CARLOS FLORES RODRIGUES JUNIOR

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA
E/OU DO TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO NAS
VIAS DE SINALIZAÇÃO DA SÍNTESE E
DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

CARLOS FLORES RODRIGUES JUNIOR

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA
E/OU DO TREINAMENTO FÍSICO RESISTIDO NAS
VIAS DE SINALIZAÇÃO DA SÍNTESE E
DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a Dr^a Tania Cristina

Pithon Curi

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rodrigues Junior, Carlos Flores.

Efeitos da suplementação com glutamina e/ou do treinamento físico resistido nas vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de ratos / Carlos Flores Rodrigues Junior. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Tania Cristina Pithon Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Suplementação e exercício físico.

Versão do título para o inglês: Effects of glutamine supplementation and/or resistance exercise training on signalling pathways of protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles.

1. Exercício físico 2. Hipertrofia muscular 3. p4EBP-1 4. pS6 5. pmTOR 6. Aminoácido I. Curi, Profa. Dra. Tania Cristina Pithon II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB08/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carlos Flores Rodrigues Junior.

Título da Tese: Efeitos da suplementação com glutamina e/ou do treinamento físico resistido nas vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Tania Cristina Pithon Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **012** nas fls. **125** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rui Curi**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos da suplementação com glutamina e treinamento resistido nas vias de síntese e degradação protéica do músculo esquelético*" do qual participam o(s) alunos(s) **Carlos Flores Rodrigues Junior**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **10.04.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 12 de abril de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

*Aos meus pais, familiares e amigos, pelo
constante encorajamento e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças todos os dias.

Ao meu pai Carlos Flores Rodrigues que sempre me deu o suporte necessário.

À minha mãe, o meu maior exemplo.

À minha orientadora Tania Cristina Python Curi, a minha admiração por ter me dado uma oportunidade e acreditado no meu trabalho.

Ao professor Rui Curi, o meu respeito pelo constante encorajamento e suporte.

Ao professor Sandro Hirabara pela orientação e amizade.

A todos os amigos do ICB, em especial Gabriel Marzuca, Kaio Vitzel, Adilson Alves, Alice Cristina Rodrigues, Renato Nachbar, Alcione Lescano, Laureane Mais, Lucas Guimarães, Rafael Croffi, Frederico Gerlinger, Caio Yogi, Rafael Salgueiro, Mariana Davanso, Amanda Roque, Diogo Vasconcelos, Haroldo, André Proença, Luis Gustavo Oliveira, Miguel Xavier, Danilo Corrêa.

Aos técnicos e amigos, Roberto Mendonça e Gilson Murata pelos cafezinhos da tarde.

Aos funcionários da biblioteca sempre solícitos.

Ao José Maria e Paloma pelas orientações dos prazos e normas da pós-graduação.

À CAPES, CNPq e FAPESP, pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para realização deste trabalho. Obrigado

*Lembre-se que as pessoas podem tirar
tudo de você, menos o seu conhecimento.*

Albert Einstein

RESUMO

Rodrigues Jr CF. Efeitos da suplementação com glutamina e/ou do treinamento físico resistido sobre as vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de ratos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

O objetivo desse estudo foi o de investigar os efeitos do treinamento físico resistido e/ou da suplementação com glutamina sobre as vias de sinalização que regulam a síntese e a degradação de proteínas no músculo esquelético de ratos machos wistar. A expressão de moléculas reguladoras das vias de síntese (Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , pEIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1 e p4E-BP1) e degradação (FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogina-1 e MuRF-1) de proteínas e mRNA foram determinadas utilizando as técnicas de PCR em tempo real e *western blotting* nos músculos EDL e sóleo de ratos wistar com 5 semanas de idade. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) controle (C), 2) treinado (T), 3) suplementado com glutamina (G) e 4) treinado e suplementado com glutamina (TG). Os ratos foram treinados a subir uma escada vertical de 110 cm e 80° de inclinação horizontal com pesos amarrados à cauda. O esforço físico foi aplicado uma vez, a cada três dias durante cinco semanas. Cada sessão de treino consistiu de seis subidas na escada. O peso carregado em cada sessão foi progressivamente aumentado e ajustado para a massa corpórea de cada animal durante o período de treinamento. A quantidade máxima de peso transportada por rato não foi inferior a 50% da sua massa corporal. Após a conclusão do treinamento, os ratos foram eutanasiados e o músculo extensor digital longo (EDL) removido de ambas as patas e processado para análise histológica ou extração de proteínas e mRNA. Não houve alteração na massa do músculo EDL, mas observou-se aumento significativo na área de secção transversa da fibra (AST). A expressão gênica de FoxO1, pFoxO1, Rictor, TSC2, pTSC2, GSK3-beta, pGSK3-beta, EIF2A, pEIF2A, eIF4E, MAPK1, pMAK1, MAPK3, pMAPK3, mTOR e pmTOR permaneceu inalterada, mas houve aumento no conteúdo das proteínas Raptor e Deptor e TSC1. Atrogina-1, Murf-1, 4E-BP1 e S6 não diferiram entre os grupos em relação à expressão de mRNA e proteína. O grau de fosforilação da Akt, 4EBP-1, p70SK e S6 foram aumentados nos grupos suplementados com glutamina. A atividade do proteossoma 26S diminuiu no grupo exercitado em relação ao controle. No músculo sóleo, o treinamento resistido induziu aumento das proteínas HtrA2 e AIF da via de sinalização da apoptose e de GPX-1 e COX-IV, relacionadas ao estresse oxidativo. Esses efeitos foram abolidos pela suplementação com glutamina. Os resultados deste estudo são sugestivos de que o protocolo de exercício físico utilizado causou hipertrofia por aumento da fosforilação de 4EBP-1. Na suplementação com glutamina, foi observado aumento da fosforilação da 4EBP-1 e de S6 elevando a AST no músculo EDL.

