lise acima descrito para ajustar a concentração proteica para 30 µg/ml e homogeneizadas com o reagente de diluição de amostra (100 µl de amostra + 100 µl de reagente de diluição). Do total, 100 µl de homogenato diluído foram dispensados na microplaca, a qual foi selada e incubada a 4°C por 12 horas. As amostras foram removidas da placa e a mesma foi lavada 4 vezes com 200 µl de tampão de lavagem. O anticorpo primário foi adicionado na placa (100 µl) seguido de incubação de 1 hora à 37°C. O procedimento de lavagem foi repetido e 100 µl do anticorpo foi adicionado na placa e a mesma foi incubada por 30 minutos à 37°C. Após nova lavagem, 100 µl do substrato TMB foi adicionado em cada poço da placa com posterior incubação de 10 minutos à 37°C. Por fim, 100 µl solução STOP foi adicionada em cada poço da placa e a leitura foi realizada imediatamente no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em absorbância, sendo os valores encontrados proporcionais à quantidade de proteína alvo ligada.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes da análise inferencial, foi verificada a presença de outliers e testada a normalidade dos dados. Tendo garantido os pressupostos fundamentais para a utilização da análise de variância, foi utilizado o Mixed Model (SAS[®]) para análise de medidas repetidas e, quando pertinente Post hoc de Tukey para comparações múltiplas. Foram testadas quatro estruturas de matriz de covariâncias diferentes (auto-regressivo, compound simétrico, toeplitz e unstructured), sendo analisado o menor valor de BIC (critério de Schwarz Bayesian) para determinar a estrutura que melhor se ajustasse ao modelo. Foi utilizado análise de variância simples (ANOVA ONE WAY) para as comparações basais. Para os valores de citocinas foi utilizado análise de variância simples não paramétrica (Teste Kruskal-Wallis) e, quando pertinente Post Hoc de Dunns.

Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. O nível de significância adotado para rejeitar a hipótese nula foi de $p \leq 0,05$. O software utilizado foi o SAS[®] versão 9.2.

6. RESULTADOS

6.1 PARTICIPANTES

Os sujeitos foram recrutados e selecionados no período de Setembro de 2011 a dezembro de 2012. Aproximadamente 35 sujeitos responderam o convite por email e telefone. Desses 35 voluntários, 18 atingiram os critérios de inclusão. A amostra final foi composta por 18 sujeitos, dos quais 6 participaram do grupo aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), 6 do grupo leucina (LEU) e 6 do grupo placebo (PLA). A figura 2 ilustra o fluxograma de sujeitos do estudo.

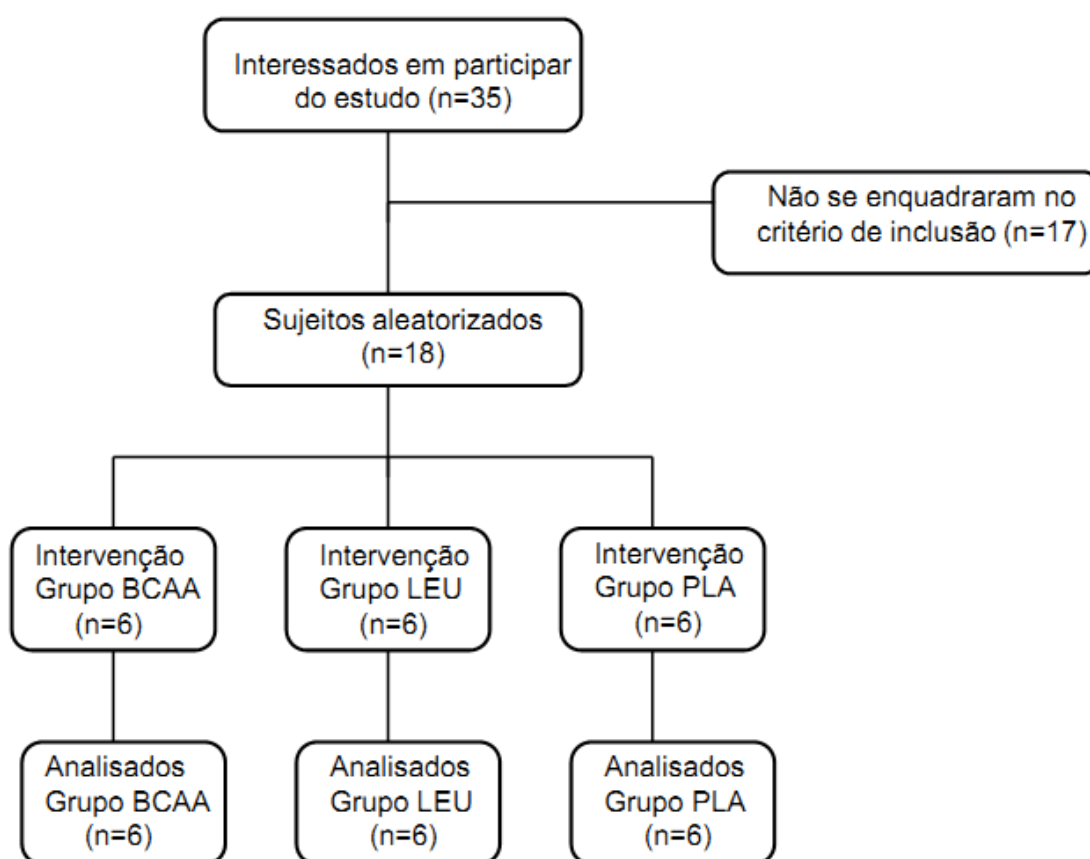


Figura 3 – Fluxograma de sujeitos do estudo. Legenda: BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina; PLA= placebo.

A tabela 1 ilustra as características gerais dos grupos. Não houve diferença para nenhuma variável no período basal.

Tabela 1- Características dos sujeitos da amostra

	<i>BCAA</i>	<i>LEU</i>	<i>PLA</i>
<i>Idade (anos)</i>	26,2 ± 3,7	25,0 ± 3,2	26,2 ± 3,7
<i>Peso (kg)</i>	80,8 ± 2,8	67,4 ± 8,6	71,3 ± 7,6
<i>Estatura (m)</i>	1,75 ± 0,1	1,76 ± 0,1	1,70 ± 0,1
<i>IMC (kg/m²)</i>	26,39 ± 1,8	22,46 ± 5,2	24,66 ± 2,6

Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Legenda: IMC = Índice de Massa Corporal; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina; PLA= grupo placebo.

6.2 FORÇA DINÂMICA MÁXIMA (1RM)

Os dados de força dinâmica máxima muscular estão representados na tabela 2 e figura 4, avaliado pelo teste de força dinâmica máxima no período basal.

Tabela 2- Força Dinâmica Máxima dos sujeitos da amostra

	<i>BCAA</i>	<i>LEU</i>	<i>PLA</i>
<i>1RM (kg)</i>	96,0 ± 9,9	78,0 ± 10,7	80,0 ± 12,3

Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Legenda: RM = Força Dinâmica Máxima; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina; PLA= grupo placebo.

Não houve diferenças significativas entre os grupos nos valores do teste de força dinâmica máxima ($p > 0,05$). Podemos observar que a amostra total e os grupos são homogêneos quanto a esses valores (Figura 4).

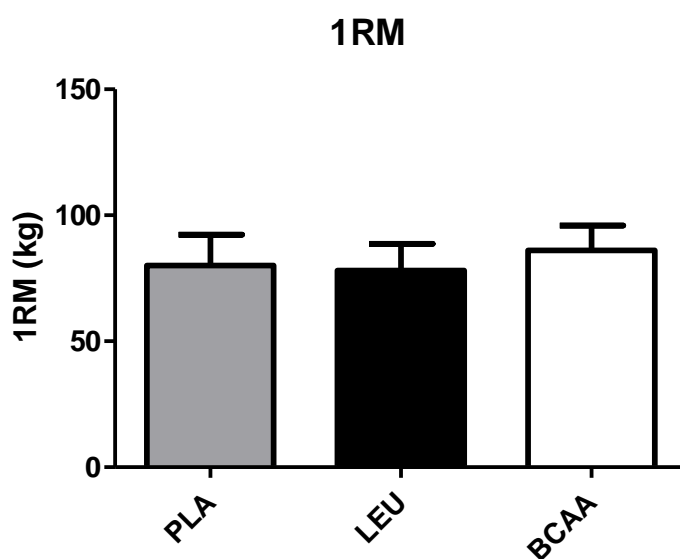


Figura 4 – Força Dinâmica Máxima dos sujeitos da amostra. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: RM = Força Dinâmica Máxima; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina; PLA= grupo placebo.

6. 3 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Os dados de consumo alimentar estão expressos na Tabela 3, como a média da ingestão alimentar de 3 dias não consecutivos incluindo um dia de final de semana. Não houve diferença significativa intra e entre grupos para nenhuma das variáveis ($p > 0,05$).

Tabela 3- Ingestão alimentar dos sujeitos da amostra

	<i>BCAA</i>	<i>LEU</i>	<i>PLA</i>
<i>VET (kcal)</i>	2357,0 ± 479,2	2547,0 ± 213,5	2484,0 ± 791,2
<i>VET/ PC (kcal/kg)</i>	29,4 ± 7,2	39,1 ± 1,9	36,6 ± 12,0
<i>CHO (g)</i>	258,6 ± 35,7	363,7 ± 48,3	311,2 ± 108,1
<i>CHO (%VET)</i>	45,2 ± 12,2	57,5 ± 10,2	49,8 ± 6,7
<i>CHO/ PC (g/kg)</i>	3,2 ± 0,4	5,67 ± 1,2	4,58 ± 1,6
<i>PROT (g)</i>	136,1 ± 43,7	107,9 ± 15,4	120,1 ± 53,7
<i>PROT (%VET)</i>	22,7 ± 2,8	16,9 ± 2,0	18,9 ± 2,6
<i>PROT/ PC (g/kg)</i>	1,71 ± 0,6	1,66 ± 0,3	1,77 ± 0,8
<i>LIP (g)</i>	86,3 ± 40,9	74,4 ± 35,4	84,3 ± 22,7
<i>LIP (%VET)</i>	31,9 ± 9,5	25,9 ± 11,0	31,3 ± 6,0
<i>LIP/ PC (g/kg)</i>	1,10 ± 0,6	1,12 ± 0,5	1,26 ± 0,4

Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Legenda: VET = valor energético total; PC = peso corporal; CHO = carboidratos; PROT = proteínas; LIP = lipídeos; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina; PLA=grupo placebo.

6.4 INSULINA E GLICEMIA

Os dados de insulina e glicemia estão representados na tabela 4 e na figura 5.

Tabela 4 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre os valores de glicemia e insulina plasmática.

