

**HELTON DE SÁ SOUZA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NAS VIAS TRÓFICAS  
E ATRÓFICAS DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS  
SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Campus São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.**

**São Paulo**

**2014**

**HELTON DE SÁ SOUZA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NAS VIAS TRÓFICAS  
E ATRÓFICAS DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS  
SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo - Campus São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.**

**Orientador:** Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hanna Karen Moreira Antunes

**São Paulo**

**2014**

Souza, Helton de Sá

**Efeito da suplementação de Leucina nas vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética de ratos submetidos à privação de sono paradoxal/**

Helton de Sá Souza. – São Paulo, 2014.

xxii, 91f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Campus São Paulo.  
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Effect of Leucine supplementation in trophic and atrophic pathways in skeletal muscle of rats submitted to paradoxical sleep deprivation.

1. Leucina. 2. Privação do sono. 3. Músculo esquelético. 4. Nutrição. 5. Hormônios.

**HELTON DE SÁ SOUZA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA NAS VIAS TRÓFICAS  
E ATRÓFICAS DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE RATOS  
SUBMETIDOS À PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL**

**Presidente da Banca:** Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dr<sup>a</sup>. Cibele Aparecida Crispim

Profa. Dr<sup>a</sup>. Nadia Carla Cheik

Profa. Dr<sup>a</sup>. Vânia D'Almeida

Aprovada em: 27 de agosto de 2014.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
CAMPUS SÃO PAULO  
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Profa. Dra. Deborah Suchecki

**Coordenadora do Curso de Pós-Graduação:** Profa. Dra. Vânia  
D'Almeida

Este trabalho foi realizado na Universidade Federal de São Paulo – Campus São Paulo, com o apoio financeiro da CAPES, CNPq, da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (# 2012/15869-0; #13/00152-5) e do Centro de Estudos em Psicobiologia e Exercício (CEPE).

## DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Roberto e Lúcia e ao meu padrinho João**

*Dedico esta dissertação de Mestrado a vocês, por serem os principais fomentadores de minha formação humana, por me ensinarem o essencial, ao mostrar-me que o próximo é tão importante quanto os mais próximos.*

*Dedico a vocês, pelas muitas vezes que abriram mão dos próprios desejos para que eu realizasse meu sonho.*

*Enfim, dedico a vitória desta conquista com todo meu amor a vocês.*

## AGRADECIMENTOS

– Acima de tudo e de todos, agradeço a DEUS, por me fornecer o dom da vida, por muitas vezes ser meu refúgio, confidente, um amigo fiel!

– Obrigado João, certamente se não fosse você, eu não estaria aqui escrevendo estas palavras. Você é meu anjo, um abrigo, um verdadeiro tesouro de DEUS. Meu amigo, amo você!

– Pai, mãe, meu irmão Wesley, Tia Sônia, Tio Cacá, Fernanda, Mileninha, Vó e Vera, eu sei o quão este sonho, também, se tornou o sonho de vocês, o nosso sonho. Poucas pessoas estiveram e estarão ao meu lado como vocês, não há amor tão grande quanto ao que nos une!

– Não existem palavras capazes de demonstrar minha gratidão a você Tia Meire e a você Renan, meu primo; meu irmão. Toda minha vida em São Paulo só se deu devido ao grandioso gesto de vocês, que me acolheram nos primeiros anos em que vivi nesta cidade. Serei eternamente grato!

– Obrigado Hanna Karen Moreira Antunes, professora, amiga, companheira. Você foi muito mais que uma orientadora, amiga, anjo. Obrigado pela extrema generosidade, disponibilidade, entrega; obrigado por concretizar boa parte de meus sonhos; obrigado por fazer parte de minha formação; obrigado por me dar esperanças de um dia conseguir ser um profissional melhor e quem sabe, um conforto maior aos meus pais. Por mais que meus familiares e amigos se esforçassem em me apoiar e ajudar, se não fosse você nenhum desses esforços valeria a pena. Obrigado por me permitir continuar sonhado!

– Ao meu Orientador Marco Túlio de Mello, pelas oportunidades, pela confiança, pela relação de amizade construída durante os 5 anos que estou em São Paulo. Obrigado pela oportunidade de trabalhar, mas também pela oportunidade de aprender; obrigado pelas cobranças, mas também pelas palavras de conforto; obrigado pela disponibilidade e por me deixar caminhar; obrigado pelos ensinamentos acadêmicos e pelos ensinamentos de vida. Obrigado!

– À Ana Claudia, minha namorada, linda, amiga, companheira e que no último ano vem sendo a pessoa com quem posso partilhar angústias, mas também alegrias, felicidade e amor. Obrigado por deixar alguns dos dias de minha vida mais leves, por me dar forças, por me permitir amá-la. Obrigado!

– Ao Murilo, meu irmãozinho, que foi um dos primeiros a me estender a mão quando aqui cheguei, pessoa que se tornou muito mais que colega de grupo de pesquisa, tornou-se amigo! Alguém com quem posso me abrir, partilhar meus anseios, sofrimentos. Você é uma pessoa muito especial para mim. Obrigado!

– Obrigado Marcos, pela pessoa generosa que é, por sempre estar disponível a me ajudar. Tive o prazer de fazer parte desse grupo junto a você, companheiro desde o início. Aprendi muito com você, muito mais do que técnicas, aprendi e convivi com uma pessoa reta, justa, engraçada, esquecida e que tem um coração enorme. Obrigado!

– À Sara, que faz parte dessa grande família, companheira de vários experimentos, risadas, também sempre muito generosa, doce, meiga e que contagia com suas histórias. Você se tornou uma irmãzinha também, obrigado!

– Aos meus amigos que compõem o grupo do qual faço parte e que sempre me acolheram com muito carinho, Camila, Jorginho, Marcus, Mariana, Banana, Cláudia, Bob, vocês estão no meu coração!

– Ao prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos pelas inúmeras conversas ao longo de todos esses anos, pelo carinho e por ser um dos maiores incentivadores para que eu persistisse neste caminho da pós-graduação. Obrigado, acima de tudo, pela amizade.

– Ao meu professor Daniel, meu “pai”, pessoa que plantou a semente da dúvida em mim; pessoa que me fez gostar de estudar; profissional que me inspira, um amigo que não me deixa. O meu ser faz parte de seus ensinamentos. Obrigado!

– Aos meus amigos de sempre Lionel e Clayton que desde que me conheço por gente também os conheço. Amizade nascida ainda no berço e que continua firme e vibrante até hoje. Obrigado por compreenderem as minhas muitas ausências físicas e, obrigado por sempre estarem comigo.

– À minha amiga Nadine, muito obrigado por me presentear com uma amizade a qual experimentei em pouquíssimas ocasiões. Na verdade, um sentimento raro de fraternidade e afinidade! Certamente um exemplo de dedicação, ética, honestidade e com que, felizmente, tive o prazer de conviver em um período muito importante de minha vida. Obrigado.

– Ao laboratório Carl Peter Von Dietrich, do Departamento de Bioquímica, em nome da profa. Dra. Kil Sun Lee, amiga e a maior colaboradora do nosso grupo. Obrigado pela parceria.

– Aos professores do Departamento de Psicobiologia, pelo profissionalismo, empenho e dedicação ao departamento. Pelo grande comprometimento com a formação dos alunos.

– À minha querida colega Pamella Ramona pela disponibilidade em ensinar-me com muita paciência a técnica de histoquímica utilizada para esta dissertação e ao Wilson Max, por contribuir com a análise da atividade enzimática inicial do proteassomo.

– Agradeço minha família, Tio Sérgio, tia Lila, Vó Rita, Tia Cleusa, Tio Adalton, Fabiano, Marquinhos, Bárbara, Tia Neusa, Tio Ney, Flavinha, Alessandra, Tia Néia, Tio Eder, Reuber, Lucio Flávio, Maicon, Maiara. Aos mais próximos e aos mais distantes, que sempre se fizeram presentes nesta caminhada, apoiaram-me, verbalizaram palavras de apoio, incentivo ou simplesmente me ofertaram um olhar fraterno.

– Aos funcionários do Departamento de Psicobiologia, pela disponibilidade, gentileza e prontidão em todas as vezes que os solicitei: Mara, Jaqueline, Valéria, Julho, Léia, Pingo, Adriana, Nelsão, Eduardo, Goiano, Sebastião, Mané, Tomé, Ivan, Zé, Seu Borba, Clóvis, Ricardinho, Gilbertinho, Vinicius, Deinha, Dunga, Marilde e todos os outros.

– Aos meus colegas do CEPE, Ioná Zalzman, Amauri Barreto, Valdir Lemos, Raquel Munhoz, Fábio Lira, Silvio Jr., Fernanda Narciso, Valter Viana, Ricardo Cassilhas, Priscila Sanches, Aline de Piano, June Carnier, Débora Mosquio, Sandra Queiroz, Bruna Andrade, Patrícia Leão, Andressa Silva, Cibele Crispim, Eduardo Alves, Daniel Cavagnolli, Vladimir Modolo, Carolina Vicária, Alexandre Abílio, que sempre contribuíram com minha formação e deixando o ambiente sempre agradável.

– À Maria da Glória (Glorinha), Maria Altamira (Mira), Ernani Rutter, Giuliano Celms, Dilma, Cley, Fernando Sales, Thiago Fernandes, Jéssica, Giscard, Júnior, Paulinho e Luciana, que além de nos fornecerem todo o conforto e condições de trabalho, ajudaram na realização das pesquisas e tornaram o convívio simples e agradável.

– Aos demais professores do CEPE: profa. Francieli Ruiz da Silva, profa. Ana R Dâmaso, profa. Juliana Martuscelli, profa. Andréa Maculano Esteves.

– Aos amigos e colegas do Departamento de Bioquímica: Marcelo, Márcio, Paulo, Thatiane, Daniele, Ana Paula, Elan e Jéssica que muitas vezes acompanharam minhas angústias no laboratório.

– Aos colegas da especialização do CEPE, Marcos Pires, Aline Millani, Vanessa Pessota, Rodrigo Formigoni, Gabriela Pontes, Roberta Luz, Hamilton Rocha, Felipe Barbosa, Alexandre Abílio, Vívian Modolo, Roberto Marques, Fátima Queirós, Fátima Soares, Fernando Salles, Karina Mingrone, Adams Menezes, Patrícia Santolia e todos os outros, por fazerem parte do início desta caminhada.

– À Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), pelo apoio financeiro.

– Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos nos primeiros meses de matrícula.

– À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de auxílio pesquisa (2013/00152-5) e a concessão da bolsa de estudos (2012/15869-0).

## ***EPÍGRAFE***

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”  
Friedrich Wilhelm Nietzsche

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	vii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	viii
<b>EPÍGRAFE</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS</b> .....	xv
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xviii
<b>RESUMO</b> .....	xxi
<b>ABSTRACT</b> .....	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	25
2.1 O sono e suas funções .....	25
2.2 Privação de sono .....	27
2.3 Músculo esquelético .....	28
2.3.1 <i>Metabolismo muscular (síntese e degradação proteica)</i> .....	31
2.3.2 <i>Metabolismo muscular e a privação de sono</i> .....	34
2.4 Leucina .....	35
2.4.1 <i>Metabolismo da Leucina</i> .....	36
2.4.2 <i>Possíveis efeitos da suplementação de Leucina durante a privação de sono paradoxal</i> .....	37
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	40
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	42
5.1.1 <i>Geral</i> .....	42
5.1.2 <i>Específicos</i> .....	42
<b>6. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	43
6.1 Animais experimentais e condições ambientais .....	43
6.2 Cuidados éticos para com os procedimentos experimentais .....	45
6.3 Procedimentos experimentais .....	45
6.3.1 <i>Privação de sono paradoxal</i> .....	46
6.3.2 <i>Suplementação de leucina</i> .....	47
6.3.3 <i>Eutanásia</i> .....	48
6.3.4 <i>Coleta de sangue e extração de tecidos</i> .....	48
6.3.5 <i>Histomorfometria</i> .....	49
6.3.6 <i>Velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo 26s</i> .....	51
6.3.7 <i>Western Blot</i> .....	52
6.3.8 <i>Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1</i> .....	53
6.4 Desenho experimental .....	54

6.5	Análise estatística.....	55
7.	<b>RESULTADOS</b> .....	56
7.1	Massa corporal.....	56
7.2	Massa muscular e histomorfometria.....	57
7.3	Sinalizações anabólicas intramusculares.....	59
7.4	Sinalizações catabólicas intramuscular.....	61
7.5	Dosagens sanguíneas de sinalizações anabólicas e catabólicas.....	63
8.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
9.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
10.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	75
11.	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b> .....	76
12.	<b>ANEXOS</b> .....	77
	ANEXO 1 – Carta de aprovação do comitê de ética e pesquisa – Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo.....	77
	ANEXO 2 – Massa do fígado e das gorduras Epidídimo e Retroperitonia.....	79
13.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA VIA <i>FOSFATILINOSITOL 3 KINASE/PROTEÍNA QUINASE B/MECHANISTIC TARGET OF RAPAMYCIN</i> (PI3K/AKT/MTOR) ATRAVÉS DA SINALIZAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA 1 (IGF-1).....	32
FIGURA 2 – CONTROLE DA AUTOFAGIA E DO SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASSOMO PELA FOXO.....	34
FIGURA 3 – METABOLISMO DA LEUCINA .....	37
FIGURA 4 – MECANISMO DE AÇÃO DA LEUCINA ESTIMULANDO A SÍNTESE PROTEICA MUSCULAR.....	38
FIGURA 5 – PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL. ....	46
FIGURA 6 – SUPLEMENTAÇÃO DE LEUCINA.. ....	47
FIGURA 7 – CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRA MUSCULAR A PARTIR DA COLORAÇÃO DA ENZIMA ATPASE EM PH 10,3.. ....	51
FIGURA 8 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	54
GRÁFICO 1 - VARIAÇÃO ( $\Delta$ ) DA MASSA CORPORAL TOTAL EM GRAMAS A CADA 24 HORAS. ....	56
GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO ( $\Delta$ ) DA MASSA CORPORAL ENTRE OS GRUPOS APÓS O PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL POR 96 HORAS.. .	57
GRÁFICO 3 – A – MASSA DO <i>GASTROCNEMIUS</i> CORRIGIDO PELO COMPRIMENTO DA TÍBIA.....	58

GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRA MUSCULAR E ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL DOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRA MUSCULAR.....	58
GRÁFICO 5 – CONCENTRAÇÃO DO IGF-1 INTRAMUSCULAR..	59
GRÁFICO 6 – CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS RESPONSÁVEIS PELA SINALIZAÇÃO DE SÍNTESE PROTEICA.....	60
GRÁFICO 7 – CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS RESPONSÁVEIS PELA SINALIZAÇÃO DE DEGRADAÇÃO PROTEICA.....	61
GRÁFICO 8 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS RESPONSÁVEIS PELA SINALIZAÇÃO DE DEGRADAÇÃO PROTEICA.....	62
GRÁFICO 9 – VELOCIDADE INICIAL DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO PROTEASSOMO 26S.....	63

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES .....	29
QUADRO 2 – DADOS NUTRICIONAIS DA RAÇÃO NUVILAB® CR1 DE ACORDO COM AS INFORMAÇÕES DO FABRICANTE. ....	44
TABELA 1 – REPRESENTAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ANIMAIS.....	45
TABELA 2 – PERFIL SÉRICO HORMONAL E DE METABÓLITOS.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Percentual ou por cento.
<b>°C</b>	Graus celsius.
<b>µg</b>	Micrograma (unidade de medida de massa).
<b>µL</b>	Microlitro (unidade de medida de volume).
<b>µM</b>	Micromol (unidade de concentração de substâncias).
<b>µm<sup>2</sup></b>	Micrometro quadrado (unidade de medida de distância).
<b>4E-BP1</b>	<i>4E-binding</i> proteína 1.
<b>Akt</b>	Proteína kinase B.
<b>Ativ.</b>	Atividade.
<b>Atg3</b>	<i>Autophagy related 3</i> .
<b>Atg5</b>	<i>Autophagy related 5</i> .
<b>Atg7</b>	<i>Autophagy related 7</i> .
<b>Atg16</b>	<i>Autophagy related 16</i> .
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina.
<b>BCAA</b>	Aminoácido de cadeia ramificada.
<b>BCAT</b>	Aminotransferase de cadeia ramificada.
<b>BCKD</b>	A-cetodesidrogenase mitocondrial de cadeia ramificada.
<b>Ca</b>	Cálcio.
<b>CaPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de cálcio.
<b>CEDEME</b>	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia.
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais.
<b>COS<sub>2</sub></b>	Dissulfeto de cobalto.
<b>dL</b>	Decilitro (unidade de medida de volume).
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma.
<b>eIF4A</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4A</i> .
<b>eIF4B</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4B</i> .
<b>eIF4E</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i> .
<b>eIF4F</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4F</i> .
<b>eIF4G</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4G</i> .
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático.
<b>FoxO</b>	<i>Forhead box O</i> .

<b>g</b>	Gramma (unidade de medida de massa).
<b>GH</b>	Hormônio do crescimento.
<b>h</b>	Hora (unidade de medida de tempo).
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água.
<b>HPA</b>	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.
<b>HPG</b>	Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.
<b>Hz</b>	Hertz (unidade de medida de frequência).
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina.
<b>IRS-1</b>	Substrato 1 do receptor de insulina.
<b>kDa</b>	Quilodaltons.
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio.
<b>kg</b>	Quilograma (unidade de medida de massa).
<b>KIC</b>	A-cetoisocaproato.
<b>L</b>	Litro (unidade de medida de volume).
<b>LC3</b>	Proteína de cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos 1.
<b>MAFbx/Atrogina -1</b>	<i>Muscle atrophy F-box.</i>
<b>mg</b>	Miligrama (unidade de medida de massa).
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio.
<b>mL</b>	Mililitro (unidade de medida de volume).
<b>mM</b>	Milimol (unidade de concentração de substâncias).
<b>mTOR</b>	<i>Mechanistic target of rapamycin.</i>
<b>mTORC1</b>	Complexo <i>mechanistic target of rapamycin 1.</i>
<b>mTORC2</b>	Complexo <i>mechanistic target of rapamycin 2.</i>
<b>MURF-1</b>	<i>Muscle RING finder protein 1.</i>
<b>MyHC</b>	Cadeia pesada de miosina.
<b>MyoD</b>	<i>Myogenic differentiation antigen.</i>
<b>η</b>	Tamanho do efeito.
<b>N1</b>	Estágio 1 do sono NREM.
<b>N2</b>	Estágio 2 do sono NREM.
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio.
<b>N3</b>	Estágio 3 do sono NREM.
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio.
<b>ng</b>	Nanograma (unidade de medida de massa).
<b>nm</b>	Nanômetro (comprimento de onda).
<b>NREM</b>	<i>Non-rapid eyes movements</i> (sem movimentos rápidos dos olhos).

<b>Oxi.</b>	Oxidativo.
<b>p62/SQSTM1</b>	Proteína sequestrassomo 1 de 62kDa.
<b>p70S6k</b>	Proteína ribossomal S6 kinase de 70kDa.
<b>p-Akt</b>	Proteína kinase B fosforilada.
<b>p-FoxO</b>	<i>Forhead box O</i> fosforilada.
<b>PGC1-<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator activade receptor gamma coativator.</i>
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico.
<b>PI3K</b>	Fosfatilinositol 3 kinase.
<b>PDK1</b>	Piruvato desidrogenase quinase 1.
<b>p-mTOR</b>	<i>Mechanistic target of rapamycin</i> fosforilado.
<b>p-p70S6k</b>	Proteína ribossomal S6 kinase de 70kDa fosforilada.
<b>REM</b>	<i>Rapid eyes movements</i> (movimentos rápidos dos olhos).
<b>RIA</b>	Radioimunoensaio.
<b>RPM</b>	Rotações por minuto (unidade de medida de frequência).
<b>SN1</b>	Sobrenadante 1 (fração citosólica do homogenato do músculo).
<b>SN2</b>	Sobrenadante 2 (fração nuclear do homogenato do músculo).
<b>SOL</b>	Sono de ondas lentas.
<b>TBS-T</b>	Tampão salino de TRIS com Tween 10%.
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano.
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>Vps15</b>	<i>Vacuolar protein sorting 15.</i>
<b>Vps34</b>	<i>Vacuolar proteín sorting 34.</i>
<b>Vel.</b>	Velocidade.
<b><math>\Delta</math></b>	Variação.
<b><math>\omega</math></b>	Poder observado.

## RESUMO

**Objetivo:** Analisar os efeitos da suplementação de leucina nas vias tróficas e atroficas da musculatura esquelética de ratos submetidos à privação de sono paradoxal por 96 horas. **Métodos:** foram utilizados 46 ratos machos Wistar<sup>EPM-1</sup> distribuídos em 4 grupos: controle (CTL); suplementado com leucina (LEU); privado de sono paradoxal por 96h (PS); e suplementado com leucina e privado de sono paradoxal por 96h (LEU+PS). A suplementação de leucina foi feita por GAVAGE (1,35g/kg), iniciando-se 3 dias antes do período de privação de sono e mantida até o fim do protocolo. Ao final do protocolo o sangue e músculo *gastrocnemius* foram coletados para análises de corticosterona, testosterona total, insulina, creatinina e ureia; bem como as proteínas envolvidas na sinalização de síntese (Akt, mTOR, p70S6k e 4E-BP1) além do IGF-1 intramuscular e as proteínas envolvidas na degradação proteica (FoxO3a, proteínas ubiquitinadas, LC3-II, p62/SQSTM1 e a atividade enzimática inicial do proteassomo). **Resultados:** A suplementação de leucina e a privação de sono não alteraram os níveis de creatinina e ureia circulantes, porém a testosterona total sérica diminuiu em ambos os grupos submetidos à privação de sono (PS e LEU+PS), enquanto a corticosterona esteve elevada nestes mesmos dois grupos. Quanto às sinalizações intramusculares a p-Akt diminuiu em ambos os grupos privados de sono, o IGF-1 foi menor apenas no grupo PS; a p-mTOR, p-p70S6k e p4E-BP1 foram aumentadas nos grupos LEU e LEU+PS, sendo esta última também aumentada no grupo PS. A atividade do proteassomo foi maior nos grupos PS e LEU+PS, assim como a FoxO3a, proteínas ubiquitinadas, LC3-II e p62/SQSTM1 que não se alteraram nos grupos que não foram privados de sono. O *gastrocnemius* apresentou diminuição da sua massa somente no grupo PS, com diferentes respostas na área de secção transversa das fibras: 1) não houve alteração nas fibras do tipo I em nenhum dos grupos; 2) foi identificada redução nas fibras do tipo IIa nos grupos PS e LEU+PS; e 3), redução das fibras do tipo IIb somente no grupo PS. **Conclusão:** A suplementação de leucina suprimiu a redução da atrofia do *gastrocnemius* na condição de privação de sono paradoxal, com ação específica sobre as fibras do tipo IIb. Mesmo não alterando a degradação, a leucina foi capaz de aumentar as sinalizações de síntese proteica durante a privação de sono, regulando o *turnover* proteico. Estes resultados foram independentes da regulação do perfil sérico da testosterona e corticosterona, sugerindo que talvez estes não sejam os únicos sinalizadores da atrofia muscular durante a privação de sono paradoxal em ratos.

