

ANÁLISE DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA HIPERTROFIA MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS WISTAR

Leticia F. D. de Oliveira¹, Juliana S. Almeida¹, Gislaine Ventrucci²

1. Estudante de IC de Medicina, da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC/SP
2. Pesquisadora da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC/SP – Departamento de Ciências Fisiológicas / Orientadora

Resumo:

O envelhecimento está intimamente associado a perda progressiva da massa e força muscular esquelética, fenômeno conhecido como sarcopenia. O exercício físico e uma dieta adequada são intervenções promissoras que podem atrasar a perda muscular. A leucina pode regular o metabolismo proteico por estimular a síntese proteica muscular esquelética. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da associação do exercício físico e da suplementação de leucina na dieta na musculatura esquelética de animais idosos. Foi avaliado a expressão de proteínas envolvidas na sinalização da síntese proteica muscular de ratos Wistar (5 e 15 meses de idade) que foram exercitados ou não e tratados com dieta controle ou rica em leucina. Observamos que o grupo de animais idosos sedentário (IS) reduziu o conteúdo de proteínas musculares quando comparado ao grupo Adulto. Observamos que o exercício físico induziu a expressão de IGFR-1 no músculo gastrocnêmio de animais idosos treinados (IT e LT).

Autorização legal: Projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da PUCSP, nr 2014/22.

Palavras-chave: leucina, exercício físico, síntese proteica.

Apoio financeiro: PIBIC - CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: PUC/SP

Introdução:

Atualmente, alguns idosos estão mais preocupados com a saúde física e mental e, dessa forma, praticam exercício físico. O exercício físico aeróbio, quando realizado de forma crônica, é responsável por modificações no sistema cardiovascular e no músculo esquelético. Por outro lado, o envelhecimento leva a uma perda progressiva de massa muscular esquelética (sarcopenia), que pode levar a incapacidade física e dependência funcional do indivíduo. Múltiplos fatores levam ao desenvolvimento dessa síndrome, que pode ter maior impacto quando associada ao estilo de vida sedentário e a má nutrição. As alterações que ocorrem no músculo esquelético podem ser resultado de uma menor capacidade de síntese proteica e aumento da proteólise, além da redução da capacidade da membrana em transportar aminoácidos que, conseqüentemente, reduz a disponibilidade dos aminoácidos para a síntese proteica. O exercício físico tem apresentado resultados promissores no atraso da perda muscular. Além disso, uma dieta adequada e balanceada se faz necessária quando se pratica atividade física, pois fornece suprimentos energéticos para a manutenção das funções orgânicas e para o metabolismo proteico. A leucina assume importante papel regulatório no metabolismo proteico e parece estimular a síntese proteica muscular esquelética. Justificativa: Como a população envelhece, há a necessidade de entender os

mecanismos que levam a sarcopenia. É preciso aprofundar os estudos das consequências da sarcopenia na população acima dos 60 anos. A associação da atividade física à dieta rica em leucina pode estimular a síntese proteica muscular esquelética em idosos, levando à estagnação da perda de massa e proporcionar um estilo de vida saudável e melhorar a qualidade de vida. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da associação do exercício físico e da suplementação de leucina da musculatura esquelética de animais idosos e quantificar a expressão de proteínas envolvidas na síntese proteica do músculo esquelético (GLUT-4, IGFR-1 e mTOR) em animais submetidos ou não ao exercício físico.

Metodologia:

Trinta e cinco ratos Wistar (5 e 15 meses de idade) foram randomizados e distribuídos em cinco grupos experimentais. Três deles (grupo adulto, grupo idoso controle e grupo idoso treinado) receberam dieta normoproteica (18% de proteína, AIN-93G) e outros dois (grupo leucina idoso e grupo leucina treinado) receberam dieta rica em leucina (18% de proteína + 3% de L-leucina durante 6 semanas. Os grupos treinados realizaram um programa de atividade física com sessões de natação. A adaptação ao treinamento consistiu em natação sem sobrecarga com tempo progressivo durante as 2 primeiras semanas, 15, 30, 45 e 60 minutos. O exercício foi realizado em uma piscina de natação para animais, com temperatura controlada ($31 \pm 1^\circ\text{C}$). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12-12 horas. Os animais tiveram livre acesso a dieta e água. Antes do início do exercício (natação), os animais dos grupos treinados foram adaptados ao meio líquido ($31 \pm 1^\circ\text{C}$) por 10 dias. Esta fase de adaptação constituiu inicialmente em deixar os animais em contato