	Pré	0'	30'	60'	90'	120'
<i>Glicemia (mg/ dL)</i>						
PLA	68,3 ± 3,5	67,9 ± 4,4	68,1 ± 7,2	68,0 ± 4,6	68,4 ± 0,9	66,7 ± 2,8
BCAA	67,1 ± 3,6	70,7 ± 4,9	68,0 ± 2,4	66,5 ± 2,9	67,4 ± 2,3	69,4 ± 3,1
LEU	70,7 ± 4,2	71,1 ± 2,3	73,1 ± 2,9	73,2 ± 1,6	71,7 ± 1,6	71,1 ± 1,0
<i>Insulina (mU/ l¹)</i>						
PLA	19,8 ± 1,3	20,0 ± 1,8	20,3 ± 1,6	20,4 ± 2,3	19,4 ± 1,5	18,8 ± 1,9
BCAA	19,7 ± 2,6	19,5 ± 3,9	20,8 ± 3,6	24,0 ± 3,0 ^{a,b}	19,8 ± 2,4	19,1 ± 1,2
LEU	21,2 ± 3,6	22,1 ± 3,3	20,5 ± 2,2	25,2 ± 2,4 ^{a,b}	21,8 ± 3,4	20,6 ± 3,2

Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Legenda: PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina. ^a Significativamente maior em comparação ao grupo placebo no mesmo tempo (p < 0,05); ^b Significativamente maior no tempo 60' em comparação ao pré (p < 0,05).

Para os valores de glicemia foi encontrado efeito de grupo (p < 0,001). Não houve alterações significativas nos valores de glicemia ao longo da curva bem como na área total abaixo da curva de glicemia em relação ao tempo ou tratamento (p > 0,05).

Para os valores de insulina, pode se observar efeito de grupo ($p= 0,0066$) e tempo ($p= 0,0027$). A concentração plasmática de insulina aumentou significativamente nos grupos BCAA e leucina 60 minutos após a ingestão em comparação ao grupo placebo ($p= 0,0023$ e $p= 0,0026$ respectivamente) e aos valores basais ($p= 0,0067$ e $p= 0,0111$ respectivamente. Figura 4). Não foi encontrada diferença significativa na área total abaixo da curva de insulina ($p > 0,05$. Figura 5).

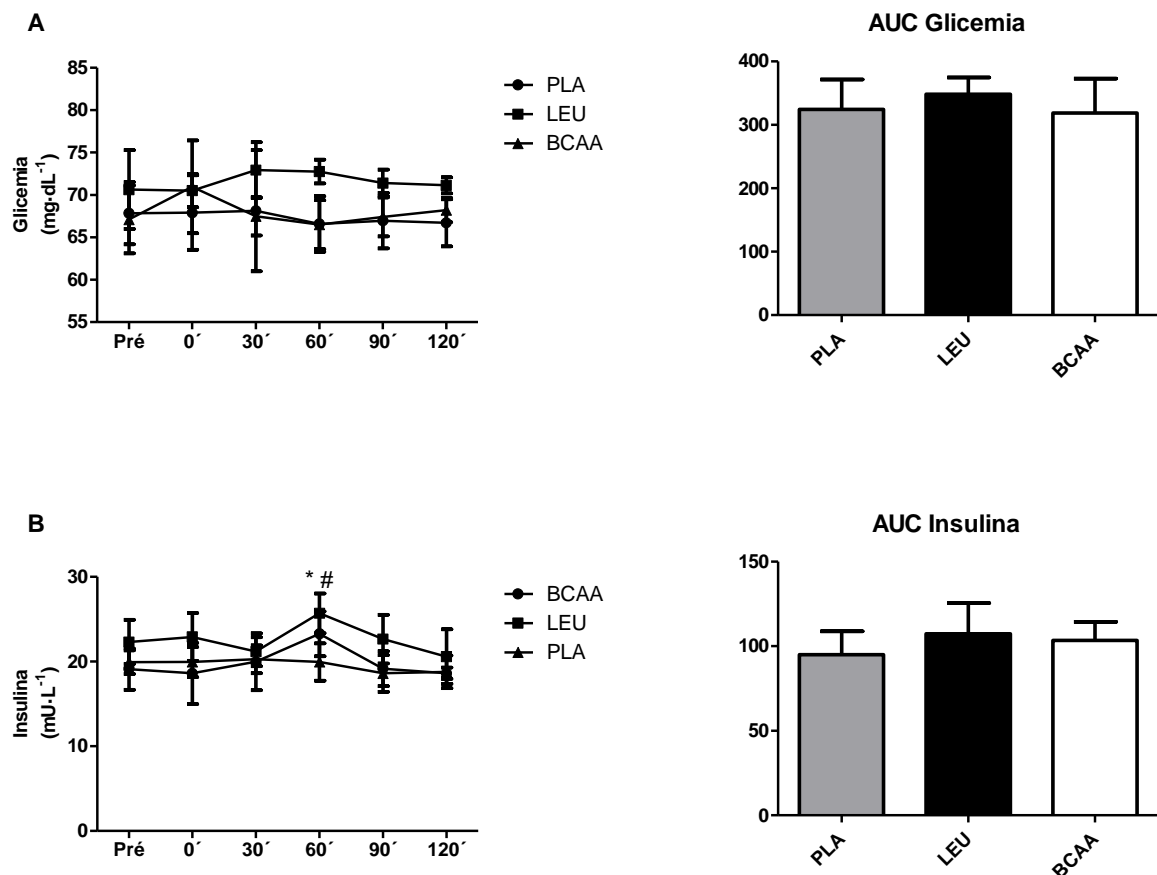


Figura 5 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre os valores de glicemia e insulina plasmática. (A) glicemia, (B) AUC glicemia, (C) insulina, (D) AUC insulina. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina, AUC = área sobre a curva. * Significativamente maior nos grupos BCAA e leucina em comparação ao grupo placebo no mesmo tempo ($p < 0,05$); # Significativamente maior nos grupos BCAA e leucina no tempo 60' em comparação ao pré ($p < 0,05$).

6.5 PERFIL LIPÍDICO

Os dados de perfil lipídico estão representados na tabela 5.

Tabela 5- Perfil lipídico dos sujeitos da amostra no período pré

	<i>BCAA</i>	<i>LEU</i>	<i>PLA</i>
<i>Colesterol total (mg/dL)</i>	189,1 ± 21,6	179,6 ± 24,5	168,4 ± 24,7
<i>TG (mg/dL)</i>	159,2 ± 46,8	148,2 ± 51,4	159,3 ± 36,5
<i>HDL colesterol (mg/dL)</i>	35,2 ± 12,1	36,6 ± 13,3	38,9 ± 6,7
<i>LDL colesterol (mg/dL)</i>	117,7 ± 20,2	117,5 ± 32,0	110,1 ± 33,5
<i>VLDL colesterol (mg/dL)</i>	31,8 ± 9,4	30,3 ± 9,9	31,9 ± 7,3

Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Legenda: TG = triglicerídeos; HDL = lipoproteína de elevada densidade; LDL= lipoproteína de baixa densidade; VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina; PLA=grupo placebo.

Não houve diferenças significativas nos valores de colesterol total, TG, HDL colesterol, LDL colesterol e VLDL colesterol no momento pré entre os grupos ($p > 0,05$).

6.6 CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS

Os dados de citocinas musculares estão representados nas figuras 6, 7. Os dados de citocinas plasmáticas estão representados nas figuras 8 e 9.

Citocinas Musculares

Para os valores de citocinas musculares pode-se observar que o exercício físico leva a uma redução na concentração de IL-10, IL-1 β , IL-4 e IL-6 entre momento pré e 60 minutos após (PLA; $\Delta 1 = -3,2 \pm 2,3$, $\Delta 1 = -0,1 \pm 0,3$, $\Delta 1 = -1,8 \pm 4,7$, $\Delta 1 = -1,0 \pm 1,8$; respectivamente. Figura 6). Já no período entre 60 e 120 minutos após, pode-se observar que o exercício físico apresenta uma redução na concentração de IL-10 e IL-6 (PLA; $\Delta 2 = -0,9 \pm 0,6$, $\Delta 2 = -0,7 \pm 1,3$; respectivamente. Figura 6) e aumento na concentração de IL-4 e IL-1 β (PLA; $\Delta 2 = 1,5 \pm 4,4$, $\Delta 2 = 0,3 \pm 0,6$; respectivamente. Figura 7).

Quando o exercício físico associa-se à suplementação de leucina pode-se observar uma redução na concentração de IL-10, IL-1 β , IL-4 (LEU; $\Delta 1 = -0,9 \pm 1,5$, $\Delta 1 = -0,8 \pm 1,1$, $\Delta 1 = -1,3 \pm 3,4$; respectivamente. Figura 6) e aumento na concentração de IL-6 (LEU; $\Delta 1 = 0,3 \pm 0,8$. Figura 6) entre o momento pré e 60 minutos após. Já no período entre 60 e 120 minutos após, pode-se observar que ocorre uma redução na concentração de IL-1 β e IL-6 (LEU; $\Delta 2 = -0,3 \pm 0,5$, $\Delta 2 = -0,2 \pm 1,0$; respectivamente. Figura 7) e aumento na concentração de IL-10 e IL-4 (LEU; $\Delta 2 = 2,5 \pm 3,1$, $\Delta 2 = 1,3 \pm 2,5$; respectivamente. Figura 7).

Quando o exercício físico associa-se à suplementação de BCAA pode-se observar uma redução na concentração de IL-10 (BCAA; $\Delta 1 = -0,4 \pm 2,5$. Figura 6) e aumento na concentração de IL-1 β , IL-4 e IL-6 (BCAA; $\Delta 1 = 0,5 \pm 0,5$, $\Delta 1 = 2,8 \pm 8,4$, $\Delta 1 = 0,3 \pm 0,3$; respectivamente. Figura 6) entre o momento pré e 60 minutos após. Já no período entre 60 e 120 minutos após, pode-se observar que ocorre uma redução na concentração de IL-1 β , IL-4 e IL-6 (BCAA; $\Delta 2 = -0,1 \pm 0,4$, $\Delta 2 = -3,0 \pm 8,0$, $\Delta 2 = -0,4 \pm 0,3$; respectivamente. Figura 7) e aumento na concentração de IL-10 (BCAA; $\Delta 2 = 2,8 \pm 2,3$. Figura 7).

Foi encontrada diferença significativa entre os grupos BCAA e leucina comparado ao grupo placebo para a concentração de IL-10 entre o momento 60 e 120 minutos após ($p=0,04$). Nesse mesmo período de tempo, também foi encontrada

diferença significativa entre o grupo leucina e BCAA para a concentração de IL-1 β ($p=0,04$). Não foram encontrados níveis detectáveis de TNF- α nas amostras musculares em todos os momentos analisados.

