

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

**Relação entre a suplementação de
leucina e a sarcopenia**

Marcelle Xavier Lacourt Rossetto

Passo Fundo
2011

Marcelle Xavier Lacourt Rossetto

Relação entre a suplementação de leucina e a sarcopenia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Envelhecimento Humano.

Orientador:

Dra. Telma Elita Bertolin

Co-orientador:

Dr. Hugo Tourinho Filho

CIP – Catalogação na Publicação

-
- R829r Rossetto, Marcelle Xavier Lacourt
Relação entre a suplementação de leucina e a sarcopenia /
Marcelle Xavier Lacourt Rossetto. – 2011.
65 f. : il. color. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) –
Universidade de Passo Fundo, 2011.
Orientação: Dra. Telma Elita Bertolin.
Co-orientação: Dr. Hugo Tourinho Filho.
1. Sistema musculoesquelético. 2. Proteínas - Metabolismo. 3.
Envelhecimento. 4. Leucina. 5. Sarcopenia. 6. Suplementos
alimentares. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora. II. Tourinho
Filho, Hugo, co-orientador. III. Título.

CDU: 613.98

Catálogo: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA

Marcelle Xavier Lacourt Rossetto

Aos trinta e um dias do mês de março do ano dois mil e onze, às dezesseis horas e trinta minutos, realizou-se, na Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, a sessão pública de defesa da Dissertação: “Relação entre a suplementação de leucina e a sarcopenia”, apresentada pela mestranda Marcelle Xavier Lacourt Rossetto, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Envelhecimento Humano. Segundo os encaminhamentos do Conselho de Pós-Graduação (CPG) do Mestrado em Envelhecimento Humano e dos registros existentes nos arquivos da Secretaria do Programa, a aluna preencheu todos os requisitos necessários para a defesa. A banca foi composta pelos professores doutores Telma Elita Bertolin - orientadora e presidente da banca examinadora (UPF), Hugo Tourinho Filho (Co-orientador UPF), Rodolfo Herberto Schneider, Luciane Maria Colla, Hugo Roberto Kurtz Lisboa e Luiz Antonio Bettinelli. Após a apresentação e a arguição da dissertação, a banca examinadora considerou a candidata APROVADA, em conformidade com o disposto na Resolução Consun N° 07/2010.

A banca recomenda a consideração dos pareceres, a realização dos ajustes sugeridos e a divulgação do trabalho em eventos científicos e em publicações.

Encerrados os trabalhos de defesa e proclamados os resultados, eu, Prof^ª. Dr^ª. Telma Elita Bertolin, presidente, dou por encerrada a sessão pela banca.

Prof^ª. Dr^ª. Telma Elita Bertolin
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Hugo Tourinho Filho
Co-orientador UPF

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Pontifícia Universidade Católica.RS

Passo Fundo, 31 de março de 2011.

Luciane Maria Colla
Universidade de Passo Fundo

Hugo Roberto Kurtz Lisboa
Universidade de Passo Fundo

Luiz Antonio Bettinelli
Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa ao meu esposo Luciano Carvalho Rossetto, pelo
companheirismo e pelo incentivo constante.

Isto me encoraja a seguir em frente e a lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de dizer que estou muito feliz em ter chego até aqui e de estar concretizando mais uma etapa na minha vida, por conquistar o título de Mestre em Envelhecimento Humano e por ter realizado um trabalho que acredito ser muito importante para a área.

Obrigada a Deus e a Nossa Senhora... não há como deixar de lembrar desta força que me move todos os dias, que guia os meus passos.

Obrigada a minha orientadora, Professora Telma Elita Bertolin pelo acompanhamento e conselhos para o desenvolvimento deste estudo e ao meu coorientador Professor Hugo Tourinho Filho, pela dedicação e atenção com esta dissertação.

Agradeço ao Professor Sérgio Porto e aos funcionários do Biotério da UPF, Ely, Sérgio e Rodrigo, pelo auxílio com os animais, e também a Elaine, funcionária do ICB.

Agradeço ao Professor Clóvis Milton Duval Wannmacher e a sua equipe do Laboratório de Bioquímica da UFRGS e a Professora Miriam Alice Frantz da Feevale, pela receptividade e pela ajuda.

Aos colegas de mestrado e em especial Greici Konrath e Daiane Mazzola que foram companheiras de todas as horas.

A Professora Simone Rossetto, da Feevale, pelo carinho e dedicação. O seu auxílio foi fundamental para a concretização deste estudo.

Obrigada a Fisioterapeuta Bruna Gobbi pela força e amizade e aos seus pais Joice e Cézár, que são pessoas raras de se encontrar.

Agradeço a todos os amigos e aos pacientes que direta e indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus pais, Nilo e Ivone, pela educação, pelo incentivo na busca de mais conhecimento, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e também às minhas irmãs Roberta e Manuella.

À minha família do coração. Meus sogros Nelson e Ely (*in memoriam*) e as minhas cunhadas Anita e Simone. Vocês são mais que especiais, são maravilhosos.

Finalmente, ao Luciano Carvalho Rossetto, meu marido que é uma pessoa preciosa, meu companheiro de todas as horas e meu grande incentivador. Te amo!

Também agradeço ao nosso tesouro, nosso bebê, simplesmente por já existir. Sei que você, meu anjo, vai chegar para iluminar nossas vidas. Mamãe te ama!

RESUMO

Rossetto, Marcelle Xavier Lacourt. **Relação entre a suplementação de leucina e a sarcopenia**. 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

A perda da massa muscular é um dos principais responsáveis pela limitação da mobilidade, da força e da capacidade funcional no envelhecimento. Em função disto, a sarcopenia tem se tornado objeto de muitas pesquisas que buscam identificar as suas causas e minimizar os seus efeitos para uma melhor qualidade de vida dos idosos. Na atualidade, os aminoácidos de cadeia ramificada, especialmente a leucina, têm sido apontados como uma estratégia no combate a atrofia muscular em função da sua relação com o metabolismo protéico muscular. O presente estudo investigou a relação entre o aporte de L-leucina no processo de sarcopenia. Para tal, foram utilizados 40 camundongos *Mus musculus*, com idade de 12 meses, divididos em quatro grupos: grupo controle (GC), grupo leucina 1 (GL1), grupo leucina 2 (GL2) e grupo leucina 3 (GL3), que receberam a suplementação de leucina na dieta *ad libidum* (0,042 g leucina/ 5 g ração/dia, 0,055 g leucina/ 5 g ração/dia e 0,063 g leucina/ 5 g ração/dia), respectivamente. O sacrifício foi realizado por inalação de halotano. O músculo gastrocnêmio foi retirado e estas amostras foram analisadas pelo método colorimétrico de Lowry para obter a concentração de proteína total e, histologicamente, utilizando a coloração hematoxilina-eosina, para evidenciar os níveis de atrofia muscular. A análise da massa corporal foi realizada mediante pesagem nos tempos inicial e final do experimento (90 dias). Os resultados foram submetidos a análise de variância para comparação múltipla entre os grupos (ANOVA), teste “Post Hoc” Tukey, teste t pareado e teste não paramétrico Qui-Quadrado. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os resultados mostram que foi possível verificar diferença significativa na média de concentração de proteínas entre os grupos, ou seja, o GL 1 apresenta média de concentração de proteína significativamente menor em comparação ao GL 2 e ao GL 3. Identificou-se também que o nível de atrofia do músculo e os grupos estão associados significativamente, pois, nos grupos GL 2 e GL 3 o percentual de camundongos sem atrofia é superior. Com relação à massa corporal houve uma redução significativa somente do GC quando comparado antes e depois do tratamento, sugerindo assim que houve uma maior preservação da massa corporal nos grupos suplementados com leucina. Com base nestes resultados conclui-se que a suplementação com leucina, em doses supra-fisiológicas, influencia de maneira positiva sobre o metabolismo protéico muscular, auxiliando na preservação do diâmetro das fibras musculares e conseqüente manutenção da massa corporal. Assim, sugere-se que a suplementação com leucina pode ser utilizada como estratégia para atenuar os efeitos da sarcopenia, bem como auxílio terapêutico durante a reabilitação de idosos.

Palavras-chave: **1. Envelhecimento. 2. Sarcopenia. 3. Leucina. 4. Suplementação.**

ABSTRACT

The loss of muscle mass is a major contributor to the limitation of movement, strength and functional capacity in aging. Because of this, sarcopenia has become the subject of many studies that seek to identify their causes and minimize their effects for a better quality of life for seniors. Currently, the branched chain amino acids, especially leucine, have been suggested as a strategy to combat muscle atrophy in terms of their relation to muscle protein metabolism. This study investigated the relationship between intake of leucine in the process of sarcopenia. To this end, we used 40 mice *Mus musculus*, aged 12 months, divided into four groups: control group (CG), leucine group 1 (GL1), leucine group 2 (GL2) and leucine group 3 (GL3), which received leucine supplementation in the diet ad libitum (0.042 g leucine / 5 g diet / day, 0.055 g leucine / 5 g diet / day and 0.063 g leucine / 5 g diet / day), respectively. Animals were euthanized by halothane inhalation. The gastrocnemius muscle was removed and these samples were analyzed by the colorimetric method of Lowry for the total protein and, histologically using hematoxylin-eosin staining to highlight the levels of muscle atrophy. The analysis of body mass was performed by weighing the initial and final times of the experiment (90 days). The results were subjected to analysis of variance for multiple comparisons between groups (ANOVA), post hoc Tukey, t test and nonparametric chi-square. Values were considered significant when $p \leq 0.05$. The results show that it was possible to verify significant differences in average protein concentration between groups, ie, the GL has a mean concentration of protein significantly lower compared to the GL 2 and GL 3. It was identified that the level of muscle atrophy and the groups are significantly associated, as in the groups GL 2 GL 3 and the percentage of mice without atrophy is superior. With respect to body mass was significantly reduced only in the CG compared before and after treatment, suggesting that there was greater preservation of body mass in groups supplemented with leucine. Based on these results it is concluded that supplementation with leucine, at supraphysiological doses, of a positive influence on muscle protein metabolism, assisting in the preservation of the diameter of muscle fibers and subsequent maintenance of body weight. Thus, it is suggested that leucine supplementation can be used as a strategy to mitigate the effects of sarcopenia, as well as therapeutic support during rehabilitation of elderly people.

Key words: 1. Aging. 2. Sarcopenia. 3. Leucine. 4. Supplementation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do músculo esquelético.	20
Figura 2 – Estrutura de uma fibra muscular esquelética.	21
Figura 3 - Estrutura molecular das proteínas contráteis do músculo esquelético.	22
Figura 4 - Unidade motora.	23
Figura 5 - Fontes e destinos dos aminoácidos.	26
Figura 6 - Degradação da leucina.	28
Figura 7 - Lista parcial dos mecanismos e conseqüências da sarcopenia.	32
Figura 8 - Síntese protéica mediada por leucina.	35
Figura 9 - Membro inferior do camundongo.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação nutricional dos aminoácidos	25
Tabela 2 - Distribuição dos grupos experimentais para os diferentes tratamentos	37
Tabela 3 - Comparação entre as médias da concentração de proteínas entre os grupos	42
Tabela 4 - Interação da concentração de proteína entre os grupos	43
Tabela 5 – Valores da concentração de proteína e a atrofia muscular no GC	43
Tabela 6 - Concentração de proteína e a atrofia muscular no GL1	44
Tabela 7 - Concentração de proteína e a atrofia muscular no GL2	44
Tabela 8 - Concentração de proteína e a atrofia muscular no GL3	45
Tabela 9 - Comparação da atrofia muscular entre os diferentes grupos	45
Tabela 10 – Teste Qui–quadrado para os níveis de atrofia muscular entre os grupos	46
Tabela 11 - Comparação das médias da massa corporal no GC	46
Tabela 12 - Comparação das médias da massa corporal no GL1	47
Tabela 13 - Comparação das médias da massa corporal no GL2	47
Tabela 14 - Comparação das médias da massa corporal no GL3	47
Tabela 15 – Diferença da massa corporal entre os grupos	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP Pi - Adenosina difosfato e fosfato inorgânico