Palavras-chave: Exercício Físico. Hipertrofia muscular. p4EBP-1. pS6. pmTOR.

ABSTRACT

Rodrigues Jr CF. Effects of glutamine supplementation and/or resistance exercise training on signalling pathways of protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The effect of physical exercise training and/or glutamine supplementation on the signaling pathways that regulate synthesis and degradation of proteins in rat skeletal muscles was investigated. The expression of key regulatory proteins of the signaling pathways of protein synthesis (Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , peIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1 and p4E-BP1) and degradation (FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogin-1 and MuRF-1) was examined using real time PCR and western blotting. The following groups were examined: 1) control (C); 2) physically trained (T); 3) supplemented with glutamine (G); and 4) physically trained and supplemented with glutamine (GT). Rats were trained to climb a vertical ladder with 1.1 m and 80° inclination from horizontal with extra weights tied to their tails. The exercise training was performed once every 3 days for a period of 5 weeks and each training session consisted of six climbs of the ladder. The extra weight load during each session was progressively increased and adjusted for each animal during the physical training period. The maximum amount of weight carried by each rat was over 50% of their body weight. After training completion, the rats were euthanized, and the extensor digitorum longus (EDL) muscles in both hind limbs were removed and processed for histological analysis or for protein and mRNA extraction. EDL muscle mass was not changed but a significant increase in cross-sectional area of the fibers was observed. The gene expression of FoxO1, pFoxO1, Rictor, TSC2, pTSC2, GSK3-beta, beta-pGSK3, eIF2 α , peIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAK1, MAPK3, pMAPK3, mTOR and pmTOR remained unchanged, but there was an increase in the protein content of the Raptor and Deptor and TSC1. Expressions of atrogin-1, Murf-1, 4E-BP1 and S6 also did not differ among the groups as indicated by the levels of mRNA and proteins. The levels of phosphorylated S6 and 4EBP-1 were significantly increased in the groups supplemented with glutamine. 26S proteasome activity was decreased in the exercised as compared to the control group. In the soleus muscle, the resistance exercise training induced an increase of HtrA2 and AIF proteins of the signaling pathway of apoptosis and of GPX-1 and COX-IV that are associated to the oxidative stress, being abolished by supplementation with glutamine. The physical exercise protocol used herein caused hypertrophy via phosphorylation of 4EBP-1. Glutamine supplementation led to an increase of the phosphorylation state of 4EBP-1 and S6 raising the AST of the EDL muscle.

Keywords: Physical exercise. Muscle hypertrophy. p4EBP-1. pS6. pmTOR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP1	<i>Eukaryotic initiation fator 4E- binding protein 1</i>
AIF	Fator de indução de apoptose
Atrogin-1	<i>Muscle-specific F-box protein</i>
AKT ou PKB	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell leukemia / lymphoma 2</i>
cAMP	AMP cíclico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX IV	Citocromo c oxidase subunidade IV
CT	<i>Cycle threshold</i>
Deptor	<i>DEP- domain- containing mTOR- interacting protein</i>
EDL	Extensor digital longo
EDTA	Ácido diaminoetanotetraacético
eIF2 α	Fator eucariótico de iniciação da tradução 2alfa
eIF4E	<i>Eukaryotic initiation fator 4E</i>
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FoxO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GSK3 beta	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HSP70	<i>70 kilodalton heat shock proteins</i>
HTRA2	<i>High temperature requirement protein A2</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL-6	Interleucina-6
LAT1	<i>L-type amino acid transporte 1</i>