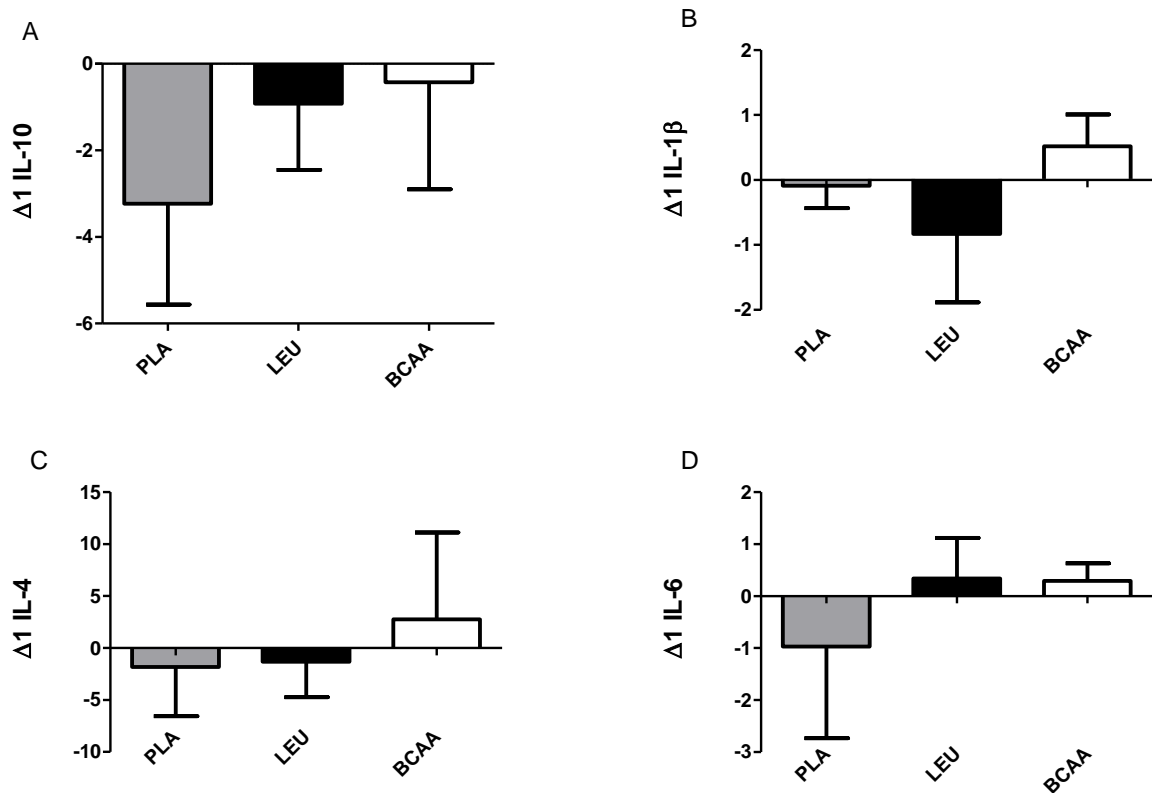


Figura 6 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre o delta de 60 minutos de citocinas musculares (A) IL-10, (B) IL-1 β , (C) IL-4, (D) IL-6. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: $\Delta 1$ = delta 1 (delta da concentração de citocina no momento 60 minutos e momento pré); PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina, IL-10= interleucina 10; IL-1 β = interleucina 1 beta; IL-4= interleucina 4; IL-6= interleucina 6.

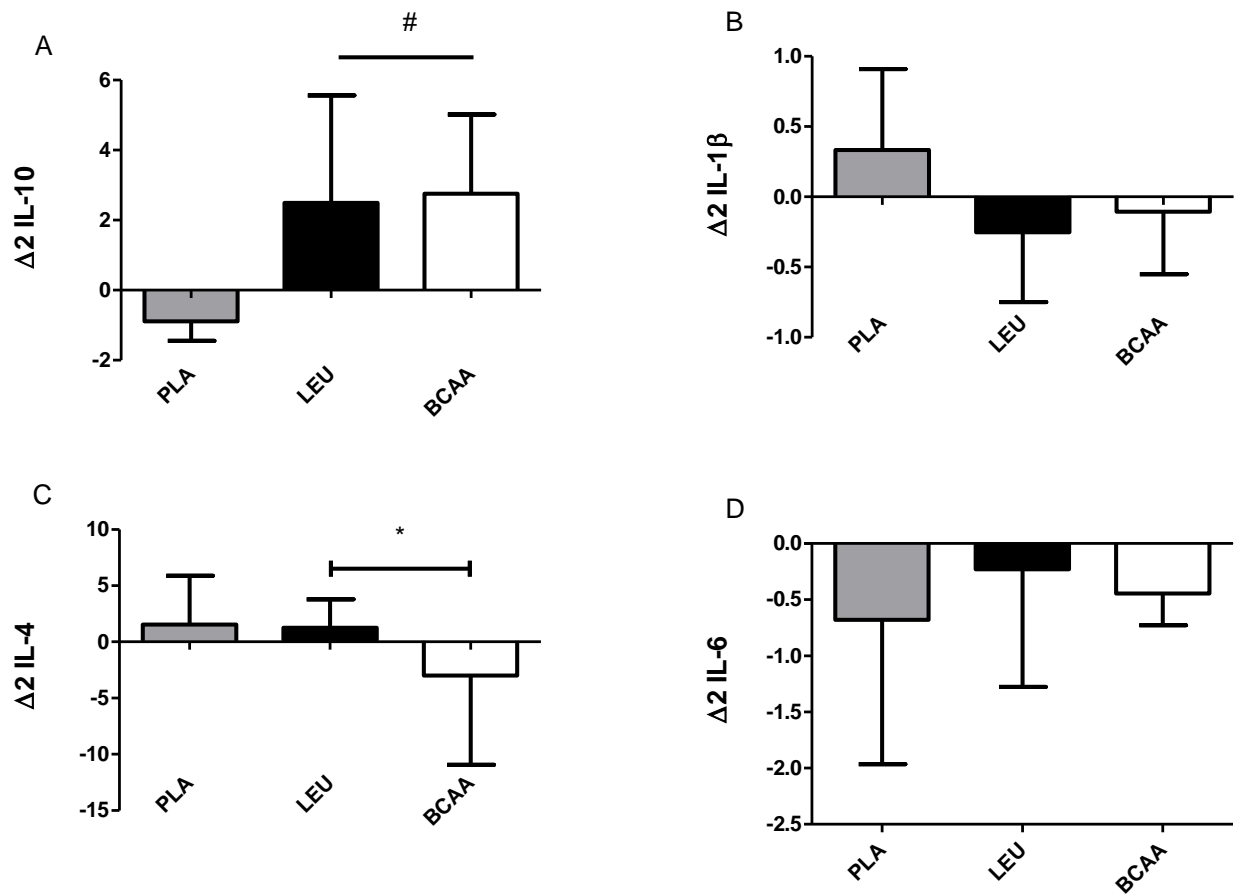


Figura 7 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre o delta de 120 minutos de citocinas musculares (A) IL-10, (B) IL-1 β , (C) IL-4, (D) IL-6. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: $\Delta 2$ = delta 2 (delta da concentração de citocina no momento 120 minutos e momento 60 minutos); PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina, IL-10= interleucina 10; IL-1 β = interleucina 1 beta; IL-4= interleucina 4; IL-6= interleucina 6. # Significativamente maior nos grupos BCAA e leucina em comparação ao grupo placebo ($p < 0,05$). * Significativamente diferente entre os grupos BCAA e leucina ($p < 0,05$);

Citocinas plasmáticas

Para os valores de citocinas plasmáticas pode-se observar que o exercício físico leva a uma redução na concentração de IL-10 e TNF- α (PLA; $\Delta 1 = -0,3 \pm 0,3$, $\Delta 1 = -0,6 \pm 0,8$, respectivamente. Figura 8) e aumento na concentração de IL-1 β e IL-4 (PLA; $\Delta 1 = 0,5 \pm 0,7$, $\Delta 1 = 0,5 \pm 0,4$, respectivamente. Figura 8) entre momento pré e 60 minutos após. No período entre 60 e 120 minutos após, pode-se observar que o exercício físico apresenta uma redução na concentração de IL-4 e IL-1 β (PLA; $\Delta 2 = -0,01 \pm 0,6$, $\Delta 2 = -0,6 \pm 1,0$; respectivamente. Figura 9) e aumento na concentração de IL-10 e TNF- α (PLA; $\Delta 2 = 0,3 \pm 0,6$, $\Delta 2 = 0,3 \pm 1,0$; respectivamente. Figura 9).

Quando o exercício físico associa-se à suplementação de leucina pode-se observar uma redução na concentração de IL-1 β , IL-4 e TNF- α (LEU; $\Delta 1 = -0,02 \pm 0,04$, $\Delta 1 = -0,06 \pm 0,3$, $\Delta 1 = -0,7 \pm 1,2$; respectivamente. Figura 8) e aumento na concentração de IL-10 (LEU; $\Delta 1 = 0,4 \pm 0,8$. Figura 8) entre o momento pré e 60 minutos após. Já no período entre 60 e 120 minutos após, pode-se observar que ocorre uma redução na concentração de TNF- α (LEU; $\Delta 2 = -0,06 \pm 0,9$. Figura 9) e aumento na concentração de IL-10, IL-1 β e IL-4 (LEU; $\Delta 2 = 0,2 \pm 0,7$, $\Delta 2 = 0,3 \pm 0,6$, $\Delta 2 = 0,2 \pm 0,7$; respectivamente. Figura 9).

Quando o exercício físico associa-se à suplementação de BCAA pode-se observar uma redução na concentração de IL-1 β , IL-4 e TNF- α (BCAA; $\Delta 1 = -0,2 \pm 0,2$; $\Delta 1 = -0,2 \pm 0,6$, $\Delta 1 = -0,9 \pm 2,4$; respectivamente. Figura 8) e aumento na concentração de IL-10 (BCAA; $\Delta 1 = 2,1 \pm 3,2$. Figura 8) entre o momento pré e 60 minutos após. Já no período entre 60 e 120 minutos após, pode-se observar que ocorre uma redução na concentração de TNF- α (BCAA; $\Delta 2 = -0,3 \pm 1,0$. Figura 9) e aumento na concentração de IL-10, IL-1 β e IL-4 (BCAA; $\Delta 2 = 0,1 \pm 1,2$, $\Delta 2 = 0,3 \pm 0,5$, $\Delta 2 = 1,7 \pm 2,4$; respectivamente. Figura 9).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em todas as variáveis e momentos analisados ($p > 0,05$). Não foram encontrados níveis detectáveis de IL-6 nas amostras plasmáticas em todos os momentos analisados.