AMPK - proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

ATP - Trifosfato de adenosina

ATPase - Enzima

CoA - Coenzima A

eIF4G - fator de iniciação eucariótico

IRS-1 - substrato do receptor de insulina 1

mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos

PI3-K- fosfatidil-inositol-3-quinase

p70S6k - proteína quinase ribossomal

PKB - proteína quinase B

RNA_m - RNA mensageiro

4E-BP1= inibidor do fator de iniciação da tradução protéica

LISTA DE SÍMBOLOS

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 MUSCULATURA ESQUELÉTICA E MECANISMO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR	19
3.2 Estruturas das proteínas e metabolismo protéico	24
3.3 Relação entre nutrição e sarcopenia	29
3.4 Suplementação com leucina como uma alternativa antiatrófica	34
4 METODOLOGIA	37
4.1 Modelo experimental	37
4.2 Tratamentos	37
4.3 Descrição dos grupos experimentais	37
4.3.1 Grupo Controle (GC)	37
4.3.2 Grupo Leucina 1 (GL1)	38
4.3.3 Grupo Leucina 2 (GL2)	38
4.3.4 Grupo Leucina 3 (GL3)	38
4.4 Procedimentos experimentais	38
4.4.1 Elaboração da dieta com leucina	38
4.4.2 Controle de massa corporal	39
4.4.3 Sacrifício dos animais	39
4.4.4 Extração do músculo gastrocnêmio	39
4.5 Análises químicas e bioquímicas	40
4.5.1 Determinação da concentração da proteína muscular	40
4.6 Análise Histológica	40
4.7 Análise Estatística	40
4.8 Questões Éticas	41
4.9 Divulgação	41
5 RESULTADOS	42

5.1 Comparação da concentração de proteínas entre os grupos	42
5.2 Comparação entre a concentração de proteína muscular e a atrofia muscular	43
5.3 Comparação da atrofia muscular entre os grupos	45
5.4 Comparação da massa corporal dentro dos grupos	46
5.5 Massa corporal entre os grupos	48
6 DISCUSSÃO	49
6.1 Concentração da proteína muscular	49
6.2 Concentração de proteína e a atrofia muscular	52
6.3 Massa corporal	53
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A atrofia muscular ocasionada pelo envelhecimento é um processo biológico, inerente a todos os seres humanos (ROBERGS e ROBERTS, 2002). Este processo gradativo, chamado sarcopenia, traz consigo conseqüências como a perda de força e da qualidade da contração muscular, déficits funcionais, com limitação da mobilidade, do equilíbrio, da marcha, das atividades de vida diária e, levando muitas vezes à dependência, principalmente se acompanhada por alguma doença (CRUZ-JENTOFT et al., 2010). Uma das condições que se observa para o desenvolvimento da sarcopenia é que ocorre um desequilíbrio entre a síntese e a degradação protéica muscular. Este fator é um dos promotores da perda de massa muscular que ocorre de 3 a 8 % a partir dos 35 - 40 anos, sendo acelerado após os 60 anos (reduzindo cerca de 30 % entre os 50 e 70 anos) (DREYER e VOLPI, 2005). Estudos realizados com ambos os sexos e faixas etárias variando dos 20 aos 90 anos de idade, demonstram que os efeitos da perda de massa muscular são aparentes a partir dos 50 anos de idade, sendo que, por volta dos 80 anos há redução de 50 % das fibras musculares, moto-neurônios, unidades motoras, massa e força muscular (ROGERS e EVANS, 1993; MATSUDO; MATSUDO; BARROS NETO, 2000).

A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada que possui efeito anabólico no metabolismo protéico por influenciar no mecanismo de síntese e de degradação de proteínas no músculo esquelético. Pesquisas recentes apontam que a suplementação com a leucina influencia no controle da massa muscular em diversas condições atroficas, diminuindo a perda de massa muscular (ZANCHI et al., 2008). O estilo de vida ativo e a suplementação com o aminoácido leucina têm sido apontados como atenuadores da atrofia muscular. No entanto, pouco se evidencia a respeito da relação entre o aporte de leucina e a sarcopenia.

Uma das hipóteses é que, em algumas circunstâncias, como no envelhecimento, ocorre um desequilíbrio entre a síntese e a degradação protéica, o que aceleraria a perda de massa magra e aumentaria a massa gorda nos idosos. Segundo Paddon-Jones (2008) a demanda de aminoácidos é um determinante para a síntese de proteína muscular, sendo a ingestão ineficiente ou insuficiente de proteínas um facilitador da sarcopenia. Silva et al. (2006) cita que, cerca de 30 % da população adulta de ambos os sexos não ingerem a quantidade apropriada de proteína e, com o avançar da idade, este índice aumenta drasticamente, pois nos idosos, a ingestão protéica encontra-se

freqüentemente diminuída em função de uma série de fatores, em decorrência da “anorexia do envelhecimento”.

Nos idosos ocorre uma perda de apetite, conseqüente da redução do paladar e do olfato, da condição oral prejudicada, da saciedade precoce e dos fatores psicológicos, econômicos e medicamentosos.

Neste sentido, com base no que foi exposto, o presente estudo apresenta a seguinte indagação: Qual a relação entre o aporte do aminoácido leucina e a sarcopenia do envelhecimento?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a relação entre a suplementação de leucina e a sarcopenia.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a concentração de proteína do músculo gastrocnêmio após a suplementação de leucina na dieta;

Identificar a ausência ou presença de atrofia do músculo gastrocnêmio, por meio do método histológico, nos diferentes níveis (sem atrofia; atrofia leve, moderada e severa);

Medir a massa corporal dos camundongos nos tempos inicial e final do experimento nos diferentes grupos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Envelhecer é uma das características biológicas que se inicia ao nascimento e que continua até a morte. (TEIXEIRA e GUARIENTO, 2010). Este processo acaba por afetar os diferentes sistemas do organismo, condição esta que limita a capacidade funcional do indivíduo e o deixa mais suscetível a doenças (TEIXEIRA e GUARIENTO, 2010).

O sistema muscular é amplamente afetado pelo envelhecimento e esta condição, denominada sarcopenia, influencia na capacidade física do idoso, facilitando a quedas e propiciando a um estado de fragilidade. A sarcopenia é prevalente na população idosa e se constitui como uma das síndromes geriátricas, que são comuns, complexas e resultantes de uma interação de fatores que ocasionam um conjunto de sinais e sintomas que ainda necessitam de maior compreensão (CRUZ-JENTOFT, et al., 2010).

3.1 Musculatura esquelética e mecanismo da contração muscular

Os músculos esqueléticos são estruturas complexas, compostos por várias camadas. O tecido conjuntivo que o recobre externamente chama-se epimísio, que envolve pequenos feixes de fibras envoltas per tecido conjuntivo. Os feixes de fibras chamam-se fascículos e o tecido conjuntivo que os envolve perimísio. Seccionando o perimísio observam-se as fibras musculares, que são as células do músculo e que estão cobertas por mais uma bainha de tecido conjuntivo, o endomísio (WILMORE e COSTILL, 2001). Os fascículos são feixes paralelos formados por fibras musculares, que possuem como membrana plasmática o sarcolema, que une a fibra ao tendão muscular que se insere ao osso. Os tendões são estruturas fibrosas de tecido conjuntivo que transmitem a força gerada pelo músculo aos ossos, permitindo o movimento, (Figura 1) (MARZZOCO; TORRES, 1999).

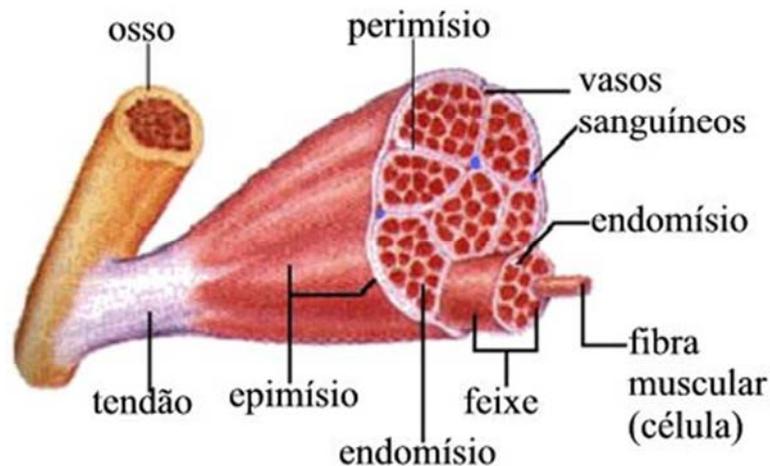


Figura 1 Anatomia do músculo esquelético.

Fonte: <http://yannaspinola.blogspot.com/2010/06/tecido-muscular-parte->

O sarcoplasma (citoplasma) das fibras é uma estrutura gelatinosa, que contém proteínas, minerais, glicogênio, gorduras e também centenas de filamentos contráteis, chamados miofibrilas. Apresenta uma rede de túbulos transversos, chamados *túbulos T* que são extensões do sarcolema e passam lateralmente através da fibra muscular, sendo interconectados quando passam nas miofibrilas e transmitem a passagem dos impulsos nervosos, além de permitirem acesso ao transporte do líquido extracelular (WILMORE e COSTILL, 2001).

No interior da fibra muscular, há o retículo sarcoplasmático, que é uma rede de canais que servem de armazenamento do cálcio, sendo essencial para a contração muscular (LENINGHER, 2002).

As miofibrilas, componentes da fibra muscular, são os elementos contráteis do músculo esquelético e são constituídas por dois tipos de filamentos protéicos, chamados filamentos grossos e filamentos finos, caracterizando as estrias do músculo esquelético e permitindo a contração muscular. Estas possuem subunidades menores chamadas sarcômeros (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A disposição os filamentos resulta em diferentes bandas, que ao microscópio observam-se em zonas claras (bandas I), que possuem na região média uma linha

chamada Z, e zonas escuras (bandas A). A região entre as duas linhas Z é chamada de sarcômero, que diminui até 50 % do seu comprimento durante a contração em função do deslizamento dos filamentos entre si. Os filamentos grossos são constituídos por uma proteína denominada miosina, que possui em sua estrutura uma cauda e duas porções globulares, as cabeças da miosina, que têm atividade de ATPásica e contém os sítios de ligação com os filamentos finos, sendo o eixo central da unidade contrátil, (Figura 2) (MARZZOCO; TORRES, 1999).

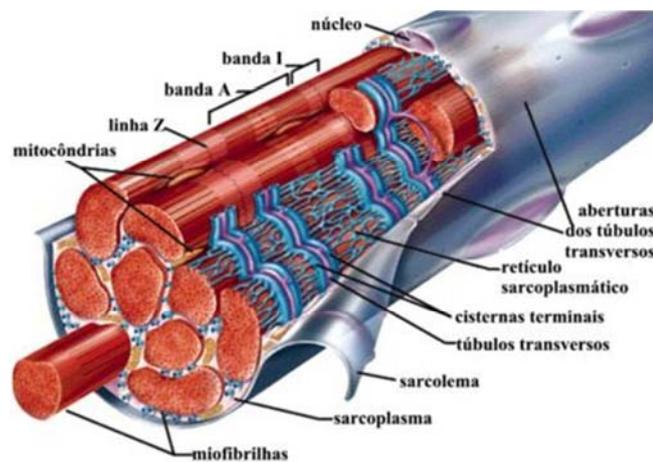


Figura 2 Estrutura de uma fibra muscular esquelética.

Fonte: <http://yannaspinola.blogspot.com/2010/06/tecido-muscular-parte-1.html>

Os filamentos finos são compostos pela actina, proteína que pode existir na forma globular ou fibrosa. Os monômeros globulares da actina, chamados actina G, organizam-se formando um polímero longo (actina F ou filamentosa). As fitas de actina F possuem uma molécula, chamada tropomiosina, que se estende por toda a sua superfície. Ligada à tropomiosina encontra-se a troponina, uma proteína que se liga ao cálcio, a actina e a tropomiosina, (Figura 3) (LENINGHER, 2002).

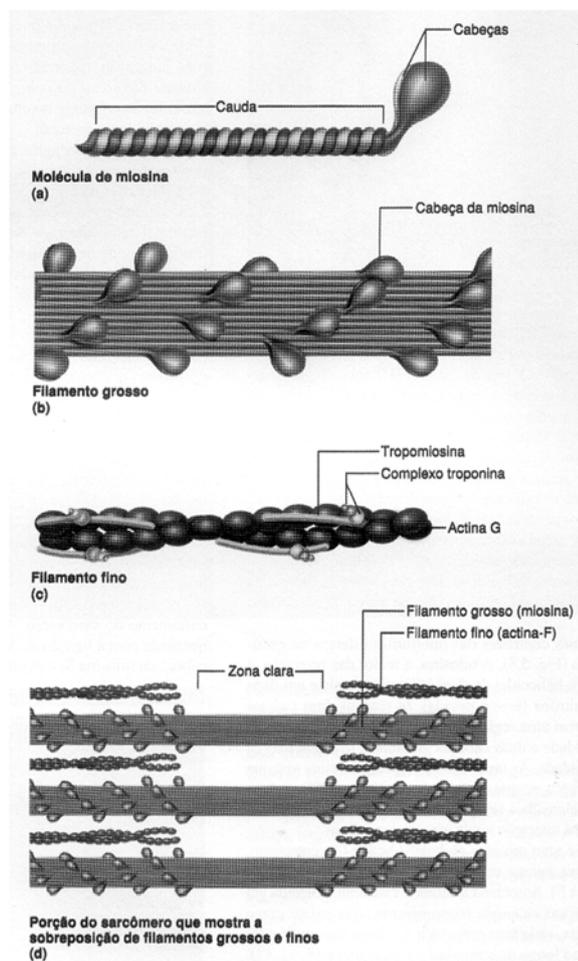


Figura 3 Estrutura molecular das proteínas contráteis do músculo esquelético.

