

Efeito dos aminoácidos de cadeia ramificada no músculo imobilizado e no músculo desnervado

Effect of branched-chain amino acids on immobilized skeletal muscle and denervated muscle

Vitor Alexandre Pezolato¹, Maria Luiza Ozores Polacow², Camila Limongi Pacheco³,
Andre Alves Lico Mascarin¹, Carlos Alberto da Silva⁴

RESUMO

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo avaliar histologicamente o músculo sóleo imobilizado e desnervado de ratos suplementados com aminoácidos de cadeia ramificada.

Materiais e Métodos: Para a realização da pesquisa foram utilizados 30 ratos *navergicus albinus* machos, variedade *Wistar*, com 3 a 4 meses de vida, divididos em 6 grupos (n=5) e denominados: controle (C), desnervado 7 dias (D), imobilizado 7 dias (I), suplementado com aminoácidos de cadeia ramificada 7 dias (BCAA), desnervado suplementado com aminoácidos de cadeia ramificada (D+BCAA) e imobilizado suplementado com aminoácidos de cadeia ramificada (I+BCAA). Os animais desnervados passaram pelo seccionamento do nervo ciático (1 cm). Os animais dos grupos imobilizados receberam uma órtese de resina acrílica acoplada na pata posterior promovendo a imobilização. Após a fase experimental os animais foram eutanasiados e os músculos foram analisados histologicamente. O teste de *Shapiro-Wilk* avaliou a normalidade dos dados, seguido da análise de variância e, posteriormente, *Tukey-Kramer* com nível de significância menor de 5%.

Resultados: A suplementação aumentou a área de secção transversa da fibra muscular em 74,94% no grupo I+BCAA e 90,37% no grupo D+BCAA em relação aos grupos I e D, respectivamente. Houve aumento de 97,21% na densidade de área de tecido conjuntivo no grupo BCAA em relação ao grupo C, porém a suplementação promoveu redução de 34,44% no grupo D+BCAA em relação ao grupo D, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos I+BCAA e I.

Conclusão: Observa-se que a utilização dos aminoácidos de cadeia ramificada pode diminuir a atrofia provocada pelo desuso muscular, tanto na condição de desnervação quanto na condição de imobilização.

Palavras-chave: aminoácidos de cadeia ramificada; atrofia muscular; imobilização; ratos.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to histologically evaluate the soleus muscle in a state of immobilization and denervation in rats supplemented with branched chain amino acids.

Materials and Methods: To conduct the study 30 male rats *navergicus Albinus*, *Wistar* variety, were used, with 3-4 months of age, divided into 6 groups (n=5): control (C), denervated 7 days (D), immobilized 7 days (I), supplemented with branched chain amino acids 7 days (BCAA), denervated supplemented with branched chain amino acids (BCAA + D) and immobilized supplemented with branched chain amino acids (BCAA + I). The animals were denervated by sectioning the sciatic nerve (1 cm). The immobilized groups received a stent coupled with acrylic resin in the hind paw promoting immobilization. After the experimental period the animals were euthanized and the muscles were analyzed histologically. The *Shapiro-Wilk* test evaluated the normality of the data, followed by analysis of variance and then *Tukey-Kramer* with significance level below 5%.

Results: Supplementation increased the cross-sectional area of the muscle fiber in 74.94% in group I+BCAA and 90.37% in group D+BCAA compared to groups I and D, respectively. There was an increase of 97.21% in the connective tissue area density in the BCAA group compared to group C, although supplementation promoted reduction of 34.44% in group D+BCAA compared to group D, however, there was no significant difference between groups I and BCAA+I.

Conclusions: It is observed that the use of branched chain amino acids can decrease the muscle atrophy caused by disuse, both the condition as provided by denervation or immobilization.

Keywords: branched-chain amino acids; muscular atrophy; immobilization; rats.

¹Fisioterapeuta. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

²Graduação em História Natural. Doutora em Biologia Patologia Buco Dental. Professora do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

³Acadêmica do Curso de Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

⁴Biólogo. Doutor em Fisiologia. Professor do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Metodista de Piracicaba.