**Palavras-chave:** Leucina, privação do sono, músculo esquelético, nutrição, hormônios.

## ABSTRACT

**Objective:** Analyze the effects of leucine supplementation in trophic and atrophic pathways in skeletal muscle of rats subjected to deprivation of paradoxical sleep for 96 hours. **Methods:** 46 male rats Wistar<sub>EPM-1</sub> were divided into 4 groups: Control (CTL); supplemented with leucine (LEU); deprived of paradoxical sleep for 96 hours (PS); and supplemented with leucine and deprived of paradoxical sleep for 96 hours (LEU+PS). The leucine supplementation was done by GAVAGE (1.35g/kg), starting 3 days before of sleep deprivation period and maintained until the end of the protocol. At the end of the protocol the blood and *gastrocnemius* muscle were collected for analysis of corticosterone, total testosterone, insulin, creatinine and urea; as well as proteins involved in signaling synthesis (Akt, mTOR, p70S6K and 4E-BP1) plus IGF-1 and intramuscular proteins involved in protein degradation (FOXO3a, ubiquitinated proteins, LC3-II enzyme activity and p62/SQSTM1 Home proteasome). **Results:** The leucine supplementation and sleep deprivation did not alter the levels of creatinine and urea circulating, but serum total testosterone decreased in both groups subjected to sleep deprivation (LEU+PS and PS), while corticosterone was elevated in these two groups. As intramuscular p-Akt signaling decreased in both groups deprived of sleep, IGF-1 was lower only in the PS group; p-mTOR, p-p70S6K and P4E-BP1 were increased in groups LEU and LEU+PS, with the latter also increased in the PS group. The proteasome activity was greater in PS and LEU+PS groups, as well as FOXO3a, ubiquitinated proteins and LC3-II p62/SQSTM1 that have not changed in the groups that were not sleep deprived. The *gastrocnemius* exhibited reduced its mass only in the PS group, with different responses in cross-sectional area of fibers: 1) no change in type I fibers in both groups; 2) was identified reduction in type IIa fibers in LEU+PS and PS groups; and 3) reduction in type IIb fibers only in the PS group. **Conclusion:** The leucine supplementation suppressed the reduction in atrophy of *gastrocnemius* on condition of paradoxical sleep deprivation, acting specifically on the type IIb fibers. Not interfering degradation, leucine was able to increase the signals of protein synthesis during sleep deprivation by regulating protein turnover. These results were independent of the regulation of profile of testosterone and corticosterone, suggesting that probably these are not the only markers of muscle atrophy during paradoxical sleep deprivation in rats.

**Keywords:** Leucine, sleep deprivation, skeletal muscle, nutrition, hormones.

# 1. INTRODUÇÃO

O sono é apontado como um comportamento essencial para a manutenção da vida na maioria dos seres vivos. Embora suas funções não sejam totalmente elucidadas, é possível afirmar que a sua ausência é capaz de promover inúmeros malefícios a saúde, causando, como exemplo, alteração do metabolismo de glicose, imunossupressão, estresse oxidativo e modificação comportamento alimentar.

Atualmente há um crescente interesse em entender os efeitos da supressão do sono sobre a musculatura esquelética, uma vez que este tecido é tão essencial quanto o sono. Tal interesse se baseia na importância do músculo que, além de ser um dos maiores tecidos existentes nos seres vertebrados, possui papel fundamental na locomoção, sustentação de órgãos e no metabolismo.

Assim, considerando que a população mundial dorme cada vez menos, buscar um melhor entendimento sobre os mecanismos que geram efeitos deletérios da privação de sono aos músculos esqueléticos torna-se necessário, bem como buscar estratégias que possam minimizar tais efeitos.

O binômio músculo-sono apresentam alguns pontos em comum, como o perfil de secreção de alguns hormônios, fatores de crescimento e de metabólitos. É bem consolidado pela literatura que a privação de sono é capaz de aumentar as concentrações séricas de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em animais), além de promover um decréscimo dos níveis de insulina, do hormônio do crescimento (GH), da testosterona e do IGF-1, que são primordiais para a manutenção da integridade deste tecido. Estas alterações desfavorecem a manutenção da massa muscular por proporcionar a perpetuação de um ambiente catabólico.

Em roedores, este ambiente catabólico é tão marcante que nosso grupo demonstrou previamente que a privação de sono paradoxal foi capaz de promover a redução na massa de diversos tecidos como no tecido adiposo, no fígado, no baço e na própria musculatura esquelética, culminando na redução da massa corporal total. Esses resultados abrem a possibilidade de uma ampla discussão sobre a importância em promover melhoras do padrão, da qualidade e do tempo total de sono da sociedade moderna, uma vez que o débito de sono pode contribuir para que a redução da massa muscular, inerente ao processo de envelhecimento, ocorra de

forma mais abrupta, ou ainda buscar estratégias que possam minimizar a perda muscular provocada pelo estilo de vida sedentário da sociedade atual.

Essas estratégias só são possíveis de serem pensadas e utilizadas na medida em que houver avanços nos conhecimentos sobre as sinalizações intracelulares que ocorrem durante condições de débito de sono. Neste sentido, alguns resultados vêm demonstrando que a privação de sono paradoxal em ratos estimula o aumento da degradação proteica por uma maior atividade do sistema ubiquitina-proteassomo e autofagia-lisossomal. Por outro lado esta condição também se mostra capaz de diminuir a atividade da principal via de sinalização de síntese proteica, a via PI3K/Akt/mTOR.

Sendo assim e considerando as sinalizações biomoleculares que ocorrem no interior da célula muscular esquelética desencadeada pela privação de sono, buscar estratégias que possam diminuir a atividade dos sistemas de degradação citadas anteriormente ou que estimulem a síntese de proteínas musculares parece ser um objetivo a ser alcançado. Neste sentido a suplementação de leucina se mostra como uma possível estratégia eficaz no combate à atrofia muscular gerada por esta condição, uma vez que este aminoácido vem sendo descrito pela literatura como um potente modulador da via PI3K/Akt/mTOR, estimulando a síntese de proteínas musculares. Além disso, alguns indícios apontam que sua utilização é capaz de inibir a expressão de marcadores que modulam tanto a atividade da autofagia quanto do sistema ubiquitina-proteassomo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O sono e suas funções

Desde o início da década de 50, com a descoberta de que os padrões eletroencefalográficos se modificam durante uma noite de sono <sup>(1, 2)</sup>, diversos autores buscam um melhor entendimento sobre as funções do sono <sup>(3-7)</sup>. Mesmo não havendo um consenso sobre o que de fato é o sono e quais as suas reais funções podemos considerar que se trata de um comportamento altamente complexo, ativo e dinâmico que modula diversos sistemas fisiológicos como, por exemplo, o sistema endócrino, neuromuscular e cardiovascular <sup>(8)</sup>.

As flutuações das ondas eletroencefálicas durante o sono permitem estabelecer as fases do sono, as quais podem ser divididas em duas; o sono REM (dessincronizado) e o sono não-REM (sincronizado) (a sigla REM é derivado do termo inglês "*rapid eyes movements*"). No sono REM as principais características são a movimentação rápida dos olhos, a atonia muscular e a maior percepção dos sonhos vívidos. Já no sono não-REM é observado atenuação dos movimentos oculares e uma lentificação progressiva da atividade cortical. O sono não-REM ainda recebe outras três subdivisões: estágio 1 do sono não-REM (N1) caracterizado pela sonolência inicial e por um padrão elétrico cortical que varia entre 4 e 7Hz; estágio 2 do sono não-REM (N2), estágio esse em que passamos a maior parte do tempo total de sono e que possui o fuso do sono e o complexo K como grafo elementos característicos; e estágio 3 do sono não-REM (N3) que também é conhecido como sono de ondas lentas (SOL) por apresentar ondas com frequências abaixo de 3,5Hz por mais de 20% de uma época de 30 segundos. Durante o tempo total de sono, normalmente ocorrem entre 4 a 6 ciclos de sono (todas as fases do sono não-REM e o sono REM) <sup>(9)</sup>.

Em ratos, a base estrutural do sono é muito similar à dos seres humanos, ou seja, quase todas as fases são observadas <sup>(10)</sup>. Assim, as atividades corticais de ratos também apresentam padrões dessincronizados (sono REM), que em roedores é mais comumente chamada de sono paradoxal. O termo sono paradoxal é utilizado devido à grande semelhança da atividade cortical desta fase do sono com as atividades observadas no estado de vigília. Durante o sono paradoxal manifestam-se

a maioria das alterações tônicas (dessincronização cortical, atonia muscular e ritmo  $\theta$  hipocampal) e fásicas (oscilações cardiorrespiratórias, abalos musculares, movimentação de vibrissas e movimentos oculares). Além disso, esses mesmos roedores apresentam padrões sincronizados no eletroencefalograma (EEG) durante o sono, que são chamados de Sono de Ondas Lentas ao invés de sono não-REM como em humanos. O SOL em ratos também apresentam três diferentes fases; a fase 1 conhecida como período de início do sono, seguido pela fase 2 que também possui o fuso do sono e é um sono mais profundo que o anterior e ainda há a fase 3 conhecida como sono mais profundo <sup>(10, 11)</sup>.

Diferentemente do que observamos em humanos, ratos apresentam a característica de sono polifásico, ou seja, dormem de forma intermitente ao invés de dormirem em um único período do dia de forma contínua. Além disso, ratos são classicamente conhecidos por sua característica de hábitos noturnos, dormindo a maior parte do tempo no período diurno. Apesar dessas diferenças, as similaridades na arquitetura do sono e no tempo total de sono representam ótimas justificativas para o uso de animais de experimentação na busca da compreensão das possíveis funções do sono <sup>(10)</sup>.

Mesmo com os inúmeros avanços relacionados à medicina e à biologia do sono, as reais funções do sono ainda não estão totalmente elucidadas, sendo o foco de investigação de diversos grupos de pesquisa. Recentemente Porkka-Heiskanen e colaboradores <sup>(12)</sup>, em sua revisão apontam as principais teorias relacionadas às funções do sono. Estas teorias são divididas em 3 categorias; a primeira está relacionada ao metabolismo energético indicando o papel do sono na restauração energética, outra categoria aponta que o sono está estritamente relacionado a modulação do sistema imunológico e processos inflamatórios e por fim, que o sono apresenta papel ímpar em processos que envolvem plasticidade neuronal incluindo memória e aprendizagem.

## 2.2 Privação de sono

Mesmo não havendo uma definição consensual sobre as funções do sono, sabe-se que as consequências de sua ausência podem ser inúmeras, incluindo reduções na eficiência do processamento cognitivo, aumento do tempo de reação e da responsividade atencional, além de prejuízo na memória, aumento da irritabilidade, alterações metabólicas, endócrinas, imunológicas, quadros hipertensivos, cansaço, náuseas, cefaleia, ardência nos olhos, turbidez da visão, dores articulares e até diminuição da libido <sup>(13-17)</sup>. Além disso, o débito de sono vem sendo associado mais recentemente a alterações no comportamento alimentar <sup>(18)</sup>, resistência à insulina <sup>(19)</sup>, diabetes *mellitus* tipo II <sup>(20)</sup> e desregulação de eixos hormonais, como eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) <sup>(21-24)</sup> e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) <sup>(21, 25)</sup>.

Ao longo dos anos, diversos autores vêm demonstrando que a privação de sono está diretamente envolvida com a hiperatividade do eixo HPA, desencadeando aumentos abruptos na secreção de glicocorticoides e causando diversas alterações metabólicas <sup>(26, 27)</sup>. Em roedores, logo nas primeiras 24h de privação de sono já é possível encontrar aumentos de aproximadamente 3 vezes na secreção de corticosterona e que se mantêm elevadas por até 96h <sup>(21, 28)</sup>. Este aumento por sua vez está relacionado a inúmeras repercussões, como alteração do comportamento alimentar, decréscimo na memória, aumento do estresse e catabolismo de diversos tecidos como o tecido adiposo e muscular <sup>(24, 28-30)</sup>. O perfil alterado dos níveis de glicocorticoides observados durante a privação aguda de sono parece ser mantido, também em condições crônicas, caracterizado por um quadro de restrição de sono <sup>(29)</sup>.

Todas essas alterações decorrentes da privação de sono são acompanhadas de uma marcante redução da massa corporal em ratos, podendo chegar à aproximadamente 37% <sup>(28)</sup> e uma redução próxima a 60% do volume do tecido adiposo <sup>(22)</sup>. Recentemente nosso grupo observou que além das reduções no tecido adiposo, há também reduções no percentual dos conteúdos proteicos corporais (de Melo, dados não publicados).

Além das alterações no eixo HPA, é bem descrito pela literatura que a privação de sono é capaz de alterar os padrões circulantes de hormônios anabólicos

(21, 25). Experimentos em animais realizados por nosso grupo demonstram que a privação de sono paradoxal em ratos por apenas 24h também foi capaz de promover reduções nas concentrações de testosterona total, se acentuando ainda mais quando o período de privação foi estendido para 96h (21, 28). Neste mesmo sentido, alguns autores demonstraram uma série de prejuízos em indivíduos com alterações no padrão de sono, nos quais os níveis de hormônios anabólicos, como o GH e testosterona, estão marcadamente reduzidos (31, 32). Além disso, as concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, que é produzido e secretado por tecidos como fígado e músculos esqueléticos em resposta à sinalização do hormônio do crescimento (GH), é subitamente reduzido em condições de privação de sono (25).

A relação desbalanceada entre a atividade dos eixos HPA e HPG, em conjunto com as alterações na secreção do GH e do IGF-1 podem explicar, em parte, os impactos da privação de sono sobre a homeostase do sistema imunológico e da integridade de tecidos específicos como o tecido adiposo e os músculos esqueléticos (22, 28, 33-35), demonstrando a instalação de um ambiente com características catabólicas nestas condições.

### **2.3 Músculo esquelético**

Os músculos esqueléticos constituem aproximadamente 40% de toda massa corporal e são compostos por, pelo menos, quatro diferentes tipos de fibras musculares: fibras do tipo I, fibras do tipo IIa, IIx e IIb (36). Essas fibras musculares se diferem essencialmente pela composição de suas respectivas cadeias pesadas de miosina. Porém, desde a primeira metade do século XIX diversos autores também distinguem as fibras musculares de acordo com sua coloração (vermelha ou branca), ou de acordo com sua propriedade contrátil (rápida ou lenta) ou ainda, de acordo com sua predominância metabólica (oxidativa ou glicolítica) (37).

Considerando tais diferenças, é possível classificar as fibras musculares da seguinte forma: fibras de contração lenta-oxidativa, fibras vermelhas ou fibras do tipo I, que são ricas em mioglobina e enzimas oxidativas, são especializadas em atividades contínuas e prolongadas; e fibras de contração rápida, fibras brancas ou fibras do tipo II. Essas últimas ainda podem ser subdivididas de três maneiras: a)

fibras tipo IIb, de contração rápida-glicolítica possuindo maior quantidade de enzimas responsáveis pelo metabolismo glicolítico e que conseqüentemente são mais responsivas a atividades fásicas; b) fibras tipo IIx, de contração rápida glicolítica-oxidativa, com velocidade de contração intermediária e uma distribuição mais uniforme com relação ao metabolismo glicolítico e oxidativo e c) – fibras tipo IIa que apresentam o metabolismo mais oxidativo, assim como uma menor velocidade de contração entre as fibras do tipo II <sup>(38-42)</sup>. A classificação dos tipos de fibras musculares estão expostas no quadro 1.

**Quadro 1 – Classificação dos diferentes tipos de fibras musculares**

<b>Características</b>	<b>Fibras Tipo I</b>	<b>Fibras Tipo IIa</b>	<b>Fibras Tipo IIx</b>	<b>Fibras Tipo IIb</b>
<b>Isoforma MyHC</b>	MyHC-I	MyHC-IIa	MyHC-IIx	MyHC-IIb
<b>Coloração</b>	Vermelha	Branca	Branca	Branca
<b>Vel. Contração</b>	Lenta	Baixa	Intermediária	Rápida
<b>Metabolismo</b>	Oxidativo	Oxidativo	Oxi./Glicolítico	Glicolítico
<b>Ativ. da ATPase</b>	Muito Baixa	Baixa	Intermediária	Alta

Adaptado de Wang e Passin <sup>(43)</sup>. Legenda: **MyHC** = cadeia pesada de miosina. **Vel.** = velocidade. **Ativ.** = atividade. **Oxi.** = oxidativo.

Uma das formas de identificar os diferentes tipos de fibras musculares é realizando ensaios histoquímicos para coloração da ATPase, uma vez que esta enzima se encontra na cadeia pesada de miosina. Para este tipo de ensaio histoquímico, o ATP é o substrato e a fonte de energia da reação; o fósforo inorgânico (Pi) é o produto da reação. Tendo em vista que o Pi é histoquimicamente invisível, o ensaio requer que o Pi reaja quimicamente com o cálcio (Ca) a fim de formar um precipitado de cálcio-fosfato (CaPO<sub>4</sub>). Posteriormente, o CaPO<sub>4</sub> é convertido em sulfeto de cobalto (COS<sub>2</sub>), que é castanho escuro, mais facilmente visível e menos solúvel. Assim, o Pi é liberado para o consumo de ATP pelas moléculas de miosina e um produto castanho escuro é depositado na secção do tecido muscular. Como as fibras musculares de contração rápida hidrolisam o ATP mais rapidamente do que as fibras de contração lenta, elas se mostram mais escuras histoquimicamente e as fibras de contração lenta permitem uma maior passagem de luz, tornando-as mais claras, sendo então possível a avaliação de diferentes tipos de fibras musculares <sup>(44)</sup>.

Independentemente de suas diferenças, as fibras musculares são de extrema importância à vida, uma vez que o músculo esquelético é um dos principais efetores da locomoção, manutenção postural e da atividade respiratória. Além disso, nos últimos anos, alguns autores vêm descrevendo o músculo esquelético como órgão endócrino, tendo em vista que esse tecido é capaz de produzir, expressar e secretar citocinas e outros peptídeos (denominados miocinas) capazes de modular o metabolismo e o funcionamento de tecidos como cérebro, tecido adiposo, além de células do sistema imune <sup>(45-47)</sup>.

Diante da grande importância dos músculos esqueléticos, sua manutenção se torna essencial. Para tal manutenção é necessário o equilíbrio entre as taxas de síntese e de degradação proteica muscular (*turnover* proteico). O *turnover* proteico é regulado por diversas proteínas intracelulares, das quais duas delas merecem grande destaque: o *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) que vem se mostrando como a principal proteína reguladora do crescimento celular, uma vez que é capaz de integrar sinais de hormônios, fatores de crescimento, nutrientes e do estado energético celular para controlar a síntese proteica; e as famílias *forkhead box O* (FoxO) que é um fator de transcrição e principal responsável por controlar as sinalizações de degradação de proteínas, seja regulando a atividade do sistema de ubiquitina-proteassomo ou do sistema de autofagia-lisossomal <sup>(37, 48, 49)</sup>.

Apesar do mTOR e da FoxO serem os principais sinalizadores da síntese e degradação proteica respectivamente, a proteína quinase B (Akt/PKB) é uma das principais responsáveis por orquestrar essas sinalizações anabólicas ou catabólicas. A Akt pode ser ativada (fosforilada) por diferentes substâncias, entre elas a insulina, o IGF-1 e a testosterona, permitindo então a fosforilação do mTOR que por sua vez é responsável pela transdução dos sinais anabólicos. Esta fosforilação da Akt permite ainda que a FoxO se mantenha fosforilada, inibindo suas ações proteolíticas. Por outro lado, quando a Akt é inibida através dos glicocorticoides, por exemplo, ocorre a inativação do mTOR e a ativação da FoxO, que perde o fosfato, migra-se ao núcleo e promove suas sinalizações catabólicas <sup>(50, 51)</sup>.

Entretanto, cabe ressaltar que os diferentes tipos de fibras musculares respondem de forma distinta aos estímulos de síntese e degradação proteica. Por exemplo, a denervação do músculo diafragma de roedores promove atrofia de fibras do tipo IIx e IIb, porém não acarretam nenhuma alteração nas fibras tipo IIa e ainda apresentam uma ligeira hipertrofia de fibras tipo I <sup>(52)</sup>. Porém, ao observar um

músculo predominantemente composto por fibras do tipo I, como o *soleus*, em experimentos em que ele é denervado, é possível observar atrofia muscular <sup>(37)</sup>. Por outro lado, durante protocolos de indução atrofica por meio do uso de glicocorticoides, este mesmo músculo não se altera quando comparado a músculos com predominância metabólica glicolítica <sup>(53)</sup>. Esses resultados demonstram ainda que o metabolismo da musculatura provavelmente seja diferente de acordo com a distribuição das suas fibras.

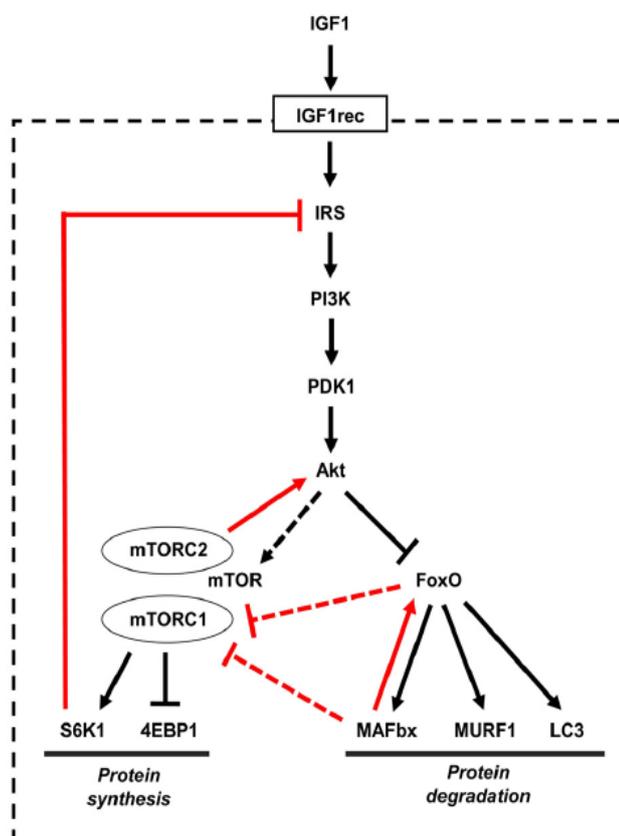
### **2.3.1 Metabolismo muscular (síntese e degradação proteica)**

O crescimento da massa muscular, assim como de qualquer outro tecido, depende de um maior acúmulo de proteínas celulares. Para que isto ocorra são necessários estímulos de sobrecarga mecânica (treinamento físico) ou estímulos anabólicos hormonais (testosterona, insulina, IGF-1) e/ou nutricionais (aminoácidos) <sup>(37)</sup>.