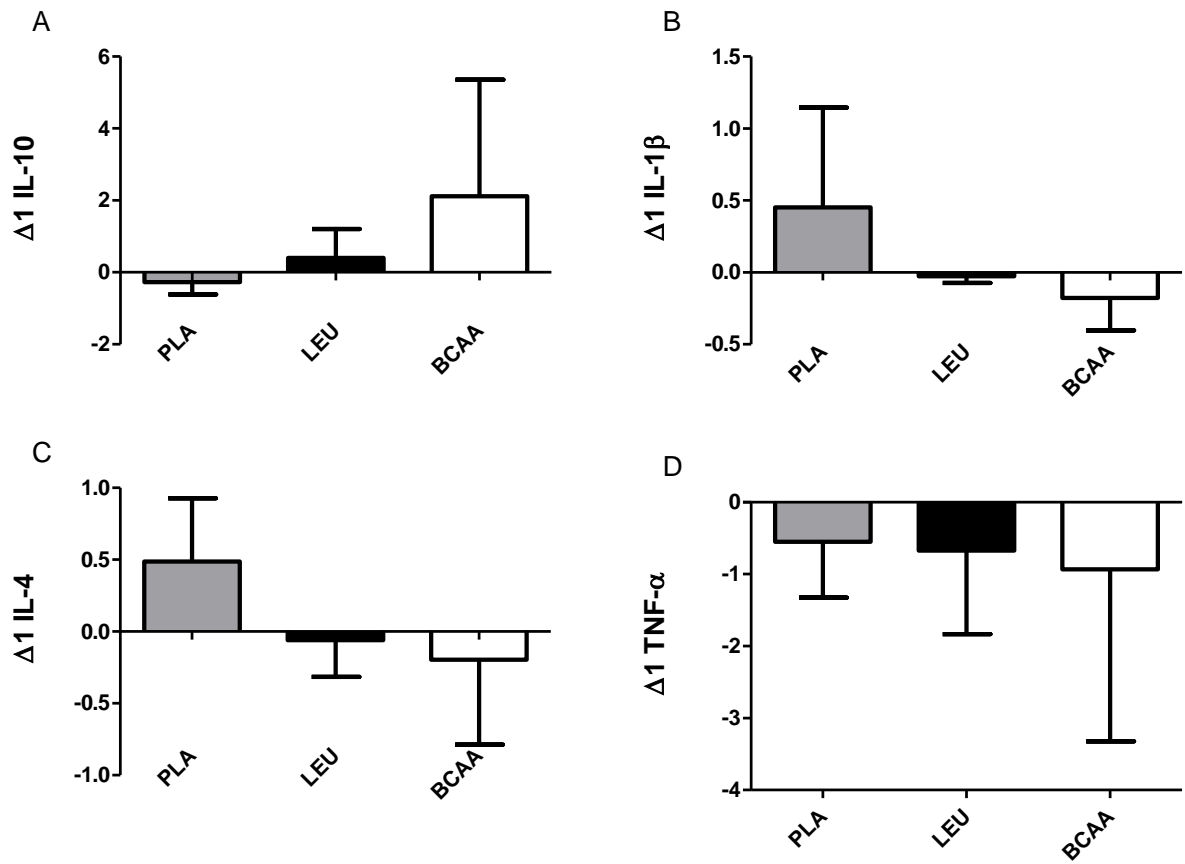


Figura 8 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre o delta de 60 minutos de citocinas plasmáticas (A) IL-10, (B) IL-1 β , (C) IL-4, (D) IL-6. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: $\Delta 1$ = delta 1 (delta da concentração de citocina no momento 60 minutos e momento pré); PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina, IL-10= interleucina 10; IL-1 β = interleucina 1 beta; IL-4= interleucina 4; IL-6= interleucina 6.

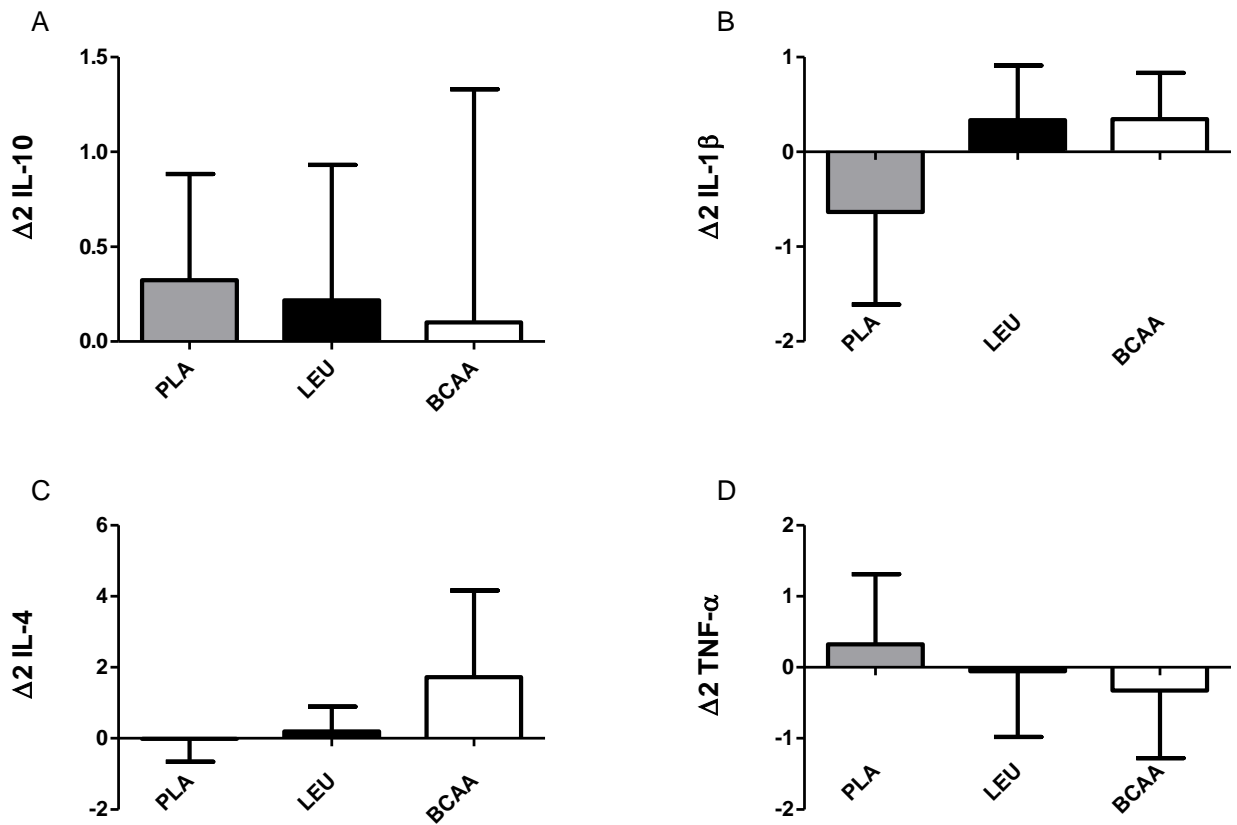


Figura 9 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre o delta de 120 minutos de citocinas plasmáticas (A) IL-10, (B) IL-1 β , (C) IL-4, (D) IL-6. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: $\Delta 2$ = delta 2 (delta da concentração de citocina no momento 120 minutos e momento 60 minutos); PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina, IL-10= interleucina 10; IL-1 β = interleucina 1 beta; IL-4= interleucina 4; IL-6= interleucina 6.

6.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MUSCULARES

6.7.1 Expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de síntese proteica muscular

Os dados de expressão de proteínas musculares envolvidas na cascata de sinalização de síntese proteica muscular estão representados na tabela 6 e figura 10. Os resultados estão expressos em absorbância, sendo os valores encontrados proporcionais à quantidade de proteína alvo ligada.

Tabela 6 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre a expressão de proteínas musculares envolvidas na cascata de síntese proteica muscular.

	Basal	60'	120'
<i>p-4E-BP1^{Thr37/46} (Absorbância)</i>			
PLA	0,634 ± 0,151	0,895 ± 0,305	0,964 ± 0,279
BCAA	0,477 ± 0,220	0,759 ± 0,227	1,431 ± 0,177 ^{a,c}
LEU	0,558 ± 0,239	0,913 ± 0,222	1,609 ± 0,182 ^{a,c}
<i>p-p70S6K^{Thr389} (Absorbância)</i>			
PLA	0,183 ± 0,005	0,251 ± 0,052	0,283 ± 0,047
BCAA	0,194 ± 0,011	0,315 ± 0,021 ^{a,b}	0,350 ± 0,036 ^{a,c}
LEU	0,189 ± 0,008	0,312 ± 0,036 ^{a,b}	0,323 ± 0,033 ^{a,c}
<i>p-eIF4E^{Ser209} (Absorbância)</i>			
PLA	0,773 ± 0,036	0,872 ± 0,053	0,950 ± 0,141
BCAA	0,808 ± 0,123	1,002 ± 0,037 ^b	1,198 ± 0,092 ^{a,c}
LEU	0,836 ± 0,146	1,082 ± 0,144 ^{a,b}	1,162 ± 0,144 ^{a,c}

Todos os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Legenda: PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina. ^a Significativamente maior em comparação ao grupo placebo no mesmo tempo (p < 0,05); ^b Significativamente maior no tempo 60' em comparação ao pré (p < 0,05); ^c Significativamente maior no tempo 60' em comparação ao pré (p < 0,05).

No início do estudo, a expressão de todas as proteínas foi semelhante entre os grupos ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram efeito de tempo significativo depois do protocolo experimental ($p < 0,0001$). No entanto, tanto a suplementação de BCAA como a de leucina aumentou significativamente a expressão p-4E-BP1^{Thr37/46} 120 minutos após comparado ao grupo placebo no mesmo tempo ($p = 0,0009$ e $p < 0,0001$, respectivamente) e aos valores basais ($p < 0,0001$). A expressão de p-p70S6k^{Thr389} foi significativamente aumentada nos grupos BCAA e leucina após 60 minutos quando comparado com o grupo placebo no mesmo tempo ($p = 0,0011$ e $p = 0,0017$, respectivamente) e aos valores basais ($p < 0,0001$). Esse padrão se manteve 120 minutos após, em ambos os grupos, comparado ao grupo placebo no mesmo tempo ($p = 0,0007$ e $p = 0,0353$ respectivamente) e aos valores basais ($p < 0,0001$). A expressão de p-eIF4E^{Ser209} encontrou-se significativamente aumentada após 60 minutos apenas no grupo leucina quando comparado ao grupo placebo ($p = 0,0021$) e aos valores basais ($p = 0,0004$). Porém, 120 minutos após encontrou-se significativamente elevada em ambos grupos comparado ao grupo placebo ($p = 0,0004$ e $p = 0,0019$ respectivamente) e aos valores basais ($p < 0,0001$).