INTRODUÇÃO

A imobilização, seja em qualquer de seus modelos, é um recurso comumente utilizado no tratamento de fraturas ósseas, lesões musculares e articulares, rupturas ligamentares, doenças degenerativas e também após cirurgias¹. Tanto a imobilização quanto a desnervação são modelos de desuso e promovem alterações que podem ser observadas pela diminuição do trofismo, aumento do tecido conjuntivo, diminuição da taxa de síntese e aumento da taxa de degradação das proteínas miofibrilares, diminuição do tamanho da célula, do núcleo, da densidade de cromatina e da atividade celular, o que resulta, assim, na menor capacidade de regeneração no músculo acometido^{2,3}. Ademais, o desuso compromete a homeostasia muscular, pois induz resistência a insulina, redução das reservas de glicogênio, com consequente redução de força e resistência à fadiga^{4,5}.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) são a valina, leucina e isoleucina, e correspondem aproximadamente a 35% dos aminoácidos essenciais das proteínas musculares. A concentração destes aminoácidos é diferente em relação ao tipo de fibra muscular, sendo 20-30% maior em fibras de contração lenta (tipo I) em comparação àquelas de contração rápida (tipo IIb)⁶.

Os BCAA atuam na manutenção da proteína corporal como fonte de nitrogênio, auxiliando a síntese de alanina e glutamina. A leucina, principalmente, estimula o processo de anabolismo, bem como a regulação dos tanto da síntese quanto da degradação proteica muscular. Apresentam também um potencial efeito terapêutico, já que esses aminoácidos podem minimizar a perda de massa magra durante a redução de massa corporal e favorecer o processo de regeneração após lesão provocada por exercícios exaustivos⁷⁻⁹. Eles são pouco oxidados pelo fígado, e, desta forma, grande parte é metabolizada nos tecidos periféricos, principalmente no músculo esquelético⁷.

Segundo Solerte et al.¹⁰, a suplementação oral com BCAA em sujeitos idosos com sarcopenia, promoveu aumento da massa magra corporal, e esta melhora pode estar ligada ao aumento da sensibilidade à insulina, à redução do fator de necrose tumoral- α e ao aumento

significativo do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF -1).

Mesmo havendo um grande interesse pela suplementação com BCAA em atletas, há escassez de trabalhos explorando o efeito do BCAA sobre músculos imobilizados ou desnervados. Neste sentido, segundo Watanabe¹¹, a suplementação com BCAA foi efetiva em manter o status nutricional dos músculos imobilizados, demonstrando uma ação anti-catabólica, fator este que pode favorecer uma reabilitação acelerada na fase pós-imobilização, mas não foi realizado um estudo morfométrico nos músculos imobilizados.

Diante do exposto, a hipótese que se levanta é que a suplementação com BCAA pode atenuar as alterações morfológicas deletérias provocadas pela imobilização e desnervação. O objetivo deste trabalho foi investigar as alterações morfológicas do músculo sóleo de ratos submetidos à desnervação ou imobilização e suplementados com BCAA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados Ratos *Wistar*, com idade entre 3 a 4 meses (250±50g) que permaneceram em condições controladas de biotério, submetidos a ciclo foto periódico de 12h claro/escuro e de temperatura (23±2°C), alimentados com ração e água *ad libitum*, e tratados segundo recomendações do *Guide for Care Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996)*. Esta pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIMEP, protocolo nº 09/2012.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais: controle (C), desnervado por 7 dias (D), imobilizado por 7 dias (I), suplementado com BCAA 7 dias (BCAA), desnervado suplementado com BCAA 7 dias (BCAA+D) e imobilizado suplementado com BCAA 7 dias (BCAA+I). A suplementação com BCAA foi administrada através da via orogástrica por gavagem na concentração de 0,5 mL/dia, segundo Kobayashi et al.¹².

Para a imobilização e desnervação, os animais foram anestesiados com uma mistura de Dopalen® (Cloridrato de Cetamina) e Rompun® (Cloridrato de Xilazina) na proporção 3:2, em dose de 0,09 mL/100g e 0,06 mL/100g de massa corporal, respectivamente, via

intramuscular. A desnervação foi efetuada segundo modelo de Coderre et al.¹³, no qual a parte posterior da coxa esquerda foi tricotomizada e uma porção do nervo ciático (1 cm) foi seccionado e retirado. Para a imobilização, uma órtese de resina acrílica foi acoplada a pata posterior esquerda de cada animal, associada a uma cinta de PVC ligada por rotadores laterais, permitindo a manutenção da articulação do tornozelo em posição de 90° e possibilitando a liberdade de movimento nas articulações do joelho e quadril, não restringindo a deambulação do animal de acordo com o modelo de Silva et al.⁵. Após 7 dias de tratamento, os animais foram decapitados, o músculo sóleo retirado e pesado, após essa análise sua porção ventral foi fixada em solução tamponada de formol 10% por 24 horas, e tratada convenientemente para inclusão em Paraplast.