Fonte: ROBERGS e ROBERTS, 2002.

A fibra muscular é inervada por um neurônio motor simples, sendo denominada unidade motora a junção de um neurônio motor alfa e todas as fibras musculares por ele inervadas. Entre o neurônio motor e a fibra muscular há a junção neuromuscular que comunica o sistema nervoso ao sistema muscular (Figura 4) (WILMORE e COSTILL, 2001).

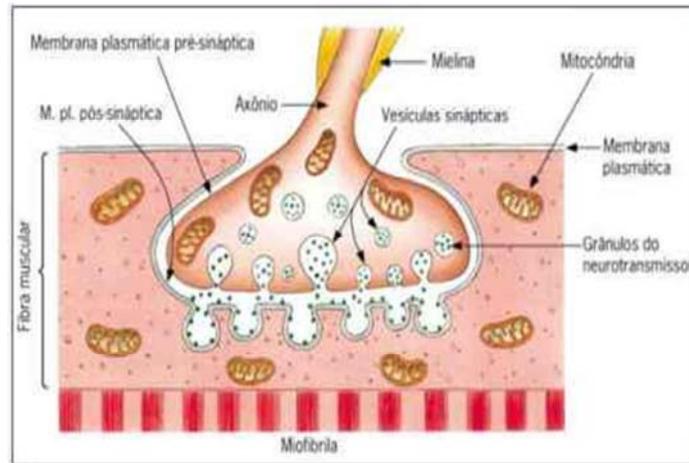


Figura 4 Unidade motora

Fonte: <http://auladefisiologia.wordpress.com/page/2/>

A contração muscular ocorre como consequência de um impulso nervoso, oriundo do sistema nervoso central, que chega aos terminais axônicos localizados próximos ao sarcolema. Estas terminações nervosas secretam uma substância neurotransmissora (acetilcolina) que se liga aos receptores localizados no sarcolema, que desencadeia a despolarização da membrana das fibras musculares. Esta despolarização é transmitida ao interior da fibra pelos túbulos T e o cálcio é liberado do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma (LENINGHER, 2002).

No repouso, a tropomiosina repousa sobre os sítios ativos dos filamentos de actina, impedindo a ligação das cabeças da miosina. Quando o cálcio é liberado, se liga aos filamentos da troponina sobre a actina, que retira as moléculas de tropomiosina de cima dos sítios ativos dos filamentos de actina, permitindo que as cabeças da miosina se fixem nos sítios ativos da actina. Desta maneira, as pontes cruzadas da miosina são ativadas e elas se ligam à actina, alterando a ponte cruzada onde, a cabeça da miosina inclina em direção ao braço da ponte cruzada, tracionando os filamentos de actina e miosina em direções opostas, levando ao encurtamento da musculatura e na geração de força (MARZZOCO; TORRES, 1999). A contração muscular exige energia que é necessária antes da ação. Uma das cabeças da miosina se liga a ATP e a ATPase localizada na cabeça, quebra a ATP em ADP P_i gerando a energia. Quando o cálcio é bombeado ativamente para o retículo sarcoplasmático para ser armazenado, a contração

termina, a troponina e a tropomiosina são desativadas e os filamentos de miosina e actina retornam ao seu estado original de relaxamento (WILMORE e COSTILL, 2001).

3.2 Estruturas das proteínas e metabolismo protéico.

As proteínas são os componentes mais abundantes das células, sendo caracterizadas por moléculas de tipos e tamanhos diversificados, que desempenham diferentes funções. Estas, estruturalmente são compostas por um conjunto de 20 aminoácidos que, distribuídos e organizados de maneiras diferentes, determinam os diferentes tipos de proteínas (MARZZOCO; TORRES, 1999).

Os aminoácidos caracterizam-se por moléculas que apresentam um grupo amino (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH), que estão ligados ao mesmo átomo de carbono (α), que também se liga a um átomo de hidrogênio e a uma cadeia lateral ou grupo R. As cadeias laterais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando a solubilidade do aminoácido em água, a conformação das proteínas e a sua função (LENINGHER, 2002; MARZZOCO; TORRES, 1999).

Do ponto de vista nutricional, estes são classificados em duas categorias: os aminoácidos não essenciais (são sintetizados pelo organismo) e os essenciais (não são produzidos pelo organismo e são obtidos através da alimentação). O valor biológico de uma proteína é medida pela qualidade, ou seja, se possui os aminoácidos essenciais para a manutenção dos tecidos. As proteínas de fonte animal possuem um alto valor biológico, fornecendo todos os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, enquanto as proteínas vegetais têm menor valor biológico. Esta classificação forneceu base para a abordagem nutricional, entretanto, após recentes pesquisas, uma terceira classe, descrita como aminoácidos condicionalmente essenciais foi introduzida, que são fundamentais para o organismo em determinado estado fisiológico do desenvolvimento ou em uma determinada condição clínica. A Tabela 1 apresenta a classificação nutricional dos aminoácidos (COZZOLINO, 2005).

Tabela 1 Classificação nutricional dos aminoácidos

<i>Aminoácidos essenciais</i>	<i>Condicionalmente essenciais</i>	<i>Não essenciais</i>
Fenilalanina	Glicina	Alanina
Triptofano	Prolina	Ácido aspártico
Valina	Tirosina	Ácido glutâmico
Leucina	Serina	Asparagina
Isoleucina	Cisteína e cistina	
Metionina	Taurina	
Treonina	Arginina	
Lisina	Histidina	
	Glutamina	

Fonte: Cozzolino (2005).

Os organismos vivos, para manterem as suas funções, retiram a energia necessária através de reações físico-químicas, que se relacionam entre si, chamada metabolismo. Estas etapas são chamadas de rotas, que são classificadas como catabólica (de degradação) ou anabólica (de síntese).

Os aminoácidos contêm em sua estrutura nitrogênio, além dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. Os aminoácidos que restam após as necessidades celulares serem supridas são imediatamente eliminados, pois o nitrogênio não é armazenado e sim, oxidado e excretado (CHAMPE e HARVEY, 1997). Em um indivíduo adulto, cerca de 30 a 55 g de proteína são excretados em forma de nitrogênio por dia.

Na degradação dos aminoácidos, ocorre a remoção e a excreção do grupo amino, que é convertido em uréia, e as 20 cadeias carbônicas são oxidadas e convertidas ao metabolismo de carboidratos e lipídios. O nitrogênio deixa o organismo em forma de uréia, amônia e outros produtos derivados do metabolismo dos aminoácidos. Nas condições de um adulto saudável, a excreção de nitrogênio fecal e urinário encontra-se em equilíbrio com a quantidade de nitrogênio ingerido (equilíbrio de nitrogênio).

Quando o consumo de nitrogênio é maior que a sua excreção, ocorre o balanço de nitrogênio positivo, comum em situações de crescimento tecidual, como em crianças, gestantes ou na recuperação de alguma doença debilitante. O balanço de nitrogênio

negativo corresponde à excreção maior que o consumo de nitrogênio, e geralmente está associado à proteína inadequada na dieta, falta de um aminoácido essencial ou em estresses fisiológicos, como por exemplo, queimaduras e traumas (CHAMPE e HARVEY, 1997).

Os aminoácidos presentes nas células são originados da dieta (proteínas exógenas) e das proteínas endógenas (do próprio organismo), chamado este processo de *pool de aminoácidos*, onde $\frac{1}{4}$ são derivados das exógenas e $\frac{3}{4}$ das proteínas endógenas. O *pool* de aminoácidos consiste nos aminoácidos liberados na hidrólise de proteínas da dieta ou dos tecidos misturadas com outros aminoácidos presentes no organismo, que contém cerca de 100 g (concentração pequena com relação ao número de proteínas do corpo). Somente 75 % destes aminoácidos realizam a síntese de novas proteínas, enquanto o restante participa de outros processos no organismo (Figura 5).

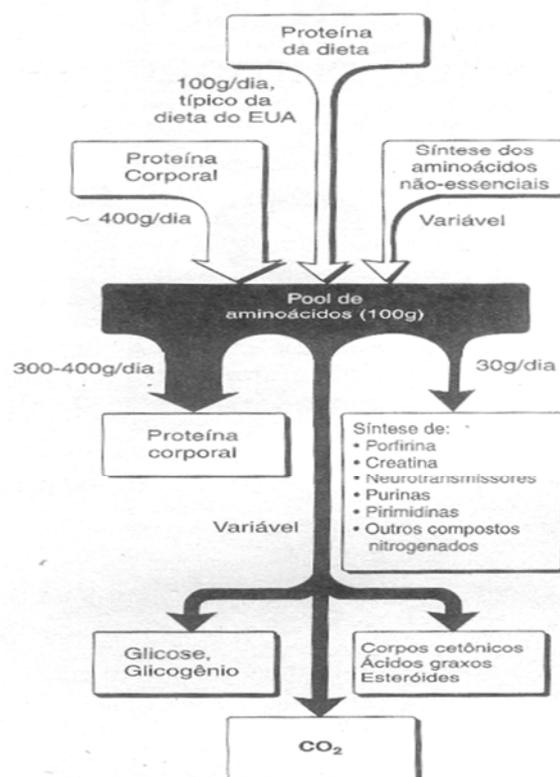


Figura 5 Fontes e destinos dos aminoácidos.

Fonte: CHAMPE e HARVEY, 1997.

A maior parte da proteína corporal encontra-se no músculo esquelético. As proteínas estão em contínua síntese e degradação, pois não são permanentes. Estima-se que o *turnover* (renovação) protéico de um adulto seja de aproximadamente 400 g diárias, em velocidades equivalentes entre a síntese e degradação, apesar deste mecanismo ainda serem parcialmente conhecidos (MARZZOCO, TORRES, 1999). Entretanto, sabe-se que a velocidade do *turnover* varia para as proteínas de maneira individual, por exemplo, as enzimas digestivas e as proteínas plasmáticas são degradadas rapidamente, enquanto o colágeno é metabolicamente estável durando meses ou anos. O anabolismo (síntese) protéico depende de um suprimento nutricional adequado, onde as proteínas exercem papel fundamental (COZZOLINO, 2005).

Os aminoácidos são os blocos estruturais da síntese de proteína tecidual (CHAMPE e HARVEY, 1997). Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com os seus produtos metabólicos finais como cetogênicos ou glicogênicos (aminoácidos que formam substrato para a glicogênese, formando glicogênio no fígado e no músculo). A leucina e a lisina são os únicos aminoácidos exclusivamente cetogênicos encontrados nas proteínas, ou seja, seu catabolismo origina acetoacetato ou acetil CoA.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) são aminoácidos essenciais que, diferentemente dos outros aminoácidos que são metabolizados no fígado, são metabolizados por tecidos musculares e, por terem uma via similar de catabolismo, são descritos como um grupo.

Inicialmente, a remoção do grupo amino deste grupo é catalisada por uma única enzima, a *aminotransferase dos alfa-aminoácidos de cadeia ramificada* (Transaminação). Após, a remoção dos grupos carboxila dos alfa-cetoácidos derivados dos aminoácidos de cadeia ramificada são catalizados por um complexo enzimático chamado *desidrogenase dos alfa-cetoácidos de cadeia ramificada* que utiliza o pirofosfato de tiamina como uma de suas coenzimas, levando à conversão de piruvato em acetil CoA (Descarboxilação oxidativa). Na Desidrogenação a oxidação da acetil CoA origina derivados da acetil CoA α - β -insaturados e, finalmente, como produtos finais, a leucina é metabolizada em acetoacetato e acetil CoA (tornando-se exclusivamente cetogênica), enquanto a isoleucina torna-se cetogênica e glicogênica e a valina glicogênica, (Figura 6).