É muito bem estabelecido na literatura que o IGF-1 é um dos maiores estimuladores da síntese proteica, principalmente por estimular a atividade da via fosfatidilinositol 3 quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt) <sup>(50)</sup>. Ao ativar a Akt, ocorre a sinalização da síntese de proteínas, através da fosforilação do mTOR. O mTOR tem a capacidade de interagir com diversas proteínas a partir de 2 complexos: o complexo mTOR 1 (mTORC1) e o complexo mTOR 2 (mTORC2). Entretanto apenas o mTORC1 vem sendo relacionado com as sinalizações envolvidas na síntese proteica, desencadeando uma série de reações que promovem os processos de iniciação e tradução <sup>(54)</sup>.

O mTOR modula a síntese proteica através da sinalização de fatores como o *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1), que após sua fosforilação induz sua dissociação do *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E), proporcionando a montagem do complexo de pré-iniciação eIF4F. Além disso, o mTOR fosforila a proteína ribossomal S6 quinase de 70kDa (p70S6K1), que por sua vez fosforila substratos como a proteína ribossomal S6 (rpS6) e a eIF4B, que estão envolvidos com a regulação da tradução de proteínas <sup>(37, 51, 55)</sup>. Cabe ainda ressaltar que o mTOR responde a vários estímulos, além da própria Akt, incluindo também estímulos gatilhados por aminoácidos ou até mesmo mecânicos

(37). Um esquema simplificado desta via de sinalização pode ser visualizado na figura 1.



**Figura 1** – Representação da ativação da via *Fosfatilinositol 3 kinase/Proteína quinase B/ mechanistic target of rapamycin* (PI3K/Akt/mTOR) através da sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). Após a sinalização do IGF-1 ocorre uma série de sinalizações em cascata culminando no aumento da síntese proteica. Ao aumentar a atividade da Akt, é possível também que ocorra uma diminuição da degradação proteica, inibindo as sinalizações mediada pela *Forhead box O* (FoxO). **IGF-1rec** – receptor de IGF-1. **PDK1** – piruvato desidrogenase quinase 1. **mTORC1** – complexo mechanistic target of rapamycin 1. **mTORC2** – complexo mechanistic target of rapamycin 2. **4E-BP1** – 4E-binding proteína. **MAFbx** – *muscle atrophy F-box*. **MURF1** – *Muscle RING finder protein*. **LC3** – Proteína de cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos 1. Figura de Schiaffino e Mammucari p.2<sup>(50)</sup>.

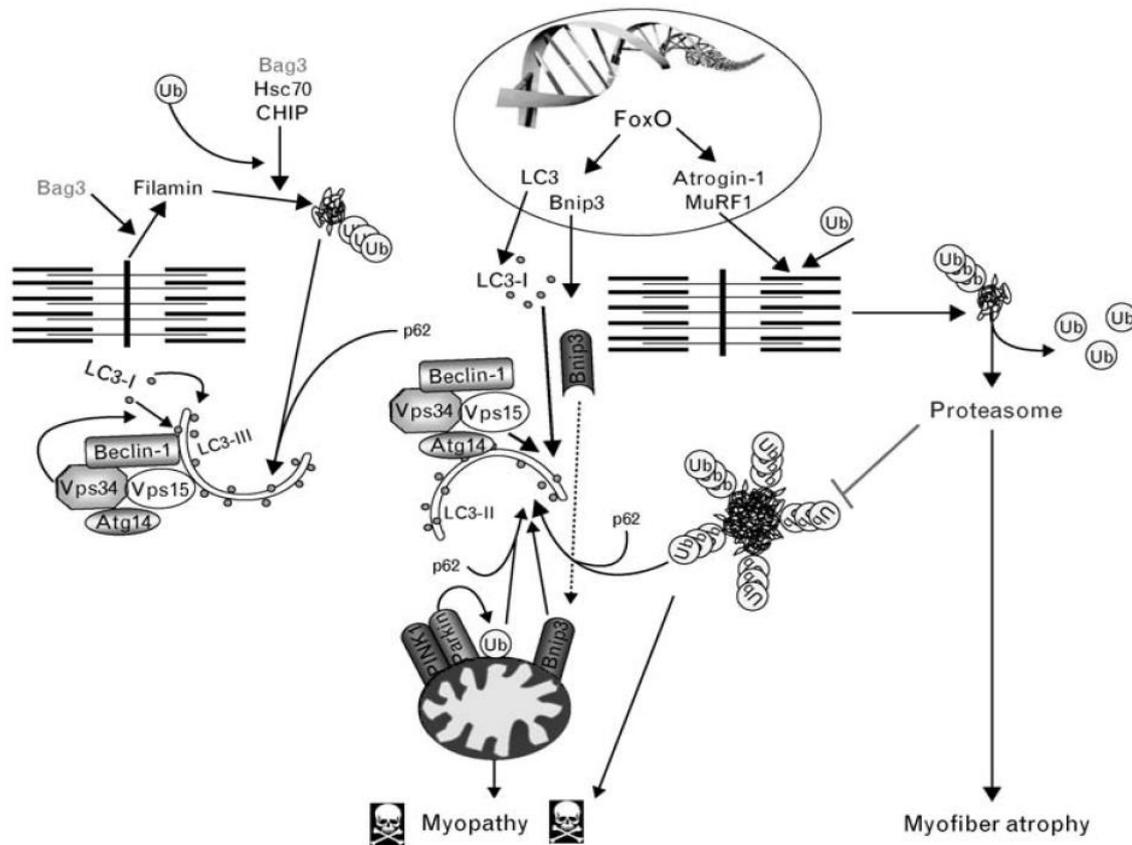
O processo de degradação muscular envolve a redução no volume das fibras musculares devido à perda de conteúdo proteico, organelas existentes no sarcoplasma. Para que isto ocorra, é necessário que haja ativação de sistemas proteolíticos, dos quais se destacam o sistema ubiquitina-proteassomo e o sistema de autofagia-lisossomal<sup>(37)</sup>. Esses sistemas são essencialmente modulados pela FoxO3a (representado na figura 2), que desempenha papel fundamental no processo de transcrição de enzimas (*Muscle atrophy F-box/ atrogina1* (MAFbx/atrogina-1) e *Muscle RING finger protein* (MURF-1)) envolvidas tanto na atividade do sistema ubiquitina-proteassomo quanto na via de autofagia-lisossomal

(49). A MAFbx catalisa o fator de transcrição miogênico MyoD, a miogenina, o fator de iniciação da tradução eucariótica eIF3F, bem como algumas proteínas sarcoplasmáticas (desmina e vimentina). Por outro lado, a MURF-1 parece estar envolvida na degradação de proteínas miofibrilares como a cadeia pesada de miosina, *myosinbinding* proteína C, e a cadeia leve de miosina 1 e 2 (56, 57).

No músculo esquelético, o sistema ubiquitina-proteassomo é ativado para remover proteínas sarcoméricas em resposta a alterações na atividade muscular. A marcação da proteína alvo é o primeiro passo para que o sistema ubiquitina-proteassomo esteja ativo. Assim, o processo de marcação é feito por peptídeos de aproximadamente 8kDa chamado de ubiquitinas (Ub) e para que esse processo ocorra são necessárias 3 etapas. A primeira etapa se dá pelo processo de ativação das Ub por meio das enzimas denominadas E1 processo este que utiliza a energia liberada por meio do ATP. Posteriormente, ocorrem as conjunções das moléculas de Ub, moduladas pelas enzimas E2 e por último, as enzimas E3 ligases MAFbx e MURF-1, responsabilizam-se em ligar a Ub ou o conjugado de ubiquitinas à proteína alvo e encaminhá-las ao proteassomo. Após este processo de ubiquitinação, as proteínas são reconhecidas e degradadas pelo proteassomo (58-60).

Além do sistema ubiquitina-proteassomo, a FoxO3a é capaz de modular o sistema de autofagia-lisossomal, que constitui um mecanismo fundamental para a manutenção das células através da degradação de organelas citoplasmáticas, proteínas solúveis e macromoléculas, além da reciclagem dos produtos de decomposição (61-63). A primeira etapa do processo de degradação proteica pelo lisossomo é o sequestro de substratos em um sistema vacuolar (autofagossomo), seguido de degradação por hidrolases lisossomais. A autofagia requer o ATG (gene relacionado autofagia), proteínas envolvidas na formação de autofagossomos e dois sistemas de conjugação de *ubiquitina-like*. O primeiro é o complexo Atg12/Atg5/Atg16, que é essencial para a formação da membrana do autofagossomo. A segunda envolve o gene Atg8, também conhecido como proteína de cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos 1 (LC3) em mamíferos. A Pro-LC3 é clivada pela Atg4 à sua forma madura, LC3-I. Esta proteína é então lapidada por Atg7 e Atg3 para formar a LC3-II, contribuindo para a fusão da membrana do autofagossomo e para a seleção de substrato. Outras proteínas também são importantes para o início do processo de autofagia, como a proteína p62/SQSTM1, que possui a função de encaminhar as proteínas ubiquitinadas ao

autofagossomo; e o complexo de ordenação *Beclin1/Vps34/Vps15* que regula a biogênese do autofagossomo e o tráfego do endossomo <sup>(61)</sup>.



**Figura 2** – Controle da autofagia e do sistema ubiquitina-proteassomo pela FoxO. Após a translocação da FoxO para o núcleo celular, uma proteína passa pelo processo de ubiquitinação, que posteriormente pode ser encaminhada para 2 sistemas de degradação, a autofagia-lisossomal ou ubiquitina-proteassomo. **MAFbx** – *muscle atrophy F-box*. **MURF1** – *Muscle RING finder protein*. **LC3** – Proteína de cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos 1. **Ub** – ubiquitinas. **Vps** – *Vacuolar protein sorting*. **Atg** – *Autophagy related gene*. **p62** – Proteína sequestradora como 1 de 62kDa. Figura de Sandri p. 227 <sup>(48)</sup>.

### 2.3.2 Metabolismo muscular e a privação de sono

Considerando que a privação de sono é capaz de reduzir a secreção de testosterona, GH e IGF-1 e de aumentar as concentrações da corticosterona, não é difícil pensar que esta condição impacte negativamente sobre o metabolismo da musculatura esquelética. Neste sentido, Dáttilo e colaboradores propuseram a hipótese de que todas as alterações no perfil endócrino e das substâncias responsáveis pela manutenção do tecido muscular acarretariam em um quadro de atrofia muscular <sup>(34)</sup>.

Pouco tempo depois esse mesmo grupo comprovou parcialmente sua hipótese ao demonstrarem que, de fato, a privação de sono paradoxal por 96h gerou atrofia muscular do *tibialis* anterior e tal atrofia foi acompanhada pela redução de testosterona e aumento dos níveis de corticosterona <sup>(28)</sup>.

Os mecanismos pelos quais a atrofia muscular é gerada pela privação de sono foram propostos por Mônico-Neto e colaboradores <sup>(33)</sup>. Neste contexto, a privação de sono ao diminuir a secreção de testosterona, IGF-1 e GH diminuiria também a atividade da via PI3K/Akt/mTOR que por sua vez diminuiria as taxas de síntese proteica muscular. Por outro lado, os aumentos nos níveis de corticosterona poderiam favorecer a degradação de proteínas musculares, na medida em que os glicocorticoides inibiriam a atividade da Akt e aumentariam a atividade da FoxO, favorecendo o funcionamento do sistema ubiquitina-proteassomo <sup>(33)</sup>. Apesar desses autores não descreverem um possível envolvimento do sistema de autofagia-lisossomal, não é difícil pensar que este sistema também possa estar ativo durante a privação de sono paradoxal, uma vez que a FoxO também poderia favorecer a atividade deste sistema proteolítico.

Assim, considerando que a privação de sono paradoxal seria capaz de diminuir as taxas de síntese e de aumentar as sinalizações de degradação proteica, buscar estratégias que possam reverter ou minimizar tais efeitos se tornam pertinentes.

## 2.4 Leucina

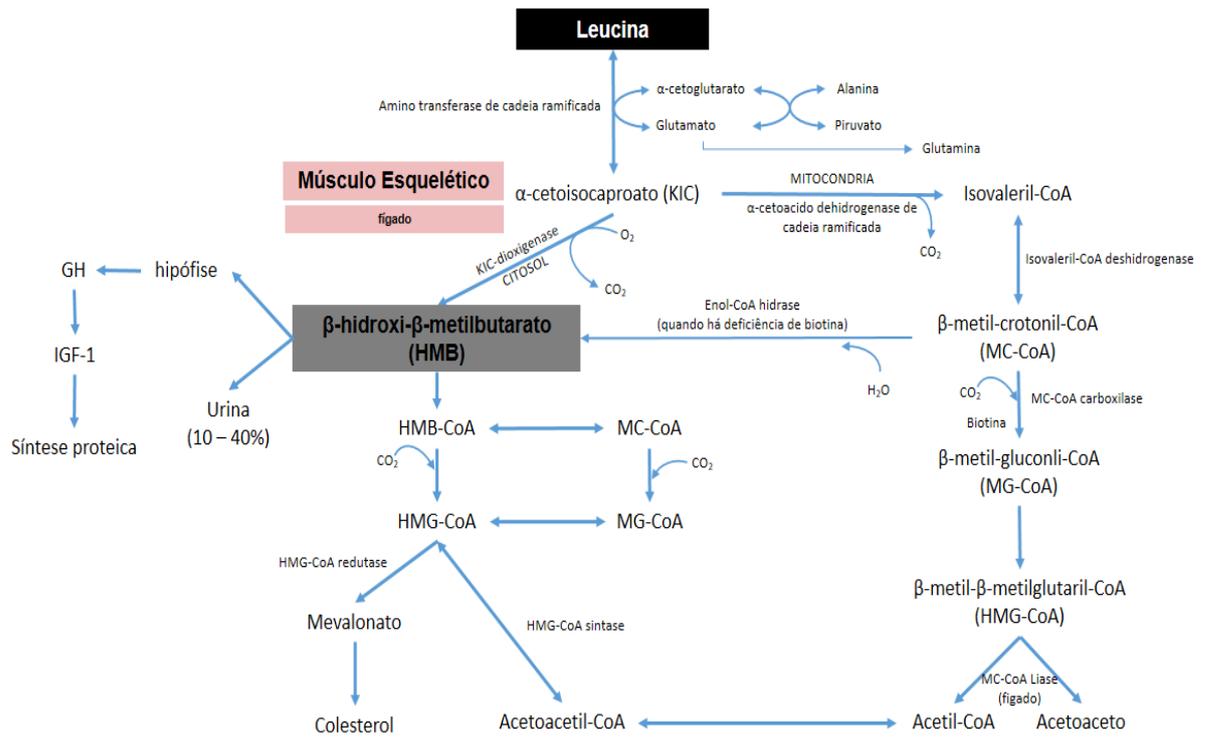
Tendo em vista o importante binômio entre músculo esquelético e sono, não nos parece difícil perceber a importância em pensar em estratégias que possam minimizar ou até mesmo reverter o quadro catabólico gerado pela privação de sono ao tecido muscular. Diante desta lacuna a utilização de aminoácidos durante a condição de privação de sono parece pertinente uma vez que alguns autores vêm demonstrando seus efeitos benéficos na tentativa de manter e/ou melhorar a saúde do tecido muscular <sup>(64, 65)</sup>.

Dentre os diferentes tipos de aminoácidos uma classe denominada aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), compostos pela valina, isoleucina e leucina que constituem aproximadamente 35% de todo conteúdo proteico muscular,

vêm sendo apontados como os principais responsáveis por modular a atividade das proteínas intracelulares responsáveis pelo metabolismo muscular <sup>(66)</sup>. Apesar dos 3 BCAAs serem apontados como reguladores do metabolismo muscular, nos últimos anos a leucina tem ganhado destaque nesta função <sup>(65, 67-69)</sup>.

### **2.4.1 Metabolismo da Leucina**

Assim como os outros BCAAs, a leucina é quase que exclusivamente catabolizada (figura 3) na musculatura esquelética (aproximadamente 82%), cujo primeiro passo é sua transaminação <sup>(70)</sup>. A transaminação da leucina é um processo reversível e ocorre a partir da ação da enzima aminotransferase de cadeia ramificada (BCAT) produzindo seu  $\alpha$ -cetoácido ( $\alpha$ -cetoisocaproato – KIC) e favorecendo a formação da glutamina. O KIC pode seguir 2 caminhos irreversíveis: 1 – sofrer um processo de descarboxilação oxidativa através da enzima  $\alpha$ -cetodesidrogenase mitocondrial de cadeia ramificada (BCKD), formando isovaleril-CoA que continuará a ser metabolizado a partir da ATP e Biotina formando o  $\beta$ -metil-CoA-crotonil que é um precursor do colesterol, acetil-CoA e acetoacetato; ou 2 – sofrer ação da enzima  $\alpha$ -cetoácidodioxigenase no citosol celular formando então o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbultarato (HMB) que pode ser excretado pela urina, favorecer a biossíntese do colesterol ou ainda exercer suas funções metabólicas <sup>(70, 71)</sup>.



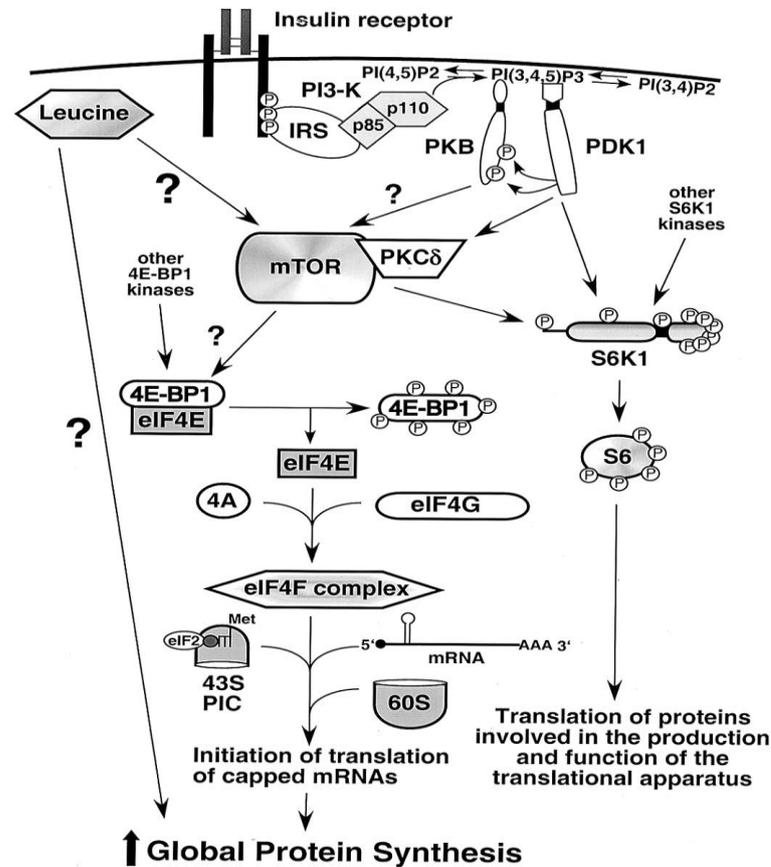
**Figura 3** – Metabolismo da Leucina – adaptado de Zanchi e colaboradores p. 1017 (71).

O HMB vem sendo descrito como um importante inibidor da atividade do sistema ubiquitina-proteassomo, além de ser capaz de estimular a atividade da via do mTOR (71, 72). Recentemente, alguns autores vêm apontando que o HMB também é capaz de estimular a secreção do IGF-1, tanto no fígado quanto no próprio músculo esquelético promovendo então efeitos indiretos sobre a síntese proteica (73-75).

#### 2.4.2 Possíveis efeitos da suplementação de Leucina durante a privação de sono paradoxal.

Apesar de todos os efeitos benéficos do HMB sobre o metabolismo muscular, apenas 5% de toda leucina consumida é convertida neste metabólito (76). Porém, inúmeras evidências vêm demonstrando que a leucina, *per se*, é capaz de estimular a síntese proteica (65, 77-79). Os mecanismos que envolvem a sinalização da síntese proteica pela leucina apesar não serem totalmente elucidados, parecem não estar envolvidos única e exclusivamente pelo aumento da disponibilidade desse substrato (80), mas também por uma função regulatória, particularmente na iniciação e na tradução de RNAs de proteínas musculares (65, 67-69, 81, 82). De forma mais

direcionada, a leucina parece estimular, diretamente, a fosforilação do mTOR (figura 4), que, como dito anteriormente, é uma proteína chave que permite que toda a cascata de reações responsáveis pelo processo de síntese proteica aconteça (69, 83).



**Figura 4** – Mecanismo de ação da leucina estimulando a síntese proteica muscular. A leucina age diretamente sinalizando o mTOR, promovendo a fosforilação da 4E-BP1 que sinaliza a montagem do complexo eIF4F para que ocorra a iniciação da tradução e a fosforilação da p70S6k que por sua vez estimula a tradução ribossomal. Figura de Anthony e colaboradores p 858S (67).

Cabe ressaltar que os efeitos da leucina sobre a síntese proteica também podem se dar em sinergia à ação da insulina, uma vez que a leucina aminoácido é descrito como sendo o segundo maior secretagogo desse hormônio (84). Além disso, alguns indícios vêm demonstrando que a leucina também é capaz de estimular a secreção de GH e IGF-1, contribuindo ainda mais para a estimulação da síntese proteica muscular (85, 86).