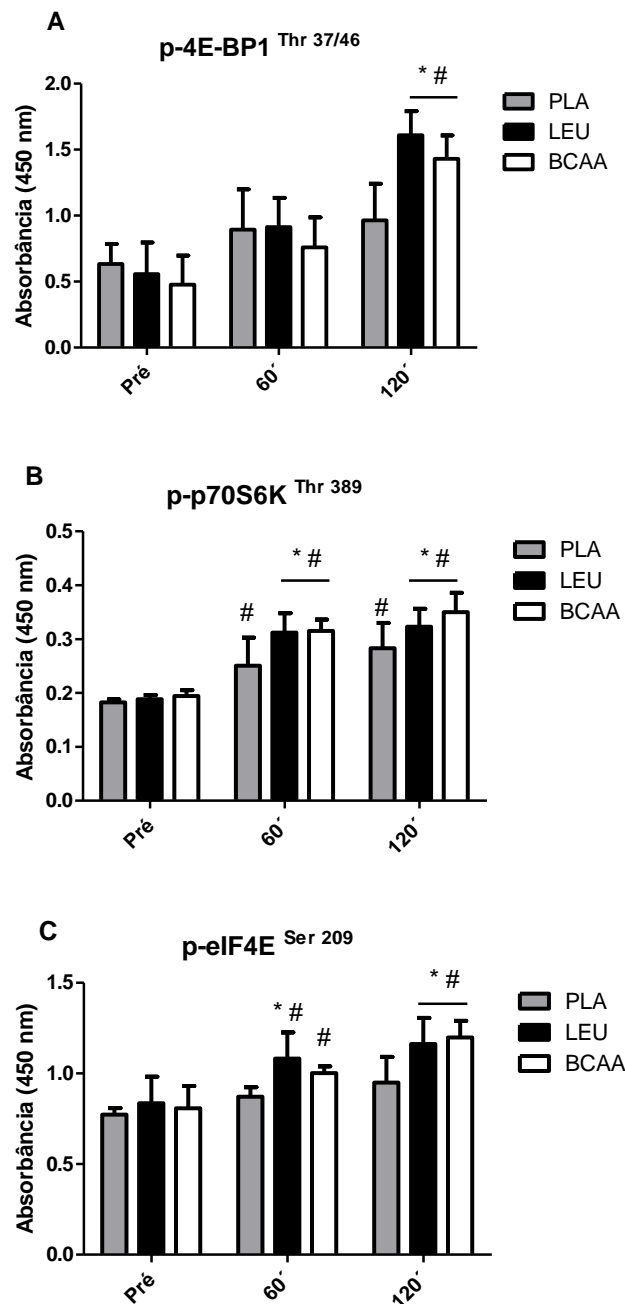


Figura 10 – Efeitos da suplementação e do exercício de força agudo sobre a expressão de proteínas musculares envolvidas na cascata de síntese proteica muscular. (A) p-4E-BP1^{Thr37/46}, (B) p-p70S6k^{Thr389}, (C) p-eIF4E^{Ser209}. Dados como média \pm desvio padrão. Legenda: PLA= grupo placebo; BCAA= grupo aminoácidos de cadeia ramificada; LEU= grupo leucina * Significativamente maior em comparação ao grupo placebo no mesmo tempo ($p < 0,05$); # Significativamente maior em comparação ao pré ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi comparar os efeitos da suplementação de BCAA e leucina isolada sobre as vias de síntese proteica muscular no exercício de força mensurando fatores sistêmicos, teciduais e moleculares. O principal achado do estudo foi que a suplementação aguda de leucina isolada, diferentemente do que era especulado, possui efeitos semelhantes à suplementação de BCAA após o exercício de força. De forma bastante curiosa, podemos observar em nosso estudo que o BCAA e a leucina possuem efeitos semelhantes sobre a homeostase de glicose; níveis plasmáticos e musculares de citocinas; e na estimulação das vias de síntese proteica muscular.

Os BCAA são aminoácidos essenciais que correspondem cerca de 35% dos aminoácidos essenciais em proteínas musculares (MARCHINI et al., 1998; WAGENMAKERS, 1998). Os BCAA apresentam papel fundamental na regulação de processos anabólicos, envolvendo tanto as vias de síntese quanto as de degradação proteica muscular (SHIMOMURA et al., 2006a; TOM; NAIR, 2006). Na prática esportiva, os BCAA são frequentemente utilizados por atletas com a finalidade de promover anabolismo proteico muscular, atenuar a fadiga central, estimular a secreção de insulina, melhorar os processos imunológicos e atenuar a lesão muscular induzida pelo exercício (DA LUZ et al., 2012; SHIMOMURA et al., 2006^a).

Os efeitos da suplementação de aminoácidos essenciais sobre a homeostase de glicose são amplamente descritos na literatura. Os aminoácidos essenciais são conhecidos por possuir uma ação insulínica, aumentando a secreção de insulina numa maior magnitude quando estão presentes em uma mistura contendo carboidrato e proteína comparada a uma fonte contendo apenas carboidrato (VAN LOON et al., 2000). Um estudo realizado por Van Loon et al. (2000) verificou a resposta da suplementação de diferentes doses e combinações de bebidas (contendo ou não carboidrato) na homeostase de glicose. Os autores demonstraram que a resposta na concentração de insulina está positivamente correlacionada à concentração plasmática de leucina, fenilalanina e tirosina. Os autores observaram que uma mistura contendo proteína hidrolisada, leucina, fenilalanina e carboidrato elevam de forma significativa as concentrações de insulina plasmática. Dentre os aminoácidos essenciais, a leucina é considerada fundamental na homeostase de

glicose por exercer efeitos agudos e crônicos no músculo, fígado e tecido adiposo, sendo capaz de estimular agudamente a secreção de insulina nas células β pancreáticas (YANG et al., 2010). Os resultados encontrados em nosso estudo demonstraram que a suplementação de BCAA e leucina possuem efeitos semelhantes sobre a homeostase de glicose aumentando significativamente a concentração plasmática de insulina 60 minutos após a ingestão em comparação ao grupo placebo. Os resultados encontrados corroboram com estudos anteriores publicados na literatura. Estudos demonstram que existe uma resposta insulínica com pico de insulina cerca de 40 a 60 minutos após a ingestão de aminoácidos essenciais, dentre eles os BCAA (BOLSTER; JEFFERSON; KIMBALL; 2004; ANTHONY et al., 2002, POWER et al., 2009). Um estudo recente, realizado por Power et al. (2009) demonstrou que a suplementação de 45g de *whey protein* e 45g de *whey protein* hidrolisado, que continha BCAA em sua composição, aumentou a concentração de insulina (~28% e 43%, respectivamente) cerca de 60 minutos após a ingestão. O aumento na concentração de insulina parece ser capaz de agir de forma sinérgica à ingestão de leucina no controle da síntese proteica muscular. Estudos recentes vêm demonstrando que a insulina é um hormônio anabólico que está relacionado à ativação da proteína Akt e consequentemente culminando na ativação dos seus efetores (NORTON; LAYMAN, 2006; DAN; BALDWIN, 2008).

Estudos recentes vêm postulando que os BCAA também poderiam ter efeitos sobre o remodelamento muscular por, possivelmente, ser capaz de modular indiretamente o balanço inflamatório de humanos. Os BCAA poderiam modular indiretamente o estado inflamatório da célula muscular através da produção de glutamina em condições caracterizadas por um consumo de glutamina elevado e/ou diminuição na concentração de glutamato. Já vem sendo amplamente demonstrado na literatura que a disponibilidade de glutamina influencia a produção de citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 10 (IL-10) e interferon gama (IFN- γ) (BRUUNSGAARD, 2005; FLYNN et al., 2007; NICASTRO et al., 2012). Estudos demonstraram que as concentrações de glutamina também possuem um papel importante na via de sinalização do NF- κ B. O NF- κ B pode levar à um quadro de resistência à insulina através nitrosilação do receptor de insulina (IR) (FOUAD et al., 2004; YASUKAWA et al., 2005). Sob tais condições, a via de tradução mTOR pode ter seu sinal prejudicado através de proteínas envolvidas nas etapas iniciais da

tradução, tais como substratos do receptor de insulina (IRS), Akt, e 4E-BP1 (SANDRI, 2008).

O exercício influencia de forma aguda e crônica o sistema imune. Em modalidades de *endurance*, alguns estudos têm avaliado a efetividade da suplementação de BCAA em manter a concentração plasmática de glutamina e modificar a resposta imune no exercício exaustivo. Dados dos estudos demonstram que a manutenção da concentração plasmática de glutamina com a suplementação de BCAA possui efeitos positivos na imunocompetência de atletas. Contudo, estudos com suplementação de glutamina durante e após exercícios de *endurance* indicam que essa intervenção nutricional não previne a redução da imunocompetência induzida pelo exercício (KRZYWKOWSKI et al., 2001a; KRZYWKOWSKI et al., 2001b; ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). Sendo assim, os mecanismos pelos quais a suplementação de BCAA atuaria de forma benéfica na melhora da imunocompetência não estão completamente elucidados na literatura. Até o presente momento não se sabe se o efeito é devido à manutenção da concentração plasmática de glutamina ou se é algum efeito direto da suplementação de BCAA.

Os resultados encontrados no nosso estudo demonstram um padrão de comportamento nas concentrações de citocinas plasmáticas e musculares. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa, pode-se observar que exercício de força leva a uma redução na concentração muscular e plasmática de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e IL-6) e aumento na concentração muscular e plasmática de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) na primeira hora após a atividade. Essa resposta se mantém na segunda hora após a atividade para a concentração de citocinas musculares, porém na concentração de citocinas plasmáticas pode-se observar que ocorre um aumento na concentração de IL-10 e redução na concentração de IL-1 β . Esses padrões de comportamento presente nos resultados vão de acordo com a literatura. Já vem sendo demonstrado que o exercício de força agudo de intensidade moderada induz uma resposta inflamatória sistêmica leve, caracterizada pelo acúmulo de macrófagos e neutrófilos na célula muscular e elevação de até 100 vezes na concentração de IL-6, seguida por aumentos dos níveis circulantes de marcadores anti-inflamatórios como IL-10 (DRENTH et al., 1998; MOLDOVEANU et al., 2000; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Tem se sugerido que o aumento na concentração de IL-6 mediado pela contração muscular

é um fenômeno bioquímico específico com a finalidade de sensor energético aumentando a captação de glicose e a oxidação de gordura durante a atividade física (PEDERSEN; FEBRAIO, 2008). De forma crônica, o exercício parece suprimir citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e aumentar citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) (BRUUNSGAARD, 2005; FLYNN et al., 2007; NICASTRO et al., 2012). Embora, o dano muscular e os processos inflamatórios caracterizados pelo aumento das concentrações de TNF- α possam inibir a sinalização celular via Akt, estudos recentes têm demonstrado que a resposta inflamatória pode ser necessária para o reparo e adaptação musculares uma vez que ativa as células satélites (LAPOINTE et al., 2002; TRAPPE et al., 2002; BONDESEN et al., 2004; SHEN et al., 2005; SOLTOW et al., 2006). Portanto, não está completamente elucidado na literatura se a atenuação da inflamação após o exercício de força seria benéfico ou atrapalharia os processos de adaptação e reparo muscular.