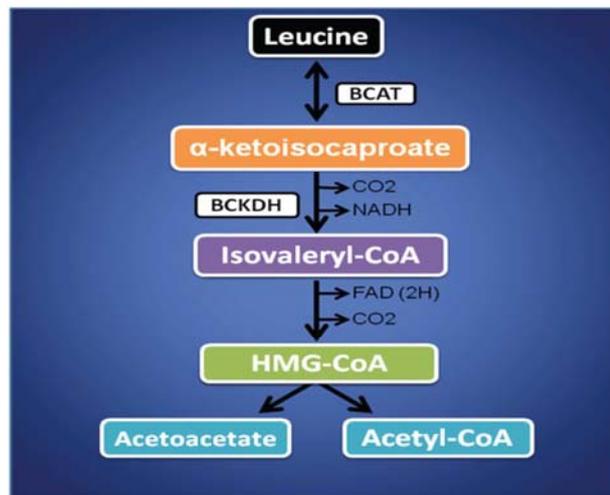


Figura 6 Degradação da leucina.

Fonte: Vianna et al., 2010.

Para a realização da síntese protéica, é necessária uma seqüência específica de aminoácidos, que é expressa por uma seqüência de ácidos nucleicos (código genético) que é uma informação genética armazenada nos cromossomos e transmitida à da célula-filha pela replicação do DNA, da transcrição em RNA para então formar-se proteína (CHAMPE; HARVEY, 1997).

A miosina é uma importante proteína com propriedades contráteis do músculo esquelético e corresponde a 30% das proteínas musculares. E, em estudo citado por Nair (1995), a taxa de síntese da miosina é 60% da síntese das proteínas musculares em humanos.

Com o envelhecimento, o transporte e a utilização dos aminoácidos na síntese protéica diminuem, podendo gerar problemas nas fibras musculares. A disponibilidade de aminoácidos também se torna decisiva para a regulação do metabolismo das proteínas musculares (FIJITA; VOLPI, 2004).

3.3 Relação entre nutrição e sarcopenia

O envelhecimento humano se caracteriza por manifestações de eventos biológicos que ocorrem ao longo de um período, sendo caracterizado um processo contínuo e progressivo com alterações gradativas de diversos sistemas do organismo, comprometendo a eficácia das suas funções. Dentre as diversas alterações, o decréscimo de massa, da força e da qualidade da contração muscular esquelética é a mais evidente, descrevendo-se este processo como sarcopenia (EVANS, 1995; ROBERGS; ROBERTS, 2002).

O envelhecimento está associado com diversas alterações na composição corporal, decorrentes de uma progressão normal e biológica. O decréscimo da massa muscular esquelética é uma das alterações mais freqüentes e visíveis no idoso, denominando-se este processo como sarcopenia (EVANS, 1995). A sarcopenia, também chamada com síndrome da fragilidade, possibilita a limitação gradativa da condição física do idoso, gerando freqüentemente fadiga, perda da mobilidade, osteopenia, dependência funcional, maior susceptibilidade a quedas e aumento da mortalidade nestes indivíduos. Em um estudo realizado por Baumgartner et al. (1998) estimou-se que entre 25 % dos idosos abaixo dos setenta anos e mais que 50 % dos idosos acima dos oitenta anos apresentam-se em um estado de sarcopenia.

Esta é de etiologia multifatorial e ainda pouco conhecida, conseqüente de fatores involuntários, de origem orgânica, e voluntária, que são variáveis de um indivíduo para outro, por serem de origem comportamental como a inatividade física e a má conduta nutricional (PADDON-JONES, 2008). A sarcopenia é um complexo multifatorial que envolve a atrofia da musculatura e do sistema nervoso característico do envelhecimento, difícil de ser evitado e passível de investigação para proporcionar uma melhora da qualidade de vida dos idosos (NAIR, 1995; MARCELL, 2003; LACOURT; MARINI, 2006).

O termo “sarcopenia” foi descrito em 1989 por Irwin Rosenberg que o define como a perda de massa e de função muscular relacionada com a idade (ROSENBERG, 1989). A perda de massa muscular resulta em menor força e resistência, não sendo conseqüente de um único fator, sendo um complexo relacionamento entre o músculo (miopatia) e o nervo (neuropatia), que formam a unidade motora, passando por declínios e alterações (DESCHENES, 2004). Com o avanço da idade, as unidades motoras se deterioram gradualmente, resultando em uma atrofia muscular por desnervação

(principalmente as fibras tipo II) e das estruturas da placa terminal (McARDLE et al., 2003). As alterações que ocorrem nas propriedades contráteis do músculo são conseqüentes do declínio do número e da velocidade da condução dos neurônios motores, da oxidação das fibras e permanente desnervação, com aumento de gordura subcutânea e intramuscular na medida em que se perde a massa muscular (DREYER et al., 2005; DESCHENES, 2004).

Com o envelhecimento a unidade motora é afetada, bem como o neurônio motor e as fibras musculares inervadas pelos feixes nervosos deste. O progressivo processo de degeneração do sistema nervoso, que afeta as unidades motoras, compromete a quantidade e a habilidade das proteínas contráteis de exercerem tensão suficiente. Gradativamente, ocorre uma deterioração das estruturas terminais das placas motoras e junções mioneurais, ocasionando uma piora do mecanismo de excitação-contração e diminuição do recrutamento de fibras. O tempo de contração e o tempo de relaxamento estão prolongados, e, por isto, a velocidade de contração máxima é diminuída (DESCHENES, 2004).

Desta maneira, há uma tendência para a redução na massa muscular pela diminuição no tamanho e/ou número da fibra muscular, tanto quantitativa como qualitativamente, sendo a perda na qualidade muscular referente à composição da fibra muscular, inervação, contratibilidade, características de fadiga, densidade capilar e metabolismo da glicose. O peso do indivíduo idoso geralmente não é afetado, pois ocorre um aumento da gordura corporal (NAIR, 1995).

As conseqüências da sarcopenia podem ser extensivas, com interferência no equilíbrio, dificuldades na marcha, aumento de quedas, prejudicando a realização das atividades diárias (WOLFSON et al., 1995; BORTZ, 2002.).

Atualmente, estudiosos europeus se reuniram e observaram a necessidade de classificar a sarcopenia em categorias e estágios, que são definidos por um conjunto de sinais apresentados pelo indivíduo. Deste modo, a sarcopenia foi classificada nas categorias primária, quando a causa aparente é exclusivamente a evolução da idade e secundária, quando outros fatores estão envolvidos, como o sedentarismo, a presença de doenças e a má conduta nutricional (CRUZ-JENTOFT et al., 2010).

Clinicamente, a sarcopenia foi dividida em diferentes estágios. Pré-sarcopenia, onde somente a perda de massa muscular é observada; sarcopenia, onde além da perda de massa muscular, há diminuição da força ou da performance física e sarcopenia

severa, onde há a diminuição da massa muscular, da força e da performance física. Neste último caso, o comprometimento físico-funcional é extremamente limitante (CRUZ-JENTOFT et al., 2010).

Em seu estudo Larsson (1979) evidenciou que a força muscular máxima é alcançada por volta dos 30 anos, mantendo-se estável até a 5ª década, onde inicia o seu declínio. Após, até os 70 anos existe uma perda de aproximadamente 15 % por década, juntamente com uma atrofia muscular pronunciada (mais evidente das fibras Tipo II) de tal modo que aos 80 anos há uma perda de aproximadamente 50 % na área de secção transversal do músculo.

Alguns estudos relatam que, as fibras do Tipo I (contração lenta, aeróbica) são mais resistentes à atrofia até a década de 60 e 70, enquanto as fibras do Tipo II (contrações rápidas, anaeróbicas), declinam com a idade. As fibras do Tipo I, durante o envelhecimento, diminuem em número, enquanto que as fibras do Tipo II tendem a reduzir-se tanto em número quanto em tamanho, comprometendo a força muscular. Pesquisas indicam que, a perda das fibras musculares ocorre tanto em homens como em mulheres e corresponde uma idade crítica ao redor dos 50 anos, quando a atrofia dos músculos torna-se mais evidente (DREYER et al., 2005; DESCHENES, 2004).

A perda das fibras musculares do Tipo II significa uma diminuição das proteínas de cadeias pesadas de miosina, que se transformam para o tipo mais lento, o que poderia afetar a velocidade do ciclo das pontes transversais de actina e miosina durante as ações musculares, além de uma concomitante diminuição de atividade da miosina ATPase (SHORT et al., 2005).

A sarcopenia, apesar da sua alta prevalência, ainda possui a etiologia parcialmente conhecida, com uma série de fatores, denominados como involuntários e voluntários, que se relacionam entre si e variam de um indivíduo para outro (Figura 7).

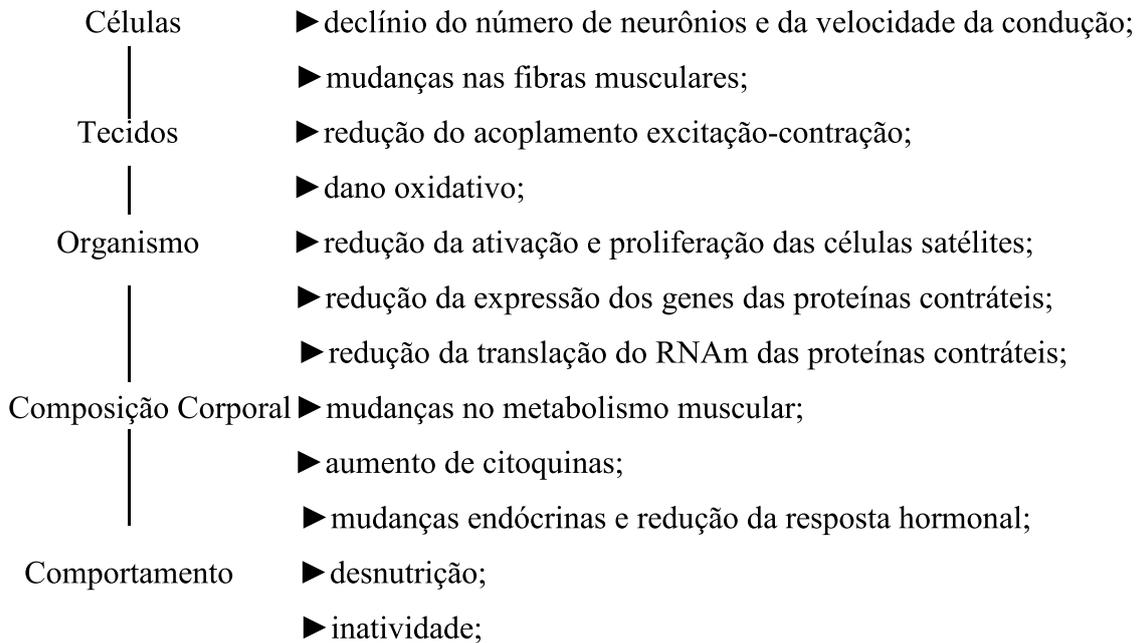


Figura 7 Lista parcial dos mecanismos e conseqüências da sarcopenia.

Fonte: PADDON-JONES et al., 2008

Os fatores involuntários, ou seja, a nível celular, tecidual e orgânico, estão relacionados com os fatores voluntários, que são variáveis de um indivíduo para o outro por serem de origem comportamental, como o a inatividade física e a má conduta nutricional (PADDON-JONES et al., 2008).

Para Evans (1995), associado a estes fatores, as mudanças da função endócrina e hormonal contribuem para este processo.

Para Nair (1995) a musculatura esquelética compreende cerca de 45 % do peso de um indivíduo e 60 a 80 % da massa corporal, sendo o maior depósito de aminoácidos e de proteínas do organismo.

A desnutrição também é um fator agravante para a progressão da sarcopenia, sendo que, a maioria dos idosos não consome os valores diários de proteína. Esta característica, inerente aos idosos, é referida como anorexia do envelhecimento (SILVA et al. 2006; ROBERTS, 1995). Para Cozzolino (2005) o envelhecimento está associado a um alto risco de deficiência de micronutrientes pela baixa ingestão energética, as peculiaridades fisiopatológicas e também por condições sócio-econômicas inadequadas.

Segundo pesquisa realizada pelo IBGE (2004), nas últimas três décadas há uma indicação de declínio contínuo da exposição a desnutrição em todas as regiões do País e em todas as classes de rendimento.

Alguns estudos têm sugerido que o consumo inadequado de proteína contribui para a sarcopenia (CAMPBELL et al., 1994). Houston et al. (2008) avaliou um grupo de idosos buscando a associação entre a dieta de proteína e a perda de massa muscular e concluiu que a dieta com proteínas pode ser um fator de risco modificável na sarcopenia.

A absorção diária de proteína recomendada a uma pessoa idosa é de aproximadamente 0,8 g.Kg⁻¹.d⁻¹. Para Houston (2008) e Paddon-Jones et al. (2008), grande parte da população idosa não ingere os níveis adequados de proteína diariamente, contribuindo para o decréscimo da massa muscular esquelética e aumentando a progressão da perda muscular relacionada ao envelhecimento.