MAPK1	<i>Mitogen- activated protein kinase 1</i>
MAPK3	<i>Mitogen- activated protein kinase 3</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MURF1	<i>Muscle RING-finger protein 1</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- κ B	Fator nuclear- kappaB
Raptor	<i>Regulatory- associated protein of mTOR</i>
RHEB	<i>Ras homolog enriched with brain</i>
PRAS40	<i>Proline- rich Akt substrate 40 kDa</i>
p70S6K	<i>70- kDa ribossomal protein S6 kinase</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
RT-PCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real
S6	<i>Ribossomal protein S6</i>
SDH	Succinato desidrogenase
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SERCA1 e 2	ATPases de cálcio do retículo sarcoplasmático 1 e 2
SNAT2	<i>Sodium-coupled neutral AA transporters</i>
SOD	Superóxido dismutase
SUP	Sistema ubiquitina proteassoma
TSC1	<i>Tuberous sclerosis complex 1</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
TG	Triacilgliceróis
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Glutamina e ganho de massa muscular.....	14
1.2 Efeitos do treinamento físico resistido.....	17
1.3 Vias de síntese e degradação de proteínas na musculatura esquelética....	18
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVO.....	25
4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 Animais.....	27
5.2 Determinação da massa corpórea e dos músculos sóleo e EDL.....	27
5.3 Protocolo de treinamento.....	27
5.3.1 Seleção dos animais.....	27
5.3.2 Protocolo de treinamento de hipertrofia muscular.....	28
5.4 Suplementação com glutamina.....	29
5.5 Determinação dos conteúdos de glutamina e glutamato no músculo esquelético.....	30
5.6 Análises histológicas do músculo esquelético e determinação da área da secção transversa da fibra (AST)	31
5.7 Avaliação da atividade do proteassoma 26S.....	31
5.8 Determinação do conteúdo de proteínas envolvidas na sinalização das vias de síntese e degradação de proteínas nos músculos esqueléticos por western blotting	32
5.9 Extração do RNA total.....	34
5.10 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR)....	34
5. 11 Avaliação da expressão gênica por PCR array.....	35
5.12 Determinação de proteína totais.....	37
5. 13 Expressão dos resultados e análise estatística.....	37
6 RESULTADOS.....	38
6.1 Massa corpórea e dos músculos sóleo e EDL.....	38
6.2 Conteúdos de glutamina e glutamato no músculo EDL.....	38
6.3 Área de secção transversa do músculo EDL.....	38

6.4 Atividade do sistema ubiquitina proteassoma (SUP).....	39
6.5 Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo EDL.....	39
6.6 Avaliação da expressão gênica por PCR array da via de sinalização da PI3K-Akt no músculo EDL.....	41
6.7 Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo sóleo.....	73
7 DISCUSSÃO.....	84
8 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICE - Quadros.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glutamina e ganho de massa muscular

A glutamina está presente em concentrações elevadas no plasma humano (0,5 a 1,0 mM; 20% dos aminoácidos livres) e no músculo esquelético de mamíferos (5 a 20 mM; 60% do conteúdo intracelular). Esse aminoácido é sintetizado a partir de glutamato e amônia pela ação da enzima glutamina sintetase na presença de ATP.

A musculatura esquelética é o principal local de produção de glutamina no organismo (Curthoys et al., 1995). A produção diária desse aminoácido no tecido muscular esquelético é de 20 a 50 gramas; 50 a 200 vezes maior que de qualquer outro aminoácido (Wagenmakers et al., 1999).

A glutamina foi reclassificada como condicionalmente essencial para os seres humanos devido ao fato da sua concentração plasmática apresentar-se diminuída em até 50% em algumas situações catabólicas tais como: câncer, trauma e sepse (Curi et al., 2000; Galassetti et al., 1998; Wu et al., 2009). A alteração da concentração plasmática desse aminoácido varia conforme a severidade da injúria a que o organismo está submetido (Oudemans et al., 2001).

A glutamina é metabolizada na mitocôndria para a produção de ATP e de outros metabólitos e isso ocorre mesmo na ausência de glicose (Choo et al., 2010; Yang et al., 2009). A oxidação de glutamina está aumentada em condições de estresse associadas a concentrações elevadas de glicocorticóides no plasma (Park et al., 1994). A administração de glicocorticóides naturais ou sintéticos é utilizada em modelos de indução de hipercatabolismo para se investigar os efeitos terapêuticos da glutamina na redução da perda de massa muscular observada nessas condições (Bozza et al., 2001; Park et al., 1994).