Cortes transversais não seriados com 7 µm de espessura foram corados em Hematoxilina-Eosina (HE). Para cada animal, foram selecionados 5 cortes e em cada um deles foram captadas aleatoriamente, imagens de 5 áreas, utilizando um *software* Image Pró-plus® 6.2 e uma câmera digital (JVC) acoplada a um microscópio (Zeiss) com integração a um microcomputador. Todas as imagens foram captadas com uma objetiva 10x, sendo que o *software* permitiu visualizar as imagens em uma área da tela (área de flame) de 190.464,12 µm². Para a análise da secção transversa das fibras foram analisadas 15 fibras por área em cada corte, totalizando 375 fibras por animal, de forma aleatória.

A densidade de área de tecido conjuntivo (em %) foi obtida por meio da planimetria por contagem de pontos¹⁴. Segundo esta técnica, no *software* Image Pró-Plus® 6.2 colocamos uma tela quadriculada, composta por 165 quadrados, com 140 intersecções de retas sobre cada imagem de corte transversal de músculo. A intersecção de reta que coincidia sobre o tecido conjuntivo era computada e a porcentagem de área foi calculada segundo a fórmula:

Nº de intersecções que coincidiam sobre o tecido conjuntivo X 100

Nº total de intersecções = 140

Todas as imagens foram captadas com uma objetiva 10x, sendo que o *software* permitiu visualizar as

imagens em uma área da tela (área de flame) de 190.464,12 µm². Para a análise da secção transversa das fibras foram analisadas 15 fibras por área em cada corte, totalizando 375 fibras por animal, de forma aleatória.

Os dados coletados foram tabulados e posteriormente analisados utilizando o *software* estatístico *Graphpad Prism* 6. A análise estatística foi precedida pela aplicação do teste *Shapiro-Wilk* para verificação da normalidade dos dados. Para as comparações entre os grupos o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) seguido de *Tukey-Kramer* de comparações múltiplas foi feito. Em todos os casos foi adotado um valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

RESULTADOS

A massa relativa do músculo sóleo apresentou redução significativa nos grupos imobilizados e desnervados (figura 1). A suplementação com BCAA, embora tenha apresentado aumento na massa relativa, esta não foi significativa ($p=0,167$) se comparado ao músculo sóleo do grupo controle.

Na análise morfométrica do músculo sóleo, as médias de área da secção transversa das fibras estão apresentadas na figura 2 e figura 3, na qual se pode observar que o grupo imobilizado apresenta redução significativa de 52,7% enquanto no grupo desnervado a redução foi de 66,5% quando comparado ao grupo controle.

Ao se comparar o grupo tratado com BCAA com o grupo controle, observa-se que a média da área das fibras não diferiu. No entanto, no grupo imobilizado suplementado com BCAA, houve um aumento significativo de 74,9% em relação ao imobilizado, não diferindo do grupo controle. No grupo desnervado suplementado com BCAA, a média da área das fibras mostra aumento significativo de 90,3% em relação ao grupo desnervado, mas manteve-se diferente do controle, com redução de 36,3%.

A figura 4 mostra em percentual, a densidade de área de tecido conjuntivo nos diferentes grupos experimentais, onde se pode observar aumento significativo de 263,7% no músculo imobilizado e 270,9% no desnervado em relação ao grupo controle

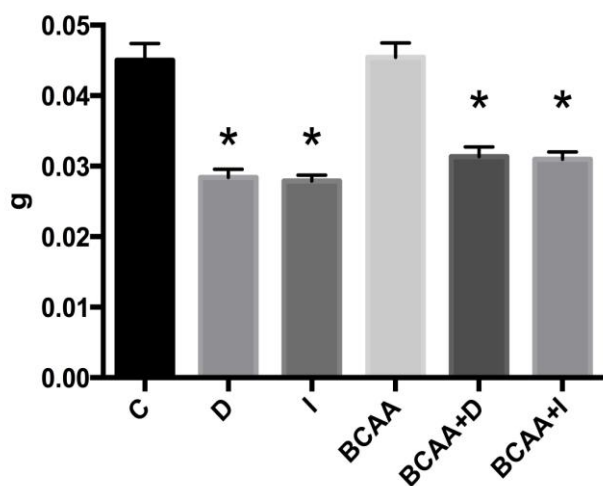


FIGURA 1 – Massa relativa, em gramas, do músculo sóleo analisado dos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ se comparado com o grupo C.