com água rasa. Os animais dos grupos sedentários foram apenas manipulados. Nessa fase de adaptação todos os animais receberam dieta controle. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados com anestesia intraperitoneal com dose excessiva de solução de Ketamina 10% (10 mg/mL) associada a Xilazina 2% (2mg/mL) e os músculos gastrocnêmio foram removidos. Alíquotas dos músculos gastrocnêmico foram homogeneizadas em solução tampão (20 mM Tris, 1mM DTT, 2 mM ATP e 5 mM MgCl_2 , pH 7,4), utilizando homogeneizador de tecidos, e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos à 4°C . Do sobrenadante foi avaliada a concentração de proteína total (método de Lowry) e analisada a expressão das proteínas IGFR-1, GLUT-4 e mTOR (Western Blotting). A detecção de proteínas IGFR-1, GLUT-4 e mTOR no músculo gastrocnêmico foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), utilizando-se kit de quimioluminescência (ECL) para detecção das bandas. Para corrida de gel eletroforese foram aplicados 5ug de proteína e, após separação, realizou-se a transferência em membrana de nitrocelulose. Para a determinação da IGFR-1, IR-1 e mTOR foram utilizados como anticorpos primário anti-goat policlonal contra IGFR-1, GLUT-4 e mTOR (Santa Cruz), diluição 1:750, fazendo-se ligação com o anticorpo secundário para as proteínas utilizamos anti-mouse (Santa Cruz) na diluição 1:1000. A reação de quimioluminescência foi determinada com reagente ECL (Amersham) e análise densitométrica da banda proteica foi feita com auxílio do Image Capture (SynGene) e analisadas segundo software genetools.

Resultados e Discussão:

Observamos que o grupo idoso controle sedentário (IS) apresentou redução do conteúdo proteico do músculo gastrocnêmio quando comparado ao grupo adulto (A). Esses dados corroboram com os dados de literatura, que relatam que durante o envelhecimento ocorre perda da massa muscular (sarcopenia). Por outro lado, o grupo tratado com dieta rica em leucina (LS) apresentou valores dos conteúdos de proteína próximos ao grupo A e apresentou aumento quando comparado ao

grupo IS ($p < 0,05$). Verificamos que o exercício físico induziu a expressão de IGFR-1 no músculo gastrocnêmio de animais idosos treinados (IT e LT), indicando que a leucina pode estar envolvida no sistema IGF-1/GFR-1.

Conclusões:

A maquinaria da síntese proteica é realizada por vários mecanismos e a leucina é estimuladora de uma delas. A via de sinalização celular mediada pela leucina na síntese proteica tem sido investigada. Nossos resultados mostraram maior expressão de IGFR-1 quando os animais foram tratados com dieta rica em leucina e submetidos ao exercício físico, indicando maior síntese proteica nesses animais idosos sarcopenicos, aumentando sua massa muscular esquelética. Apesar disso, a expressão dos receptores de GLUT-4 e mTOR não correspondeu aos resultados esperados com base na literatura.

Referências bibliográficas

ADAMO ML, FARRAR RP. Resistance training and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process. *Aging Res Rev.* 5(3): 310:331, 2006.

KATO H, SUZUKI H, MIMURA M, et al. Leucine-enriched essential amino acids attenuate muscle soreness and improve muscle protein synthesis after eccentric contractions in rats. *Amino Acids.* 47(6): 1193–1201, 2015

PHILLIPS SM. A Brief Review of Critical Processes in Exercise-Induced Muscular Hypertrophy. *Sports Med.* 44 (Suppl 1):S71–S77, 2014.

PROUD CG. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Obst Gynecol*, 71: 861-64, 2003.

REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY J. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *Journal of Nutrition* 123: 1939-1651, 1993.

YANAI, H. Nutrition for Sarcopenia. *Journal of Clinical Medicine Research*, 7(12): 926–931, 2015.

PÍCOLI TDAS, FIGUEIREDO LL, DE PATRIZZI LJ. Sarcopenia and aging. *Fisioter. Mov*, 24(3): 455–462, 2011.

MORTON RW, McGLORY C, PHILLIPS SM. Nutritional interventions to augment resistance training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol.* 3(6):245, 2015.