Em ratos, foi demonstrado que, após a administração de glicocorticóides, a atividade e o conteúdo de mRNA da glutamina sintetase estão aumentados em até 4 vezes no músculo plantar que é predominantemente constituído de fibras brancas de contração rápida (Hickson et al., 1996). Neste estudo, foi também verificado que os glicocorticóides aumentam a síntese de glutamina em células musculares. A dexametasona, que é um glicocorticoide sintético, aumenta a disponibilidade e liberação de glutamina a partir do músculo sóleo e diminui as concentrações deste

aminoácido nos músculos gastrocnêmico e extensor digital longo (EDL) (Parry et al., 1990). Estes achados são sugestivos de que os músculos esqueléticos respondem aos glicocorticoides de forma diferente dependendo do tipo de fibra. Outro fato relevante é que a atenuação da atrofia muscular, induzida por glicocorticóides, por infusão de glutamina não está associada a alterações nas concentrações de IGF-I ou insulina bem como da proteína ligante de IGF1 (IGFBP) na circulação (Hickson et al., 1997). A infusão enteral de glutamina em humanos causa redução nos conteúdos de mRNA das ubiquitinas no intestino (Coeffier et al., 2003). Por sua vez, os conteúdos de mRNA de catepsina e calpaína não foram alterados nas mesmas condições. Em paralelo, foi observado aumento da síntese proteica. Desta forma, a glutamina pode estimular a síntese e atenuar a proteólise melhorando o equilíbrio de proteínas no intestino de humanos (Coeffier et al., 2003).

A glutamina é também uma molécula sinalizadora e regula positivamente a via da rapamicina em mamíferos (mTOR), facilitando a captação de leucina em células HeLa (Durán et al., 2012; Nicklin et al., 2009; Kim et al., 2013). Em um experimento realizado com células HeLa na presença de L-glutamina a 10 mM, durante uma hora, foi mostrado que a captação celular desse aminoácido e seu efluxo na presença de aminoácidos essenciais é um passo limitante para ativar mTOR. O LAT1 (SLC7A5/SLC3A2) é um transportador bidirecional que regula o transporte de L-glutamina para fora das células e de L-leucina para dentro delas. Desta forma, o fluxo de L-glutamina, entrada e saída da célula, regula indiretamente via leucina a atividade de mTOR, tradução e autofagia coordenando o crescimento e a proliferação das células (Nicklin et al., 2009). O SNAT2 é o transportador que regula o conteúdo de glutamina no músculo esquelético (Bevington et al., 2002; Hyde et al., 2005; Evans et al., 2007; Dickinson et al., 2013) onde este é encontrado em quantidades elevadas (Mittendorfer et al., 2001). O SNAT2 medeia a captação de aminoácidos neutros especificamente da glutamina e foi descrito em conjunto com LAT1 (SLC7A5/SLC3A2). Assim, SNAT2 mantém os conteúdos de glutamina no interior das células e LAT1/CD98 (SLC7A5/SLC3A2) realiza a permuta dos aminoácidos (Baird et al., 2009; Pochini et al., 2014). Este sistema é referido como transporte ativo e o silenciamento da expressão do gene SNAT2 em células L6 musculares provoca queda no conteúdo intracelular de leucina e de glutamina,

indicando a dependência desse transportador para a captação de glutamina (Evans et al., 2008; Taylor et al., 2014).

O mecanismo de transporte intracelular de leucina está apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Mecanismos de transporte e acúmulo intracelular de leucina.

A célula usa uma combinação de transportadores de aminoácidos para aumentar seletivamente os conteúdos intracelulares de leucina. A bomba de Na^+/K^+ mantém um gradiente eletroquímico na célula trocando K^+ por Na^+ de maneira dependente de ATP. Esta ciclagem de Na^+ permite que o sistema de transportador SNAT2 medie a captação de aminoácidos neutros como a glutamina. O aumento de glutamina no interior da célula permite ao trocador *L-type amino acid transporter 1- LAT1* realizar a troca de glutamina intracelular pela leucina extracelular. Figura preparada a partir de informações obtidas e modificadas de Laplante et al., 2009; Dodd et al., 2012; Proença et al., 2014.