Kimball, Vary e Jefferson (1994) salientam que a atrofia muscular esquelética depende do balanço entre a taxa de síntese e a taxa de degradação das proteínas intracelulares e Silva et al. (2006) citam que estudos sugerem a necessidade de suplementação protéica na população idosa.

A sarcopenia é originada por uma série de fatores, que se relacionam entre si. A má conduta nutricional e as alterações da resposta anabólica muscular frente aos estímulos nutricionais têm sido identificadas como um fator predisponente e agravante da sarcopenia (FUJITA e VOLPI, 2004).

Durante o processo de envelhecimento, o metabolismo protéico muscular sofre alterações. Em indivíduos idosos, o metabolismo protéico muscular encontra-se em desequilíbrio, onde o estímulo à síntese protéica muscular está diminuído, enquanto a degradação protéica está aumentada, levando a perda de massa muscular (DREYER e VOLPI, 2005).

Para Cuthbertson et al. (2005), ocorre uma resistência anabólica aos aminoácidos, ou seja, a sinalização induzida pelo consumo de proteínas na dieta encontra-se insensível, estabelecendo um déficit na síntese protéica pós – prandial (após a refeição). O organismo possui um complexo sistema que sinaliza a construção das proteínas musculares na musculatura esquelética no estado pós-prandial, que é estimulado pelo aminoácido leucina presente na dieta. Dreyer e Volpi (2005) também

salientam que os aminoácidos de cadeia ramificada, particularmente a leucina, induzem a estimulação da síntese protéica muscular.

Em um estudo realizado em ratos por Dardevet et al. (2001) concluiu que uma dieta rica em leucina contribui para reduzir a sarcopenia do envelhecimento.

3.4 Suplementação com a leucina como uma alternativa antiatrófica

Com o aumento da expectativa de vida, a população idosa teve um crescimento progressivo nos últimas décadas e, as projeções do censo demográfico demonstram que, em 2050 irá duplicar, alcançando 15 % do total da população brasileira (CHAIMOWICZ, 1997).

A população idosa está suscetível a alterações na sua condição nutricional em decorrência de diferentes fatores, como as mudanças fisiológicas próprias do envelhecimento, a presença de enfermidades que diminuem o apetite e a absorção dos alimentos, a interação com fármacos que interferem na ingestão e no metabolismo de nutrientes, o desconhecimento sobre o preparo dos alimentos e a nutrição adequada, a limitações físicas e psíquicas, a saúde orofacial ou a problemas socioeconômicos e familiares (REZENDE et al., 2010).

Estes fatores refletem na elevada prevalência que esta população vem apresentando de distúrbios nutricionais como a desnutrição, o sobrepeso e a obesidade (NOGUÉS, 1995).

Rezende et. al (2010) salientam em seu estudo que a desnutrição protéico-calórica é um dos problemas clínicos mais comumente encontrado em idosos e que há uma tendência crescente do aumento do risco de óbito por desnutrição na velhice no Brasil. Estes autores investigaram as mortes ocorridas no período de 2000 a 2003, de pessoas com 60 anos e mais, residentes em Belo Horizonte, que tinham a desnutrição como uma das causas mencionadas na Declaração de Óbito. A desnutrição protéico-calórica representou 98 % dos casos de desnutrição, que se apresentou como impactante na saúde do idoso podendo ser a causa da morte por debilitar a sua condição física, pela alteração da quantidade e composição de fluidos teciduais, o que resulta em desidratação, choque e óbito. Esta condição dificulta ainda mais a reabilitação do idoso quando há uma doença existente.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, valina e isoleucina) são conhecidos por possuírem um importante papel nas condições atróficas da musculatura

esquelética, sendo a sua ingestão na dieta essencial para manter a regulação da síntese protéica muscular. Entretanto, Li e Jefferson (1978) verificaram que a síntese protéica muscular é basicamente mantida pelo aminoácido leucina após investigarem, em músculo esquelético perfundido, que a leucina é tão efetiva isoladamente como quando administrada juntamente com a valina e a isoleucina.

A ação da leucina ocorre pelo fato de que o aumento da sua concentração a nível intracelular ativa a proteína quinase mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) que estimula a síntese protéica muscular pela ação de outras proteínas, a proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA (p70^{S6k}); a proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1) e o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G). Os efeitos da leucina ocorrem sinergicamente com a insulina, que é um hormônio anabólico na estimulação da síntese protéica muscular. A insulina é dependente da ingestão de aminoácidos para potencializar o sistema de tradução de proteínas, permitindo a síntese protéica muscular (Figura 8), (ROGERO e TIRAPEGUI, 2008).

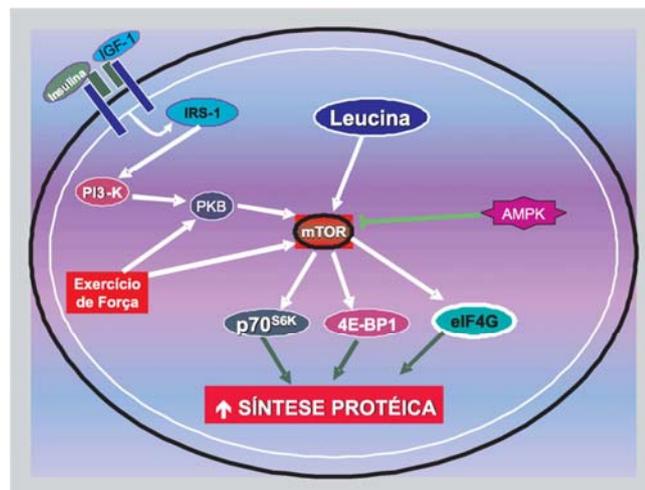


Figura 8: Síntese protéica mediada por leucina.

Fonte: (ROGERO e TIRAPEGUI, 2008).

Onde: (mTOR= proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos; p70S6k = proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA; eIF4G= fator de iniciação eucariótico 4G; 4E-BP1= inibidor do fator de iniciação da tradução protéica denominada eIF4E; AMPK= proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMP); PKB= proteína quinase B; IRS-1 substrato do receptor de insulina 1; PI3-K= fosfatidil-inositol-3-quinase.

No envelhecimento ocorre a perda progressiva de massa muscular que parece ter relação com a perda da habilidade do músculo esquelético de responder a estímulos anabólicos, incluindo a insulina, e a baixa concentração de aminoácidos que está diretamente relacionada com o aspecto nutricional do indivíduo. Entretanto, um músculo mais velho parece responder a estímulos anabólicos em resposta à administração de aminoácidos, especialmente a leucina, sugerindo a redução da perda do músculo com envelhecimento. Por esta razão, as intervenções nutricionais, como a suplementação de leucina, podem vir a manter e a restaurar a massa muscular, pela estimulação protéica muscular (FUJITA e VOLPI, 2006).

Sendo assim, torna-se importante investigar se a suplementação de leucina pode vir a reduzir as conseqüências da sarcopenia que acometem a qualidade de vida de grande parte da população idosa.

4 METODOLOGIA

4.1 Modelo experimental

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 40 camundongos (*Mus musculus*) machos, adultos, com idade de 12 meses, nascidos e mantidos no Biotério Central da Universidade de Passo Fundo, alimentados com ração e água *ad libitum* e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=10), dispostos em gaiolas individuais, conforme Tabela 2.

Os animais foram tratados durante 90 dias, período no qual, foi observado o efeito dos tratamentos sobre a atrofia muscular no processo do envelhecimento.

O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (UPF), sob o registro de número 079/2009.

4.2 Tratamentos

A Tabela 2 apresenta os grupos experimentais com seus respectivos tratamentos.

Tabela 2 Distribuição dos grupos experimentais para os diferentes tratamentos

Grupos	Tratamentos
GC	Dieta controle
GL1	Dieta acrescida de 0,042 g de leucina /25 g ração/dia
GL2	Dieta acrescida de 0,055 g de leucina /25 g ração/dia
GL3	Dieta acrescida com 0,063 g de leucina /25 g ração/dia

4.3 Descrição dos grupos experimentais

4.3.1 Grupo Controle (GC)

Os camundongos submetidos ao tratamento controle (GC) receberam ração padrão para roedores, balanceada de acordo com as recomendações do *National*

Research Council e National Institute of Health (USA), da marca Nuvital, tipo Nuvilab CR1.

A quantidade de ração oferecida ao grupo controle foi de 5 g/dia por indivíduo. Este valor foi baseado no Manual para Técnicos em Laboratório da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ, 1994).

4.3.2 Grupo Leucina 1 (GL1)

O Grupo Leucina 1 (GL1) foi submetido a uma dieta formulada com o acréscimo do aminoácido leucina na quantidade de 0,042 g em 5 g ração/dia e água *ad libidum*.

Para a determinação da adição do aminoácido leucina considerou-se as orientações dos valores diários da DRI (Dietary Reference Intakes) referentes à faixa etária de adultos e idosos (PADOVANI et al., 2006).

4.3.3 Grupo Leucina 2 (GL2)

O Grupo Leucina 2 (GL2) foi submetido a uma dieta acrescentada com 30 % de leucina da dieta do grupo GL1. Sendo assim, foi fornecido ao grupo 0,055 g de leucina/ 5 g ração/dia e água *ad libidum*.

4.3.4 Grupo Leucina 3 (GL3)

Neste grupo os animais receberam uma dieta acrescentada com 50 % a mais de leucina da dieta do grupo GL1, totalizando assim 0,063 g de leucina/5 g de ração/dia e água *ad libidum*.

4.4 Procedimentos experimentais

4.4.1 Elaboração da dieta com leucina

O preparo da dieta acrescida do aminoácido leucina consistiu na moagem da ração padrão para roedores Nuvital CR-1, acrescentando-se 1,5 folhas de gelatina incolor e sem sabor/kg ração. A gelatina foi adicionada para obtenção de coesão das partículas, sendo dissolvida em água quente (500 mL). Na seqüência a ração moída foi adicionada do aminoácido padrão L-Leucina (Ajinomoto), homogeneizada e preparado os peletes. Estes então foram submetidos à estufa de secagem com circulação de ar

(Tecnal 540) durante o período de 24 horas a 60 °C, tempo necessário para atingir 12,50 % de umidade conforme a ração padrão.

4.4.2 Controle da massa corporal

Os animais foram pesados no início e no final do experimento em balança de precisão, modelo PR1000, para observar o percentual do ganho ou da perda massa corporal durante o período experimental.

4.4.3 Sacrifício dos animais

Os animais foram sacrificados por inalação do anestésico halotano, conforme descrito por Schanaider e Silva (2004).

4.4.4 Extração do músculo gastrocnêmio

Após o sacrifício do animal, os membros inferiores foram utilizados para avaliação. Para tal, a pele e outras partes moles foram removidas e o membro inferior desarticulado no quadril, com a precaução de manter a integridade do músculo gastrocnêmio, na sua origem e inserção, conforme apresentado na Figura 9.



Figura 9 Membro inferior do camundongo.

Fonte: a autora

4.5 Análises químicas e bioquímicas

4.5.1 Determinação da concentração da proteína muscular

A concentração de proteína muscular do músculo gastrocnêmio foi determinada pelo método colorimétrico, de acordo com LOWRY et al. (1951). Seu princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas e na formação de um complexo de cor azul, a partir da reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, sendo a intensidade da cor proporcional à quantidade de proteína da amostra. A medida foi realizada em espectrofotômetro UV com comprimento de onda de 660 nm. Para obtenção da curva padrão, utilizou-se albumina bovina.

4.6 Análise histológica

Após a retirada do músculo gastrocnêmio, este foi fixado durante 24 horas em formol tamponado a 10 % e desidratado em soluções com concentração crescente de álcool etílico (70 %, 80 %, 90 %) e em Xilol (Reagen). Na seqüência, foi impregnado e incluído em parafina para a realização dos cortes de 5 µm de espessura no micrótomo e colocados em lâminas de microscopia, e submetidos às colorações histológicas de hematoxilina-eosina (HE), para a análise morfológica da estrutura muscular na microscopia (JUNQUEIRA, 2004). A análise foi realizada em microscópio óptico a fim de se observar a ausência ou presença de atrofia em diferentes níveis (atrofia leve, atrofia moderada e atrofia severa). Para avaliação das lâminas foram utilizados os critérios histológicos sistematizados por Dubowitz & Brooke (1973), onde a atrofia muscular é representada pela presença de fibras musculares com diâmetro menor que 25 micra.