Além da leucina estar diretamente associada à estimulação da síntese proteica, alguns dados sugerem que este aminoácido também atua inibindo a degradação proteica muscular (87-90). A leucina parece atuar principalmente inibindo a expressão de *MAFbx* e *MURF-1* e/ou promovendo um *dowregulation* de fatores de

transcrições que modulam essas enzimas E3 ligases, como por exemplo, do fator de transcrição da família *FoxO3a*, inibindo assim a proteólise muscular <sup>(89)</sup>.

Nos últimos anos, diversos autores vêm buscando entender o efeito da suplementação de leucina em condições atroficas, como em protocolos que utilizam a administração de glicocorticoide sintético (dexametasona) <sup>(89-94)</sup>. Como esperado, em protocolos de indução atrofica da musculatura esquelética que administraram doses extremamente elevadas de dexametasona (5mg/kg) não se observa aumento nas vias de síntese proteica mediada pela suplementação de leucina <sup>(91, 93)</sup>. Em contrapartida, outros trabalhos demonstram que a leucina é capaz de atenuar a atrofia muscular por inibição da via de degradação proteica em protocolos com dosagens similares à citada anteriormente <sup>(89, 90)</sup>. Por outro lado, quando a indução atrofica por glicocorticoides é feita sobre uma dosagem não tão elevada (100µg/100g), a leucina é capaz de estimular a síntese proteica <sup>(94)</sup>.

### **3. HIPÓTESE**

Nos últimos anos nosso grupo vem demonstrando que a saúde do tecido muscular esquelético parece ser fortemente influenciada pelo débito de sono. Os prejuízos impostos pela privação de sono à musculatura esquelética vêm sendo associados com modificações do perfil circulante de hormônios que possuem características predominantemente anabólicas ou catabólicas, como diminuição dos níveis de testosterona e IGF-1 e aumento de corticosterona.

Considerando que existem diversos indícios de que a suplementação de leucina vem apresentando efeitos benéficos sobre a manutenção da integridade muscular em protocolos de indução atrofica por glicocorticoides sintéticos, nossa hipótese é que a suplementação de leucina iniciada previamente ao período de privação de sono paradoxal e mantida até o fim desta condição poderia minimizar, ou até mesmo anular os efeitos deletérios causados sobre o músculo esquelético de ratos.

## 4. JUSTIFICATIVA

As descobertas de que a privação de sono gera atrofia muscular promove a abertura de um grande leque para futuras pesquisas, não só para o entendimento dos mecanismos envolvidos, mas também para o desenvolvimento de estratégias que possam minimizar os efeitos deletérios da privação de sono no tecido músculo esquelético.

Entre as diversas possibilidades, a intervenção sobre o estado nutricional parece se tornar pertinente, uma vez que a manutenção da massa muscular está diretamente relacionada com a disponibilidade de substratos para que ocorra a síntese proteica e também com o funcionamento adequado dos sistemas proteolíticos. Assim, alguns macronutrientes, como proteínas e aminoácidos, vêm se mostrando capazes de modular diretamente tanto a atividade das vias envolvidas na síntese quanto nas vias de degradação proteica, podendo, então, apresentar efeitos benéficos à musculatura esquelética durante a privação de sono paradoxal.

Neste sentido, a suplementação de leucina vem sendo frequentemente utilizada em situações em que há perda de conteúdo proteico muscular com o intuito de promover uma redução da proteólise muscular bem com aumentar a síntese proteica. Isto é possível uma vez que este aminoácido possui a propriedade em estimular diretamente a proteína chave na via de síntese proteica (mTOR), além de inibir a atividade de duas das principais via de degradação proteica (sistema ubiquitina-proteassomo e autofagia-lisossomal).

Assim, a construção do conhecimento a respeito deste parâmetro se torna importante haja vista que o tecido muscular desempenha importantes funções para a manutenção da vida, entre elas a sustentação do esqueleto, geração de movimento, proteção de algumas vísceras e também é um importante fornecedor de substrato energético. Portanto, a manutenção da saúde desse tecido é extremamente importante para garantir uma boa qualidade de vida.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1.1 Geral

Avaliar os efeitos da suplementação de leucina nas vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética de ratos submetidos à privação de sono paradoxal.

### 5.1.2 Específicos

1- Avaliar respostas hormonais anabólicas e catabólicas (testosterona e corticosterona) e do fator de crescimento semelhante à insulina-1, dos animais na condição de privação de sono paradoxal por 96h, com e sem a suplementação de leucina;

2- Avaliar a resposta do controle glicêmico (insulina e glicose) dos animais na condição de privação de sono paradoxal por 96h, com e sem a suplementação de leucina;

3- Avaliar a expressão das proteínas Akt, p-Akt (Ser473), p70S6k, p-p70S6K (Thr389), mTOR, p-mTOR (Ser2448), 4E-BP1, p-4E-BP1 (Thr70),  $\alpha$ -ubiquitina, FoxO3a, p-FoxO3a (Ser256), LC3II e P62/SQSTM1 envolvidas na síntese e degradação proteica da musculatura esquelética na condição de privação de sono paradoxal por 96h, com e sem a suplementação de leucina;

4- Avaliar a atividade enzimática inicial do proteassomo na musculatura esquelética na condição de privação de sono paradoxal por 96h, com e sem a suplementação de leucina;

5- Avaliar a histomorfometria (área de secção transversal) da musculatura esquelética na condição de privação de sono paradoxal por 96h, com e sem a suplementação de leucina.

## 6. MATERIAL E MÉTODO

Previamente, essa pesquisa foi submetida, avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, sob o protocolo de número #0764/10 (ANEXO 1).

### 6.1 Animais experimentais e condições ambientais

Para o estudo foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar EPM-1, oriundos da colônia do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) – Escola Paulista de Medicina/UNIFESP Registro CEUA/UNIFESP nº. 01. Os animais foram distribuídos, após o período de desmame (21 dias de idade), em grupos de aproximadamente 5 animais em caixas de polipropileno com dimensões de 31x38x16,5 cm e tampas de aço inoxidável com desnível para alocação de ração e êmbolo de água. A fim de aumentar as possibilidades de higienização às caixas moradias foi utilizado sabugo de milho triturado ao fundo das caixas moradias, trocadas 4 vezes por semana no período da manhã pelos técnicos responsáveis pelo laboratório.

Um mês antes do período de experimentação os animais foram alocados no biotério do Departamento de Psicobiologia (Registro CEUA/UNIFESP nº. 19) onde foram mantidos até o final do protocolo sob ambiente e luminosidade controlados, mantendo a temperatura de  $22^{\circ}\text{C}\pm 1$  e o ciclo claro-escuro de 12/12h em que o período claro era iniciado às 7h da manhã, tendo água e ração (Nuvilab® - os dados nutricionais da ração são apresentados no quadro 2) *ad libitum*. Para a experimentação utilizamos os animais com 90 dias de idade (momento que completam a maturação sexual) cuja massa corporal variou entre 320 e 380g.

**Quadro 2 –** Dados nutricionais da ração Nuvilab® CR1 de acordo com as informações do fabricante.

<b>Nuvilab® CR1 Alimento Completo</b>			
	<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade/Kg</b>	<b>Valor Energético (Kcal)</b>
<b>Vitaminas</b>	Vitamina A	13mL	0
	Vitamina D3	2mL	0
	Vitamina E	30µL	0
	Vitamina K3	3mg	0
	Vitamina B1	5mg	0
	Vitamina B2	6mg	0
	Vitamina B6	7mg	0
	Vitamina B12	22µg	0
	Niacina (B3)	60mg	0
	Ácido Pantotênico (B5)	20mg	0
	Ácido Fólico (B9)	1mg	0
	Biotina	0,05mg	0
	Colina	1900mg	0
<b>Minerais</b>	Sódio	2700mg	0
	Ferro	50mg	0
	Manganês	60mg	0
	Zinco	60mg	0
	Cobre	10mg	0
	Iodo	2mg	0
	Selênio	0,05mg	0
	Cobalto	1,5mg	0
	Flúor	80mg	0
	Cálcio	14g	0
	Fósforo	8g	0
<b>a.a. e anti-oxidante</b>	Lisina	12g	0
	Metionina	4000mg	0
	BHT (antioxidante)	100mg	0

## 6.2 Cuidados éticos para com os procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a lei Federal em vigor – LEI AROUCA nº 11.794 <sup>(95)</sup> – além de terem sido conduzidos por pessoas devidamente treinadas conforme sugerido pelo Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (National Research Council, 2011) <sup>(96)</sup>. O procedimento de eutanásia por decapitação seguiu rigorosamente os cuidados necessários apontados nas Diretrizes para o Cuidado e Utilização de Mamíferos na Neurociência e Pesquisa Comportamental (National Research Council 2003) <sup>(97)</sup>.

## 6.3 Procedimentos experimentais

Para o cumprimento dos objetivos traçados, os animais foram distribuídos, após o pareamento pela massa corporal, em aproximadamente 11 animais para formação dos grupos experimentais, os quais foram formados da seguinte forma:

Grupo controle salina (CTL): constituído por animais mantidos em suas caixas moradias que receberam salina; grupo controle com suplementação com leucina (LEU): composto por animais que foram mantidos em suas caixas moradia e receberam a suplementação de leucina; grupo privação de sono paradoxal por 96h (PS): composto por animais submetidos à privação de sono paradoxal por 96h e que receberam a salina e grupo privação de sono paradoxal por 96h suplementado com leucina (LEU+PS) composto por animais submetidos à privação de sono paradoxal por 96h e que receberam a suplementação de leucina.

**Tabela 1** – Representação da distribuição dos grupos e seus respectivos números de animais.

<b>Grupos</b>	<b>Representação</b>	<b>n</b>
Controle – Salina	CTL	11
Controle suplementado com Leucina	LEU	11
Privado de sono paradoxal – Salina	PS	12
Privado de sono paradoxal e suplementado com leucina	LEU+PS	12

### 6.3.1 Privação de sono paradoxal

A privação de sono paradoxal foi realizada pelo método modificado das plataformas múltiplas, que consiste em alojar até 5 animais sobre 7 plataformas circulares de 6,5cm de diâmetro distanciadas uma das outras por aproximadamente 10 cm, submersa em água em um tanque de aço inoxidável (123 cm de comprimento x 44 cm de largura x 44 cm de altura) <sup>(98)</sup>. O nível da água fica a 1cm abaixo da superfície das plataformas e os animais permanecem nas superfícies secas; devido a atonia muscular oriunda do sono paradoxal, ao iniciar essa fase do sono os animais podem tocar ou até mesmo cair na água, sendo-os então acordados durante o período de 96h (figura 5A). Por todo tempo do protocolo experimental de privação de sono paradoxal por 96h os animais receberam água e comida *ad libitum* (figura 5B). Antes do procedimento de privação propriamente dito, os animais foram adaptados ao tanque de privação por 3 dias consecutivos por 1 hora, para que os animais fossem ambientados às condições experimentais e para que o estresse gerado por este protocolo fosse minimizado.

É importante mencionar que este método é eficiente em suprimir toda fase paradoxal do sono, conforme consiste sua definição, mas também é capaz de resultar em significativas reduções, em torno de -31 a -37%, da fase do SOL. Estas perdas persistem durante os 4 dias de duração do protocolo. Logo, este é um método eficiente para supressão total do sono paradoxal, mas não de maneira exclusiva <sup>(99)</sup>.

Durante o mesmo período de experimentação, os animais do grupo CTL foram mantidos em suas caixas moradias e manipulados para a limpeza da forração das mesmas. Os animais deste grupo receberam água e comida *ad libitum* e foram mantidos na mesma sala que o grupo experimental para igualar suas condições ambientais (figura 5C).

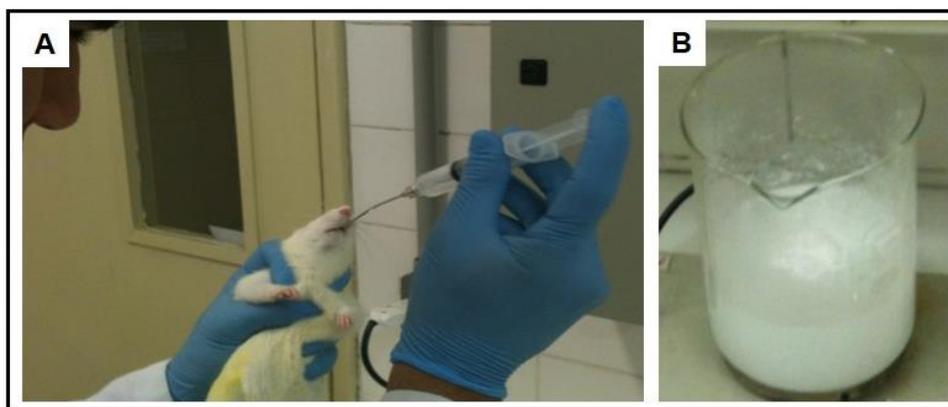


**Figura 5** – Privação de Sono Paradoxal. (A) privação de sono paradoxal pelo método das plataformas múltiplas. (B) representação de disponibilidade de água e comida *ad libitum* durante a privação de sono paradoxal. (C) representação da manutenção dos animais controles no mesmo ambiente da privação de sono paradoxal.

### 6.3.2 Suplementação de leucina

A suplementação de leucina (L-leucina Ajinomoto<sup>®</sup>, Lote n<sup>o</sup>:090047M04C) foi realizada de forma intragástrica (GAVAGE – figura 6A) como descrito por Crozier e colaboradores <sup>(78)</sup>. Neste procedimento 54g de Leucina foi adicionada em 1 litro de água MilliQ, formando uma suspensão (figura 6B). Para a suplementação de leucina cada animal recebeu a quantidade de 1,35g/kg da massa corporal da suspensão de leucina 1 vez ao dia (7h da manhã) <sup>(78)</sup>. Para tanto, a dosagem de suplementação foi recalculada diariamente durante todo o período de experimento. A suplementação de leucina iniciou ainda durante o período de adaptação dos animais à privação de sono paradoxal (3 dias consecutivos) e se manteve até o fim das 96h de privação de sono paradoxal.

A fim de evitar que a própria expansão gástrica sinalizasse algumas das proteínas que foram analisadas, uma solução salina (NaCl 0,9%) foi administrada via GAVAGE em volume equivalente à suplementação de leucina (2,5mL/100g <sub>massa corporal</sub>) nos grupos que não foram suplementados. Além disso, antes do início do protocolo todos os animais passaram por um período de adaptação à GAVAGE, o qual consistiu em introdução da sonda de alimentação intragástrica e administração de 1mL de salina por 3 dias consecutivos.



**Figura 6** – Suplementação de Leucina. **A** – representação do procedimento de GAVAGE. **B** – suspensão de leucina.

### 6.3.3 Eutanásia

Após o período de intervenção de privação de sono paradoxal por 96h e/ou suplementação de leucina os animais foram eutanasiados por decapitação (guilhotina); um procedimento de morte rápida, inconsciente e livre de dor, aceito para roedores quando o propósito é a obtenção de tecidos e sangue livres de contaminação por agentes químicos <sup>(100)</sup>. Além disso, é plausível destacar que 2h antes da realização de tal procedimento, foi vedada a oferta de ração aos animais para que as dosagens sanguíneas e as sinalizações moleculares não sofressem alterações decorrentes da alimentação regular.

### 6.3.4 Coleta de sangue e extração de tecidos

Imediatamente após a eutanásia o sangue foi coletado em tubos secos para aquisição do soro ou em tubos contendo EDTA (*Vacutaine*<sup>®</sup>) como anticoagulante para análise de hemograma e obtenção de plasma. Além disso, 25µL de sangue foi coletado em tubos capilares de vidros heparinizados que rapidamente foram diluídos em 50µL de fluoreto de sódio contidos em micro tubos (*ependorf*<sup>®</sup>) e posteriormente estocada em -20°C, para análise da glicemia. Para formação das alíquotas do soro, o sangue coletado no tubo seco permaneceu em repouso para retenção de coágulo por 2h, posteriormente foi centrifugado em temperatura ambiente (20±2°C) à 3500rpm por 10 minutos. Já para as alíquotas de plasma, o sangue coletado nos tubos com EDTA foram centrifugados à 3400rpm por 12 minutos em 4°C. Ambas as alíquotas foram estocadas em freezer -80°C para posteriores análises de testosterona, corticosterona, creatinina, ureia (realizadas no soro) e insulina (realizadas no plasma).

Além da coleta de sangue, o músculo *gastrocnemius* foi dissecado e limpo de tecidos conjuntivos, posteriormente envolto em papel filtro para retirada do excesso de líquido e sua massa foi mensurada.

Após este procedimento a porção medial foi rapidamente dissecada e cuidadosamente dividida em 2 partes, proximal e distal, em que a porção proximal foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido para análises de proteínas

envolvidas nas vias de síntese e degradação de proteínas musculares e a porção distal foi utilizada para análise histológica.

As dosagens sanguíneas realizadas foram:

- Corticosterona – As concentrações de corticosterona foram mensuradas no soro pelo método de radioimunoensaio (RIA), usando kit comercialmente disponível (MP Biomedicals, EUA), com limite de detecção mínima de aproximadamente 20ng/dL.

- Testosterona Total – A análise foi realizada no soro através do equipamento Unicell™ Dxl 800 Access® fabricado pela empresa Beckman Coulter®. O método de análise trata-se de um imunoensaio quimioluminescente, com limite de detecção mínima de aproximadamente 10ng/dL.

- Creatinina – A análise foi realizada no soro através do equipamento ADVIA 2400® fabricado pela empresa SIEMENS. O método de análise se baseia em Jaffe, picrato alcalino, cinética com correção da velocidade do branco, com limite de detecção mínima de aproximadamente 0,1mg/dL

- Ureia– A análise foi realizada no soro através do equipamento ADVIA 2400® fabricado pela empresa SIEMENS. O método baseia-se na reação enzimática Roch Ramel meio de urease e glutamato desidrogenase com limite de detecção mínima de aproximadamente 5mg/dL

- Glicose – A glicose foi analisada no sangue pelo método eletroquímico com enzima imobilizada (glicose-oxidase), utilizando o analisador YSI 2300 STAT PLUS™ (Yellow Springs, Ohio, EUA) com limite de detecção mínima de aproximadamente 500mg/dL.

- Insulina – A dosagem foi realizada no plasma pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o Kit comercial Millipore (Billerica, MA, EUA) com limite de detecção mínima de aproximadamente 2ng/dL.

### **6.3.5 Histomorfometria**

#### **a) Histologia**

A porção distal do *gastrocnemius* foi coberta com amido de milho e imbricada com uma massa composta de leite em pó e *Tissue-Tek® O.C.T. Compound*,

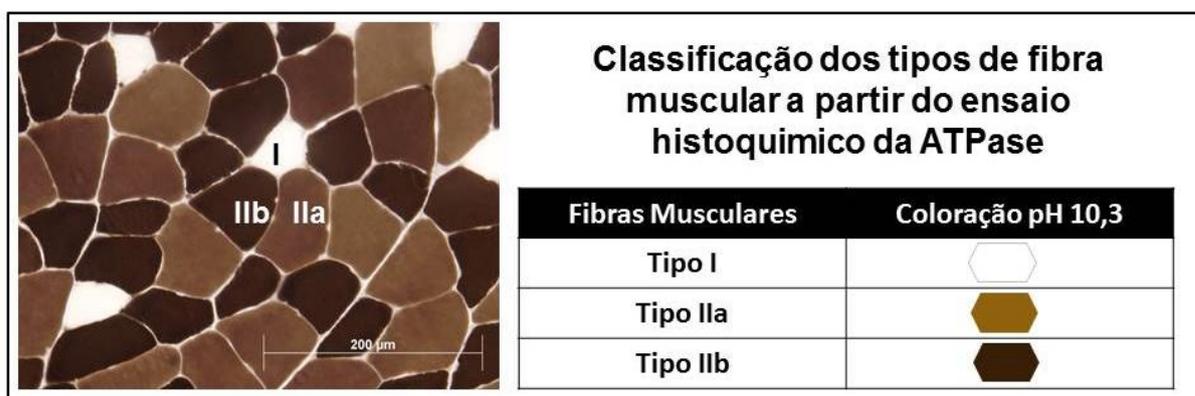
imediatamente congelado em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) para que fossem realizados cortes transversais a partir de um criostato. Após o imbricamento os tecidos foram armazenados em freezer -80°C e posteriormente cortes seriados de 10µm foram obtidos em criostato (Leica Microsystem- CM1850), à temperatura de -22°C, coletados em lâminas de vidro silanizadas.

Para análise morfológica foi utilizada a coloração da ATPase à 10,3 de pH pelo método adaptado ao descrito por Brooke e Kaiser <sup>(41)</sup>. Após a aquisição dos cortes, as lâminas foram alocadas em uma cubeta imergidas de Formol Ca<sup>++</sup> de Backer mantidas por 4 minutos a 4°C (50mL de formalina 10% e 0,5 de cloreto de cálcio). Após este procedimento as lâminas foram lavadas 3 vezes com H<sub>2</sub>O destilada e cobertas com um Tampão Glicina (SOLUÇÃO A: 751mg de glicina; 585mgNaCl, 860mg CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 100mL H<sub>2</sub>O destilada e SOLUÇÃO B: 9mL Na OH 1M, 90mL H<sub>2</sub>O destilada) por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a cubeta com as lâminas foi lavada com H<sub>2</sub>O destilada por 3 vezes; foi adicionada solução ATP-Na<sub>2</sub>, pH 9,5 (ATP-Na<sub>2</sub>-9,5 reconstituída com a SOLUÇÃO B do tampão glicina) filtrada e levada a uma estufa à 37°C por 35 minutos. Ao final desse período a cubeta foi lavada outras 3 vezes com H<sub>2</sub>O destilada e foi adicionado o Cloreto de Cobalto 2% o qual permaneceu por 5 minutos. Outra série de 3 lavagens com H<sub>2</sub>O foram realizadas para adição da solução de Sulfeto de Amônia a 0,5% (80mL de H<sub>2</sub>O, 1,9mL de sulfeto de amônia) que foi mantida por 3 minutos. Logo em seguida uma última sequência de lavagens foi realizada com H<sub>2</sub>O destilada por 3 vezes para que a lamínula fosse fixada à lâmina com gelatina glicina <sup>(41)</sup>. Após a montagem das lâminas, estas foram secas em ambiente escuro. Os cortes histológicos foram previamente avaliados por microscopia de luz (microscópio *Axioplan 2 Zeiss* – Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo) e posteriormente analisado a área de secção transversal.