No grupo controle tratado com BCAA, houve aumento significativo de 97,2% na densidade de área de conjuntivo quando comparado ao grupo controle. Por sua vez, no grupo imobilizado tratado com BCAA este parâmetro não foi alterado, mas nota-se um ligeiro aumento (não significativo) de 6,4% em relação ao grupo imobilizado. Já o grupo desnervado tratado com BCAA apresentou redução significativa de 34,4% quando comparado com o grupo desnervado.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que a suplementação com BCAA provocou alterações no músculo sóleo, aumentando a área de secção transversa, tanto nos músculos imobilizados quanto nos desnervados.

Pelo fato de ter predominantemente fibras lentas (tipo I), o músculo sóleo foi utilizado para o estudo morfométrico. Além disto, a arquitetura deste músculo, com fibras paralelas ao seu longo eixo, facilita este tipo de análise. Outro fator que condicionou esta escolha é a maior concentração de BCAA na fibra muscular de contração lenta em relação à de contração rápida^{6,15}.

De acordo com a literatura, os valores normais para secção transversa da fibra do músculo sóleo é de 2084 a 3500 μm^2 ¹⁶. Neste estudo a média do grupo controle foi de 2791,75 μm^2 , mostrando que a metodologia de análise adotada é confiável. Dependendo do músculo avaliado, a literatura mostra valores que variam de 1 a

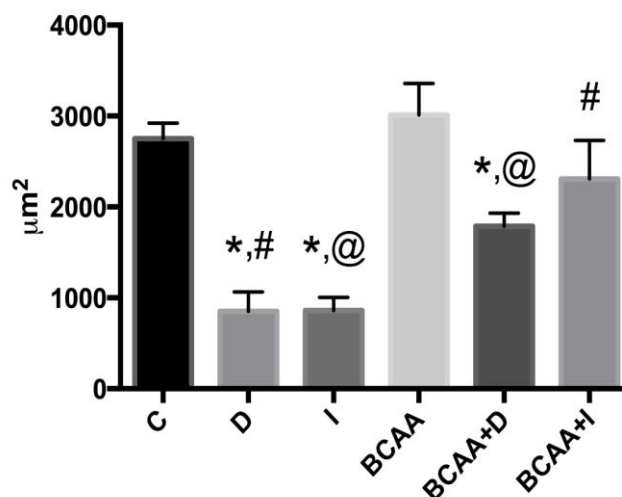


FIGURA 2 – Área de secção transversa de fibras do músculo sóleo nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ se comparado com o grupo C; # $p < 0,05$ se comparado com o grupo I; @ $p < 0,05$ se comparado com o grupo D.

10% de tecido conjuntivo intramuscular¹⁷. No presente trabalho, observou-se um valor de 8,66% no músculo sóleo do grupo controle, demonstrando estar de acordo com os valores da referência.

Os resultados apresentados para a massa relativa, bem como para área da secção transversa do músculo sóleo do grupo controle não mostraram diferença significativa quando comparados com os dos animais tratados com BCAA. Holm et al.¹⁸, relataram que a taxa de síntese de proteínas miofibrilares são dependentes da intensidade de contração e não da alimentação isoladamente. Acrescentaram que somente quando há contração utilizando cargas é que as vias do complexo MAPK e mTOR I-dependentes são ativadas.

Neste trabalho foi encontrado aumento na densidade de área de tecido conjuntivo em músculo sóleo dos animais tratados BCAA. Babraj et al.¹⁹, mostraram que a síntese de colágeno em músculo esquelético e em pele de humanos não se altera com a alimentação em situação de repouso. Do mesmo modo, Holm et al.¹⁸ relataram que fibroblastos do músculo esquelético, em humanos, aumenta o *turnover* do tecido conjuntivo em grande parte influenciada pelo estresse mecânico, independente da intensidade de exercício e não varia com a disponibilidade de alimento. Como a matriz extracelular não se restringe ao colágeno, proteína abordada nos trabalhos citados, é possível que a ingestão do BCAA tenha alterado a síntese ou o