4.7 Análise Estatística

O resultado de todas as variáveis (massa corporal, concentração de proteína muscular e níveis de atrofia do músculo gastrocnêmio) foi avaliado com auxílio do programa SPSS 17.0.

Para tal, foi realizada a análise de variância para comparação múltipla entre os grupos (ANOVA), teste “Post Hoc” Tukey, teste t pareado e teste não paramétrico Qui-Quadrado. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4.8 Questões Éticas

Todos os procedimentos desta pesquisa foram adequados às normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo e ao Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.9 Divulgação

Os conhecimentos obtidos após a realização deste projeto serão divulgados em encontros científicos e publicados em revista especializada na área.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo, que estão descritos posteriormente são: a comparação da concentração de proteína muscular; a relação entre a concentração de proteína e os níveis de atrofia muscular e as alterações na massa corporal dos camundongos antes e depois do experimento.

5.1 Comparação da concentração de proteínas entre os grupos

Na Tabela 3 encontram-se os valores das médias de concentração de proteína entre os grupos estudados em função da suplementação com leucina.

Tabela 3 Comparação entre as médias da concentração de proteínas entre os grupos

Grupos	N	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	p
GC	8	1,91250	0,576333	1,103	2,787	0,002
GL1	8	1,52113	0,371311	0,770	1,976	
GL2	10	2,40040	0,292084	1,976	3,016	
GL3	8	2,52738	0,817059	1,331	3,775	

A Tabela 4 demonstra os valores significativos para a concentração de proteína entre os diferentes grupos.

Tabela 4 Interação da comparação da concentração de proteína entre os grupos

Grupos		p	95% Intervalo de Confiança	
			Limite inferior	Limite superior
GC	GL1	0,479	-0,34208	1,12483
	GL2	0,247	-1,18371	0,20791
	GL3	0,126	-1,34833	0,11858
GL1	GL2	0,009*	-1,57509	-0,18346
	GL3	0,004*	-1,73970	-0,27280
GL2	GL3	0,959	-0,82279	0,56884

* Com auxílio do Test “Post Hoc” Tukey se pode verificar que o GL 1 apresenta média de concentração de proteína significativamente menor em comparação ao GL2 e ao GL3.

5.2 Comparação entre a concentração de proteína muscular e a atrofia muscular (dentro dos grupos)

Na Tabela 5 as médias da concentração de proteína e a relação com a atrofia muscular são descritas, dentro do GC.

Tabela 5 Valores da concentração de proteína e a atrofia muscular no GC

Atrofia Muscular	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	F	p
Leve	6	1,99533	0,634767	1,103	2,787	0,457	0,524
Moderada	2	1,66400	0,381838	1,394	1,934		

A Tabela 6 mostra as médias da concentração de proteína muscular e a relação com a atrofia muscular no GL1.

Tabela 6 Concentração de proteína e a atrofia muscular no GL1

Atrofia							
Muscular	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	F	p
Sem	2	1,29500	0,742462	0,770	1,820	0,987	0,359
atrofia							
Atrofia	6	1,59650	0,235584	1,352	1,976		
leve							

Na Tabela 7 estão descritos os valores das médias da concentração de proteína muscular e a relação com a atrofia muscular no GL2.

Tabela 7 Concentração de proteína e a atrofia muscular no GL2

Atrofia							
Muscular	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	F	p
Sem	8	2,44288	0,308705	1,976	3,016	1,027	0,345
atrofia							
Atrofia	1	2,11100	–	2,111	2,111		
leve							

A Tabela 8 apresenta os resultados da relação entre a concentração de proteína e a atrofia muscular no GL3.

Tabela 8 Concentração de proteína e a atrofia muscular no GL3

Atrofia							
Muscular	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	F	p
Sem atrofia	4	2,72750	1,174651	1,331	3,775	0,471	0,523
Atrofia leve	3	2,24300	0,253083	2,018	2,517		

5.3 Comparação da atrofia muscular entre os grupos

A Tabela 9 apresenta a comparação entre os níveis de atrofia muscular nos diferentes grupos GC, GL1, GL2 e GL3.

Tabela 9 Comparação da atrofia muscular entre os diferentes grupos

Níveis de atrofia		GRUPOS			
		GC	GL1	GL2	GL3
Sem atrofia	N	0	2	8	4
	% dentro do grupo	0,0%	25,0%	88,9%	57,1%
Atrofia leve	N	6	6	1	3
	% dentro do grupo	75,0%	75,0%	11,1%	42,9%
Atrofia moderada	N	2	0	0	0
	% dentro do grupo	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%

A Tabela 10 apresenta o Teste Qui – quadrado para os níveis de atrofia muscular entre diferentes grupos.

Tabela 10 Teste Qui- quadrado para os níveis de atrofia muscular entre os grupos

	Qui-quadrado	Graus de Liberdade	Significância
<i>Pearson Chi-Square</i>	19,415 ^a	6	0,004*
Probabilidade de relação	22,584	6	0,001
Associação <i>Linear-by-Linear</i>	10,872	1	0,001
Número de casos válidos	32		

a. 12 células (100,0%) esperaram resultado menor que 5. O resultado mínimo esperado é 44.

*Com auxílio do Teste não paramétrico Qui-quadrado, identificou-se que o nível de atrofia do músculo e os grupos estão associados significativamente. Nos Grupos Leucina 2 e Leucina 3 o percentual de camundongos sem atrofia é superior aos Grupos Controle e Leucina 1 ($\chi^2 = 19,415$; $p = 0,004$).

5.4 Comparação da massa corporal (dentro dos grupos)

A Tabela 11 descreve a comparação das médias da massa corporal do GC antes e depois do tratamento.

Tabela 11 Comparação das médias da massa corporal no GC

Massa Corporal	N	Média	Desvio-padrão	t	p
Antes	8	54,56250	7,127600	3,185	0,015*
Depois	8	49,20000	3,886239		

*Por meio do Teste t pareado, verificou-se neste estudo, que houve uma redução significativa na massa corporal quando comparado antes e depois do tratamento ($t = 3,185$; $p = 0,015$).

Na Tabela 12 encontram-se os valores das médias da massa corporal do GL1.

Tabela 12 Comparação das médias da massa corporal no GL1

Massa Corporal	N	Média	Desvio-padrão	t	p
Antes	8	48,50000	3,627671	0,527	0,614
Depois	8	47,26250	5,139466		

A Tabela 13 apresenta a comparação das médias da massa corporal do GL2.

Tabela 13 Comparação das médias da massa corporal no GL2

Massa Corporal	N	Média	Desvio-padrão	t	p
Antes	10	46,06000	3,099892	1,394	0,197
Depois	10	44,02000	3,247153		

Na Tabela 14 estão expostos os valores das médias da massa corporal do GL3.

Tabela 14 Comparação das médias da massa corporal no GL3

Massa Corporal	N	Média	Desvio-padrão	t	p
Antes	8	49,97500	7,173513	0,262	0,801
Depois	8	49,00000	7,038263		

5.5 Massa corporal entre os grupos

A Tabela 15 mostra os valores das médias da massa corporal entre os diferentes grupos GC, GL1, GL2 e GL3.

Tabela 15 Diferença na massa corporal entre os grupos

Grupos	N	Média	Desvio -Padrão	Mínimo	Máximo	F	p
GC	8	5,3625	4,76173	-10,30	4,40	0,686	0,568
GL1	8	1,2375	6,63969	-7,40	9,90		
GL2	10	2,0400	4,62726	-10,60	3,20		
GL3	8	0,9750	10,53847	-19,90	11,50		

6 DISCUSSÃO

Na atualidade, inúmeras pesquisas científicas têm demonstrado que a sarcopenia possui uma etiologia parcialmente conhecida e multifatorial, o que dificulta a precisão de como este fenômeno ocorre no organismo humano. Entretanto, uma das condições amplamente discutidas é que uma dieta inadequada do idoso pode implicar em déficits ainda maiores na musculatura esquelética, sugerindo no agravamento da atrofia muscular.

A desnutrição protéico-calórica tem sido apontada como um fator amplamente prejudicial à saúde do idoso, sendo esta condição ocasionada pelas mudanças fisiológicas que acontecem no metabolismo corporal ao longo dos anos, que proporcionam a anorexia do envelhecimento, e exacerbado por condições sócio- econômicas e psicológicas inadequadas.

O propósito deste estudo foi o de investigar a o efeito da suplementação de leucina, administrada em diferentes doses, sobre a concentração da proteína muscular e na atrofia muscular esquelética de camundongos, bem como as alterações na massa corporal durante o processo de envelhecimento.

6.1 Concentração da proteína muscular

As alterações na massa muscular esquelética que advêm com o envelhecimento podem ser atribuídas a mudanças no metabolismo de regulação protéico muscular onde ocorre um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas neste tecido. Estudos indicam que as taxas de síntese protéica são menores em idosos, quando comparados com indivíduos jovens e que o aumento da degradação protéica, presente nos idosos, contribui para a evolução da sarcopenia (PADDON-JONES et al., 2004).

No presente estudo, identificou-se uma diferença significativa na concentração da proteína muscular, que foi maior nos grupos que receberam uma quantidade superior de leucina na dieta, conforme demonstrado na Tabela 3. Este resultado mostra que existe diferença significativa na média de concentração de proteínas entre os grupos e que o GL1 apresenta média de concentração de proteína significativamente menor em comparação ao GL2 e ao GL3.

Estes resultados são reforçados por estudos realizados por Dardevet et al. (2003) e Rieu et al. (2003) que investigaram o efeito da suplementação de leucina na refeição de ratos adultos e idosos. A suplementação com leucina não teve efeito adicional na síntese protéica muscular dos ratos adultos, mas a estimulou nos ratos idosos, sugerindo assim que, com o envelhecimento, o músculo apresenta uma redução do efeito estimulante dos aminoácidos em concentrações fisiológicas, mas é capaz de responder aminocidemia, ou seja, ao aumento de aminoácidos circulantes. Neste contexto, Rieu et al. (2006) realizaram uma pesquisa com indivíduos idosos que foram submetidos a suplementação com leucina e verificaram que a síntese protéica muscular foi aumentada nestes indivíduos com relação aos não suplementados e este fato pode ter ocorrido pela maior concentração de leucina livre plasmática. Sendo assim, a suplementação de leucina na alimentação melhorou a síntese protéica muscular em idosos, independente da concentração de outros aminoácidos.

Para Vary e Lynch (2007) o acréscimo de massa muscular é mais dependente da síntese do que da degradação protéica. Os aminoácidos anabólicos interagem para aumentar as taxas de síntese protéica de uma maneira aguda, por meio da aceleração do início da tradução do RNAm (RNA mensageiro) no músculo estriado, codificando proteínas.

É sabido que os aminoácidos apresentam uma importante função na regulação do turnover de proteína muscular. Em nível molecular, os aminoácidos modulam a expressão gênica, ou seja, promovem a transcrição de proteínas. O aumento da síntese protéica é dependente do aumento na taxa de tradução de RNAs mensageiros (RNAm), sendo delicadamente controlada pela via mTOR. Dreyer et al. (2008) demonstraram que a fosforilação da mTOR teve sua ativação aumentada pela ingestão de aminoácidos, desempenhando um melhor papel na síntese de proteínas.

Esta é a hipótese mais discutida atualmente. Acredita-se que a leucina estimula a síntese protéica por um aumento nas taxas de iniciação traducional, processo que envolve diversos fatores de iniciação, quinases e fosfatases, cujas atividades são reguladas por fosforilação. Esta ativação ocorre por vias de sinalização dependentes da proteína quinase mTOR e também por vias que não são sensíveis à rapamicina (ROGERO e TIRAPEGUI, 2008).

No músculo esquelético humano, parece que a atividade da mTOR aumenta a expressão de vários transportadores de aminoácidos, que podem ser uma importante

resposta adaptativa para sensibilizar músculo a um subsequente aumento na disponibilidade de aminoácidos (DICKINSON; RASMUSSEN, 2011).

Para Vianna et al. (2010), a função dos aminoácidos como substrato para a síntese de proteínas é evidente, porém as formas como os aminoácidos modulam a etapa da transcrição e regulam a tradução do RNAm, pela via de sinalização dependente da mTOR, ainda não estão totalmente esclarecidas. O que se tem verificado é que a mTOR é uma proteína responsável por ativar uma cascata de eventos bioquímicos intracelulares que ativam o processo de tradução protéica. Para estes mesmos autores, a leucina é um dos aminoácidos mais eficazes em estimular a síntese protéica, reduzir a proteólise e por favorecer a ativação desta proteína, além de estimular direta e indiretamente a síntese e a secreção de insulina, aumentando as propriedades anabólicas celulares.