#### b) Área de secção transversal

Após a coloração das lâminas, as imagens digitais de aproximadamente 4 animais por grupo foram obtidas por um microscópio *Olympus BX50 brightfield* e uma câmera DP71 (*Melville, NY*) com magnificação de 400x e objetiva de 40x do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. As análises da área de secção transversal das fibras musculares foram mensuradas de forma

cega, contando 100 fibras de cada tipo de fibra muscular (fibras tipo I, tipo IIa e IIb) por animal com auxílio do *software Axio Vision 4.6 software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH)*. Para a identificação dos subtipos de fibras, foi realizada a comparação entre as colorações obtidas nesses ensaios (figura 3) conforme descrito por Hamalainen e Pette <sup>(101)</sup> e posteriormente corrigidos pelo comprimento da tíbia de cada animal. Devido ao protocolo de coloração das lâminas se torna possível identificar apenas 3 cores diferentes, limitando-nos a identificar as fibras musculares do tipo I, IIa e IIb, em que as fibras tipo IIx podem ter sido contadas como fibras tipo IIa.



**Figura 7** – Classificação dos diferentes tipos de fibra muscular a partir da coloração da enzima ATPase em pH 10,3. Adaptado de Brooke e Kaiser <sup>(41)</sup>.

### 6.3.6 Velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo 26s

Os músculos *gastrocnemius* foram homogeneizados com tampão de lise (Manitol 210mM, Sacarose 70mM, MOPS 5mM, EDTA 1mM, pH 7.5), sem inibidores de protease e fosfatase por 10 minutos a 50Hz no homogenizador *TissueLyser LT (Qiagen, Sample & Assay Technologies)*. Após a homogeneização os tubos foram centrifugados a 7000rpm por 5 minutos para coleta do sobrenadante e a dosagem de proteínas dos sobrenadantes foi realizada utilizando *BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific Pierce Protein Biology)*.

Alíquotas de 50μg de cada amostra foram submetidas ao ensaio fluorimétrico por 40 minutos com intervalos de 50 segundos entre as leituras utilizando o substrato fluorogênico *Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7amido-4-metilcoumarin (Suc-LLVY-AMC – Enzo Life Sciences item #P802-0005)*. Para tanto, as amostras foram incubadas em 100μL de Tris 50mM, pH 7.5 contendo 25mM KCl, 10mM NaCl, 200μM Suc-LLVY-AMC, 25μM de ATP e 5mM MgCl<sub>2</sub> que atuam como cofatores da

peptidase. Após a degradação do substrato, amido-4-metilcoumarin é liberado e detectado por fluorímetro (excitação à 360nm e emissão à 460nm). A atividade da peptidase foi medida na presença ou na ausência do inibidor específico do proteassomo (epoxomicina) dos quais utilizamos os primeiros 12 minutos da leitura realizada no fluorímetro e a diferença entre os dois meios foi utilizada para análise e atribuição da velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo.

Todo o ensaio da Atividade do Proteassomo 26S foi realizado no Laboratório Carl Peter von Dietrich do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

### **6.3.7 Western Blot**

Para o ensaio do *Western Blot* outras alíquotas do músculo *gastrocnemius* foram homogeneizados com tampão de lise (tris 100mM, NaCl 150mM, EDTA 10mM, triton X-100 1%, PBS 0,1%, deoxicolato de sódio 0,5%, glicerol 10%, pH 8.0), contendo inibidores de proteases “*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*” (Roche Applied Science Inc. Penzberg - Germany) e de fosfatases “*PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets*” (Roche Applied Science Inc. Penzberg - Germany) (10% do peso do tecido / volume) por 10 minutos a 50Hz no homogenizador *TissueLyser LT* (Qiagen, Sample & Assay Technologies). Posteriormente, o tecido homogenizado passou por 4 ciclos de congelamento/descongelamento em N<sub>2</sub> líquido e centrifugados a 7.000rpm por 5 minutos para coletar o sobrenadante (SN1 – considerado como a fração citosólica do homogenato); o pellet foi novamente homogeneizado seguindo os mesmos passos descritos anteriormente, porém foi acrescido ao tampão SDS 0,1% para obter um novo sobrenadante (SN2 – considerado a fração nuclear do homogenato), que foi incubado em gelo por 10 minutos e centrifugados a 7.000rpm por 5 minutos e posteriormente estocado.

A dosagem de proteína dos sobrenadantes foi realizada utilizando *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific Pierce Protein Biology). Alíquotas de 50µg de cada amostra foram submetidas a SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF. Posteriormente, a membrana foi incubada em uma solução de bloqueio (5% de BSA em TBST- TRIS 50mM pH 7,4, NaCl 150mM e Tween-20

0,1%) por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio por 2h em temperatura ambiente e lavadas três vezes (5 minutos cada) com TBS-T.

Para detecção das bandas de interesse, foi utilizado anticorpo secundário conjugado com peroxidase e substrato (*Supersignal West Pico – Thermo Scientific Pierce Substrates*). A imagem digital da membrana foi adquirida usando fotodocumentador (*Uvitec Cambridge- Alliance mini 4m*). A intensidade das bandas foi quantificada usando software comercialmente disponível (*Uvitec Cambridge-UVIband*).

Os anticorpos aplicados foram: fosfo-Akt (Ser473) (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; Akt (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; fosfo-p70S6 Kinase (Thr389) (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; p70S6 Kinase (100) (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; fosfo-mTOR (Ser2448) (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; mTOR (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; 4E-BP1 (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; fosfo-4E-BP1 (Thr 70) (*Cell Signalling*) com diluição 1:200; LC3-II (*Cell Signalling*) diluição 1:1000 e p62/SQSTM1 (*Cell Signalling*) diluição 1:1000; fosfo-FoxO3a (Ser253) com diluição 1:200; FoxO3a (*Cell Signalling*) com diluição 1:200 e  $\alpha$ -ubiquitina (*Cell Signalling*) com diluição 1:1000. Todas as proteínas foram quantificadas e normalizadas pela quantidade da proteína GAPDH (*Cell Signalling*) com diluição 1:1000.

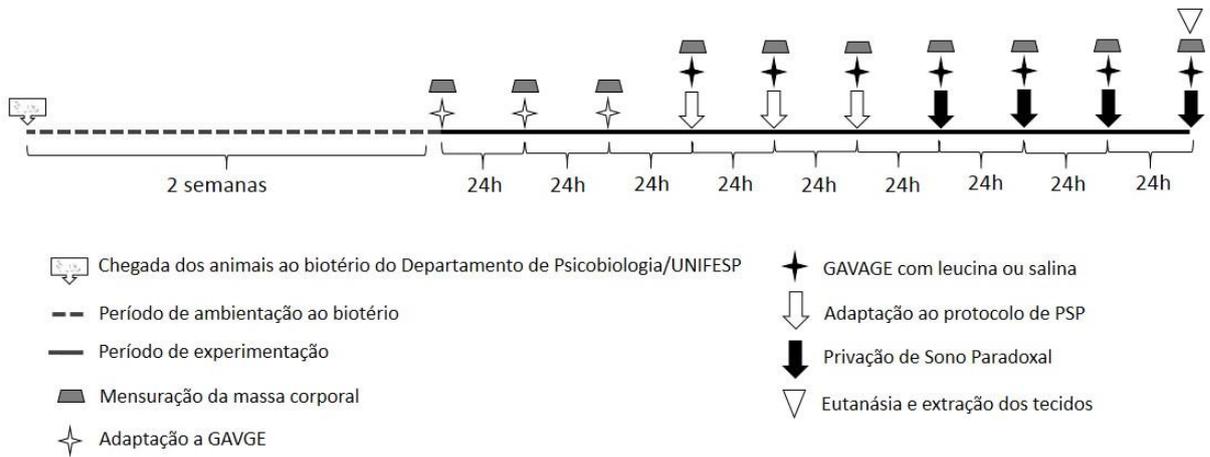
Todo o ensaio de *Western Blot* foi realizado no Laboratório Carl Peter von Dietrich do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

### **6.3.8 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1**

O IGF-1 foi analisado no próprio músculo *gastrocnemius* utilizando o mesmo homogenato (SN1) realizado para análise de *Western Blot*. Sendo assim, o IGF-1 foi analisado a partir do Ensaio Imunoenzimático (ELISA), utilizando o Kit comercial de ultra sensibilidade *USCN Life Science® Inc.* seguindo os passos descritos na bula.

Todo o ensaio de ELISA foi realizado no Laboratório Carl Peter von Dietrich do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

## 6.4 Desenho experimental



**Figura 8 – Desenho Experimental** – Em um primeiro momento, os animais foram alocados no biotério do Departamento de Psicobiologia e distribuídos nos respectivos grupos. Após 2 semanas de ambientação, os animais passaram por um período de adaptação a GAVAGE por três dias consecutivos. Em seguida, iniciou-se o período de adaptação ao método modificado das plataformas múltiplas para privação de sono paradoxal, por três dias consecutivos durante 1 hora; nestes mesmos três dias ocorreu a suplementação de leucina. Posteriormente a este período começou a privação de sono paradoxal por 96h e a cada 24 horas os animais continuaram a ser suplementados com leucina. Após o período de 96h de privação de sono paradoxal os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados. Durante todo o período de experimentação a massa corporal foi mensurada (a cada 24 horas).

## 6.5 Análise estatística

Antes das análises de comparação entre os grupos foi testada a normalidade da distribuição dos dados com o teste de Shapiro-Wilks (W). Para comparação entre os grupos dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via (F) com *post-hoc* de Duncan *test* através do modelo linear geral (GLM). As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (H) com correção de Bonferroni. Para comparação de medidas repetidas foi utilizada a análise de variância de duas vias (MANOVA) com *post-hoc* de Scheffé também pelo GLM.

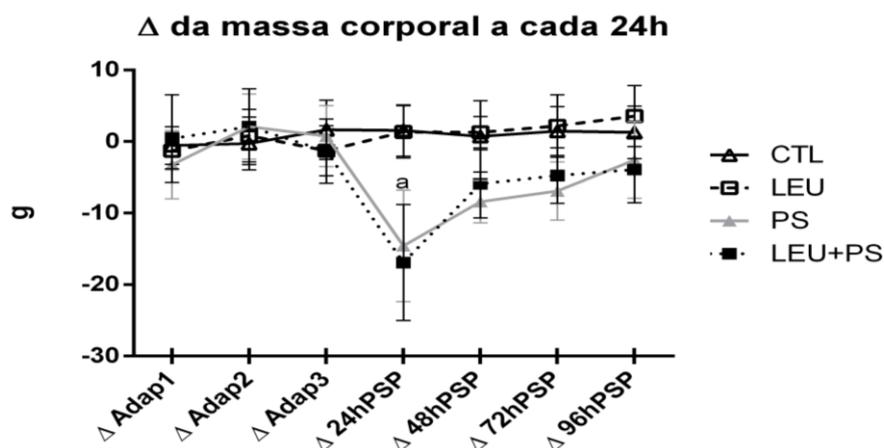
Todos os resultados são apresentados em média±desvio padrão e a significância foi adotada quando o valor de  $p \leq 0,05$  e/ou tamanho do efeito ( $\eta$ )  $\geq 0,30$  e o poder observado ( $\omega$ )  $\geq 0,80$ . Para tanto, foi utilizado o software STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Massa corporal

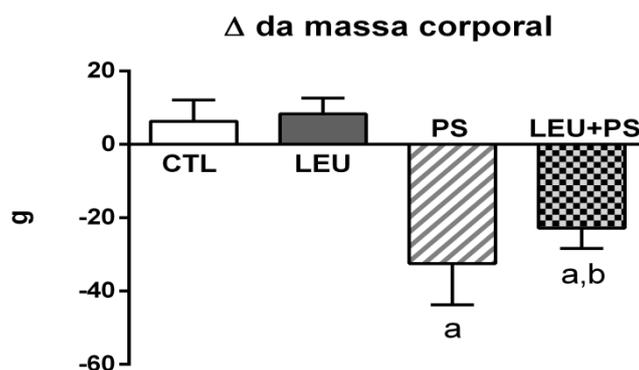
Inicialmente, realizamos o pareamento dos animais a partir da massa corporal ao completarem 90 dias de idade. Para isto a massa corporal de cada um deles, após ser mensurada passou pelo teste de normalidade ( $W=0,95$ ,  $p=0,11$ ) que demonstrou uma distribuição paramétrica. Assim, os grupos experimentais foram formados aleatoriamente seguindo a mesma distribuição realizada após o desmame dos animais. Em seguida a ANOVA ( $F_{(3, 42)}:1,67$ ;  $p=0,18$ ;  $\eta=0,10$ ;  $\omega=0,40$ ) não demonstrou diferenças na massa corporal entre os grupos formados.

Ao analisar o comportamento (variação –  $\Delta$ ) da massa corporal a cada 24h durante todo o protocolo desde o início do período de suplementação de leucina até o fim da privação de sono paradoxal ( $F_{(18, 252)}=8,1990$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,36$ ;  $\omega=1$ ) é possível observar que nos três primeiros dias não houve variações. Porém logo nas primeiras 24h de privação de sono paradoxal encontramos uma queda abrupta em ambos os grupos privados de sono em detrimento aos grupos não submetidos à privação de sono paradoxal. Também observamos uma manutenção da massa corporal nos grupos que não foram privados de sono ao longo de todo o experimento (gráfico 1).



**Gráfico 1** - Variação ( $\Delta$ ) da massa corporal total em gramas a cada 24 horas. MANOVA, com *post-hoc* de Scheffé *test*. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.  $\Delta$  Adap-1 é a variação da massa no 1º dia de suplementação e adaptação a privação de sono paradoxal.  $\Delta$  Adap-2 é a variação da massa no 2º dia de suplementação e adaptação a privação de sono paradoxal.  $\Delta$  Adap-3 é a variação da massa no 3º dia de suplementação e adaptação a privação de sono paradoxal. <sup>a</sup>grupos PS e LEU+PS diferentes dos grupos CTL e LEU no mesmo período.

Quanto à variação da massa corporal entre o primeiro e último dia de privação de sono paradoxal existe efeito do grupo ( $F_{(3, 42)}=86,483$ ;  $p<0,00$ ;  $\eta=0,86$ ;  $\omega=1$ ) em que o grupo CTL e o grupo LEU não variaram, por outro lado tanto o grupo PS quanto o grupo LEU+PS diminuíram a massa corporal ao final das 96h de privação de sono paradoxal, e o LEU+PS perdeu menos massa corporal que o grupo PS (gráfico 2).

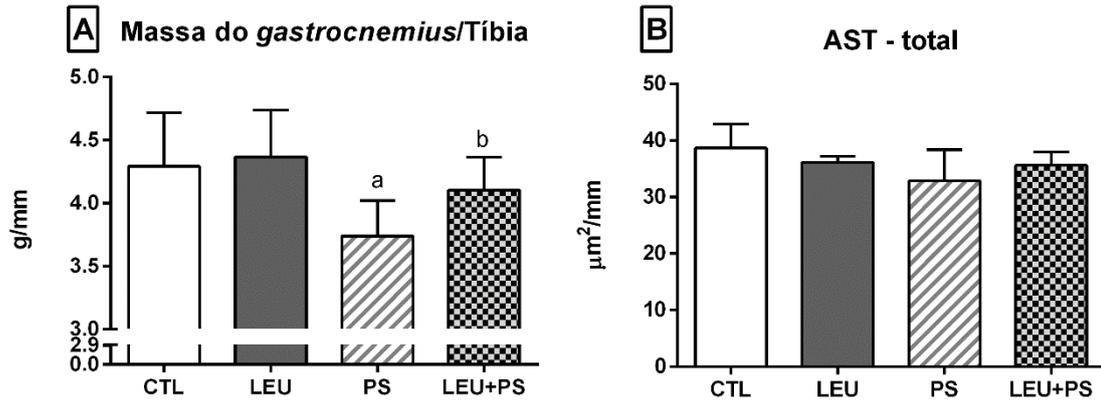


**Gráfico 2** - Variação ( $\Delta$ ) da massa corporal entre os grupos após o protocolo de privação de sono paradoxal por 96 horas. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL e LEU, <sup>b</sup>diferente do grupo PS.

## 7.2 Massa muscular e histomorfometria

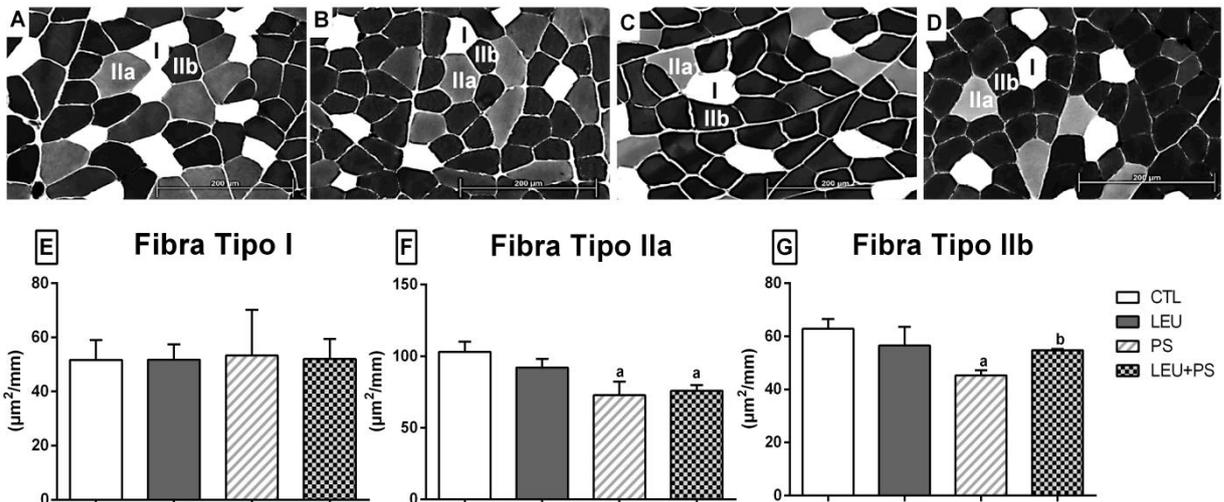
A análise da massa do *gastrocnemius* foi realizada utilizando uma ANOVA<sub>one-way</sub> porém, antes da análise propriamente dita, realizamos uma padronização a partir da razão entre a massa muscular e o comprimento da tíbia (g/mm). Assim, o grupo PS mostrou-se com menor massa muscular do que os grupos CTL e LEU ao passo que o grupo LEU+PS apresentou massa muscular similar ao dos grupos CTL e LEU, diferindo-se apenas do grupo PS ( $F_{(3, 42)}=8,5081$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,38$ ;  $\omega=0,98$ ) (gráfico 3A).

Já para área de secção transversal total, a padronização foi realizada pela razão do valor da área de secção transversal de todos os tipos de fibra muscular pelo comprimento da tíbia ( $\mu\text{m}^2/\text{mm}$ ) e posteriormente os valores foram analisados por ANOVA<sub>one-way</sub>. Para esta variável não houve efeito dos grupos ( $F_{(3, 10)}=1,3509$ ;  $p=0,31$ ;  $\eta=0,28$ ;  $\omega=0,25$ ) (gráfico 3B).



**Gráfico 3 – A –** Massa do *gastrocnemius* corrigido pelo comprimento da tíbia. **B –** Área de secção transversal total corrigido pelo comprimento da tíbia. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL e LEU, <sup>b</sup>diferente do grupo PS.

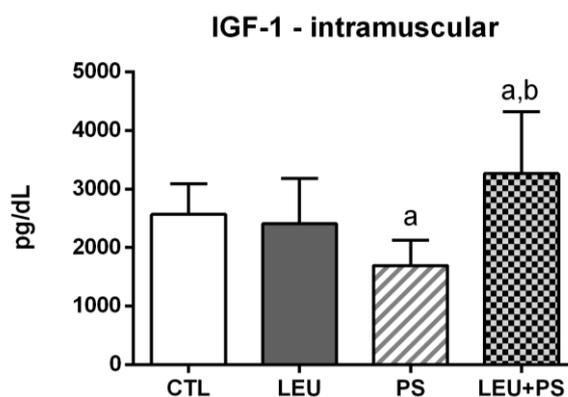
Após analisar a área de secção transversal total foi possível avaliar os 3 tipos de fibras musculares em cada um dos grupos experimentais (gráfico 4A, B, C e D). A área de secção transversal das fibras tipo I não foi diferente entre os grupos ( $H_{(3, 14)}=0,99$ ;  $p=0,8$ ) (gráfico 4E). Já a área de secção transversal das fibras tipo IIa no grupo PS e LEU+PS foi menor do que nos grupos CTL e LEU ( $F_{(3, 10)}=14,263$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,81$ ;  $\omega=0,99$ ) (gráfico 4F). Entretanto para as fibras tipo IIb a área de secção transversal se mostrou menor apenas no grupo PS quando comparado aos grupos CTL, LEU e LEU+PS ( $F_{(3, 10)}=13,472$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,80$ ;  $\omega=0,99$ ) (gráfico 4G).



**Gráfico 4 –** Representação dos diferentes tipos de fibra muscular e área de secção transversal dos diferentes tipos de fibra muscular. **A –** diferentes tipos de fibra muscular no grupo CTL. **B –** diferentes tipos de fibra muscular no grupo LEU. **C –** diferentes tipos de fibra muscular no grupo PS. **D –** diferentes tipos de fibra muscular no grupo LEU+PS. **E –** Área de secção transversal das fibras tipo I corrigido pelo comprimento da tíbia. **F –** Área de secção transversal das fibras tipo IIa corrigido pelo comprimento da tíbia. **G –** Área de secção transversal das fibras tipo IIb corrigido pelo comprimento da tíbia. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL e LEU, <sup>b</sup>diferente do grupo PS.

