ARTIGO ORIGINAL

Efeito de diferentes doses de leucina sobre as reservas glicogênicas da musculatura esquelética desnervada de ratos

Effect of different dose of leucine on glycogen reserves from denervated skeletal muscle of rats

Carolina Barbosa Ribeiro[1], Sergio Henrique Borin[2], Carlos Alberto da Silva[3]

RESUMO

O objetivo do estudo foi investigar o efeito de diferentes doses de leucina sobre as reservas glicogênicas do músculo esquelético de ratos desnervados. Foram utilizados 36 ratos Wistar com 3 a 4 meses, pesando entre 200 e 300g sendo mantidos em condições controladas de bioterismo. Os animais foram distribuídos em grupo experimentais denominados controle(C); desnervados(D); tratados com aminoácido leucina em três doses 5mM(CL5); 1,25mM(CL1,25) e 0,30mM(CL0,30); desnervado tratado com 0,30mM(DL0,30). A suplementação da leucina foi feita por gavagem e a desnervação foi realizada pela secção do nervo isquiático. As análises do conteúdo de glicogênio foram realizadas em amostras dos músculos sóleo(S), gastrocnemio branco(GB) e vermelho(GV). O músculo S apresentou redução no glicogênio tanto em CL5(-42,8%) quanto em CL1,25(-33%) e aumento na dose CL0,30(+38%). É possível que a baixas doses de leucina tenham estimulado a secreção de insulina, promovendo aumento na velocidade de captação de glicose pelos tecidos periféricos de 11.2±0,3%/min C para 14,16±0,2%/min no grupo tratado com CL0,30. O glicogênio do GB e GV apresentou-se reduzido nos grupos CL5(-44,8%) e CL1,25(-32,6%) comparado ao C; no entanto, no grupo CL0,30 não foi observado diferença em relação ao Grupo C. Observou-se ainda diminuição do glicogênio no grupo D(26% S; 35% GB; 28,5% no GV) e no DL0,30(35,6% GB e 65% no GV) em comparação com C. Conclusão: Altas doses de leucina podem comprometer a formação de glicogênio muscular e 0,30mM mostrou-se efetiva mesmo estando o músculo em repouso.

Palavras-chave: Denervação. Glicogênio. Leucina.

1- Mestre em Fisioterapia e Docente do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia Desportiva – UNIMEP – Piracicaba/SP – Brasil.
2- Coordenador da Pós-graduação em Fisioterapia Desportiva – UNIMEP – Piracicaba/SP – Brasil.
3- Docente do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia – UNIMEP – Piracicaba/SP – Brasil. Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP – Rod. Do Açucar Km 156 Bairro Taquaral, Piracicaba/SP.

Correspondência
Carolina Barbosa Ribeiro
Rua Maria Tarsia n°51 apto 81, Ed. Lerian, Jd. Elite,
13417-440, Piracicaba – SP
Fone: (19) 3426.9761,
carolribeiro_fisio@yahoo.com.br

Artigo recebido em 03/06/2011
Aprovado para publicação em 1º/03/2012

Introdução

Visando compreender a plasticidade do tecido muscular, foram desenvolvidos modelos experimentais que promovem desordem na homeostasia da junção neuromuscular, quer seja por meio da desnervação ou pela imobilização muscular, induzindo o quadro de hipotrofia.[1]

Vários estudos abordam parâmetros morfológicos e fisiológicos de músculos desnervados, mas a literatura é escassa sobre o efeito do aminoácido leucina sobre parâmetros quimiometabólicos das fibras desnervadas.

Infelizmente, não há tratamento eficaz para prevenir os eventos deletérios inerentes ao desuso muscular. Porém, com a identificação de algumas vias de sinalização relacionada à hipotrofia muscular e concomitante ao avanço das pesquisas, novos tratamentos podem ser propostos buscando minimizar os efeitos deletérios promovidos pelas alterações no controle motor ou funcional.[2] Dentre as diversas substâncias plausíveis de utilização, destaca-se o aminoácido leucina que interage tanto com as vias anabólicas quanto com as vias anticatabólicas da musculatura esquelética, local das principais alterações resultantes da limitação funcional.