Vary e Lynch (2007) também salientam que os aminoácidos e em particular a leucina, são extremamente eficazes para estimular a iniciação da tradução do RNAm.

Controversamente, para Sugawara et al. (2009) a proteína da dieta suplementada com leucina suprime a degradação de proteínas do músculo ao invés de estimular a síntese protéica. Esta foi a conclusão destes autores que verificaram que a taxa de degradação protéica muscular foi diminuída, sem um aumento na síntese protéica muscular em ratos suplementados com leucina na dieta.

O que se observa é que a leucina atua no metabolismo protéico muscular, tanto na síntese quanto na degradação de proteínas na musculatura estriada. Entretanto, a precisão com que estes eventos fisiológicos ocorrem no organismo humano não está totalmente esclarecida.

A concentração de proteína muscular é um fator determinante nas condições que envolvem o trofismo muscular. Segundo Proctor et. al (1998) a diminuição da massa muscular indica uma diminuição no teor de proteína muscular. D'Antona e Nisoli (2010) salientam que o balanço entre a formação de novas proteínas (síntese) e o catabolismo destas (degradação) contribui para a concentração de proteínas em cada fibra muscular. Neste contexto, para Carmeli et al. (2002) a atrofia muscular é um dos efeitos do envelhecimento sobre o sistema muscular que reflete de uma alteração no metabolismo protéico, ou seja, uma diminuição gradativa da concentração da proteína muscular ao longo dos anos. A presença da sarcopenia acaba ocorrendo por uma diminuição do turnover protéico miofibrilar, seja pela diminuição da síntese protéica ou pelo aumento da

degradação protéica ou por uma combinação de ambos os casos (D'ANTONA; NISOLI, 2010).

Após 12 meses de estudo, um grupo de pesquisadores em saúde do idoso, publicaram as recomendações nutricionais para gestão em sarcopenia. Eles sugerem que a suplementação de aminoácidos, principalmente doses elevadas de leucina, mostra-se eficaz na construção e manutenção da massa muscular em pessoas idosas (MORLEY et. al, 2010).

6.2 Concentração de proteína e a atrofia muscular

No presente estudo, observou-se uma associação da concentração de proteína muscular e o nível de atrofia neste tecido. Entretanto, apesar de haver uma tendência de maior concentração de proteína em camundongos classificados com atrofia leve, em comparação aos com atrofia moderada, não foi possível no presente estudo, identificar diferenças significativas dentro dos grupos.

Porém, comparando o nível de atrofia entre os diferentes grupos identificou-se uma diferença significativa. Conforme exposto na Tabela 10, os grupos GL2 e GL3 o percentual de camundongos sem atrofia é superior aos GC e GL1, que foram os camundongos que ingeriram maior quantidade de leucina na dieta (30 e 50 % superiores aos valores fisiológicos). Neste caso, o músculo gastocnêmio apresentou um diâmetro aumentado de fibras com relação aos outros grupos que ingeriram menor quantidade de leucina e do grupo que não possuía leucina na dieta (GC). Este dado sugere que a suplementação com leucina pode minimizar a atrofia no músculo esquelético, no que diz respeito ao diâmetro das fibras musculares.

Este dado vem ao encontro com o estudo realizado por Pansarasa et al. (2008) onde após suplementação com aminoácidos houve adaptações parciais na musculatura de ratos envelhecidos, com aumento da área transversal das fibras musculares e restauração da sinalização da mTOR.

Morfologicamente, o músculo que apresenta atrofia possui um conjunto de características como redução da área de secção transversal das fibras, diminuição das fibras (principalmente as Tipo II), aumento do espaço intersticial e tecido conjuntivo.

Lexell (1995) realizou uma pesquisa para avaliar as perdas de massa muscular relacionadas à idade e para determinar os mecanismos da sarcopenia, bem como a estrutura muscular e composição dos tipos de fibra. Os resultados indicaram que ocorre

uma diminuição gradual no tamanho e no volume muscular com o avançar da idade, acompanhado por uma substituição por tecido adiposo e conjuntivo. Esta atrofia do envelhecimento parece ser devido a uma redução em número e tamanho das fibras musculares, principalmente do Tipo II, e é em certa medida, causada por um processo lento e progressivo neurogênico.

Segundo Narici e Maffulli (2010) tanto o comprimento da fibra muscular como o seu ângulo de inserção na aponeurose do tendão diminuiu com o envelhecimento. Este fator implica em uma perda de sarcômeros em série e em paralelo e prevê uma perda de massa muscular e conseqüente menor perda de potencial de força e da velocidade.

Em sua pesquisa, Han et al. (2007) verificaram que a suplementação com 5 % de leucina por 14 dias reduziu a atrofia no músculo de ratos submetidos ao modelo de desuso muscular. Deluca (2007), na sua dissertação, demonstrou que a leucina minimizou a lesão no músculo por distração gradual osteogênica e auxiliou na adição de sarcômeros em série, juntamente com o aumento do diâmetro das fibras musculares.

Em seu artigo de revisão, Zanchi et al. (2008) salientam que o potencial antiatrófico da leucina geralmente ocorre em estudos onde doses supra-fisiológicas deste aminoácido são administradas. Esta é uma das questões observadas no presente trabalho onde a minimização da atrofia nos grupos onde doses com 30 a 50 % acima do valor de consumo diário recomendado.

6.3 Massa corporal

Na presente pesquisa, ao se comparar a massa corporal dentro dos grupos, houve uma redução significativa apenas no GC quando comparado antes e depois do tratamento, conforme descrito na Tabela 11. Nos outros grupos, apesar de se verificar uma tendência de redução na massa corporal, não se verificou diferenças significativas. Também não foram encontradas diferenças significativas na massa corporal entre os grupos GC, GL1, GL2 e GL3.

Observa-se neste trabalho que a leucina atenuou a perda de massa corporal, podendo este aspecto estar relacionado à preservação da massa muscular esquelética.

Entretanto, recentes pesquisas têm demonstrado que a leucina por si só não ocasiona o aumento da massa magra e que a sua ação depende da presença de outros aminoácidos, mas que a suplementação de leucina limitou a perda de peso induzida pela desnutrição (BALAGE e DARDEVET, 2010). Para estes mesmos autores, até o momento

não há evidências de que a leucina promova o aumento da massa muscular e que pesquisas utilizando a suplementação com leucina a longo prazo devem ser realizadas, pois os mecanismos fisiológicos de ação deste aminoácido são apenas parcialmente conhecidos.

As mudanças que acontecem na composição corporal ao longo dos anos são resultado de um conjunto de fatores que ocorrem com o envelhecimento. A massa corporal tende a diminuir consideravelmente conseqüente da redução de massa muscular que também modifica a sua composição em função da infiltração de tecido adiposo, que acaba também por alterar a qualidade e a função muscular, o que afeta a força e funcionalidade destes indivíduos (GOODPASTER et al., 2008).

Visser (2009) realizou um estudo longitudinal com humanos que buscou avaliar as mudanças na composição corporal com o envelhecimento e observou que o aumento de gordura corporal pode ser atribuída à diminuição acelerada da massa magra, ao aumento da gordura intramuscular e subcutânea, o que afeta o desempenho físico pela redução de força. Este fator tem sido amplamente discutido pelo aumento da obesidade populacional, implicando relação entre a mudança de peso, perda de massa muscular e diminuição de força com o envelhecimento. No mesmo estudo, a autora observou um declínio de massa muscular esquelética em cerca de 1 % ao ano em indivíduos mais velhos (70-79 anos).

Wolden-Hanson (2010) observou a composição corporal de ratos idosos e verificou que, na medida em que envelhecem, os ratos apresentam crescimento linear, com um aumento da massa magra e da gordura, tanto visceral como subcutânea, que continua a acumular ao longo da vida. Depois da meia - idade a massa muscular esquelética começa a declinar, e a sarcopenia se desenvolve quando os animais atingem a senescência. Finalmente, na terceira idade tardia ou senescência, o peso corporal começa a declinar, e tanto a massa gorda e magra são perdidas.

Desta forma, estes resultados confirmam dados da literatura que relatam que a perda de massa corporal que ocorre com o envelhecimento pode estar relacionado com a sarcopenia.

CONCLUSÕES

Neste estudo observou-se que a leucina interferiu na musculatura esquelética, influenciando nos níveis da concentração de proteínas, amenizando o quadro de atrofia muscular e, também diminuindo a perda da massa corporal, que é reduzida com o envelhecimento.

O efeito supressor da leucina ocorre quando quantidades supra-fisiológicas deste aminoácido são administradas, corroborando com dados da literatura que sugerem que a suplementação da dieta com o aminoácido leucina pode amenizar a sarcopenia.

REFERÊNCIAS

1 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 16 ed. Washington, 1998.

2 BALAGE, Michèle, DARDEVET Dominique. Long-term effect of leucine supplementation on body composition. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. v. 13, n.3, p 265–270, 2010.

3 BAUMGARTNER, R. N.; KOEHLER, K. M.; GALLAGHER, D.; ROMERO, L.; HEYMSFIELD, S. B.; ROSS, R. R.; GARRY, P. J.; LINDEMAN, R. D. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v.147, n.8, p.755–763, 1998.

Disponível em: [http:// aje.oxfordjournals.org/cgi/reprint/147/8/755](http://aje.oxfordjournals.org/cgi/reprint/147/8/755). Acesso em 28/fev. 2009.

4 BORTZ, W.M II. A conceptual framework of frailty: a review. *J Gerontol Med Sci*. v. 57A: 283–288, 2002.

5 BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal Appl. Physiology*. v. 45, p. 1009-1015, 1978.

6 CAMPBELL, W.; CRIM, M. C; DALLAL, G.E; YOUNG, V.R; EVANS, W. J: Increased protein requirements in the elderly: new data and retrospective reassessments. *Am J Clin Nutrition* ,v. 60, p. 167-75, 1994.

7 CARMELI, Eli; COLEMAN, Raymond; REZNICK, Abraham Z. The biochemistry of aging muscle. *Experimental Gerontology*. v. 37, Issue 4, p. 477-489, 2002.

8 CHAIMOWICZ, Flávio. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. *Rev. Saúde Pública*. v. 31, n. 2, abril, 1997.

9 CHAMPE, Pamela C.; HARVEY, Richard A. *Bioquímica Ilustrada*. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

10 COZZOLINO, Silvia M. F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. 1 ed. São Paulo: Manole, 2005.

11 CRUZ-JENTOFT, ALFONSO J.; BAEYENS, JEAN PIERRE; BAUER, JÜRGEN M.; BOIRIE, YVES; CEDERHOLM, TOMMY; LANDI, FRANCESCO; MARTIN, FINBARR C.; MICHEL, JEAN-PIERRE; ROLLAND, YVES; SCHNEIDER, STÉPHANE M.; TOPINKOVÁ, EVA; VANDEWOUDE, MAURITS; ZAMBONI, MAURO. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, n. 39, p.412–423, 2010.

12 CUTHBERTSON, D.; SMITH, Kenneth; BABRAJ, John; LEESE, Graham; WADDELL, Tom; ATHERTON, Philip; WACKERHAGE, Henning Peter M. Taylor; RENNIE, Michael J. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J*. v.19, p.422-4, 2005.

13 D'ANTONA, Giuseppe ; NISOLI, Enzo. mTOR signaling as a target of amino acid treatment of the age-related sarcopenia body composition and aging. *Interdiscipl. Top Gerontol*. Basel, Karger, v. 37, p. 115-141, 2010.

14 DARDEVET, Dominique; RIEU, Isabelle; FAFOURNOUX, Pierre; SORNET, Claire; COMBARET, Lydie; BRUHAT, Alain; MORDIER, Sylvie; MOSONI, Laurent; GRIZARD, Jean. Leucine: a

key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutrition Research Reviews*, v. 16, p. 61–70, 2003.

15 DARDEVET, Dominique; SORNET, Claire; BAYLE, Gérard; PRUGNAUD, Jacques; POUYET, Corinne; GRIZARD, Jean. Postprandial Stimulation of Muscle Protein Synthesis in Old Rats Can Be Restored by a Leucine-Supplemented Meal. *The Journal of Nutrition*. p. 95-100, 2001.

16 DELUCA, Cãmila Valentim. Efeito da sobrecarga de leucina no músculo sóleo de ratos durante a distração gradual osteogênica, 2007. *Dissertação de Mestrado*- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

17 DESCHENES, M.R. Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Medicine*, v. 34, n. 12, p. 809-824, 2004.

18 DREYER, H. C.; VOLPI, E. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *Journal of American College of Nutrition*, New York, v.24, n.2, p.140S–145S, 2005.

Disponível em: <http://www.jacn.org/reprint/24/2/140S>. Acesso em 28/fev. 2009.