No tocante da estimulação da síntese proteica muscular, vem sendo amplamente demonstrado na literatura o papel do BCAA e particularmente a leucina. Estudos demonstram que a leucina exerce os seus efeitos em nível pós-traducional durante a fase de iniciação da tradução do mRNA em proteína, sendo o mecanismo relacionado ao fato da ativação da proteína quinase mTOR e também por meio de três proteínas regulatórias chaves: p70S6k, 4E-BP1 e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) (MERO, 1999; ANTHONY et al., 2002; CYNOBER & HARRIS, 2006; HARRIS et al., 2004; HARRIS et al., 2005; HUTSON et al., 2005; SHIMOMURA et al., 2006a; SHIMOMURA et al., 2006b; SHIMOMURA; HARRIS, 2006). Nós observamos no presente estudo que a suplementação de leucina e BCAA possuem efeitos sobre a ativação dos efetores da cascata de sinalização da via mTOR. O exercício físico de forma isolada é capaz de estimular a fosforilação de p-p70S6k^{Thr389}, porém o efeito é potencializado quando associado à suplementação de leucina e BCAA a partir de 60 minutos após e o efeito se mantém até 120 após a suplementação. Em contrapartida, a fosforilação de p-4E-BP1^{Thr37/46} e p-eIF4E^{Ser209} parecem ser estimuladas somente na presença de BCAA e leucina. A fosforilação de p-4E-BP1^{Thr37/46} encontra-se aumentada 120 minutos após a ingestão de leucina e BCAA. Já para os dados de fosforilação de p-eIF4E^{Ser209} podemos observar que a leucina e o BCAA possuem efeitos distintos. A leucina é capaz de estimular a fosforilação de eIF4E^{Ser209} a partir de 60 minutos após e o efeito se mantém em 120

minutos após a suplementação. Já o BCAA possui um efeito mais tardio, fosforilando a via apenas 120 minutos após a suplementação.

Os resultados encontrados em nosso estudo vão de acordo com dados da literatura. Diversas linhas de pesquisa sugerem que a leucina possui papel fundamental na estimulação da síntese proteica muscular. Estudos recentes demonstraram que a leucinemia sanguínea após o exercício físico é capaz de maximizar a síntese proteica muscular. Os mecanismos que sustentam a relação anabólica sinérgica entre os aminoácidos e o exercício de força na síntese proteica muscular parecem envolver a ativação contração/nutriente mediada da via de sinalização Akt/mTOR. Após a ingestão do aminoácido leucina a síntese proteica sofre incremento paralelamente à ativação/fosforilação da proteína p70s6k (APRÓ; BLOMSTRAND, 2010; TERZIS et al., 2010; WEST et al., 2011). Em adição, outros efetores da via mTOR são ativados em resposta à estímulos anabólicos, como a suplementação com aminoácidos. Entre estes, pode-se destacar o aumento na fosforilação de 4EBP-1, o qual ativa o processo de síntese proteica através da liberação do eIF4E, favorecendo a formação do complexo eIF4F e a conseqüente interação do mRNA com a subunidade ribossomal 40S, dando início ao processo de tradução (TEE ; BLENIS, 2005).

Um estudo realizado por Karlsson et al. (2004) investigou o efeito do treinamento de força isolado (4 séries de 10 repetições a 80% de 1RM no *leg press* em duas ocasiões) ou combinado com a suplementação de BCAA (45% de leucina, 30% de valina e 25% de isoleucina, totalizando 100 mg/kg de BCAA) na fosforilação de proteínas envolvidas na síntese proteica muscular após o exercício de força. Semelhante aos dados encontrados em nosso estudo, o exercício gerou um aumento significativo na fosforilação de p70S6k^{Ser424} e p70S6k^{Thr421} o qual persistiu até 2 horas após o término da sessão de exercício. A suplementação de BCAA aumentou este padrão de fosforilação em 3,5 vezes no período de recuperação, sendo que a fosforilação de p70S6k^{Thr389} aumentou somente no grupo suplementado com BCAA. O mesmo grupo de pesquisa realizou um estudo com o objetivo de distinguir a influência do exercício de força (4 séries de 10 repetições a 80% de 1RM, seguida de 4 séries de 15 repetições a 65% de 1RM em *leg press*) e da suplementação de BCAA (45% de leucina, 30% de valina e 25% de isoleucina, totalizando 85 mg/kg de BCAA) na expressão de proteínas envolvidas na regulação

da síntese proteica. Os autores observaram que independente da suplementação, a fosforilação de mTOR^{Ser2448} aumentou significativamente em ambas as pernas após o exercício. A fosforilação de p70s6k^{Thr389} aumentou somente com a suplementação de BCAA cerca de 11 e 30 vezes imediatamente e 1 hora após a sessão de exercício em relação à perna não exercitada. Surpreendentemente, a fosforilação de p70S6k^{Thr389} na perna não exercitada aumentou 5 e 16 vezes imediatamente e 1 hora após a sessão de exercício em relação ao repouso. A fosforilação do fator de alongamento eucariótico 2 foi atenuado 1 hora após a sessão de exercício tanto na perna controle (10-40%) como na perna exercitada (30-50%) em ambas condições (APRO; BLOMSTRAND, 2010).

Já vem sendo amplamente demonstrado na literatura que dentre os BCAA a leucina é responsável pela resposta anabólica por possuir uma taxa de oxidação maior quando comparada a isoleucina e valina. Estudos recentes apontam que a leucina é responsável por estimular os processos de síntese proteica muscular atuando na ativação/fosforilação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da via Akt/mTOR. Embora esses dados já venham sendo amplamente descritos na literatura, os estudos utilizam a leucina dentro do composto BCAA, pois há relatos na literatura que a suplementação isolada de leucina poderia causar um desbalanço na concentração de aminoácidos plasmáticos, sugerindo então um possível efeito antagônico sobre a aminoacidemia. Alguns autores especulam que esse efeito poderia influenciar os processos de síntese proteica muscular (VERHOEVEN et al., 2009; LEENDERS et al., 2011; NICASTRO et al., 2011). Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que comparou os efeitos da suplementação de leucina isolada e de BCAA sobre as vias de síntese proteica muscular. Curiosamente, verificamos em nosso estudo que de forma aguda a leucina isolada e o BCAA possuem efeitos semelhantes sobre as vias de síntese proteica muscular, homeostase de glicose e inflamação muscular e sistêmica. Com os nossos dados podemos observar que de forma aguda, diferentemente do que era especulado, a leucina estimula as vias de síntese proteica muscular na mesma magnitude que o BCAA. Esses dados nos permitem especular que o possível desbalanço na concentração de aminoácidos plasmáticos causados pela suplementação isolada de leucina, de forma aguda não prejudica a estimulação dos processos de síntese proteica. De forma aguda, a leucina estimula a ativação/fosforilação de proteínas

envolvidas na cascata de sinalização proteica muscular na mesma magnitude que o BCAA. Porém, de forma crônica não se sabe se esse desbalanço poderia influenciar de forma negativa os ganhos de massa e força muscular. São necessários mais estudos, que investiguem e comparem os efeitos da suplementação crônica de leucina e BCAA sobre as vias de síntese proteica muscular mensurando ganhos funcionais de força e massa muscular. Vale ressaltar que embora a expressão de proteínas musculares indique um possível aumento na síntese proteica que, consequentemente, podem refletir em aumento de massa e força muscular em longo prazo, a literatura tem demonstrado resultados controversos. Aparentemente, a cinética de expressão de tais proteínas não apresenta correlação significativa com a cinética da síntese proteica dinâmica. Dessa forma, é imprescindível a realização de estudos crônicos a fim de confirmar as potenciais evidências agudas da suplementação de leucina combinada ao treinamento de força sobre o remodelamento muscular.

A maioria dos estudos publicados na literatura que investigam o efeito da suplementação de BCAA sobre a ativação das proteínas envolvidas na cascata de sinalização de síntese proteica muscular utiliza como protocolo a suplementação de BCAA de forma fracionada ao longo do exercício de força e utilizam como placebo uma mistura contendo apenas carboidrato. Esses fatores são grandes limitações dos estudos já publicados. A suplementação de forma fracionada não é recomendada desde que um estudo recente publicado por West et al. (2011) demonstrou que a suplementação de aminoácidos em dose única é mais eficaz na estimulação da taxa de síntese proteica muscular. Os autores demonstraram que a dose aplicada de forma única é mais eficaz que a mesma dose aplicada de forma fracionada. Outra limitação dos estudos publicados é a escolha do placebo a ser utilizado. Diferentemente do protocolo adotado no nosso estudo, os estudos não utilizam um placebo isonitrogenado para comparação dos efeitos, portanto os achados podem ser questionados, pois não se sabe se os efeitos encontrados são devido à característica do aminoácido utilizado ou à carga de nitrogênio ofertada.

Esse estudo apresentou algumas limitações e deixou algumas lacunas a serem investigadas. Primeiramente, o desenho experimental não permitiu a realização do estudo de forma *crossover*. Não foi possível uma comparação adequada do perfil inflamatório dos sujeitos após o exercício de força, uma vez que

os valores de concentrações de citocinas plasmáticas e musculares apresentam uma grande variabilidade inter sujeito. Não podemos excluir a hipótese de que os resultados encontrados sejam devido à resposta individual e ao perfil inflamatório prévio dos sujeitos da amostra. Em segundo, não foram mensurados os valores da concentração plasmática de glutamina, portanto não se pode dizer se o padrão de comportamento encontrado foi devido à manutenção na concentração de glutamina plasmática.

São necessários mais estudos, que verifiquem os efeitos crônicos da suplementação de leucina e BCAA sobre as vias inflamatórias, para verificar se o balanço anti-inflamatório agudo persiste e se essa modulação não interfere nos mecanismos de adaptação e reparo muscular. Ainda mais, são necessários estudos crônicos a fim de confirmar as potenciais evidências agudas da suplementação de leucina e de BCAA combinada ao treinamento de força sobre o remodelamento muscular.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nós reportamos que o exercício de força unilateral agudo associado à suplementação de BCAA e leucina possuem efeitos semelhantes sobre o balanço inflamatório e sobre a via de sinalização de síntese proteica muscular Akt/mTOR. Nosso modelo nos permitiu demonstrar que a suplementação aguda de leucina e BCAA possuem efeitos semelhantes na estimulação das vias de síntese proteica muscular, aumentando a fosforilação de efetores da cascata de sinalização da via Akt-mTOR. Com nossos resultados podemos especular que a suplementação de BCAA e leucina podem possivelmente atuar no balanço inflamatório de indivíduos saudáveis após o exercício de força.