Dentre a diversidade de condições patológicas atendidas nas clínicas fisioterapeuticas, destacam-se pacientes que são acometidos de lesões de nervos periféricos, muitos até com interrupção completa da inervação motora. Concomitante à lesão, há perda da ação voluntária e reflexa, proliferação de tecido conjuntivo intramuscular, diminuição ou perda na capacidade de gerar força, fatores que podem levar à hipotrofia muscular.[3]

Além das alterações supracitadas, o músculo desnervado apresenta resistência insulínica, diminuição na concentração da enzima fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K), diminuição na população de GLUT 4 e na expressão gênica do RNAm do GLUT 4, fatores que convergem para a diminuição nas reservas energéticas acompanhada de proteólise e atrofia.[4,5]

Nesse contexto, tem-se caracterizado a hipotrofia muscular como um processo com intensidade diferente para cada tipo de músculo.[6,7] As fibras musculares do tipo I possuem menor adaptação em relação às fibras do tipo II, sendo consequentemente mais afetadas pelo desuso.[8]

Em situações de desuso, as fibras lentas apresentam alterações histo-fisiológicas marcantes como irregularidades no retículo sarcoplasmático, fibrilas desintegradas, lesão mitocondrial, linhas Z estendidas, condensação e fragmentação da cromatina nuclear, além da redução de sarcômeros em paralelo.[9,10]

Nos dias atuais, é muito comum, atletas e praticante de atividade física utilizarem substâncias que potencialmente auxiliem o ganho de massa muscular e aumentem as reservas energéticas, visando melhorar o desempenho físico. Dentre as diferentes opções, o uso de complexos de aminoácidos de cadeia ramificada é uma opção amplamente utilizada.[11]

A leucina é um aminoácido diretamente envolvido na síntese protéica muscular, diminuição no catabolismo e melhora nas reservas energéticas.[12,13,14] É possível que haja uma inter-relação entre os sinais metabólicos gerados pela leucina e o equilíbrio no metabolismo de carboidratos, modulando os sinais insulínicos nos tecidos periféricos.[15] Uma vez que o conteúdo de glicogênio é indicativo do status energético do músculo, o objetivo do presente estudo foi investigar a ação de diferentes doses de leucina sobre o comportamento das reservas glicogênicas do músculo esquelético de ratos desnervados.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar (*Rathus novergicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 3 a 4 meses de idade pesando entre 200 e 300 gramas adquiridos da empresa ANILAB® (Paulínia). Os animais permaneceram em gaiolas coletivas contendo 3 a 4 animais recebendo água e alimentação *ad libitum*, sendo mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2 ºC e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz acesa a partir das 6 horas. Posteriormente, os ratos foram distribuídos em grupos, segundo o Quadro 1. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo protocolo 011/2006.

Suplementação com aminoácido leucina

Diariamente, a leucina foi administrada por gavagem durante sete dias, nas doses de 5 mM, 1,25 mM e 0,30 mM/100g de peso corporal do animal.

Desnervação

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, peso, ip), a pata posterior esquerda foi tricotomizada e uma porção do nervo isquiático (1 cm) foi seccionada e retirada, segundo a proposta de Coderre et al., 1992.[3]

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

Grupos experimentais	n
Controle (Grupo C)	6
Denervado (Grupo D)	6
Controle Tratado com aminoácido Leucina 5 mM (Grupo CL5)	6
Controle Tratado com aminoácido Leucina 1,25 mM (Grupo CL1,25)	6
Controle Tratado com aminoácido Leucina 0,30 mM (Grupo CL0,30)	6
Desnervado Tratado com aminoácido Leucina 0,30 mM (Grupo DL0,30)	6

Glicogênio muscular

Para a determinação do conteúdo de glicogênio, os animais foram decapitados e amostras dos músculos sóleo, gastrocnêmio porção branca e gastrocnêmio porção vermelha foram retiradas e pesados em balança eletrônica. A determinação da concentração de glicogênio nas amostras foi feita através do método do fenol sulfúrico, segundo a proposta de Siu et al., (1970).[16] Os valores foram expressos em mg/100 mg de peso úmido.