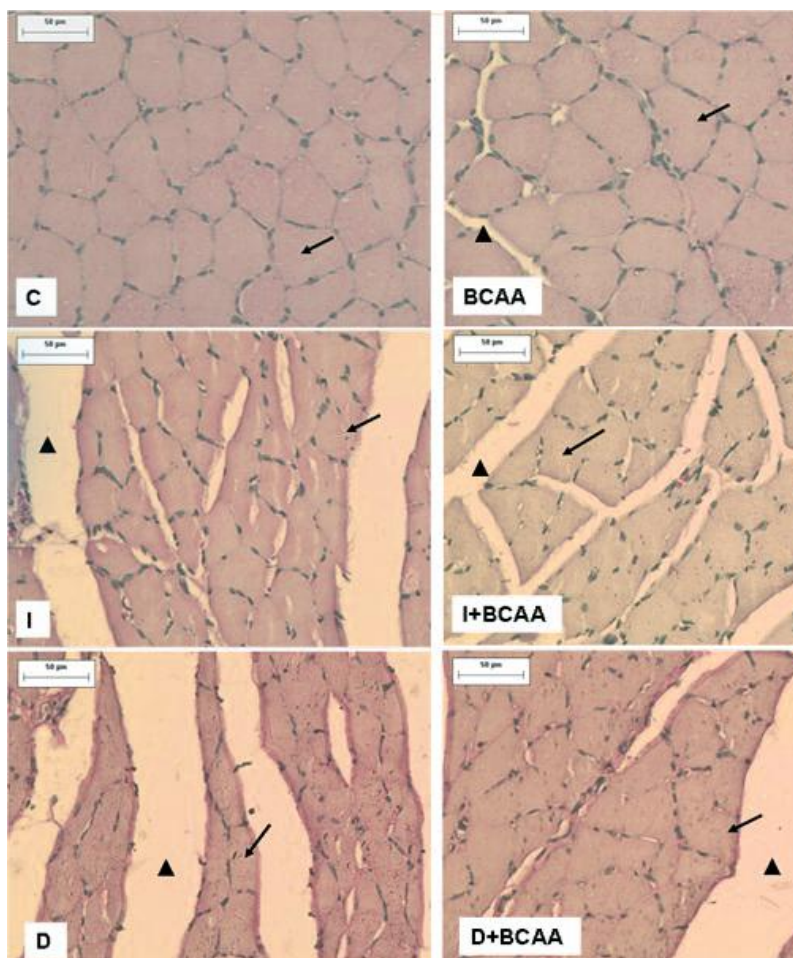


FIGURA 3 - Micrografias do músculo sóleo do grupo controle (C), controle tratado com BCAA (BCAA), imobilizado (I), imobilizado tratado com BCAA (I+BCAA), desnervado (D), e desnervado tratado com BCAA (D+BCAA). Nota-se redução da área da secção transversa nos músculos dos grupos I e D – seta. Nos grupos I+BCAA e D+BCAA, aumento da área das fibras, mas diferentes do controle. As cabeças de setas mostram o tecido conjuntivo com porcentagem de área maior no grupo I e D. Com a suplementação com BCAA o grupo D+BCAA apresentou redução desta área. (Hematoxilina- Eosina, 200x, barra= 50µm).

turnover de outros componentes, como proteínas ou glicosaminoglicanas.

A imobilização, comumente utilizada na prática clínica, promove efeitos deletérios no sistema músculo esquelético e alguns fatores como o tipo de fibra e a posição de imobilização podem influenciar os resultados desta prática. Quanto ao tipo de fibra, vários trabalhos mostram que músculos antigravitacionais e músculos com predominância de fibras lentas têm um maior grau de susceptibilidade à atrofia²⁰.

Além do tipo de fibra muscular, outro fator importante a se questionar é a posição de imobilização. Neste estudo foi adotada a posição de 90° de tornozelo, pois a fixação do membro de maneira encurtada, é a que provoca maiores alterações como: redução das reservas de glicogênio, atrofia, diminuição de sarcômeros em série, proliferação de tecido conjuntivo e,

consequentemente, diminuição da força muscular¹⁶, sendo adotado 7 dias de imobilização, pois segundo Lima et al.²¹ este período é suficiente para provocar adaptações de sarcômero, na morfometria, assim como alterações nas propriedades mecânicas, utilizando o mesmo modelo experimental.