### 7.3 Sinalizações anabólicas intramusculares

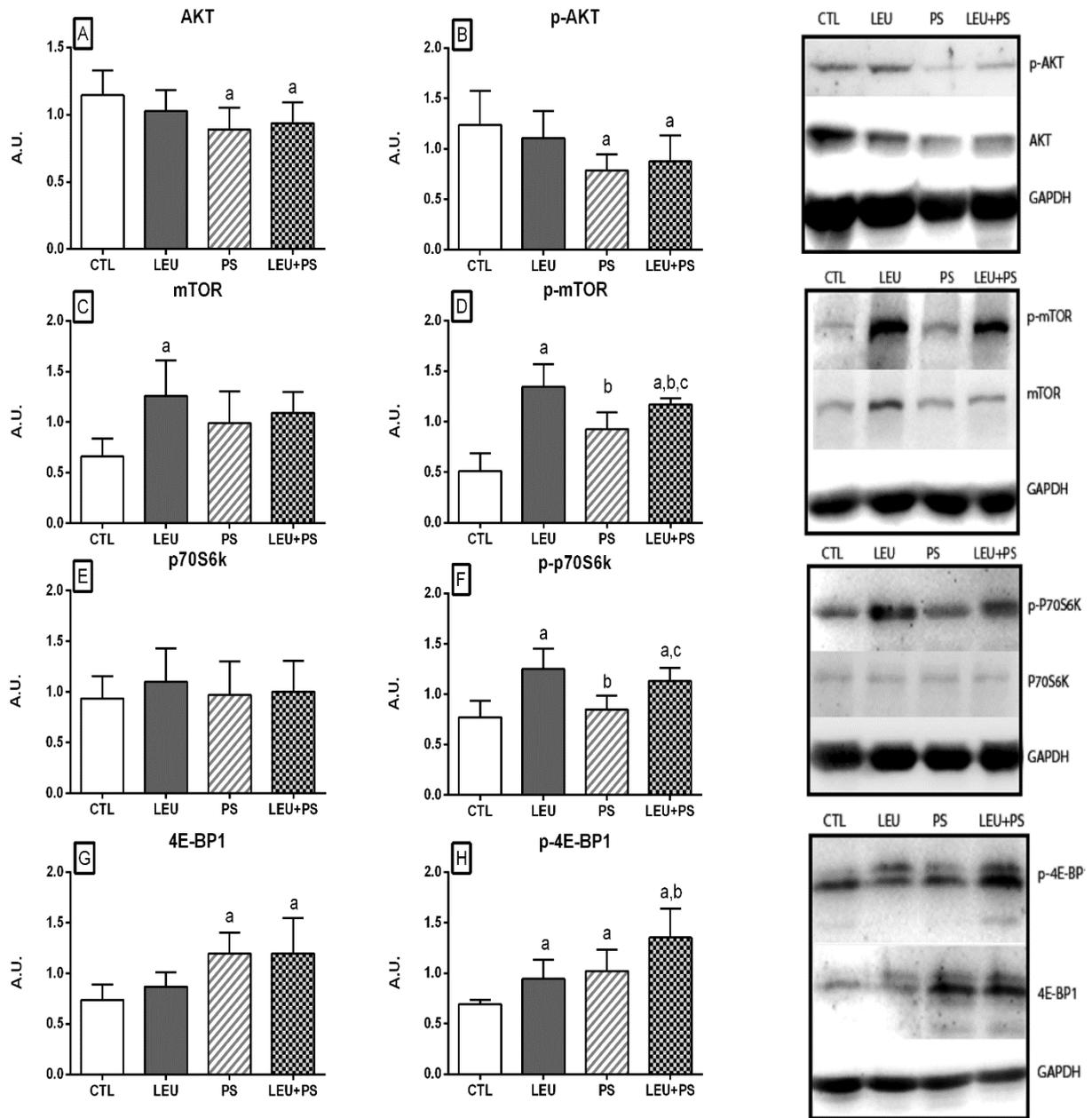
A primeira substância anabólica analisada no interior do tecido muscular foi o IGF-1 ( $F_{(3, 46)}=7,63$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,40$ ;  $\omega=0,97$ ) que apresentou níveis menores no grupo PS quando comparado aos grupos CTL, LEU e LEU+PS. Por outro lado, os níveis de IGF-1 intramuscular no grupo LEU+PS foram ainda maiores do que nos grupos CTL e LEU (gráfico 5).



**Gráfico 5** – Concentração do IGF-1 intramuscular. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL e LEU, <sup>b</sup>diferente do grupo PS.

Com relação às proteínas intracelulares que fazem parte da cascata de reações que sinalizam a síntese proteica a Akt total ( $F_{(3,32)}=2,79$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta=0,30$ ;  $\omega=0,58$ ) foi menor nos grupos PS e LEU+PS quando comparada aos grupos CTL e LEU (gráfico 6A). Comportamento similar foi observado na Akt fosforilada ( $F_{(3,32)}=3,72$ ;  $p<0,03$ ;  $\eta=0,35$ ;  $\omega=0,72$ ) em que os mesmos grupos PS e LEU+PS foram menores do que os grupos CTL e LEU (gráfico 6B). O mTOR total ( $F_{(3,32)}=3,43$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta=0,46$ ;  $\omega=0,61$ ), mostrou-se mais elevado apenas no grupo LEU quando comparado a todos os outros grupos (gráfico 6C), já o p-mTOR ( $F_{(3,32)}=4,66$ ;  $p<0,03$ ;  $\eta=0,53$ ;  $\omega=0,76$ ) foi maior nos grupos LEU, e LEU+PS quando comparados aos grupos CTL e PS porém, o grupo LEU+PS apresentou níveis menores do que o grupo LEU e níveis maiores que o grupo PS (gráfico 6D). A p70S6k não se alterou em nenhuma das condições experimentais ( $F_{(3,32)}=0,33$ ;  $p>0,05$ ;  $\eta=0,047$ ;  $\omega=0,10$ ) (gráfico 6E), porém a p-p70S6k ( $F_{(3,32)}=4,41$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,39$ ;  $\omega=0,79$ ) foi maior nos grupos LEU e LEU+PS quando comparados aos grupos CTL e PS (gráfico 6F). Com relação a 4E-BP1 total ( $F_{(3,32)}=3,30$ ;  $p<0,05$ ;  $\eta=0,45$ ;  $\omega=0,60$ ), foi possível observar concentrações elevadas desta proteína

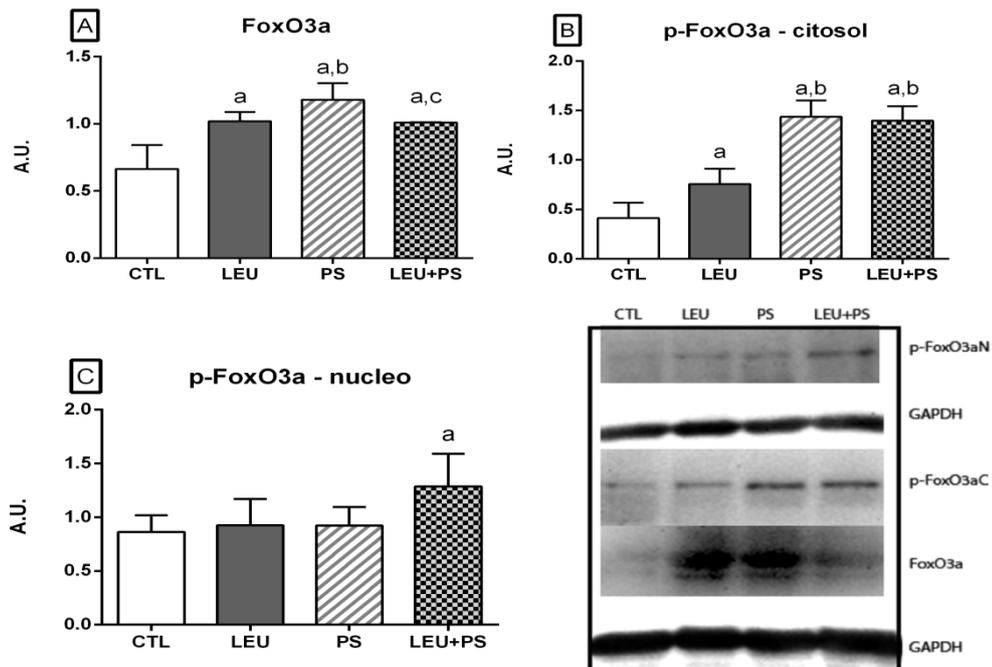
apenas nos grupos PS e LEU+PS (gráfico 6G). Por outro lado, ao analisarmos a fosfo-4E-BP1 ( $F_{(3,32)}=7,16$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,64$ ;  $\omega=0,92$ ) observamos valores maiores nos grupos LEU, PS e LEU+PS comparados ao grupo CTL e valores ainda mais elevados foram observados no grupo LEU+PS quando comparados aos grupos LEU e PS (gráfico 6H).



**Gráfico 6** – Concentração das proteínas responsáveis pela sinalização de síntese proteica. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. **A** – concentração Akt total. **B** – concentração Akt fosforilada. **C** – concentração mTOR total. **D** – concentração mTOR fosforilada. **E** – concentração p70s6k total. **F** – concentração p70s6k fosforilada. **G** – concentração 4E-BP1 total. **H** – concentração 4E-BP1 fosforilada. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL, <sup>b</sup>diferente do grupo LEU, <sup>c</sup>diferente do grupo PS.

## 7.4 Sinalizações catabólicas intramuscular

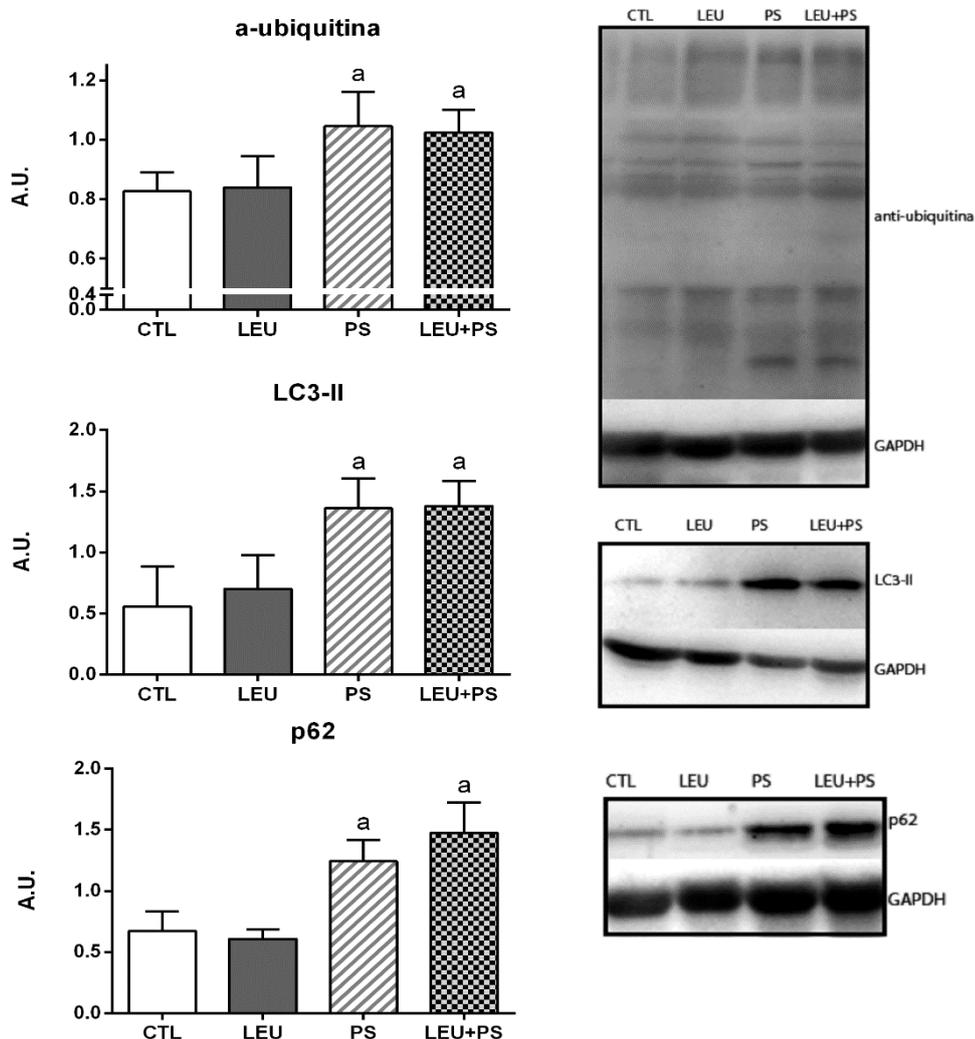
Após a análise da via de sinalização intramuscular de degradação proteica foi possível observar que a proteína FoxO3a total ( $F_{(3,32)}=16,56$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,80$ ;  $\omega=0,99$ ) apresentou valores mais altos nos grupos LEU, PS e LEU+PS, entretanto o grupo PS apresentou nível ainda mais elevado que os grupos LEU e LEU+PS (gráfico 7A). Para a fosfo-FoxO3a da fração citosólica ( $F_{(3,32)}=64,33$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,92$ ;  $\omega=1$ ) observamos níveis elevados nos grupos LEU, PS e LEU+PS, sendo que nos grupos PS e LEU+PS apresentam-se maiores concentrações do que o grupo LEU (gráfico 7B). Já para fração nuclear, a fosfo-FoxO3a ( $F_{(3,32)}=3,66$ ;  $p<0,03$ ;  $\eta=0,40$ ;  $\omega=0,68$ ) foi maior apenas no grupo LEU+PS comparado a todos os outros grupos (gráfico 7C).



**Gráfico 7** – Concentração das proteínas responsáveis pela sinalização de degradação proteica. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. **A** – concentração FoxO3a total do sobrenadante 1. **B** – concentração FoxO3a fosforilada do sobrenadante 1. **C** – concentração FoxO3a fosforilada do sobrenadante 2. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL, <sup>b</sup>diferente do grupo LEU, <sup>c</sup>diferente do grupo PS.

Com relação às proteínas ubiquitinadas ( $F_{(3,32)}=3,75$ ;  $p<0,03$ ;  $\eta=0,41$ ;  $\omega=0,70$ ) ambos os grupos privados de sono (PS e LEU+PS) obtiveram níveis maiores do que os grupos que não foram privados de sono (CTL e LEU) (gráfico 8A). A LC3-II ( $F_{(3,32)}=6,39$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta=0,61$ ;  $\omega=0,88$ ) seguiu um comportamento similar já que foi mais elevada nos grupos PS e LEU+PS comparados aos grupos CTL e LEU (gráfico

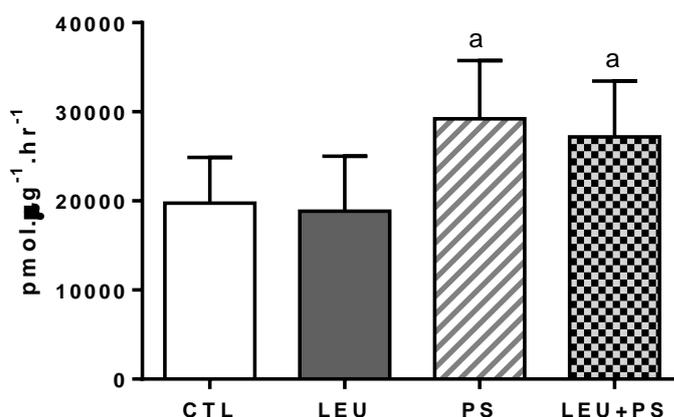
8B). O mesmo comportamento foi observado com relação a p62/SQSTM1 ( $F_{(3,32)}=35,10$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta=0,84$ ;  $\omega=1$ ), a qual nos grupos PS e LEU+PS apresentam maiores concentrações dessa proteína do que os grupos CTL e LEU (gráfico 8C).



**Gráfico 8** - Concentração de proteínas responsáveis pela sinalização de degradação proteica. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. **A** – concentração de proteínas ubiquitinadas. **B** – concentração LC3-II. **C** – concentração p62/SQSTM1. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL, <sup>b</sup>diferente do grupo LEU.

Além das proteínas intramusculares que sinalizam a degradação proteica estarem alteradas após a privação de sono paradoxal, foi possível observar que a velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo também foi alterada ( $F_{(3,36)}=3,79$ ;  $p<0,01$ ;  $\eta=0,24$ ;  $\omega=0,77$ . Ambos os grupos submetidos à privação de sono paradoxal suplementados ou não com leucina (PS e LEU+PS respectivamente) apresentam maior velocidade da atividade enzimática do proteassomo do que os grupos que não foram submetidos à privação de sono paradoxal (CTL e LEU) (figura 9).

### Velocidade Inicial da Atividade Enzimática do Proteassomo 26s



**Gráfico 9** – Velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo 26s. ANOVA<sub>one-way</sub>, com *post-hoc* de Duncan *test*. Dados expressos em média±desvio padrão. **A** – concentração de proteínas ubiquitinadas. **B** – concentração LC3-II. **C** – concentração p62/SQSTM1. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL e LEU

## 7.5 Dosagens sanguíneas de sinalizações anabólicas e catabólicas

Além das sinalizações intracelulares também avaliamos o comportamento de marcadores sanguíneos que pudessem demonstrar as alterações observadas no trofismo da musculatura esquelética ao final do período experimental. Na tabela 2 demonstramos algumas alterações do perfil circulante de alguns hormônios e metabólitos, assim como a glicemia. Neste sentido, observamos que a corticosterona ( $H_{(3, 46)}=28,42$ ,  $p<0,001$ ) apresentou níveis menores nos grupos CTL e LEU enquanto que os grupos PS e LEU+PS apresentaram valores elevados. Já para a testosterona total ( $H_{(3, 46)}=27,9$ ;  $p<0,001$ ) observamos um comportamento inverso, em que os grupos CTL e LEU apresentaram valores maiores enquanto que nos grupos PS e LEU+PS os valores foram menores.

A insulina foi outro hormônio que apresentou uma variação importante entre os grupos ( $F_{(3, 42)}=10,911$ ,  $p<0,001$ ;  $\eta=0,47$ ;  $\omega=0,99$ ), onde os grupos PS e LEU+PS apresentaram menores níveis de insulina circulante do que os grupos CTL e LEU. Porém ao analisarmos a glicemia não foi possível identificar nenhuma diferença entre os grupos ( $F_{(3, 42)}=1,8816$ ,  $p=,14738$ ;  $\eta=0,11$ ;  $\omega=0,45$ ).

A fim de buscar um melhor entendimento do possível estado catabólico gerado pela privação de sono, ou ainda, se a suplementação de leucina gerou algum tipo de sobrecarga renal, tanto a creatinina quanto a ureia sistêmicas foram analisadas, para tanto, os níveis de creatinina ( $H_{(3, 46)}=2,63$ ;  $p=0,45$ ) bem como de ureia sérica ( $F_{(3, 42)}=0,68$ ,  $p=0,56$ ;  $\eta=0,06$ ;  $\omega=0,17$ ) não se diferiram entre os grupos.

**Tabela 2** – Perfil sérico hormonal e de metabólitos.

	<b>CTL</b>	<b>LEU</b>	<b>PS</b>	<b>LEU+PS</b>
Corticosterona (ng/mL)	39,5±33,6	45,3±22,2	223,5±154,8 <sup>a</sup>	294,2±148,4 <sup>a</sup>
Testosterona (ng/dL)	706,9±375,2	903,6±378,9	144,5±59,7 <sup>a</sup>	229,1±149,1 <sup>a</sup>
Insulina (ng/mL)	2,3±1,3	2,6±1,9	0,34±0,2 <sup>a</sup>	0,34±0,3 <sup>a</sup>
Glicose (mg/mL)	88,1±17,5	85,6±6,3	98,7±16	88,8±14,8
Creatinina (ng/mL)	0,22±0,04	0,22±0,06	0,23±0,03	0,22±0,02
Uréia (mg/mL)	43,5±3,8	43,1±4,3	45,6±3,6	43,5±3,8

Análises realizadas através do teste de KRUSKAL-WALLIS com pos-hoc de Mann Whitney corrigido por Bonferroni test para Testosterona, Corticosterona e Creatinina e ANOVAone-way, com post-hoc de Tukey test para Insulina, Glicose e Ureia. Dados expressos em média±desvio padrão. <sup>a</sup>diferente do grupo CTL e do grupo LEU.

## 8. DISCUSSÃO

Nos últimos anos nosso grupo vem dedicando esforço para entender as repercussões do débito de sono sobre a musculatura esquelética. Neste contexto, Dáttilo e colaboradores, apresentaram a hipótese de que as alterações na secreção de testosterona e da corticosterona sejam os principais responsáveis pelo prejuízo do débito de sono à recuperação muscular, uma vez que são hormônios predominantemente anabólico e catabólico, respectivamente <sup>(34)</sup>.

Posteriormente, esta hipótese foi confirmada experimentalmente mostrando que a privação de sono paradoxal por 96h promoveu redução da massa corporal, da área de secção transversal e da massa do músculo *tibialis* anterior, juntamente com reduções dos níveis de testosterona e aumento de corticosterona <sup>(28)</sup>. A partir desses resultados, utilizar estratégias que possam minimizar ou até mesmo reverter o quando de atrofia muscular se torna necessário. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar os efeito da suplementação de leucina nas vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética de ratos submetidos à privação de sono paradoxal. Como esperado, a privação de sono promoveu a atrofia de fibras glicolíticas, ao passo que a suplementação de leucina foi capaz de inibir que tal atrofia fosse observada.

A atrofia muscular decorrente da privação de sono paradoxal foi acompanhada pela redução dos níveis de testosterona total sérica e aumento dos níveis de corticosterona, reproduzindo os achados previamente descritos por nosso grupo <sup>(28, 33)</sup>. Três fatores podem justificar as alterações hormonais ocorridas durante a privação de sono paradoxal: alta atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que promove uma maior secreção de corticosterona <sup>(24)</sup>, a competição entre corticosterona e testosterona pelos mesmos receptores <sup>(102)</sup> e o fato de que o aumento de glicocorticoides pode estimular apoptose das células de *Leydig*, diminuindo a síntese de testosterona <sup>(103)</sup>. Assim, é plausível pensar que a elevação dos níveis de corticosterona gerada pela privação de sono paradoxal iniba as ações e a produção de testosterona, diminuindo a síntese e/ou aumentando o catabolismo de diversos tecidos, incluindo os músculos esqueléticos.

No sentido que a privação de sono gera um ambiente catabólico, foi possível reproduzirmos dados encontrados por outros autores, já que houve diminuição da massa corporal tanto durante (variação da massa corporal a cada 24h) quanto ao final das 96h de privação de sono paradoxal <sup>(22, 24, 104)</sup>. Até o início da década de

2010, a redução da massa corporal observada a partir da privação de sono paradoxal em ratos, foi associada principalmente ao catabolismo dos componentes de gordura corporal <sup>(22, 24)</sup>; resultado também observado neste estudo (dados apresentados no anexo 2). Entretanto, a partir de 2012 com os achados de Dáttilo e colaboradores <sup>(28)</sup>, Mônico-Neto <sup>(104)</sup> e pelos resultados demonstrados no presente estudo, é possível afirmar que a diminuição da massa muscular também contribua com a redução da massa corporal total observada durante e ao final da privação de sono paradoxal em ratos, uma vez que este tecido representa aproximadamente 40% de toda massa corporal <sup>(105)</sup>.