Avaliação da constante de decaimento da glicemia

Para avaliação da constante de decaimento da glicemia, os animais foram anestesiados (tiopental 40 mg/Kg, ip) e através de um corte da cauda foi coletado uma amostra de sangue. A glicemia foi avaliada através de fita de glicoteste One touch, configurando o tempo zero. A seguir, insulina (2 U/Kg) foi injetada na região intraperitoneal e a glicose foi reavaliada em amostras de sangue coletadas nos tempos 2,5; 5; 10; 15 e 30 min. Os valores glicêmicos foram utilizados para o cálculo da constante de decaimento através do software ORIGIN®.

Análise estatistica

A análise estatística foi realizada através do teste *t de Student* para as amostras quando comparados entre si, para as demais analises foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido da aplicação da análise de variância ANOVA: *one way* e do pós-teste de Tukey, com relevância estatística de $p<0,05$. Para tal, foi utilizado o software Origin ®. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.

Resultados

A análise do efeito da desnervação muscular sobre as reservas glicogênicas mostra redução expressiva no conteúdo de glicogênio, atingindo 26% no sóleo, 35% no gastrocnêmio porção branca e 28,5% no gastrocnêmio porção vermelha (figura 1).

Após suplementação com leucina houve redução nas reservas de glicogênio atingindo 42,8% na dose 5 mM no sóleo; 44,8% no gastrocnêmio porção branca e 50,9% no gastrocnêmio porção vermelha (Figura 2). Após suplementação com 1,25 mM de leucina foi observada redução de 33,3% na concentração de glicogênio no sóleo; 32,6% no gastrocnêmio porção branca e 23,5% no gastrocnêmio porção vermelha.

Após suplementação com o aminoácido na concentração 0,30 mM foi observado aumento significativo nas reservas de glicogênio do músculo sóleo normal, onde o conteúdo foi elevado em 38%, não sendo observada ação nos demais músculos (figura 3).

Partindo da observação que a suplementação com leucina na dose de 0,30 mM foi efetiva na melhora das condições energéticas do músculo sóleo normal, passamos a avaliar o efeito desta dose nos músculos desnervados. Não foi verificada mudança nas reservas de glicogênio do músculo sóleo desnervado tratado com esta dose, além de existir redução nas reservas de glicogênio, atingindo 35,6% no gastrocnêmio porção branca e 65% no gastrocnêmio porção vermelha (figura 4).

Frente a diferentes doses da leucina, não houve modificação no peso do músculo sóleo em nenhuma concentração. Observa-se também que a denervação reduziu 25,4% do peso do músculo sóleo