A imobilização por diferentes períodos acarreta uma atrofia muscular variando de 15 a 70% na área da fibra, dependendo do tipo de fibra avaliada²². Cancellero et al.²³ relataram redução de 44,14% na área da fibra do músculo sóleo imobilizado em posição encurtada por 7 dias, nas mesmas condições experimentais do presente trabalho, no qual se obteve redução de 52,70%.

Independente do modelo de desuso muscular utilizado (imobilização, tenotomia, ou desnervação) ocorre também aumento do tecido conjuntivo variando de 50 a 700%. Cancellero et al.²³ notou um aumento de

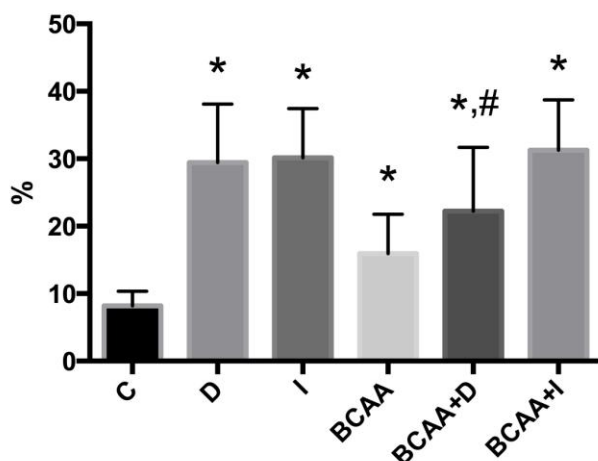


FIGURA 4 – Porcentagem de área do tecido conjuntivo dos diferentes grupos experimentais. * $p < 0,05$ se comparado com o grupo C; # para $p < 0,05$ se comparado com o grupo I.

216% com 7 dias de imobilização, dados confirmados por este estudo, que observou um aumento de 263,75% nas mesmas condições experimentais.

De maneira geral, o processo de imobilização reduz os componentes da matriz extracelular em 40% no ácido hialurônico, em 30% na condroitina-4-sulfato e condroitina-6-sulfato, bem como reduz a massa de colágeno na ordem de 10% e aumenta sua taxa de renovação (“turnover”), com degradação e síntese acelerados. Com a imobilização há redução do conteúdo de água e de GAG (glicosaminoglicanas), redução da matriz extracelular, associada com diminuição na lubrificação entre as ligações cruzadas das fibras colágenas, aumentando o ritmo de renovação destas fibras²⁴.

Como não há forças fisiológicas atuando sobre este tecido conjuntivo, isso impede a formação de ligações cruzadas, dando origem a fibras imaturas, responsáveis pela fibrose²⁵. Como pode ser observado pela figura 3 e figura 4, o tecido conjuntivo do sóleo no grupo imobilizado e tratado com BCAA permaneceu com a mesma porcentagem de área do que no grupo imobilizado, mas não se observou fibrose, pois o colágeno seria visível, pela coloração pela Eosina utilizada neste experimento.

Em relação à média da secção transversa do sóleo do grupo imobilizado+BCAA houve um aumento significativo de 74,94% em relação ao imobilizado, não diferindo do grupo controle. Isto se deve, muito

provavelmente, à ação da leucina, presente na suplementação utilizada neste trabalho. É sabido que os produtos do metabolismo da leucina em células β pancreáticas, podem ativar fatores reguladores da tradução e como consequência ativar importantes sistemas reguladores das vias anabólicas, com destaque a mTOR, aumentando a síntese protéica no local^{26,27}. Essa ação é maior quando há contrações musculares, as quais podem ter ocorrido, de forma isométrica, nos ratos imobilizados.

O modelo de desnervação aqui empregado, neurotmesa, no qual o nervo foi seccionado por completo, acarreta alterações morfológicas, como diminuição da massa muscular, da área de secção transversa das fibras, bem como aumento do tecido conjuntivo no endomísio²⁸. Os resultados do presente estudo vêm corroborar com estes trabalhos, mostrando redução de 66,55% na área de secção transversa nas fibras do músculo sóleo após 7 dias de desnervação. No sóleo desnervado dos animais tratados com BCAA a média da área das fibras foi 90% maior comparada com o músculo desnervado, mas manteve-se diferente do controle com redução de 36,31%.