19 DREYER, H.C.; DRUMMOND, M.J.; PENNINGS, B.; FUJITA, S.; GLYNN, E.L.; CHINKES, D.L.; DHANANI, S.; VOLPI, E.; RASMUSSEN, B. B. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 294, p. 392–400, 2008.

20 DICKINSON, Jared M.; RASMUSSEN, Blake B. Essential amino acid sensing, signaling, and transport in the regulation of human muscle protein metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition &*

Metabolic Care. v. 14, n. 1, p. 83–88, 2011.

21 DUBOWITZ, V. & BROOKE, M.H.: *Muscle biopsy: a modern approach*. London, England, W.B. Saunders, p. 20-167, 1973.

22 EVANS, William J. What Is Sarcopenia? *The Journals of Gerontology* series A, v. 50, p. 5-8, 1995.

23 FILHO, J.C.S.; VANDERLEI, Luiz C. M; CAMARGO, Regina C. T; OLIVEIRA, Dean A. R; OLIVEIRA Júnior, Silvio A; DAL PAI, Vitalino; BELANGERO, William D. Análise histológica, histoquímica e morfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico em esteira rolante. *Arq Ciênc Saúde*. v. 12, n.3, p.196-99, 2005.

24 FUJITA, Satoshi; VOLPI, Elena. Nutrition and sarcopenia of aging. *Nutrition Research Reviews*. v.17, p. 69–76, 2004.

25 FUJITA, Satoshi; VOLPI, Elena. Amino Acids and Muscle Loss with Aging. *The Journal of Nutrition*. v. 136, p. 277S - 280S, 2006.

26 GOODPASTER, Bret H.; CHOMENTOWSKI, Peter; WARD, Bryan K.; ROSSI, Andrea; GLYNN, Nancy W.; DELMONICO, Matthew J.; KRITCHEVSKY, Stephen B.; PAHOR, Marco; NEWMAN, Anne B. Effects of physical activity on strength and skeletal muscle fat infiltration in older adults: a randomized controlled trial. *J Appl Physiol*. v. 105, n. 5, p. 1498–1503, 2008.

27 GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. Tratado de Fisiologia Médica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

28 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003- Análise da

disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional do Brasil. *Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão*. Rio de Janeiro, 2004.

29 JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

30 HAN, B.; MA, C.; ZHU, M.J.; SHEN, Q.W.; DU, M. Leucine supplementation mitigates atrophy of non-weight-bearing skeletal muscle in rats. *The FASEB Journal*, v. 21, n.6, p.895-3, 2007.

31 HASKELL, William L.; LEE, I-Min; PATE, Russell R.; POWELL, Kenneth E.; BLAIR, Steven N.; FRANKLIN, Barry A.; MACERA, Caroline A.; HEATH, Gregory W.; THOMPSON, Paul; BAUMAN, Adrian. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, p.1423-1434, 2007.

32 HOUSTON, Denise K.; NICKLAS, Barbara J.; DING, Jingzhong; HARRIS, Tamara B.; TYLAVSKY, Frances A.; NEWMAN, Anne B.; LEE, Jung Sun.; SAHYOUN, Nadine R.; VISSER, Marjolein.; KRITCHEVSKY, Stephen B. for the Health ABC Study. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older community-dwelling adults: the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*,. v. 87, p. 150-5, 2008.

33 KIMBALL, S.R.; VARY, T.C.; JEFFERSON, L.S. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annual Review of Physiology*, v.56, p.321-48, 1994.

34 LACOURT, Marcelle X., MARINI, Lucas L. Decréscimo da

função muscular decorrente do envelhecimento e a influência na qualidade de vida do idoso: uma revisão de literatura *Revista Brasileira de Ciências do Envelhecimento Humano*. v. 3, n. 1, 2006.

35 LARSSON L, Grimby G, Karlsson J. Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol*. v. 46, p. 451-456, 1979.

36 LEHNINGER, Albert Lester. *Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2002.

37 LEXELL, J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *Journal Gerontol A Biol Sci Med Sci*. V. 50, 1995.

38 LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira J.; FARR, Lewis; RANDALL, Rose J.. Protein measurement with the folin fenol reagent. *The Journal of Biological chemistry*, p. 265-275, 1995.

39 LI, J.B.; JEFFERSON, L.S. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.544, n.2, p.351-359, 1978.

40 McARDLE, W. D; KATCH, F. I.; KATCH, V. *Fisiologia do Exercício: Energia, nutrição e desempenho humano*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

41 MARCELL, Taylor J. Sarcopenia: Causes, Consequences, and Preventions. *Journal of Gerontology: MEDICAL SCIENCES*, v. 58A, n. 10, p. 911–916, 2003.

42 MARCHINI, Júlio S.; MORIGUTI, Júlio C., PADOVAN, Gilberto J.; NONINO, Carla B.; VIANNA, Silviane Maria Luna; OLIVEIRA,

José Eduardo Dutra de. Métodos atuais de investigação do metabolismo protéico: aspectos básicos e estudos experimentais e clínicos. *Medicina*. Ribeirão Preto, v. 31, p. 22-30, 1998.

43 MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

44 MATSUDO, S.M.; MATSUDO, V.K.R. e BARROS NETO, T.L., Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física. *Rev. Bras. Ciên. e Mov.* v. 8, n.4, p. 21-32, 2000.

45 MORLEY J.E; ARGILES J.M; EVANS W.J; BHASIN S; CELLA D; DEUTZ N.E; DOEHNER W; FEARON K.C; FERRUCCI L; HELLERSTEIN M.K; KALANTAR-ZADEH K; LOCHS H; MACDONALD N; MULLIGAN K; MUSCARITOLI M; PONIKOWSKI P; POSTHAUER M.E; ROSSI FANELLI F; SCHAMBELAN M; SCHOLS A.M; SCHUSTER M.W; ANKER S.D; Society for Sarcopenia, Cachexia, and Wasting Disease. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc.*; v. 11, n.6, p. 391-6, 2010.

46 NAGASAWA, T.; KIDO, T.; YOSHIZAXA, F.; ITO, Y.; NISHIZAWA, N. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, 2001.

47 NAIR, K. S. Muscle protein turnover: methodological issues and the effect of aging. *J. Gerontol. Biol. Med. Sci.* v. 50, n. Special Issue, p. 107-12, 1995.

48 NARICI, Marco V.; MAFFULLI, Nicola . Sarcopenia:

characteristics, mechanisms and functional significance. *Oxford Journals British Medical Bulletin*.v. 95, n. 1, p. 139-159, 2010.

49 NOGUÉS, R. Factors que afectan la ingesta de nutrientes en el anciano y que condicionan su correcta nutrición. *Nutrición Clínica*, v.15, n.2, p.39-44, 1995.

50 PADDON-JONES, Douglas; SHORT, Kevin R.; CAMPBELL, Wayne W., VOLPI, He lena; WOLFE, Robert R. Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 87. p. 1562S - 6S, 2008.

51 PADDON-JONES D, SHEFFIELD-MOORE M, Zhang XJ, et al. Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; v. 286, p. 321– 8, 2004.

52 PADOVANI, Renata Maria; AMAYA-FARFÁN, JAIME; COLUGNATI, Fernando A. B.; DOMENE Seramis M. A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.19, n.6, p. 741-760, 2006.

53 PANSARASA, Orietta; FLATI, Vincenzo; CORSETTI, Giovanni; BROCCA, Lorenza; PASINI, Evasio; D'ANTONA, Giuseppe. Oral Amino Acid Supplementation Counteracts Age-Induced Sarcopenia in Elderly Rats. *American Journal of Cardiology*. v. 101, n. 11, p. S35-S41, 2008.

54 PETERSON, M.J.; GIULIANI Carol; MOREY, Miriam C.; PIEPER Carl F.; EVENSON, Kelly R.; MERCER, Vicki; COHEN, Harvey J.; VISSER, Marjolein, BRACH, Jennifer S.; KRITCHEVSKY, Stephen B., GOODPASTER, Bret H.; RUBIN, Susan; SATTERFIELD, Suzanne; NEWMAN, Anne B.; SIMONSICK Eleanor M.; and for the Health, Aging and Body Composition Study

Research Group. Physical Activity as a Preventative Factor for Frailty: The Health, Aging, and Body Composition Study. *Journal of Gerontology*, v. 64A, n.1, p. 61-68, 2009.

55 PROCTOR, D. N.; BALAGOPAL, P.; NAIR, S. Age-Related Sarcopenia in Humans Is Associated with Reduced Synthetic Rates of Specific Muscle Proteins. *Journal of Nutrition*. v. 128, p.351-355, 1998.

56 REZENDE, E. M.; SAMPAIO, I.B.M.; ISHITANI, L.H.; MARTINS, E.F.; VILELLA, L. de C. M. Mortalidade de idosos com desnutrição em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma análise multidimensional sob o enfoque de causas múltiplas de morte. *Caderno de Saúde Pública*, v. 26, n. 6, p. 1109-1121, 2010.

57 RIEU, I.; SORNET, C.; BAYLE, G.; PRUGNAUD, J.; POUYET, C.; BALAGE, M.; PAPET, I.; GRIZARD, J.; DARDEVET, D. Leucine supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats. *J. Nutr.* v. 133, p. 1198–1205, 2003.

58 RIEU, I.; BALAGE, M.; SORNET, C.; GIRAUDET, C.; PUJOS, E.; GRIZARD, J.; MOSONI, L.; DARDEVET, D. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol*. v. 575, p.305–315, 2006.

59 ROBERTS, S. B. Effects of aging on energy requirements and the control of food intake in men. *The Journals of Gerontology*. v. 50, p.101-106, 1995.

60 ROBERGS, Robert A.; ROBERTS, Scott O. *Princípios fundamentais de fisiologia do exercício para aptidão, desempenho e saúde*. São Paulo: Phorte, 2002.

61 ROGERO, Marcelo M.; TIRAPÉGUI, Julio. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 44, n. 4, 2008.

62 ROGERS, MA, EVANS WJ. Changes in skeletal muscle with aging: effects of exercise training. *Exercise and Sport Science Reviews*. American College of Sports Medicine Series v.21, p.65 - 102, 1993.

63 ROSENBERG, I.H. Summary Comments. *American Journal of Clinical Nutrition*, n. 50, p. 1231-1233, 1989.

64 SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v19n4/a14v19n4.pdf>. Acesso em: 16 de março de 2009.

65 SHORT, Kevin R.; VITTONÉ, Janet L.; BIGELOW Maureen L.; PROCTOR, David N., COENEN-SCHIMKE; Jill M.; RYS Paul; NAIR K. Sreekumaran. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. *J Appl Physiol*, v.99, p. 95 – 102, 2005.

66 SILVA, T.A., JUNIOR, A.F; PINHEIRO, M.M.; SZEJNFELD, V.L. Sarcopenia: aspectos etiológicos e opções terapêuticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.46, n.06, 2006.

67 SUGAWARA Takayuki, ITO, Yoshiaki, NISHIZAWA Naoyuki and NAGASAWA Takashi. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids*. v. 37, n. 4, p. 609-616, 2009.

68 TEIXEIRA, Ilka Nicéia D'Aquino Oliveira, GUARIENTO, Maria Elena. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e

perspectivas. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 15, n. 6, p. 2845-2857, 2010.

69 VARY, Thomas C.; LYNCH Christopher J. Nutrient Signaling Components Controlling Protein Synthesis in Striated Muscle. *J. Nutr.* v. 137, p. 1835-1843, 2007.

70 VIANNA, Daiana; TEODORO, Gabriela Fullin Resende; TORRES-LEAL, Francisco Leonardo; TIRAPEGUI, Julio. Protein synthesis regulation by leucine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 46, n. 1, 2010.

71 VISSER, Marjolein. Changes in body composition with aging: results from Longitudinal studies. Disponível em: <http://anhi.org/learning/PDFs/Sarcopenia/2009/2009%20Sarcopenia%20Proceedings%20Book%20Changes%20Body%20Composition.pdf>. Acesso em: 12 de dezembro de 2010.

72 WOLDEN-HANSON, Tami. Body Composition and Aging. *Interdiscipl Top Gerontol*. v. 37, p. 64–83, 2010.

73 WOLFSON, L.; JUDGE J.; WHIPPLE, R.; KING, M. Strength is a major factor in balance, gait, and the occurrence of falls. *Journals of Gerontology*, v. 50A, p. 64–67, 1995.

74 ZANCHI, N.E; NICHASTRO, H.; LANCHÁ JUNIOR, A.H. Potential antiproteolytic effects of L-Leucine: Observations of in vitro and vivo studies. *Nutrition & Metabolism*, v. 5, p. 20, 2008.