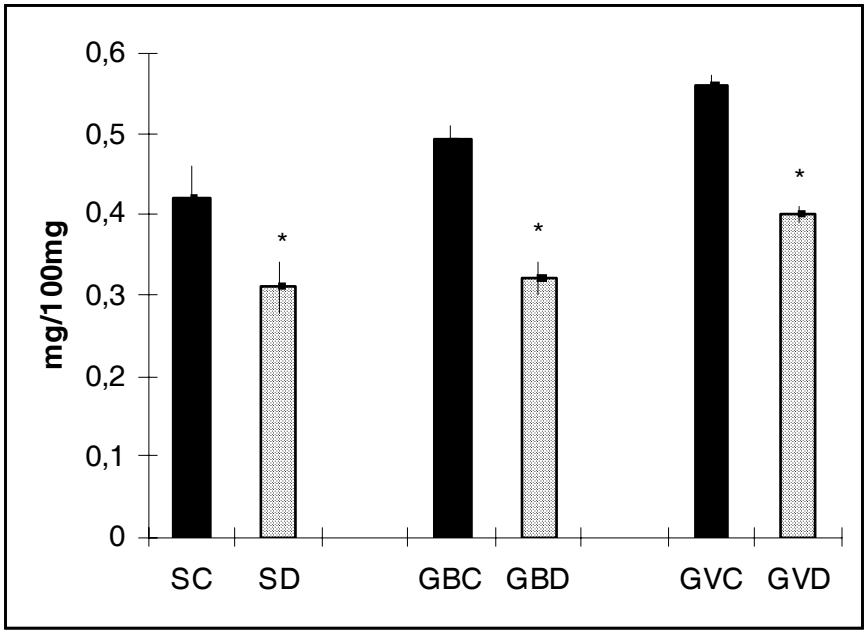

Figura 1. Valores de média ± epm, da concentração de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) de ratos controle (C) e desnervados (D), n=6 para cada grupo. *P<0,05 comparado ao controle.

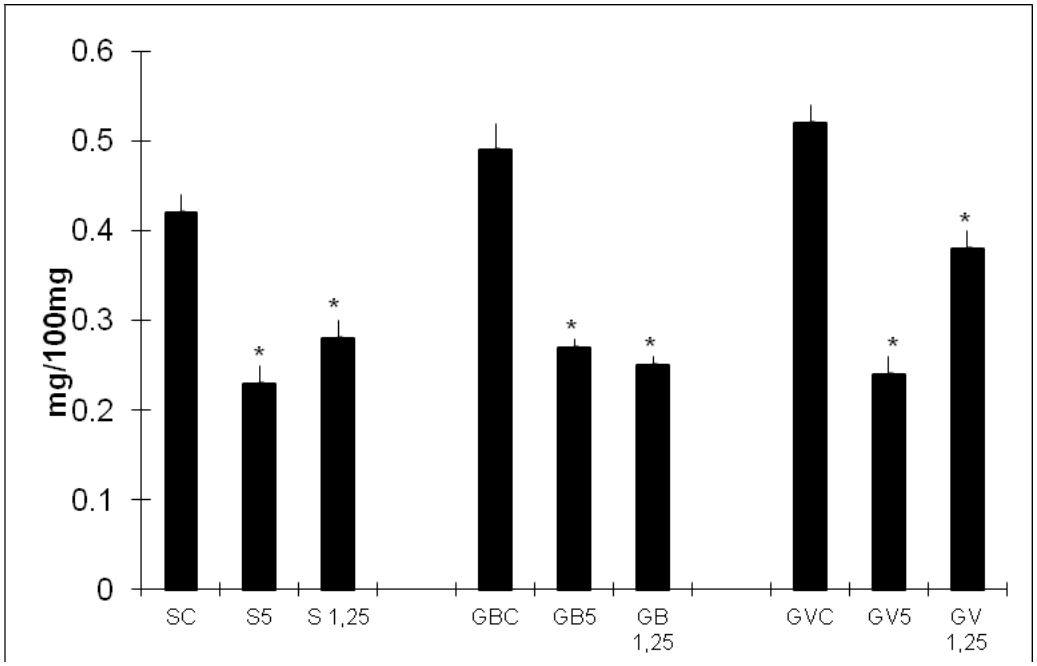

Figura 2. Valores de média ± epm, da concentração de glicogênio (mg/100mg) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV) de ratos tratados com leucina 5mM (5) e leucina 1,25 mM (1,25), n=6 por grupo. *P<0,05 comparado ao controle.