Dentre os BCAAs, acredita-se que a leucina seja o aminoácido de maior importância para a recuperação muscular. Sabe-se que a suplementação oral é capaz de elevar sua concentração intracelular, sendo que altas concentrações são fundamentais para ativação da proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e de fatores de iniciação de transdução que, por sua vez, são responsáveis pela recuperação da síntese protéica muscular após o exercício de resistência ou de força²⁹.

Tem sido demonstrado também, que a desnervação provoca modificações relacionadas ao metabolismo de carboidratos, principalmente a resistência à insulina, desencadeada pela redução na atividade das enzimas reguladoras das vias metabólicas ligadas à interface pós-receptor da insulina; redução na população do GLUT4 (transportador de glicose tipo 4); redução na concentração citosólica do RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) do GLUT 4; redução na expressão gênica dos transportadores GLUT 1 (transportador de glicose tipo 1) e GLUT 4; redução na atividade das enzimas participantes da glicólise e da enzima glicogênio

sintetase, bem como redução na habilidade da insulina em ativá-la¹³. Esses eventos associados participam das alterações metabólicas que predisõem as fibras musculares à hipotrofia.

Por sua vez, os BCAAs melhoram o metabolismo da glicose no músculo esquelético, tecido adiposo e no fígado, mas, os mecanismos moleculares em cada órgão são diferentes. No músculo esquelético, os BCAAs promovem a captação de glicose através da ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), da proteína quinase C e, posteriormente, translocação do transportador de glicose (GLUT) 1 e GLUT4 para a membrana plasmática^{30,31}.

O BCAA conseguiu realizar anticatabolismo na fase aguda da imobilização e desnervação experimental. Clinicamente, é comum que indivíduos não realizem exercícios físicos na imobilização devido o uso de gesso/tipoia, sendo que no quadro de desnervação, exercícios físicos podem influenciar de forma negativa a regeneração nervosa periférica³², necessitando de um suplemento que atenua a degradação proteica. Este estudo se preocupou em relatar os efeitos da suplementação com BCAA nos quadros de desnervação e imobilização. No entanto ainda se tem necessidade de estudos demonstrando os efeitos da leucina, valina e isoleucina, quando ingeridas de maneira isolada em quadros de desuso muscular.

Os resultados morfométricos do músculo sóleo imobilizado e/ou desnervado aqui apresentados, demonstram que a suplementação com BCAA pode ser um recurso interessante para ser utilizado, na tentativa de diminuir a atrofia provocada pelo desuso muscular. Dessa maneira, a suplementação com BCAA alterou a morfologia do músculo sóleo em desuso por 7 dias, pois diminuiu a atrofia desencadeada pela imobilização e pela desnervação.