Por outro lado, demonstramos que a suplementação de leucina durante a privação de sono foi capaz de atenuar a redução da massa corporal. É bem estabelecido na literatura que a leucina possui propriedade anticatabólica, não só por inibir a degradação, mas também por estimular a síntese em diversos tecidos, incluindo o fígado, o tecido adiposo e os músculos esqueléticos <sup>(68)</sup>. Corroborando estas informações observamos que o grupo LEU+PS apresentou uma redução na massa do fígado, da gordura epididimal e retroperitonal em menor magnitude quando comparado ao grupo PS (anexo 2). Entretanto muitas pesquisas vêm demonstrando que o principal efeito da leucina pode ser observado nos músculos esqueléticos, estimulando a síntese proteica neste tecido ou inibindo sua degradação <sup>(78, 82, 90, 106)</sup>. Neste mesmo sentido, observamos que a massa do *gastrocnemius* foi preservada durante a privação de sono quando suplementado com leucina.

Apesar de observarmos redução na massa muscular não foi possível identificar, no presente trabalho, redução da área de secção transversal total do músculo *gastrocnemius* nos animais submetidos à privação de sono. Aparentemente, este achado parece ser contraditório aos resultados encontrados por Dáttilo e colaboradores <sup>(28)</sup> e Mônico-Neto <sup>(104)</sup>, porém, é preciso considerar que esses autores utilizaram músculos compostos predominantemente por fibras glicolíticas, ao passo que no presente estudo utilizamos o *gastrocnemius* que é uma musculatura mista, cuja distribuição de fibras musculares se dá de forma mais uniforme <sup>(40)</sup>.

Esta diferença na composição muscular vem sendo apontada por alguns autores como fator determinante à responsividade seletiva aos diferentes estímulos atrofícos. Assim, músculos glicolíticos seriam primariamente afetados por estímulos

catabólicos induzidos por glicocorticoides e privação de alimento, por exemplo, enquanto que músculos oxidativos seriam mais sensíveis a atrofia induzida por denervação (37, 43).

Por outro lado, ao analisarmos os diferentes tipos de fibras musculares foi possível identificar que as fibras do tipo IIa e IIb foram atrofiadas após o período de 96h de privação de sono paradoxal, enquanto que as fibras tipo I não sofreram nenhum tipo de alteração com relação a área de secção transversal. Esta seletividade atrofica pelas fibras do tipo II pode ser justificada pelas diferenças metabólicas e pelas diferentes sinalizações moleculares deste tipo de fibra em comparação às fibras tipo I (43).

Entre as proteínas intracelulares que podem explicar certo tipo de proteção à atrofia nas fibras do tipo I durante condições atroficas induzida por glicocorticoides, destacam-se a *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator* (PGC)-1 $\alpha$ , uma proteína altamente expressa em fibras oxidativas e que possui papel fundamental na biogênese mitocondrial e na formação de fibras tipo I (107, 108). Além disso, alguns autores apontam que as sinalizações catabólicas por meio das famílias da FoxO que modulam a atividade do sistema ubiquitina-proteassomo e da autofagia-lisossomal tendem a atingir primariamente fibras do tipo II (109, 110).

De fato, Wang e Pessin apontam em sua revisão que protocolos de imobilização de patas, por exemplo, por sua característica de desuso muscular apresentam reduções em ambos os tipos de fibras musculares, enquanto que a atrofia relacionada a déficits nutricionais, envelhecimento, caquexia do câncer, sepse, diabetes, tratamento de inflamação com glicocorticoide ou estresse são mais relacionadas à perda de fibras glicolíticas (43).

A partir dessas possibilidades de sinalizações biomoleculares, observamos que a suplementação de leucina foi capaz de reverter a atrofia muscular apenas nas fibras do tipo IIb, não modulando o trofismo das fibras do tipo IIa. Possivelmente isto ocorra devido a característica das fibras musculares do tipo IIa, que possuem atividade migratória podendo exercer tanto funções de fibras oxidativas quanto de glicolíticas, caracterizando este tipo de fibra como intermediária (38, 42).

Considerando que as sinalizações mediadas pela FoxO atinge preferencialmente as fibras tipo II após a privação de sono, observamos um aumento da p-FoxO3a no citosol celular, o que poderia ir em sentido oposto às teorias que apontam que este fator de transcrição modula o catabolismo de fibras glicolíticas.

Entretanto, ao analisarmos a FoxO3a total no núcleo celular foi possível identificar que animais privados de sono apresentam níveis mais elevados desta proteína, enquanto que a p-FoxO3a alterou apenas no grupo LEU+PS. A partir desses resultados podemos afirmar que a privação de sono foi capaz de aumentar a dissociação da FoxO3a da molécula de fosfato no citosol celular, permitindo com que a FoxO3a migre ao núcleo celular e promovendo a transcrição de sinais capazes de marcar (ubiquitar) proteínas específicas, que seriam reconhecidas e degradadas pelo proteassomo ou pelo lisossomo <sup>(48, 111)</sup>.

Embora alguns autores tenham demonstrado que a suplementação de leucina foi capaz de reduzir a atrofia muscular por meio da redução de proteínas ubiquitinadas <sup>(89, 106)</sup>, no presente trabalho não observamos nenhum efeito da suplementação de leucina na redução das proteínas ubiquitinadas. Este resultado, porém, parece estar de acordo com outro achado de Batista e colaboradores <sup>(90)</sup> que também não observaram efeito da suplementação de leucina na redução de proteínas ubiquitinadas durante o tratamento com glicocorticoide sintético. Além disso, é bem estabelecido na literatura que a privação de sono é capaz de estimular o perfil inflamatório, aumentando os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e NF-kB <sup>(112-115)</sup>. Sendo assim, o fato do grupo LEU+PS apresentar aumento da p-FoxO3a na fração nuclear, pode indicar uma via paralela de estimulação da degradação proteica, uma vez que o NF-kB é capaz de regular a atividade de enzimas E3 ligases <sup>(116, 117)</sup>.

Observando que a privação de sono foi capaz de aumentar a atividade da FoxO3a e de aumentar a quantidade de proteínas ubiquitinadas, analisamos também a expressão de proteínas responsáveis pela formação do autofagossomo (LC3-II) e por ligar as proteínas ubiquitinadas em LC3 e encaminhá-las ao autofagossomo (p62/SQSTM1). E ainda analisamos a atividade enzimática inicial do proteassomo. Corroborando os achados de Mônico-Neto <sup>(104)</sup> tanto a LC3-II quanto a p62/SQSTM1 foram aumentadas após o período de privação de sono paradoxal, mesmo quando houve a suplementação de leucina associada. O aumento da expressão destas proteínas pode indicar que a privação de sono foi capaz de aumentar a formação de autofagossomos ou ainda que esta condição estimule uma má formação do complexo autofagossomo/lisossomo. Assim, a atrofia muscular pode ter sido gerada tanto pelo excesso quanto pela falha da autofagia <sup>(48)</sup>.

Por outro lado, diferentemente do que foi apresentado por Mônico-Neto <sup>(104)</sup>, observamos que a velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo foi

maior nos animais privados de sono paradoxal. Possivelmente, tal diferença possa ter ocorrido devido há algumas peculiaridades entre os protocolos experimentais como, por exemplo, o fato da musculatura analisada serem diferentes, uma vez que é observada uma maior atividade de autofagia em músculos glicolíticos, ou ainda a retirada de alimentos 2h antes da realização da eutanásia, que poderiam mascarar a análise da atividade enzimática do proteassomo. Além disso, a análise do resultado do ensaio da atividade enzimática do proteassomo foi realizada de forma diferente; enquanto Mônico-Neto <sup>(104)</sup> fez análise da inclinação da reta, no presente estudo analisamos a velocidade inicial da atividade enzimática do proteassomo utilizando os 12 minutos do ensaio fluorimétrico.

A partir dos nossos resultados, é possível pensar que tanto o sistema ubiquitina-proteassomo quanto a autofagia-lisossomal possam estar ativos durante a privação de sono, uma vez que a autofagia-lisossomal tem sido atribuída como responsável pela degradação e reciclagem de massa citoplasmática, proteínas e organelas de vida longa, enquanto que o sistema ubiquitina-proteassomo está associado à degradação de proteínas estruturais da musculatura esquelética como a actina, a cadeias pesadas de miosina e à troponina I <sup>(62, 111)</sup>.

É preciso considerar também que a atrofia muscular não se dá exclusivamente pelo aumento da degradação proteica, mas sim pelo desequilíbrio entre as taxas de síntese e degradação. Neste sentido, considerando os resultados observados em relação à via de degradação, buscamos entender também o comportamento da via PI3K/Akt/mTOR, uma das principais vias responsáveis pela sinalização da síntese proteica durante a privação de sono.

Para que esta via esteja ativa são necessários estímulos, que podem se originar de hormônios como a testosterona e a insulina; fatores de crescimento (IGF-1, por exemplo); macro nutriente como o aminoácido e glicose; ou ainda da própria condição energética tecidual <sup>(51, 118, 119)</sup>. Neste sentido, foi possível observar que os níveis de insulina foram menores em ambos os grupos de animais submetidos à privação de sono paradoxal e que a leucina, apesar de ser apontada como uma das principais estimuladoras da secreção de insulina <sup>(84)</sup>, não foi capaz de alterar seus níveis plasmáticos em qualquer condição experimental.

Esses resultados estão em consonância aos achados de outros autores que também demonstraram que a privação de sono paradoxal foi capaz de reduzir os níveis de insulina circulante <sup>(22, 120)</sup>. Além disso, é possível observar em alguns

protocolos de suplementação de leucina em que se utilizaram dosagens similares a empregada no presente estudo, que os níveis de insulina circulante também não foram alteradas (68, 77, 89, 94), demonstrando que diversos efeitos da leucina podem ocorrer em sinergia ou não à ação da insulina.

Considerando que a privação de sono paradoxal eleva os níveis de glicocorticoides e que estes possuem efeitos antagônicos ao da insulina sobre a captação de glicose, a redução dos níveis de insulina circulante poderiam se dá com a finalidade de promover a manutenção do fornecimento de glicose ao sistema nervoso central (121). Além disso, os níveis de IGF-1 intramuscular também foram menores no grupo PS, indo ao encontro dos resultados de Monico-Neto (104) e Dáttilo e colaboradores (dados não publicados). As reduções de insulina e IGF-1 nos grupos privados de sono culminaram em uma menor fosforilação da Akt quando comparado aos grupos que não foram privados de sono.

A Akt, entre várias outras funções é capaz de regular a atividade da captação de insulina a partir do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e de translocar o GLUT4 para a membrana celular, permitindo assim, que a glicose seja captada de forma mais adequada (122, 123). Além disso, o *status* energético no interior celular também é responsável por manter um nível adequado de trofismo muscular. Neste sentido, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas ( $p=0,057$ ), os níveis glicêmicos dos animais privados de sono apresentaram maiores médias em relação aos outros grupos, sugerindo que a privação de sono pode alterar a captação de glicose pelos músculos esqueléticos e possivelmente diminuir a disponibilidade de energia neste tecido.

Por outro lado, no grupo LEU+PS, os níveis de IGF-1 foram mais elevados do que nos grupos que não foram privados de sono, ao passo que a p-Akt também foi diminuída neste grupo. Provavelmente, a redução da atividade da Akt não ocorra apenas pela diminuição dos níveis de IGF-1 ou insulina, mas também, pelo aumento dos níveis de corticosterona, que podem inibir a Akt diretamente, como ocorre em condições de tratamento com dexametasona (124). Tendo dito isso, sugerimos que o aumento dos níveis de IGF-1 observado nos animais privados de sono e suplementado com leucina ocorram na tentativa de regular a atividade da via PI3K/Akt, uma vez que este aminoácido tem a capacidade de estimulação da síntese de IGF-1 (71, 75).

O alvo subjacente da Akt é o mTOR que ao ser fosforilado tem a propriedade de sinalizar outras duas proteínas a p70S6K e a 4E-BP1, essenciais para formação de novas proteínas <sup>(50, 125)</sup>. Neste sentido observamos que tanto o mTOR total quanto sua porção fosforilada (p-mTOR) não apresentaram diferenças entre os grupos PS e CTL, possivelmente devido a redução da atividade de síntese proteica e aumento da sinalização de degradação proteica, tipicamente observado em situações em que há aumento de glicocorticoides <sup>(126)</sup>.

Por outro lado, desde o final da década de 90 e início da década de 2000 até os dias atuais, diversos autores vêm demonstrando que a leucina exerce um papel fundamental na estimulação da síntese proteica, principalmente por estimular diretamente a fosforilação do mTOR <sup>(67, 69, 77, 127)</sup>. Nossos achados corroboram as informações previamente apresentadas uma vez que os grupos LEU e LEU+PS apresentaram maiores níveis de ativação do mTOR quando comparados aos outros grupos.

Paralelamente ao comportamento do mTOR, a p70S6k e a p-p70S6k também não se alteraram no grupo PS, porém a p-p70S6k estava mais ativa em ambos os grupos suplementados com leucina, enquanto que a p-4E-BP1 esteve aumentada nos grupos LEU, LEU+PS e PS. É importante mencionar que a p70S6k exerce papel fundamental na tradução proteica, enquanto que a 4E-BP1 possui a função de iniciação da tradução. O processo de iniciação da tradução é controlado pelo complexo eIF4F, que é formado por proteínas do complexo eIF4A, eIF4B, eIF4G e eIF4E e possui a função de reconhecer, desenrolar e encaminhar o mRNA para o complexo ribossomal de pré-iniciação 43S <sup>(128)</sup>. Entretanto para que isto ocorra é necessário que haja disponibilidade de eIF4E, e esta disponibilidade é regulada por uma família de proteínas repressoras da tradução, a 4E-BP1 <sup>(129)</sup>.

Em situações de quiescência do trofismo muscular a 4E-BP1 se mantém associada ao eIF4E, impedindo suas ações enquanto que a p70S6k não é fosforilada. Porém, quando há estímulos hipertróficos, geralmente a partir da sinalização do mTOR, a 4E-BP1 é fosforilada e ocorre sua dissociação do eIF4E, formando o complexo eIF4F, enquanto que a fosforilação da p70S6k permite que a proteína S6 desempenhe seu papel de regulação de síntese de proteínas ribossomais e de fatores de elongações, que posteriormente serão traduzidos em novas proteínas <sup>(67)</sup>.

Neste sentido, parece pertinente pensar que haja algum tipo de tentativa em estimular a síntese proteica durante a privação de sono, como observado em outras condições catabólicas <sup>(130)</sup>, entretanto este processo parece ser impedido por uma falha no processo de tradução do mRNAs, que não é observado quando a suplementação de leucina foi associada a privação de sono paradoxal. Assim, a manutenção do trofismo das fibras tipo IIb observadas nos animais privados de sono e suplementados com leucina, ocorreu não pela diminuição das sinalizações de degradação, mas sim pelo aumento da síntese proteica, balanceando adequadamente o *turnover* proteico muscular.

Apesar de todos os efeitos benéficos da suplementação de leucina ao tecido muscular, alguns autores demonstram que o excesso de consumo de aminoácidos/proteínas, poderia comprometer a função renal <sup>(131)</sup>, tanto por aumento da produção de ureia como consequência da metabolização dos aminoácidos <sup>(132)</sup> quanto pelo aumento da pressão glomerular e da hiperatividade renal para filtração sanguínea, a qual desencadearia uma esclerose glomerular. Assim, de forma simplificada, não observamos nenhum indício de que a suplementação de leucina pudesse comprometer as funções renais em nosso protocolo. Nossos resultados estão de acordo a outros trabalhos em que não foi observado aumento de creatinina e ureia com as concentrações plasmáticas de leucina <sup>(133)</sup>.

Outro ponto que necessita ser abordado é a cinética da creatinina e ureia durante protocolos de indução à atrofia muscular, já que esses dois metabólitos podem ser aumentados em condições de proteólises. Neste sentido nossos resultados foram similares aos observados por Hellgren e colaboradores <sup>(134)</sup> que durante experimento de imobilização de patas induzido por uso de anestésicos não observaram alterações nos níveis séricos de creatina e ureia, porém são divergentes aos de protocolos de imobilização de patas por elevação das mesmas <sup>(135)</sup>, que observam tanto aumento de creatinina quanto de ureia. Assim, nossos resultados apontam que alterações nos níveis de ureia e de creatinina durante a privação de sono paradoxal poderiam ser secundárias à proteólise observada nesta condição.

Outro resultado possível de ser explorado é o fato de que os efeitos benéficos da suplementação de leucina à musculatura esquelética tenham ocorrido independente da modulação da secreção dos hormônios corticosterona e testosterona. Até o presente momento não há nenhum indício que a leucina module a síntese ou secreção dessas substâncias, assim, esses resultados podem indicar

que a atrofia muscular ocorrida durante a privação de sono, não ocorra única e exclusivamente pelo perfil circulante dos mesmos. Possivelmente a privação de sono seja capaz de sinalizar a atrofia muscular de outras maneiras, porém, estudos mais específicos devem ser conduzidos para que isto seja confirmado, ou não.

## 9. CONCLUSÕES

A privação de sono paradoxal por 96h foi capaz de reduzir os níveis séricos de testosterona total e IGF-1 intramuscular, além de elevar os níveis de corticosterona. Além disso, a suplementação de leucina não alterou o perfil de nenhuma dessas substâncias quando os animais não foram submetidos a privação de sono, porém o IGF-1 no grupo LEU+PS apresentou níveis ainda mais elevados que os grupos CTL e LEU.

Os níveis de insulina foram menores em ambos os grupos privados de sono, não havendo nenhuma influência da suplementação de leucina em nenhuma das condições experimentais. A glicemia, apesar de observamos um ligeiro aumento nos animais privados de sono sem a suplementação de leucina, não apresentou nenhuma alteração significativa entre os grupos.

No presente estudo foi possível observar que a privação de sono foi capaz de estimular a atividade de algumas proteínas envolvidas na síntese proteica, porém observamos um efeito menos expressivo na atividade da 4EBP-1. Neste sentido a suplementação de leucina se mostrou eficaz na estimulação da síntese proteica, na presença ou não da privação de sono, já que nos grupos suplementados com leucina a atividade de toda a via de síntese proteica foi ainda mais elevada do que nos outros grupos não suplementados.

Com relação às proteínas que indicam a degradação proteica, observamos que a privação de sono foi capaz de aumentar a atividade destas proteínas e a suplementação de leucina não foi capaz de reduzi-las.

A atividade inicial enzimática do proteassomo também foi mais elevada em ambos os grupos submetidos à privação de sono paradoxal, não havendo nenhuma influência da suplementação de leucina neste parâmetro.

Apenas as fibras musculares tipo IIa e IIb reduziram sua área de secção transversal após o período de 96h de privação de sono paradoxal, não havendo nenhuma alteração nas fibras do tipo I. A suplementação de leucina não promoveu o aumento da área de secção transversal em nenhum dos tipos de fibra musculares na condição de sono normal, porém a suplementação de leucina protegeu as fibras tipo IIb da atrofia após a privação de sono paradoxal, não havendo nenhum efeito sobre as fibras tipo IIa.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados expostos, podemos considerar que a privação de sono paradoxal por 96h em ratos promove atrofia seletiva de fibras glicolíticas em uma musculatura mista a partir da diminuição da sinalização de síntese proteica, pelo aumento da autofagia e pela elevada velocidade inicial enzimática do proteassomo. Por outro lado, a suplementação de leucina foi capaz de inibir a atrofia muscular, não pelo retardo da degradação proteica, mas sim por aumentar a síntese de proteínas musculares.

Nossos achados apontam que a atrofia das fibras glicolíticas ocorreu a partir de sinalizações similares as observadas durante o tratamento com glicocorticoide sintético, sendo essa sinalização modulada pela corticosterona aumentada durante a privação de sono e favorecida pela diminuição dos hormônios anabólicos insulina e testosterona e do IGF-1. Porém a reversão da atrofia observada com a suplementação de leucina sugere que o catabolismo muscular durante a privação de sono pode não ocorrer exclusivamente por essas sinalizações, uma vez que isto foi possível mesmo não havendo restauração dos perfis hormonais.

Esses resultados sugerem ainda que a suplementação de 1,35g/kg de leucina não gerou sobrecarga renal, sendo uma estratégia eficiente na tentativa de minimizar alguns dos efeitos deletérios da privação de sono paradoxal em ratos.

## 11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Alguns dos procedimentos experimentais, *per se*, apresentam características que podem exacerbar os resultados encontrados como, por exemplo, o método modificado das plataformas múltiplas para a privação de sono paradoxal. Mesmo que este método seja classicamente reconhecido como efetivo para promover a privação de sono, também é um método que promove secreção de glicocorticoide de forma exacerbada. Este fato pode mascarar ou potencializar os efeitos de atrofia muscular observados em roedores na condição de privação de sono paradoxal.

Outro ponto que se mostra como limitação é o método utilizado para identificar os tipos de fibra muscular. No método utilizado por nós permite-nos identificar 3 colorações diferentes, nos limitando a identificar apenas as fibras tipo I, IIa e IIb, em que as fibras IIx podem ter sido confundidas com as fibras tipo IIa. Este fato, apesar de não comprometer a qualidade da pesquisa, nos limita entender como as fibras tipo IIa e IIx se comportam durante a privação de sono paradoxal.

No mesmo sentido da tipagem de fibras musculares, não podemos atribuir as alterações das sinalizações intramusculares que observamos no presente estudo, a fibras musculares específicas, uma vez que não foi possível separar cada um dos tipos de fibra muscular.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1 – Carta de aprovação do comitê de ética e pesquisa – Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de Julho de 2010.  
CEP 0764/10

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) MARCO TÚLIO DE MELLO  
Co-Investigadores: Hanna Karen Moreira Antunes, Murilo Dáttilo, Alessandra Medeiros, Marco Tulio de Mello (orientador)  
Disciplina/Departamento: Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Efeitos da privação de sono nas vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética de ratos”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Verificar os efeitos da privação de sono no balanço das vias de síntese e degradação proteica musculares, nas condições de privação de sono, assim como o impacto da privação de sono no processo de recuperação muscular, após o dano induzido pela criolesão ou toxina de cobra..