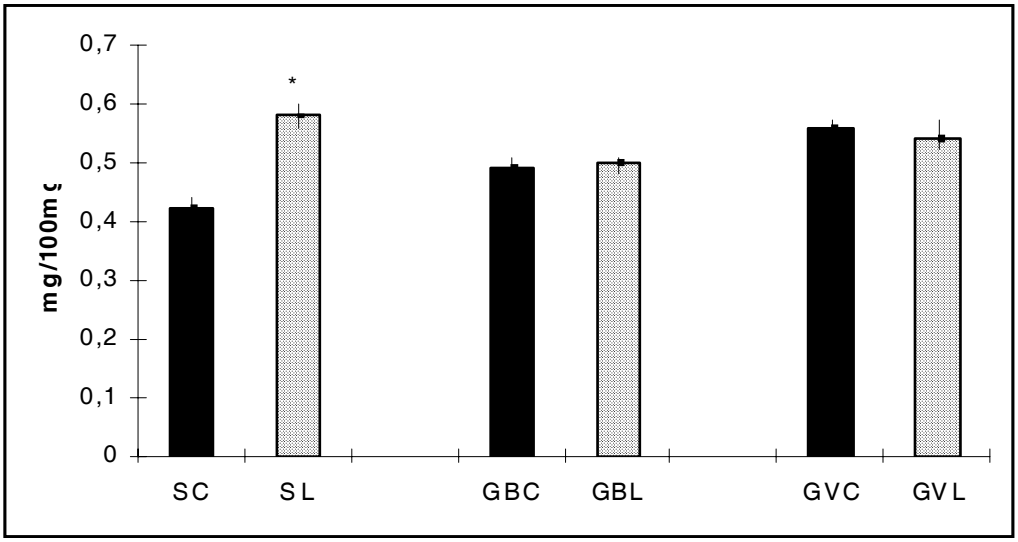

Figura 3. Concentração de glicogênio (mg/100mg) de ratos controle (C) e suplementados com leucina (L; 0,30mM/100g) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV). Os valores correspondem à média ± epm,. *P<0,05 comparado ao controle.

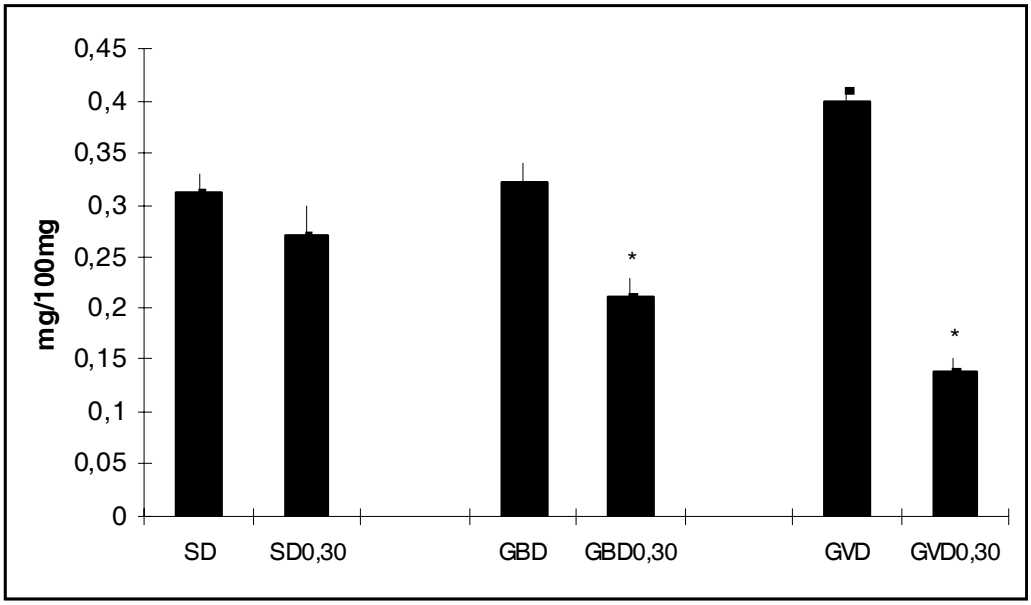

Figura 4. Concentração de glicogênio (mg/100mg) de ratos desnervados (D) e suplementados com leucina (L; 0,30mM/100g) dos músculos sóleo (S), gastrocnêmio porção branca (GB) e gastrocnêmio porção vermelha (GV). Os valores correspondem à média ± epm, n=6 para cada grupo. *P<0,05 comparado ao desnervado.

e que a dose de 0,30mM de leucina não foi efetiva em impedir a hipotrofia (figura 5).