REFERÊNCIAS

- Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012; 3(3):163-79.
- Kern H, Hofer C, Modlin M, Forstner C, Raschka-Hogler D, Mayr W, Stohr H. Denervated muscles in humans: limitations and problems of currently used functional electrical stimulation training protocols. *Artif Organs*. 2002; 26(3):216-8.
- Kujawa M, Baran W, Jankowska-Steifer E. Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilization after soleus muscle denervation. *Exp and Mol Pathol* 2005; 78(1):78-85.
- Henriksen EJ, Roodnick KJ, Mondon CE, James DE, Holloszy JO. Effect of denervation or unweighting on GLUT 4 protein in rat soleus muscle. *J Appl Physiol*. 1991; 70:2322-27
- Silva CA, Guirro RRJ, Polacow MLO, Cancelliero KM, Durigan JLQ. Rat hindlimb joint immobilization with acrylic resin orthoses. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(7):979-85.
- Rogero MM, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2008; 44(4):563-75.
- Shimomura Y, Harris RA. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. *J Nutri*. 2006; 136:232-33.
- Nicastro H, Da Luz CR, Chaves DF, Bechara LR, Voltarelli VA, Rogero MM, Lancha AHJ. Does branched-chain amino acids supplementation modulate skeletal muscle remodeling through inflammation modulation? possible mechanisms of action. *J Nutr Metab*. 2012; 20:121-36.
- da Luz CR, Nicastro H, Zanchi NE, Chaves DF, Lancha AHJr. Potential therapeutic effects of branched-chain amino acids supplementation on resistance exercise-based muscle damage in humans. *J Int Soc Sports Nutr*. 2011; 14:8-23.
- Solerte SB, Gazzaruso C, Bonacasa R, Rondanelli M, Zamboni M, Basso C, Locatelli E, Schifino N, Giustina A, Fioravanti M. Nutritional supplements with oral amino acid mixtures increases whole-body lean mass and insulin sensitivity in elderly subjects with sarcopenia. *Am J Cardiol*. 2008; 101(11A):69E-77E.
- Watanabe RCT. As ações do BCAA associado à estimulação elétrica neuromuscular em músculos imobilizados de ratos [dissertação]. Piracicaba, SP: Universidade Metodista de Piracicaba; 2010.
- Shimomura Y, Yakemoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N, Kobayashi H, Mawatari K. Nutraceuital effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J Nutr*. 2006; 136(2):529-32.
- Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, Pilch PF. Alteration in the expression of GLUT 1 and GLUT 4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscle. *Endocrinology*. 1992; 131(4):1821-5.
- Mandarim-De-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative Morphology. In: Hewitson TD, Darby IA. *Histology Protocols*. New York: Humana Press; 2010. p. 211-25.
- Gualano AB, Bozza T, Lopes de Campos P, Roschel H, dos Santos Costa A, Luiz Marquezi M, Benaliti F, Helbert Lancha Junior A. Branched-chain amino acids supplementation enhances exercise capacity and lipid oxidation during endurance exercise after muscle glycogen depletion. *J Sports Med Phys Fitness*. 2011; 51(1):82-8.
- Gomes ARS, Coutinho EL, França CN, Polonio J, Salvini TF. Effect of one stretch a week applied to the immobilized soleus muscle on rat muscle fiber morphology. *Braz J Med And Biol Res*. 2004; 37(10):1473-80.
- Jarvinen TAH, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TLN, Jarvinen M. Organization and distribution of a intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002; 23(3):245-54.
- Holm L, Van Hall G, Rose AJ, Miller BF, Doessing S, Richter EA, Kjaer M. Contraction intensity and feeding affect collagen and myofibrillar protein synthesis rats differently in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298(2):E257-E269.

19. Babraj JÁ, Cuthbertson DJ, Smith K, Langberg H, Miller B, Kroegsgaard MR, Kjaer M, Rennie MJ. Collagen synthesis in human musculoskeletal tissues and skin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 nov;289(5):E864-869.
20. Tanaka T, Kariya Y, Hoshino Y. Histochemical study on the changes in muscle fibers in relation to the effects of aging on recovery from muscular atrophy caused by disuse in rats. *J Orthop Sci.* 2004; 9:76-85.
21. Lima SC, Caierão QM, Durigan JLQ, Schwarzenbeck A, Silva CA, Minamoto VB, Guirro RRJ. Curto período de imobilização provoca alterações morfométricas e mecânicas no músculo de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2007; 11(4):297-302.
22. Qin L, Appell HJ, Chan KM, Maffulli N. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbit. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997; 78:512-7.
23. Cancelliero KM, Durigan JLQ, Vieira RP, Silva CA, Polacow MLO. The effect of a low dose of clenbuterol on rat soleus muscle submitted to joint immobilization. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41(12):1054-58.
24. Akeson WH, Amiel D, Abel MF, Garfin SR, Woo SL. Effects of immobilization on joints. *Clin Orthop Relat Res.* 1987; 219:28-37.
25. Amiel D, Woo SL, Harwood FL, Akeson WH. The effect of immobilization on collagen turnover in connective tissue: a biochemical correlation. *Acta Orthop Scand.* 1982; 53:325-32.
26. Lewis MI, Bodine SC, Kamangar N, Xu X, Da X, Fournier M. Effect of severe short-term malnutrition on diaphragm muscle signal transduction pathway influencing protein turnover. *J Appl Physiol.* 2006; 100:1799-806.
27. Kimball SR, Jefferson LS. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(2):500S-507S.
28. Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 2000; 23(4):617-26.
29. Norton LE, Layman DK. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *J Nutr.* 2006; 136:533S-537S.
30. Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 299:693-96.
31. Nishitani S, Takehana K, Fujitani S, Sonaka I. Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288:G1292-1300.
32. Amako M, Nemoto K. Influence of water immersion stress on peripheral nerve recovery in the rat. *J Orthop Sci.* 1998; 3(1):32-41.

Endereço para correspondência:

Vitor Alexandre Pezolato
Duque de Caxias n° 47
Santa Barbara d'Oeste/SP – CEP 13450-015
Telefone: +55 19 991883221
E-mail: vitor.pezolato@gmail.com