RESUMO: Estudo com 1260 ratos Wistar, machos, 12 semanas. Anestésico: ketamina e xilazina. Analgésico: buprenorfina ou butorfanol. Eutanásia: decapitação. Serão realizados 3 sub-projetos: protocolo experimental 1- controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições de rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Protocolo experimental 2 - controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, sob administração de L-leucina, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Protocolo experimental 3- controle, privação de sono de 48h e 96h, as respectivas condições rebote de sono de 24h e restrições de 7, 14 e 21 dias, com período de rebote de sono de 7 dias, sob administração de mofetina, nas condições sem dano muscular e com dano muscular induzido por criolesão e por toxina de cobra. Para cada protocolo experimental, serão utilizados 10 animais por grupo. Os animais serão sacrificados, o sangue coletado para análise de IGF-1, corticosterona, testosterona e TNF-alfa. Serão retirados os músculos das patas traseiras: sóleo, tibial anterior e plantar para análise das proteínas que compõem as vias tróficas e atróficas da musculatura esquelética e para análise histológica. Serão retirados também amostras de tecido hepático e cardíaco. A privação seletiva de sono paradoxal será realizada pelo método da plataforma múltipla. O aminoácido L-leucina será administrado por gavagem 3 dias antes do procedimento de privação do sono e será

mantido pelo tempo que esse procedimento durar. A aplicação da modafinila será realizada ip sempre no período da manhã ao longo de todas as condições de privação e restrição de sono. O procedimento de criolesão será realizado sob anestesia, utilizando-se um bastão metálico resfriado em nitrogênio líquido, diretamente no ventre da musculatura da pata esquerda. Para o protocolo de indução de dano muscular por toxina de cobra, será injetado notexina isolada do veneno de cobra diretamente no ventre do músculo. Para análise histológica do músculo serão realizadas colorações com HE, ATPase e SDH, avaliando-se o remodelamento tecidual, tipo de infiltrado inflamatório, edema necrose, fibras com núcleos centralizados e fibras com nucléolos proeminentes. Serão realizados ensaios de imuno-histoquímica e western blot..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Estudos tem mostrado que o sono é fundamental para o funcionamento celular, orgânico e sistêmico, sendo sua falta potencialmente prejudicial, alterando comportamento alimentar, regulação glicêmica, pressão arterial, processos cognitivos e eixos hormonais. Este estudo visa verificar os efeitos da privação de sono no balanço das vias de síntese e degradação proteica musculares, nas condições de privação de sono, assim como o impacto da privação de sono no processo de recuperação muscular, após o dano induzido pela criolesão ou toxina de cobra..

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos, utilizando metodologia de domínio do laboratório, com infra-estruturada adequada..

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo - R\$ 47655,00.

**CRONOGRAMA:** 72 meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Doutorado.

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA:** **25/7/2011 e 24/7/2012.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

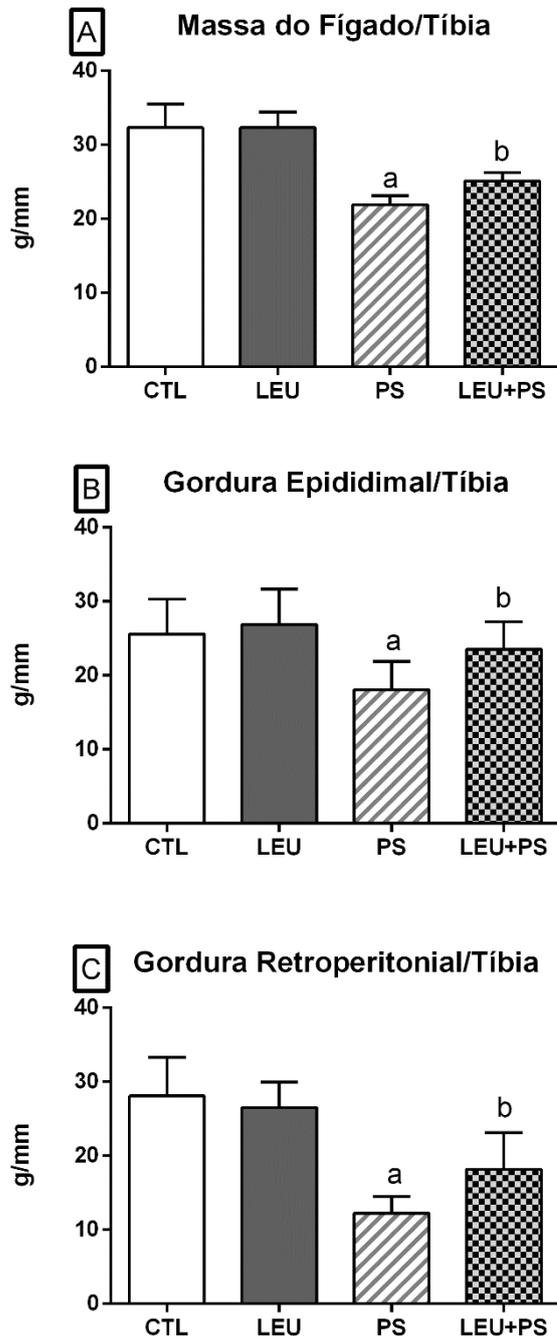
Atenciosamente,



**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0764/10

**ANEXO 2 – Massa do fígado e das gorduras Epidídimo e Retroperitoneal.**



**Gráfico Anexo 2 –** Massa corporal de diferentes estruturas corporais. **A** – massa do fígado corrigido pelo comprimento da tíbia. **B** – massa da gordura epididimal corrigido pelo comprimento da tíbia. **C** – massa da gordura retroperitoneal corrigido pelo comprimento da tíbia. ANOVA<sub>one-way</sub> com post-hoc de *Duncan Test*. <sup>a</sup>diferente dos grupos CTL e LEU. <sup>b</sup>diferente do grupo PS.

## 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*. 1953;118(3062):273-4.
2. Dement W, Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1957;9(4):673-90.
3. Gamaldo CE, Spira AP, Hock RS, Salas RE, McArthur JC, David PM, et al. Sleep, function and HIV: a multi-method assessment. *AIDS and behavior*. 2013;17(8):2808-15.
4. Murillo-Rodriguez E, Arias-Carrion O, Zavala-Garcia A, Sarro-Ramirez A, Huitron-Resendiz S, Arankowsky-Sandoval G. Basic sleep mechanisms: an integrative review. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*. 2012;12(1):38-54.
5. Lesku JA, Vyssotski AL, Martinez-Gonzalez D, Wilzeck C, Rattenborg NC. Local sleep homeostasis in the avian brain: convergence of sleep function in mammals and birds? *Proceedings Biological sciences / The Royal Society*. 2011;278(1717):2419-28.
6. Franken P, Kopp C, Landolt HP, Luthi A. The functions of sleep. *The European journal of neuroscience*. 2009;29(9):1739-40.
7. Vassalli A, Dijk DJ. Sleep function: current questions and new approaches. *The European journal of neuroscience*. 2009;29(9):1830-41.
8. Siegel JM. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*. 2005;437(7063):1264-71.
9. Iber C, Ancoli-Israel, S., Chesson Jr., A. L., & Quan, S. F. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events*. Westchester IAAoSM, editor 2007. 59 p.
10. Timo-laria C, Negrao N, Schmidek WR, Hoshino K, Lobato de Menezes CE, Leme da Rocha T. Phases and states of sleep in the rat. *Physiology & behavior*. 1970;5(9):1057-62.
11. Valle AC, Timo-laria C, Fraga JL, Sameshima K, Yamashita R. Theta waves and behavioral manifestations of alertness and dreaming activity in the rat. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1992;25(7):745-9.

12. Porkka-Heiskanen T, Zitting KM, Wigren HK. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. *Acta physiologica*. 2013;208(4):311-28.
13. Shephard RJ, Shek PN. Interactions between sleep, other body rhythms, immune responses, and exercise. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee*. 1997;22(2):95-116.
14. Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet*. 1999;354(9188):1435-9.
15. Brouwers FM, Lenders JW. Sleep-disordered breathing and hypertension. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):967.
16. Harrison Y, Horne JA, Rothwell A. Prefrontal neuropsychological effects of sleep deprivation in young adults--a model for healthy aging? *Sleep*. 2000;23(8):1067-73.
17. Bonnet MH, Arand DL. Clinical effects of sleep fragmentation versus sleep deprivation. *Sleep medicine reviews*. 2003;7(4):297-310.
18. Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Annals of internal medicine*. 2004;141(11):846-50.
19. Tasali E, Van Cauter E, Hoffman L, Ehrmann DA. Impact of obstructive sleep apnea on insulin resistance and glucose tolerance in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(10):3878-84.
20. Spiegel K, Knutson K, Leproult R, Tasali E, Van Cauter E. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol* (1985). 2005;99(5):2008-19.
21. Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *Journal of sleep research*. 2005;14(1):83-90.
22. Hipolide DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *Journal of neuroendocrinology*. 2006;18(4):231-8.
23. Suchecki D, Antunes J, Tufik S. Palatable solutions during paradoxical sleep deprivation: reduction of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and lack of effect on energy imbalance. *Journal of neuroendocrinology*. 2003;15(9):815-21.

24. Galvao MO, Sinigaglia-Coimbra R, Kawakami SE, Tufik S, Suchecki D. Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(8):1176-83.
25. Everson CA, Crowley WR. Reductions in circulating anabolic hormones induced by sustained sleep deprivation in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;286(6):E1060-70.
26. Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep*. 1989;12(1):13-21.
27. Suchecki D, Lobo LL, Hipolide DC, Tufik S. Increased ACTH and corticosterone secretion induced by different methods of paradoxical sleep deprivation. *Journal of sleep research*. 1998;7(4):276-81.
28. Dattilo M, Antunes HK, Medeiros A, Monico-Neto M, Souza Hde S, Lee KS, et al. Paradoxical sleep deprivation induces muscle atrophy. *Muscle & nerve*. 2012;45(3):431-3.
29. Martins PJ, Marques MS, Tufik S, D'Almeida V. Orexin activation precedes increased NPY expression, hyperphagia, and metabolic changes in response to sleep deprivation. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2010;298(3):E726-34.
30. Tiba PA, Oliveira MG, Rossi VC, Tufik S, Suchecki D. Glucocorticoids are not responsible for paradoxical sleep deprivation-induced memory impairments. *Sleep*. 2008;31(4):505-15.
31. Gambineri A, Pelusi C, Pasquali R. Testosterone levels in obese male patients with obstructive sleep apnea syndrome: relation to oxygen desaturation, body weight, fat distribution and the metabolic parameters. *Journal of endocrinological investigation*. 2003;26(6):493-8.
32. Luboshitzky R, Lavie L, Shen-Orr Z, Herer P. Altered luteinizing hormone and testosterone secretion in middle-aged obese men with obstructive sleep apnea. *Obesity research*. 2005;13(4):780-6.
33. Monico-Neto M, Antunes HK, Dattilo M, Medeiros A, Souza HS, Lee KS, et al. Resistance exercise: A non-pharmacological strategy to minimize or reverse sleep deprivation-induced muscle atrophy. *Medical hypotheses*. 2013.
34. Dattilo M, Antunes HK, Medeiros A, Monico Neto M, Souza HS, Tufik S, et al. Sleep and muscle recovery: endocrinological and molecular basis for a new and promising hypothesis. *Medical hypotheses*. 2011;77(2):220-2.

35. Lungato L, Gazarini ML, Paredes-Gamero EJ, Tersariol IL, Tufik S, D'Almeida V. Sleep deprivation impairs calcium signaling in mouse splenocytes and leads to a decreased immune response. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1820(12):1997-2006.
36. Kalpidis IP, Kapoukranidou D, Charalambakis N, Chatzisotiriou A, Albani M. Three-dimensional morphometric mapping of rat muscle fibers. *Muscle & nerve*. 2013;48(6):951-7.
37. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal*. 2013;280(17):4294-314.
38. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*. 2011;91(4):1447-531.
39. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *Journal of muscle research and cell motility*. 1989;10(3):197-205.
40. Sher J, Cardasis C. Skeletal muscle fiber types in the adult mouse. *Acta neurologica Scandinavica*. 1976;54(1):45-56.
41. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of neurology*. 1970;23(4):369-79.
42. Sartorius CA, Lu BD, Acakpo-Satchivi L, Jacobsen RP, Byrnes WC, Leinwand LA. Myosin heavy chains IIa and IIc are functionally distinct in the mouse. *The Journal of cell biology*. 1998;141(4):943-53.
43. Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2013;16(3):243-50.
44. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Experimental neurology*. 1969;25(1):138-52.
45. Pratesi A, Tarantini F, Di Bari M. Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2013;10(1):11-4.
46. Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(3):1337-62.
47. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*. 2008;88(4):1379-406.
48. Sandri M. New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(3):223-9.

49. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117(3):399-412.
50. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal muscle*. 2011;1(1):4.
51. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology*. 2001;3(11):1014-9.
52. Aravamudan B, Mantilla CB, Zhan WZ, Sieck GC. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J Appl Physiol* (1985). 2006;100(5):1617-22.
53. Li JB, Goldberg AL. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*. 1976;231(2):441-8.
54. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
55. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology*. 2008;23:160-70.
56. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*. 2007;6(6):458-71.
57. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.
58. Wing SS. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(10):2075-87.
59. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*. 2002;82(2):373-428.
60. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 1999;96(5):635-44.
61. Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters*. 2010;584(7):1411-6.
62. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(1):25-39.

63. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
64. Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *British medical bulletin*. 2007;81-82:209-30.
65. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *The Journal of nutrition*. 2000;130(2):139-45.
66. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2008.
67. Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *The Journal of nutrition*. 2001;131(3):856S-60S.
68. Lynch CJ, Hutson SM, Patson BJ, Vaval A, Vary TC. Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;283(4):E824-35.
69. Kimball SR, Jefferson LS. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *The Journal of nutrition*. 2006;136(1 Suppl):227S-31S.
70. Hutson SM, Sweatt AJ, Lanoue KF. Branched-chain [corrected] amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *The Journal of nutrition*. 2005;135(6 Suppl):1557S-64S.
71. Zanchi NE, Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, de Siqueira Filho MA, Felitti V, Lira FS, et al. HMB supplementation: clinical and athletic performance-related effects and mechanisms of action. *Amino acids*. 2011;40(4):1015-25.
72. Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer research*. 2005;65(1):277-83.
73. Zanchi NE, Nicastro H, Lancha AH, Jr. Potential antiproteolytic effects of L-leucine: observations of in vitro and in vivo studies. *Nutrition & metabolism*. 2008;5:20.
74. Wilson JM, Fitschen PJ, Campbell B, Wilson GJ, Zanchi N, Taylor L, et al. International Society of Sports Nutrition Position Stand: beta-hydroxy-beta-

methylbutyrate (HMB). *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2013;10(1):6.

75. Gerlinger-Romero F, Guimaraes-Ferreira L, Giannocco G, Nunes MT. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate (HMBeta) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2011;21(2):57-62.

76. Van Koevering M, Nissen S. Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *Am J Physiol*. 1992;262(1 Pt 1):E27-31.

77. Anthony JC, Anthony TG, Layman DK. Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *The Journal of nutrition*. 1999;129(6):1102-6.

78. Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *The Journal of nutrition*. 2005;135(3):376-82.

79. Dodd KM, Tee AR. Leucine and mTORC1: a complex relationship. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302(11):E1329-42.

80. Vary TC, Goodman S, Kilpatrick LE, Lynch CJ. Nutrient regulation of PKCepsilon is mediated by leucine, not insulin, in skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005;289(4):E684-94.

81. Bolster DR, Vary TC, Kimball SR, Jefferson LS. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *The Journal of nutrition*. 2004;134(7):1704-10.

82. Vianna D, Teodoro GFR, Torres-Leal FL, Tirapegui J. Protein synthesis regulation by leucine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;46(1).

83. Dreyer HC, Drummond MJ, Pennings B, Fujita S, Glynn EL, Chinkes DL, et al. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(2):E392-400.

84. Nair KS, Short KR. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *The Journal of nutrition*. 2005;135(6 Suppl):1547S-52S.

85. van Loon LJ. Leucine as a pharmacconutrient in health and disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2012;15(1):71-7.

86. Pedroso JA, Nishimura LS, de Matos-Neto EM, Donato J, Jr., Tirapegui J. Leucine improves protein nutritional status and regulates hepatic lipid metabolism in calorie-restricted rats. *Cell biochemistry and function*. 2014;32(4):326-32.
87. Nakashima K, Ishida A, Yamazaki M, Abe H. Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;336(2):660-6.
88. Sugawara T, Ito Y, Nishizawa N, Nagasawa T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino acids*. 2009;37(4):609-16.
89. Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, et al. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle & nerve*. 2010;41(6):800-8.
90. Baptista IL, Silva WJ, Artioli GG, Guilherme JP, Leal ML, Aoki MS, et al. Correction: Leucine and HMB Differentially Modulate Proteasome System in Skeletal Muscle under Different Sarcopenic Conditions. *PloS one*. 2013;8(10).
91. Nicastro H, Zanchi NE, da Luz CR, de Moraes WM, Ramona P, de Siqueira Filho MA, et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. *Nutrition*. 2012;28(4):465-71.
92. Zanchi NE, Filho MA, Felitti V, Nicastro H, Lorenzetti FM, Lancha AH, Jr. Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation. *Journal of cellular physiology*. 2010;224(2):311-5.
93. Nicastro H, da Luz CR, Chaves DF, das Neves W, Valente KS, Lancha AH, Jr. Leucine supplementation combined with resistance exercise improves the plasma lipid profile of dexamethasone-treated rats. *Lipids in health and disease*. 2012;11:7.
94. Shah OJ, Anthony JC, Kimball SR, Jefferson LS. Glucocorticoids oppose translational control by leucine in skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2000;279(5):E1185-90.
95. Lei Arouca - Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008.
96. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. 8th ed. Washington (DC)2011.
97. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Washington (DC)2003.

98. Suchecki D, Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiology & behavior*. 2000;68(3):309-16.
99. Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain research*. 2004;1004(1-2):45-51.
100. American Veterinary Medical Association APoE. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001;218(5):669-96.
101. Hamalainen N, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1993;41(5):733-43.
102. Mayer M, Rosen F. Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol. *Am J Physiol*. 1975;229(5):1381-6.
103. Andric SA, Kojic Z, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Baburski AZ, Sokanovic SJ, et al. The opposite roles of glucocorticoid and alpha1-adrenergic receptors in stress triggered apoptosis of rat Leydig cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304(1):E51-9.
104. Mônico-Neto M. Efeitos do Treinamento Resistido Sobre a Atrofia Muscular Induzida pela Privação de Sono Paradoxal: UNIFESP; 2013.
105. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(8):457-65.
106. Pereira MG, Baptista IL, Carlassara EO, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PloS one*. 2014;9(1):e85283.
107. Wing SS, Lecker SH, Jagoe RT. Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2011;48(2):49-70.
108. Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1alpha signaling in skeletal muscle health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1271:110-7.
109. Moriscot AS, Baptista IL, Bogomolovas J, Witt C, Hirner S, Granzier H, et al. MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance. *Journal of structural biology*. 2010;170(2):344-53.

110. Reed SA, Sandesara PB, Senf SM, Judge AR. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(3):987-1000.
111. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013.
112. Krueger JM, Obal FJ, Fang J, Kubota T, Taishi P. The role of cytokines in physiological sleep regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;933:211-21.
113. Ramesh V, Thatte HS, McCarley RW, Basheer R. Adenosine and sleep deprivation promote NF-kappaB nuclear translocation in cholinergic basal forebrain. *Journal of neurochemistry*. 2007;100(5):1351-63.
114. Yehuda S, Sredni B, Carasso RL, Kenigsbuch-Sredni D. REM sleep deprivation in rats results in inflammation and interleukin-17 elevation. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(7):393-8.
115. Morrow JD, Opp MR. Sleep-wake behavior and responses of interleukin-6-deficient mice to sleep deprivation. *Brain, behavior, and immunity*. 2005;19(1):28-39.
116. Haegens A, Schols AM, Gorissen SH, van Essen AL, Snepvangers F, Gray DA, et al. NF-kappaB activation and polyubiquitin conjugation are required for pulmonary inflammation-induced diaphragm atrophy. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302(1):L103-10.
117. Wu CL, Cornwell EW, Jackman RW, Kandarian SC. NF-kappaB but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. *American journal of physiology Cell physiology*. 2014;306(8):C762-7.
118. Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British journal of pharmacology*. 2008;154(3):557-68.
119. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology*. 2001;3(11):1009-13.
120. Chen H, Zhao Z, Zheng J, Chen X, Zou J, Shi Y, et al. The effect of IGF-1 on symptoms of sleep deprivation in a rat model of inflammatory heart disease and metabolic syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;446(4):843-9.

121. Kumagai AK. Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 1999;15(4):261-73.
122. Duan L, Ying G, Danzer B, Perez RE, Shariat-Madar Z, Levenson VV, et al. The prolyl peptidases PRCP/PREP regulate IRS-1 stability critical for rapamycin-induced feedback activation of PI3K and AKT. *The Journal of biological chemistry*. 2014.
123. Haruta T, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM, et al. A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Molecular endocrinology*. 2000;14(6):783-94.
124. Zanchi NE. Efeito da Suplementação com Leucina Sobre a Resposta Atrófica da Musculatura Esquelética Induzida pelo Uso de Dexametasona: Universidade de São Paulo, USP; 2011.
125. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.
126. Yin HN, Chai JK, Yu YM, Shen CA, Wu YQ, Yao YM, et al. Regulation of signaling pathways downstream of IGF-I/insulin by androgen in skeletal muscle of glucocorticoid-treated rats. *The Journal of trauma*. 2009;66(4):1083-90.
127. McAllan L, Cotter PD, Roche HM, Korpela R, Nilaweera KN. Impact of leucine on energy balance. *Journal of physiology and biochemistry*. 2013;69(1):155-63.
128. Pain VM. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1996;236(3):747-71.
129. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr., et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 1994;371(6500):762-7.
130. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science*. 2011;334(6056):678-83.
131. Martin WF, Armstrong LE, Rodriguez NR. Dietary protein intake and renal function. *Nutrition & metabolism*. 2005;2:25.
132. Bankir L, Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, Ahloulay M, Promeneur D. Direct and indirect cost of urea excretion. *Kidney international*. 1996;49(6):1598-607.
133. Mak RH. Effect of metabolic acidosis on branched-chain amino acids in uremia. *Pediatric nephrology*. 1999;13(4):319-22.

134. Hellgren EC, Lochmiller RL, Amoss MS, Jr., Grant WE. Endocrine and metabolic responses of the collared peccary (*Tayassu tajacu*) to immobilization with ketamine hydrochloride. *Journal of wildlife diseases*. 1985;21(4):417-25.
135. Cohen I, Bogin E, Chechick A, Rzetelny V. Biochemical alterations secondary to disuse atrophy in the rat's serum and limb tissues. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 1999;119(7-8):410-7.