No grupo controle, a constante de decaimento da glicemia foi de 11,2 ± 0,3%/min. Por outro lado, no grupo tratado com leucina 0,30 mM foi observado o valor de 14,16 ± 0,2%/min, representando elevação de 26% na presença do aminoácido.

Discussão

Apesar da literatura retratar os benefícios ligados à suplementação nutricional com o aminoácido leucina, não há consenso com relação à dose efetiva deste aminoácido.

Os dados demonstraram diminuição significati-

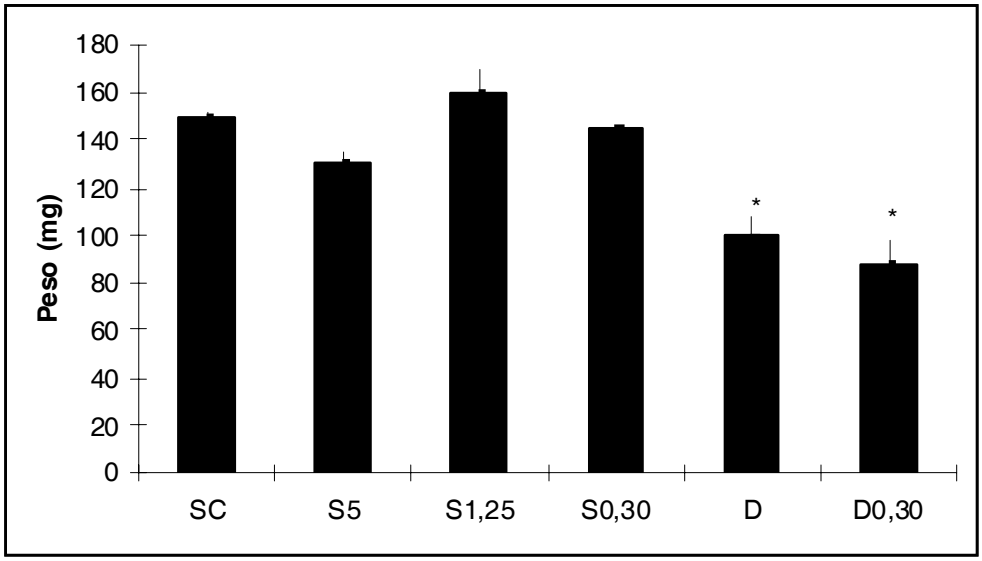

Figura 5. Peso (mg) do músculo sóleo controle (C) e desnervados (D), suplementados com leucina 5 mM (5); 1,25 mM (1,25) e 0,30 mM. Os valores correspondem à média ± epm, n=6 para cada grupo. *P<0,05 comparado ao controle.

va no conteúdo de glicogênio dos músculos quando há suplementação com leucina na dose de 5 mM e 1,25 mM. Este fato possivelmente se deve a uma relação multifatorial exercida pelo aminoácido, na modulação das vias metabólicas do tecido muscular. Ressalta-se que Lancha (2004)[14] sugeriu que os aminoácidos de cadeia ramificada são ativadores de síntese protéica e da formação das reservas energéticas musculares após esforços intensos, diferindo do perfil de análise aqui apresentado, uma vez que foi realizado em repouso.