Referências

- ANTHONY, J.C.; YOSHIKAWA, F.; ANTHONY, T.G.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S.; KIMBALL, S.R. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. **J. Nutr.**, v.130, n.10, p.2413-2419, 2000.
- ANTHONY, J.C.; LANG, C.H.; CROZIER, S.J.; ANTHONY, T.G.; MACLEAN, D.A.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.282, n.5, p.E1092-101, 2002.
- APRÓ, W.; BLOMSTRAND, E. Influence of supplementation with branched-chain amino acids in combination with resistance exercise on p70S6 kinase phosphorylation in resting and exercising human skeletal muscle. **Acta Physiol (Oxf)**. v.200, n.3, p.237-48, 2010.
- ATHERTON, P.J.; BABRAJ, J.; SMITH, K.; SINGH, J.; RENNIE, M.J.; WACKERHAGE, H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB- TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. **FASEB J**, v. 19, p.786–798, 2005.
- BLOCH, R.J.; GONZALEZ-SERRATOS, H. Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 31, p.73–78, 2003.
- BODINE, S.C.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W.O.; STOVER, G.L.; BAUERLEIN, R.; ZLOTCHENKO, E.; SCRIMGEOUR, A.; LAWRENCE, J.C.; GLASS, D.J.; YANCOPOULOS, G.D. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol.**, v. 3, p.1014–1019, 2001.
- BOHÉ, J.; LOW, A.; WOLFE, R.R.; RENNIE, M.J. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. **J Physiol.**, v.552, p.315-24, 2003.
- BOLSTER, D.R.; KUBICA, N.; CROZIER, S.J.; WILLIAMSON, D.L.; FARRELL, P.A.; KIMBALL, S.R.; JEFFERSON, L.S. Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. **J Physiol**, v.15, p.213–220, 2003.

BOOTH, F.W.; BALDWIN, K.M. Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In: Rowell LB, Shepard JT (eds) Handbook of physiology. **Oxford University Press**, New York, pp 1074–1123, 1966.

BONDESSEN, B.A.; MILLS, S.T.; KEGLEY, K.M.; PAVLATH, G.K. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v.287, n.2, p.C475-83, 2004.

BORGENVIK, M.; APRÓ, W.; BLOMSTRAND, E. Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 302: E510–E521, 2012.

BORSHEIM, E.; TIPTON, K.D.; WOLF, S.E.; WOLFE, R.R. Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. **Am. J. Physiol.** 283, E648–E657, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976.

BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. **J. Nutr.**, v.136, p.207S-211S, 2006.

BRUUNSGAARD H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. **J Leuk Biol** 2005;78:819-35.

BURD, N.A.; HOLWERDA, A.M.; SELBY, K.C.; WEST, D.W.; STAPLES, A.W.; CAIN, N.E.; CASHBACK, J.G.; POTVIN, J.R.; BAKER, S.K.; PHILLIPS, S.M. Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. **J Physiol.** v.;588, p.3119-30, 2010.

CASTANEDA, C.; LAYNE, J.E.; MUNOZ-ORIAN, L.; GORDON, P.L.; WALSMITH, J.; FOLDVARI, M.; ROUBENOFF, R.; TUCKER, K.L.; NELSON, M.E. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. **Diabetes Care.**25(12):2335-41, 2002.

CHURCHWARD-VENNE, T.A.; MURPHY, C.H.; LONGLAND, T.M.; PHILLIPS, S.M. Role of protein and amino acids in promoting lean mass accretion with resistance exercise and attenuating lean mass loss during energy deficit in humans. **Amino Acids.** May 5, 2012 In press

CYNOBER, L.; HARRIS, R.A. Symposium on branched chain amino acids: conference summary. **J Nutr**, v.136, p.333S-336S, 2006.

CYNOBER, L.; BIER, D.M.; KADOWAKI, M.; MORRIS, S.M. JR; RENWICK, A.G. A proposal for an upper limit of leucine safe intake in healthy adults. **J Nutr**. v.142, n.12, 2249S-2250S, 2012.

DA LUZ, C.R.; NICASTRO, H.; ZANCHI, N.E.; CHAVES, D.F.S.; LANCHA JUNIOR, A.E. Potential therapeutic effects of branched-chain amino acids supplementation on resistance exercise-based muscle damage in humans. **Journal of the International Society of Sports Nutrition** , 8 :23, 2011.

DAN, H.C.; BALDWIN, A.S. Differential involvement of IkappaB kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt. **J Immunol**. v.180, n.11, p.7582-9, 2008.

DARDEVET, D.; SORNET, C.; BALAGE, M.; GRIZARD, J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **J Nutr**., v.130, n.11, p.2630-5, 2000.

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

DIVINO FILHO, J.C.; BARANY, P.; STEHLE, P.;FURST, P.;BERGSTROM, J. Free amino-acid levels simultaneously collected in plasma, muscle, and erythrocytes of uraemic patients. **Nephrol Dial Transplant**., v.11, p.2339-48, 1997.

DREYER, H.C.; FUJITA, S.; CADENAS, J.; CHINKES, D.L.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B.B. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 576, p.613–624, 2006.

DRENTH JP, KREBBERS RJ, BIJZET J, VAN DER MEER JW. Increased circulating cytokine receptors and ex vivo interleukin-1 receptor antagonist and interleukin1b production but decreased tumour necrosis factor-a production after a 5-km run. **Eur J Clin Invest**, 28:866-72, 1998.

ELLIS, K. J. Human Body Composition : In Vivo Methods. **American Physiological Society**. v.80, n.2, p. 649-680, 2000.

ERVASTI, J.M . Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. **J Biol Chem**, v. 278, p. 13591–13594, 2003.

FANG, Y.; PARK, I.H.; WU, A.L.; DU, G.; HUANG, P.; FROHMAN, M.A.; HUANG, P.; FROHMAN, M.A.; BROWN, H.A.; CHEN, J. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. **Curr Biol**, v.13, p.2037–2044, 2003.

FEBRAIO, M.A.; STEENBERG, R.L; MCCONELL, G.K.; KINGWELL, B.A. Skeletal Muscle Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- Release in Healthy Subjects and Patients With Type 2 Diabetes at Rest and During Exercise. **Metabolism**, Vol 52, No 7 (July), 2003: pp 939-944

FLYNN M, MCFARLIN BK, MARKOFSKI MA. The anti-inflammatory actions of exercise training. **Am J Lifestyle Med** ;1:220-35, 2007.

FOUAD, D.; SIENDONES, E.; COSTAN, G.; MUNTANE, J. Role of NF-kappaB activation and nitric oxide expression during PGE protection against d-galactosamine-induced cell death in cultured rat hepatocytes, **Liver Int**, vol. 24, n. 3, pp. 227-236, 2004.

GARCIA-MARTINEZ, C.; LLOVERA, M.; AGELL, N.; LÓPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILÉS, J.M. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased during sepsis: involvement of TNF-alpha but not IL-1. **Biochem Biophys Res Commun**. , v.217, n.3, p.839-44, 1995.

GARLICK, P.J. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. **J Nutr.**, p.1553S-6S, 2005.

GOLDMAN, H.I.; BECKLAKE, M.R. Respiratory function tests: normal values of medium altitudes and the prediction of normal results. **American Review of Tuberculosis and Respiratory Disease**, v.79, p.457-6, 1959. .

GOLDSPINK, G.; BOOTH, F. General remarks: mechanical signals and gene expression in muscle. **Am J Physiol**, v. 262, p.327–328, 1992.

HADDAD, F.; ADAMS, G.R . Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise. **J Appl Physiol**, v.93, p.393–40, 2002.

HADDAD, F.; ADAMS, G.R.; BODELL, P.W.; BALDWIN, K.M. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. **J Appl Physiol.**, v.100, n.2, p.433-41, 2006.

- HARPER, A.E.; MILLER, R.H.; BLOCK, K.P. Branched-chain amino acid metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v.4,p.409-454, 1984.
- HARRIS, R.A.; JOSHI, M.; JEOUNG, N.H.; OBAYASHI, M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. **J Nutr**, v.135, p.1527S-1530S, 2005.
- HONG, J.H.; OH, S.O.; LEE, M.; KIM, Y.R.; KIM, D.U.; HUR, G.M.; LEE, J.H.; LIM, K.; HWANG, B.D.; PARK, S.K. Enhancement of lysophosphatidic acid-induced ERK phosphorylation by phospholipase D1 via the formation of phosphatidic acid. **Biochem Biophys Res Commun**, v.281, p.1337–1342, 2001.
- HORNBERGER, T.A.; MCLOUGHLIN, T.J.; LESZCZYNSKI, J.K.; ARMSTRONG, D.D.; JAMESON, R.R.; BOWEN, P.E.; HWANG, E.S.; HOU, H.; MOUSTAFA, M.E.; CARLSON, B.A.; HATWELD, D.L.; DIAMOND, A.M.; ESSER, K.A. Selenoprotein-deficient transgenic mice exhibit enhanced exercise-induced muscle growth. **J Nutr**, v. 133, p.3091–3097, 2003.
- HORNBERGER, T.A.; CHIEN, S. Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. **J Cell Biochem**, v. 97, p.1207–1216, 2006.
- HURLEY, B.F.; ROTH, S.M. Strength training in the elderly: effects on risk factors for age-related diseases. **Sports Med.** 30(4):249-68, 2000.
- HUTSON, S.M.; SWEATT, A.J.; LANOUE, K.F. Branched chain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. **J Nutr**, v.135, p.1557S-1564S, 2005.
- INGBER, D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. **FASEB J.**, v.20, p.811–827, 2006.
- JANSSEN, S.P.; GAYAN- RAMIREZ, G.; VAN DEN BERGH, A.; HERIJGERS, P.; MAES, K.; VERBEKEN, E.; DECRAMER, M. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. **Circulation.** v.111, n.8, p.996-1005, 2005.
- KARLSSON, H.K.; NILSSON, P.A.; NILSSON, J.; CHIBALIN, A.V.; ZIERATH, J.R.;BLOMSTRAND, E. Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.287, n.1, p.E1-7, 2004

KOH, T.J.; PIZZA, F.X. Do inflammatory cells influence skeletal muscle hypertrophy? **Front Biosci** (Elite Ed). v.1, p.60-71, 2009.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; AMSTER, H.L.; BOZA, J.; KRISTENSEN, J.H.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation and protein supplementation on exercise-induced decreases in salivary IgA. **J. Appl. Physiol.**, v.91, p.832-838, 2001a.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; KRISTENSEN, J.H.; BOZA, J.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v.281, p.C1259-C1265, 2001b.

LAPOINTE, B.M.; FRENETTE, J.; CÔTÉ, C.H. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. **J Appl Physiol.** v.92, n.5, p.1995-2004, 2002.

LEENDERS, M.; VERDIJOK, L.B.; van der HOEVEN, L.; van KRANENBURG, J.; HARTGENS, F.; WODZIG, W.K.; SARIS, W.H.; van LOON, L.J. Prolonged leucine supplementation does not augment muscle mass or affect glycemic control in elderly type 2 diabetic men. **J. Nutr.**, 2011.

LÉGER, B.; CARTONI, R.; PRAZ, M.; LAMON, S.; DÉRIAZ, O.; CRETENAND, A.; GOBELET, C.; ROHMER, P.; KONZELMANN, M.; LUTHI, F.; RUSSEL, A.P. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol.**, v.1, p.923-33, 2006.

LI, W., MOYLAN, J.S., CHAMBERS, M.A., SMITH, J., REID, M.B. Interleukin-1 stimulates catabolism in C2C12 myotubes, **Am J Physiol Cell Physiol**, vol. 297, n. 3, pp. C706-714, 2009.

MARFELL-JONES M.; OLDS, T.; STEWART, A.; CARTER, L. International standards for anthropometric assessment ISAK: **Potchefstroom**, South Africa, 2006.

MARCHINI, J.S.; MORIGUTI, J.C.; PADOVAN, G.J.; NONINO, C.B.; VIANNA, S.M.L.; OLIVEIRA, J.E.D. Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: Aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos *Medicina*, v.31, n.1, p.22-30, 1998.

MASCHER, H.; TANNERSTEDT, J.; BRINK-ELFEGOUN, T.; EKBLOM, B.; GUSTAFSSON, T.; BLOMSTRAND, E. Repeated resistance exercise training induces different changes in

mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.294, p.43-51, 2008.

MAYER, U. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? **J Biol Chem.**, v.278, p.14587–14590, 2003.

.

MERO, A. Leucine supplementation and intensive training. **Sports Med.**, v.27, n.6, p.347-358, 1999.

MOLDOVEANU, A.I.; SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1b, IL-6, and TNF- α in blood mononuclear cells. **J Appl Physiol** ;89:1499-504, 2000.

MURTON, A.J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P.L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. **Biochim Biophys Acta.** v.1782, n.12, p.730-43, 2008.

NADER, G.A.; ESSER, K.A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **J Appl Physiol** 90 (5): 1936-42, 2001

NAVE, B.T.; OUWENS, D.J.; WITHERS, D.R.; SHEPHERD, A.; SHEPHERD, P.R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. **Biochem J.**, v. 344, p.427–431, 1999.

NORTON, L.E.; LAYMAN, D.K. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. **J. Nutr.**, v.136, n.2, p.533S-537S, 2006.

NICASTRO, H. et al. An overview of the therapeutic effects of leucine supplementation on skeletal muscle under atrophic conditions. **Amino acids**, 2010.

NICASTRO, H.; DA LUZ, C.R.; CHAVES, D.F.; BECHARA, L.R.G.; VOLTARELLI, V.A.; ROGERO, M.M.; et al. Does branched-chain amino acids supplementation modulate skeletal muscle remodeling through inflammation modulation? Possible mechanisms of action. **J Nutr Metab.** 2012.

OHANNA, M.; SOBBERING, A.K.; LAPOINTE, T.; LORENZO, L.; PRAUD, C.; PETROULAKIS, E.; SONENBERG, N.; KELLY, P.A.; Sotiropoulos A, Pende M. Atrophy of S6k1 β skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. **Nat Cell Biol.**, v. 7, p.286–294, 2005.

PALLAFACCHINA, G.; CALABRIA, E.; SERRANO, A.; KALHOVDE, J.M.; SCHIAFINO, S. A protein kinase B-dependent and rapamycin sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p.9213–9218, 2002

PEAKE, J.M.; SUZUKI, K.; HORDERN, M.; WILSON, G.; NOSAKA, K.; COOMBES, J.S. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. **Eur J Appl Physiol** ;95:514-21, 2005.

PEDERSEN, B.K.; FEBBRAIO, M.A. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. **Physiol Rev** ;88:1379-406, 2008.

PENCHARZ, P.B.; ELANGO, R.; BALL, R.O. Determination of the tolerable upper intake level of leucine in adult men. **J Nutr.** v.142, n.12, 2220S-2224S, 2012.

PETERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol** ;98:1154-62, 2005.

POWER, A.; HALLIHAN, A.E.; JAKEMAN, P. Human insulinotropic response to oral ingestion of native and hydrolysed whey protein. **Amino Acids**, 37:333–339, 2009.

PHILLIPS, S.M.; PARISE, G.; ROY, B.D.; TIPTON, K.D.; WOLFE, R.R.; TARNOPOLSKY, M.A. Resistance-training-induced adaptations in skeletal muscle protein turnover in fed state. **Can J Physiol Pharmacol.**, v.80, p.1045–1053, 2002.

RENNIE, M.J.; WACKERHAGE H. Connecting the dots for mechanochemical transduction in muscle. **J Physiol** v.553,p.1, 2003.

REYNOLDS, T.H.; BODINE, S.C.; LAWRENCE, Jr J.C. Control of Ser 2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. **J Biol Chem.**, v. 277,p.17657–17662, 2002.

RIQUE, A.B.R.; SOARES, E.A.; MEIRELES, C.M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Med Esporte** Vol. 8, Nº 6 – Nov/Dez, 2002.

ROGERO, M.M.; TIRAPGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 44, n. 4, out./dez., 2008.

ROMMEL, C.; BODINE, S.C.; CLARKE, B.A.; ROSSMAN, R.; NUNEZ, L.; STITT, T.N.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Mediation of IGF-1 induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/ Akt/GSK3 pathways. **Nat Cell Biol.**, v. 3, p.1009–1013, 2001.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy, **Physiology (Bethesda)**, vol. 23, n. pp. 160-170, 2008.

SANTOS, R.V.; BASSIT, R.A.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.F. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30 km race. **Life Sci.** 75, 1917–1924, 2004.

SAKAMOTO, K.; HIRSHMAN, M.F.; ASCHENBACH, W.G.; GOODYEAR, L.J. Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle. **J Biol Chem.**, v.277, p.11910–11917, 2002.

SCAGLIUSI, F. et al. Under-reporting of energy intake is more prevalent in a healthy dietary pattern cluster. **Br J Nutr.**, v.100, p.1060–1068, 2008.

SCHIMIDT, J. et al. Interrelation of inflammation and APP in sIBM: IL-1 β induces accumulation of β -amyloid in skeletal muscle. **Brain**, v. 131, n. 5, p. 1228–1240, 2008.

SCOTT, P.H.; BRUNN, G.J.; KONH, A.D.; ROTH, R.A.; LAWRENCE, Jc-JR. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p.7772–7777, 1998.

SHEN, W.; LI, Y.; TANG, Y.; CUMMINS, J.; HUARD, J. NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. **Am J Pathol.** 2005 Oct;167(4):1105-17.

SHIMOMURA, Y., et al. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. **The Journal of Nutrition**, v.136, n.2, p.529S-532S, 2006a.

SHIMOMURA, Y.; HARRIS, R.A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. **J. Nutr.**, v.136, p.232S-233S, 2006b.

SHIMOMURA, Y., et al. Effects of Squat Exercise and branched-chain amino acids supplementation on plasma free amino acid concentrations in young women. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 55, p. 288-291, 2009.

SIRI, W.E. Body composition from fluid spaces and density. In: Brozek J, Henschel A, editors. Techniques for measuring body composition. Washington DC: **National Academy of Science**, p.223-44, 1961.

SMITH, S.A.; MONTAIN, S.J.; MATOTT, R.P; ZIENTARA, G.P.; JOLESZ, J.M.; FIELDING, R.A. Creatine supplementation and age influence muscle metabolism during exercise. **J. Appl. Physiol.** 85,1349–1356,1998.

SOLTOW, Q.A.; BETTERS, J.L.; SELLMAN, J.E.; LIRA, V.A.; LONG, J.H.; CRISWELL, D.S. Ibuprofen inhibits skeletal muscle hypertrophy in rats. **Med Sci Sports Exerc.**, v.38, n.5, p.840-6, 2006.

SORICHTER, S.; PUSCHENDORF, B.; MAIR, J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. **Exerc Immunol Rev**, v.5, p.5–21, 1999.

SPIERING, B.A.; KRAEMER, W.J.; ANDERSON, J.M.; ARMSTRONG, L.E.; NINDL, B.C.; VOLEK, J.S.; MARESH, C.M. Resistance Exercise Biology: Manipulation of Resistance Exercise Programme Variables Determines the Responses of Cellular and Molecular Signalling Pathways. **Sports Med** 38 (7): 527-540, 2008.

STOKOE, D.; STEPHENS, L.R.; COPELAND, T.; GAFINEY, P.R.; REESE, C.B.; PAINTER, G.F.; HOLMES, A.B.; MCCORMICK, F.; HAWKINS, P.T. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. **Science**, v. 277, p.567–701, 1997.

TEE, A.R.; BLENIS, J.. mTOR, translational control and human disease. **Semin Cell Dev Biol.**, v.16, n.1, p.29-37, 2005.

TERZIS, G.; SPENGOS, K.; MASCHER, H.; GEORGIADIS, G.; MANTA, P.; BLOMSTRAND, E. The degree of p70 S6k and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume. **Eur J Appl Physiol.** Nov;110(4):835-43, 2010.

TIPTON, K.D.; ELLIOTT, T.A.; FERRANDO, A.A.; AARSLAND, A.A.; WOLFE, R.R. Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v.34, n.2, p.151-61, 2009.

TOM, A.; NAIR, K.S. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. **J. Nutr.**, v.136,n. p.324S-330S, 2006.

TRAPPE, T.A.; WHITE, F.; LAMBERT, C.P.; CESAR, D.; HELLERSTEIN, M.; EVANS, W.J. Effect of ibuprofen and acetaminophen on postexercise muscle protein synthesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.282, n.3, p.:E551-6, 2002.

VAN LOON, L.J.; KRUIJSHOOP, M.; VERHAGEN, H.; SARIS, W.H.; WAGENMAKERS, A.J. Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. **J Nutr.** v.130, n.10, 2508-13, 2000.

VERHOEVEN , S.; VANSCHOONBEEK, K.; VERDIJIK, L.B.; KOOPMAN, R.; WODZIG, W.K.; DENDALE, P.; van LOON, L.J. Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. **Am J Clin Nutr**, v.89, n.5, p.1468-75, 2009.

VOLPI, E.; KOBAYASHI, H.; SHEFFIELD-MOORE, M.; MITTENDORFER, B.; WOLFE, R.R. Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. **Am. J. Clin. Nutr.** 78, 250–258, 2003.

WAGENMAKERS, A.J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v.26, n. p.287-314,1998.

WEST, D.W.D.; BURD, N.A.; COFFEY, V.G.; BAKER, S.K.; BURKE, L.M.; HAWLEY, J.A.; MOORE, D.R.; TELLINGWER, F.F.T.S.; PHILLIPS, S.M. Rapid aminoacidemia enhances myofibrillar protein synthesis and anabolic intramuscular signaling responses after resistance exercise. **Am J Clin Nutr.** Sep;94(3):795-803, 2011.

WILMORE, J.H.; BEHNKE, A.R. An anthropometric estimation of body density and lean body weight in young men. **Journal of Applied Physiology.** v.27, n.1, p.25-31, 1969.

YANG, Q.; GUAN, K.L. Expanding mTOR signaling. **Cell Res**;17:666-81, 2007.

YASUKAWA,T.; TOKUNAGA,E.; OTA,H.; SUGITA,H.; MARTYN, J.A.; KANEKI,M. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance, **J Biol Chem**, vol. 280, n. 9, pp. 7511-7518, 2005.

ZANCHI, N.E.; NICASTRO, H; LANCHI, A.H Jr. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and in vivo studies. **Nutr Metab.**, v.5, n.20, 2008.

ZANCHI, N. E. et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. **Amino Acids**, 2010.