No âmbito da tipagem de fibra muscular, foi observado que a leucina atuou preferencialmente em fibra tipo I, característica do músculo sóleo, o qual é mais responsivo à insulina e, desta forma, as reservas glicogênicas podem ter sido elevadas por ação indireta, uma vez que o aminoácido exerce ação enquanto secretagogo da insulina.[15,17,24]

Um ponto importante a se destacar é que nos músculos desnervados, a leucina não expressou sua ação indicando que a manutenção das reservas energéticas está relacionada com a manutenção da inervação motora, responsável pelo trofismo e pelo controle na sensibilidade insulínica e integridade das vias citosólicas.[17]

Diversos autores demonstraram que as doses de leucina utilizadas na experimentação científica podem ser excessivas, ocasionando resistência insulínica periférica. Isto resultaria no declínio significativo nas reservas musculares de glicogênio como demonstramos nos grupos tratados com leucina nas doses de 5 mM e 1,25 mM. Por outro lado, este estudo demonstrou que leucina na dose de 0,30 mM (considerada baixa) pode exercer ação potencializadora na formação destas reservas. Esta dose pode ser usada como um instrumento de manutenção das reservas energéticas em casos de depleção como observado na desnervação, imobilização muscular, ou ainda na prática esportiva.[17,19,20,21]

Um ponto a se considerar esta ligado ao estudo de Deshmukh et al. (2009)[20], onde foi demonstrado que a dose 5 mM é considerada como alta (supra fisiológica), e por esta razão pode ter comprometido a homeostasia das reservas aqui relatadas.[22,23]

Sabe-se que a leucina atua preferencialmente em fibras de contração lenta e como observado no grupo desnervado e desnervado suplementado com aminoácido leucina, as reservas glicogênicas dos músculos sóleo foram similares e indicam que não houve efeito nesta condição.[12] Outro ponto a ser aventado se refere à possibilidade do tratamento com altas doses ter ação dessensibilizadora, visto sua ação potencializadora do processo secretório de insulina provocando redução na sensibilidade insulínica devido a intensidade do estímulo e como reflexo há comprometi-

mento na formação das reservas glicogênicas.[18]

Foi descrito que leucina na dose de 0,30mM eleva a velocidade de captação de glicose por tecidos periféricos, corroborando com a melhora no suprimento energético tecidual, tal como demonstrado neste estudo.[23] No mesmo perfil de análise sabe-se que a leucina também exerce ação anabólica ativando a enzima mTOR trazendo reflexos na manutenção das vias sinalizadoras teciduais, no entanto, nesta condição a leucina não foi eficiente para impedir a proteólise dos músculos desnervados.[19,25,26]

Conclusão

O experimento demonstra que altas doses de leucina podem comprometer a homeostasia dos processos formadores das reservas musculares de glicogênio, afetando o equilíbrio energético muscular. Por outro lado, a dose de leucina de 0,30 mM (considerada baixa) mostrou-se efetiva na sensibilização periférica à insulina e na indução da formação das reservas glicogênicas no músculo tipo I, promovendo melhores condições energéticas.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the action of different doses of leucine on the dynamics of glycogen reserves of denervated skeletal muscle of rats. Wistar rats aged 3 to 4 months, weighing between 200 and 300g being kept under controlled conditions Biotery. The animals were divided into experimental group called control (C), denervated (D) treated with amino acid leucine in three doses 5nm(CL5), 1.25 mM (CL1,25) and 0.30mM(CL0,30), denervated treated with 0.30mM(DL0,30). Supplementation was performed by gavage and denervation was performed by sectioning the sciatic nerve. The analysis of the content of glycogen was performed on samples of the soleus(S), gastrocnemius white(GW) and red(GR). The muscle was lower in S glycogen (-33% and -42,8%), both in CL1,25 and CL5 and increased in a dose CL0,30(+38%), possibly due to act upon this low dose of insulin secretagogue, promoting an increase in the rate of glucose uptake by peripheral tissues (11,2± 0,3%/min C x 14,16 ± 0,2%/min CL0,30). The glycogen's GW and GR presented themselves in small groups CL1,25 (-32,6%) and CL5 (-44,8%) compared to C, however, the group CL0,30 no difference was observed in C. There was also decreased in group D (26% S; 35% GW; 28,5% GR) if compared to C. Conclusion: High doses of leucine may compromise the formation of muscle glycogen and 0.30mM was shown to be effective even when the muscle at rest.

Keywords: Denervation. Glycogen. Leucine.

Referências Bibliográficas

1. Heriksen EJ, Rodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. J Appl Physiol.1997; 70: 2322-7.
2. Musacchia XJ, Stefen JM, Fell RD. Disuse atrophy of skeletal muscle: animal models. Exerc Sport Sci Rev. 1988; 16:61-87
3. Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowshi TG, Ruderman NB, et al. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and Messenger RNA leves in denervated rat muscle. Endocrinol.1992;131:1821-5.
4. Sowell MO, Borggs KP, Robinson KA, Dutton SL, Buse MG. Effects of insulin and phospholipase C in control and denervated rat skeletal muscle. Am J Physiol. 1991; 260: E247-56.
5. Forti F, Guirro RRJ, Silva CA. Efeitos da glutamina e da estimulação elétrica sobre o perfil metabólico de músculos desnervados. Rev Bras Educ Fís Esp. 2004;18: 273-81.
6. Polacow MLO, Silva CA, Guirro RJ, Campos MR, Borges JP. Estudo morfométrico do músculo sóleo denervado de ratos tratados pela associação de metformina e estimulação elétrica. Rev Bras Fisioter. 2003; 7: 57-64.
7. Hirose M, Kaneki M, Sugita H, Yasuhara S, Martyn JA. Immobilization depresses insulin signaling in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000; 279:1235-41.
8. Talmadge RJ.Mechanical properties of rat soleus after long-term spinal cord transection. J Appl Physiol. 2002; 93: 1487-97.
9. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. Anat Rec. 1997; 248: 355-65.
10. Smith J, Goldsmith C, Ward A, Ledieu R. IGF-II ameliorates the dystrophic phenotype and coordinately down-regulates programmed cell death. Cell Death Differ. 2000; 7: 1109-18.
11. Lancha Jr AH. Nutrição e metabolismo aplicados à atividade motora. São Paulo: Atheneu; 2004.
12. Shimomura Y, Yamamoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N et al. Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. J Nutr. 2006;136: 529S-32S.
13. Li JB, Jefferson LS. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. Biochim Biophys Acta. 1978; 544: 351-9.

14. Tom A, Nair KS. Assessment of branched-chain amino acid status and potential for biomarkers. J Nutr. 2006;136: 324S-30S.

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

16. Siu LO, Russeau JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. J Appl Physiol.1970; 28: 234-6.

17. Xu G, Kwon G, Cruz WS, Marshall CA, McDaniel ML. Metabolic Regulation by Leucine of Translation Initiation Through the mTOR-Signaling Pathway by Pancreatic β-cell. Diabetes. 2001; 50: 353-60.

18. Saha AK, Xu XJ, Balon TW, Brandon A, Kraegen EW, Ruderman NB. Insulin resistance due to nutrient excess: Is it a consequence of AMPK down regulation? Cell Cycle. 2011;10: 3447-51.

19. Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle Am J Physiol Endocrinol Metab.1999; 277: E1077-86.

20. Deshmukh A, Salehzadeh F, Metayer-Coustard S, Fahlman R, Nair KS, Al-Kahalili L. Post-transcriptional gene silencing of ribosomal protein S6 kinase 1 restores insulin action in leucine-treated skeletal muscle. Cell Mol Life Sci. 2009; 66: 1457-66.

21. Gleeson M. Interrelationship between physical activity and branched-chain amino acids. J Nutr. 2005;135:1591-5.

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

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

24. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, IIB fibers and citrate cinthase activity of rat muscle. J Appl Physiol. 1996, 80: 261-70.

25. Van Loon LJ. Leucine as a pharmaconutrient in health and disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011; 26: 204-11.

26. Pasiakos SM, McClung JP. Supplemental dietary leucine and the skeletal muscle anabolic response to essential amino acids. Nutr Rev. 2011; 69:550-7.