No final da década de oitenta, foi mostrado o efeito da glutamina na regulação da síntese e degradação de proteínas musculares por meio da incorporação de fenilalanina. Os autores relataram que a infusão de glutamina (15 mM) no músculo esquelético de ratos aumenta a síntese e inibe a degradação de proteínas (MacLennan et al., 1987). A elevação da concentração de glutamina no líquido de perfusão de 0,67 para 5,0 mM provocou aumento de 200% no conteúdo de

glutamina intracelular e de 66% na síntese de proteínas na ausência de insulina. Na presença deste hormônio, houve aumento de 30% no conteúdo intramuscular de glutamina que foi acompanhado por incremento de 80% na síntese de proteínas. Assim, observou-se relação positiva entre o conteúdo intramuscular de glutamina e a síntese de proteínas na presença ou ausência de insulina (MacLennan et al., 1988). Em aves, foi também observado que a síntese de proteínas no músculo esquelético está associada com o conteúdo intramuscular de glutamina (Watford et al., 2005). Os mecanismos não são totalmente conhecidos, mas podem envolver ativação do complexo de sinalização mTOR (Marc et al., 2009; Meijer et al., 2004). Esse é um aspecto importante que foi considerado no presente trabalho de tese.

1.2 Efeitos do treinamento físico resistido

A hipertrofia do músculo esquelético e o ganho de força ocorrem em atletas de elite e são indicados para pacientes em reabilitação de lesões e idosos que têm mobilidade reduzida devido à fraqueza muscular.

Várias intervenções foram desenvolvidas e testadas para encontrar o protocolo mais eficaz na indução de hipertrofia muscular (Cholewa et al., 2014; Klitgaard et al., 1990; Tamaki et al., 1992; Wong et al., 1988;). Dentre as intervenções, o treinamento físico resistido progressivo demonstra eficácia no aumento da massa e da força muscular esquelética (Hornberger et al., 2004). Os modelos de treinamento físico resistido desenvolvido para ratos apresentam princípios similares aos protocolos de exercícios de resistência aplicados em seres humanos. Por esta razão, modelos de treinamento físico resistido estão sendo utilizados em estudos sobre o ganho de massa muscular esquelética como o treinamento de escalada (Gordon et al., 1967; Jaweed et al., 1977; Yarasheski et al., 1990), agachamento (Klitgaard et al., 1988; Tamaki et al., 1992), levantamento de peso por estimulação elétrica (Garner et al., 1991; Ho et al., 1980; Roy et al., 1997; Wong, Booth 1988) e esteira ergométrica (Heck et al., 1996) (Cholewa et al., 2014). Nos estudos realizados por esses autores foram utilizadas a estimulação elétrica ou a recompensa alimentar para que o animal executasse o exercício físico de resistência. Nos estudos de exercício de resistência, a relação entre a massa muscular e a massa corporal é utilizada como indicação de hipertrofia do músculo

esquelético. Contudo, o valor médio da massa corporal final dos animais treinados é menor do que o valor médio da massa corporal dos animais do grupo controle devido à diminuição da adiposidade (Ho et al., 1980; Roy et al., 1997).

Nos protocolos de treinamento físico resistido, recomenda-se que o indivíduo realize exercícios físicos pelo menos 2 a 3 vezes por semana para cada grupo muscular, com uma carga em torno de 40 a 60% de 1RM (repetição máxima) e intervalos de 2 minutos entre as séries (Kraemer et al., 2002). Protocolos de treinamento físico com estas características promovem aumento significativo na massa do músculo esquelético exercitado, ganho de força e maior resistência à fadiga. As adaptações ao treinamento são específicas para cada tipo de exercício físico realizado e dependem da frequência, intensidade e duração, bem como dos períodos de recuperação após o esforço físico (Pasiakos et al., 2014).

O treinamento físico resistido de escalada é reconhecido como uma modalidade de esforço físico que mimetiza muito bem os efeitos crônicos do exercício de resistência em humanos (Hornberger et al., 2004). Ratos submetidos ao treinamento de resistência motivado pela recompensa alimentar apresentam ganho significativo na massa dos músculos exercitados (Klitgaard et al., 1988).

1.3 Vias de síntese e degradação de proteínas na musculatura esquelética

A síntese e a degradação de proteínas no músculo esquelético envolvem vias de sinalização que regulam processos transcricionais e pós- transcricionais (Guttridge et al., 2004; Chaillou et al., 2014). O complexo de mTOR1 (mTORC1) é o regulador mais importante da síntese proteica, sendo formado por cinco componentes: *mammalian target of rapamycin* (mTOR) que é a subunidade catalítica do complexo; *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor); *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8, também conhecida como GbL); *proline-rich AKT substrate* 40 kDa (PRAS40); e *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor) (Peterson et al., 2009; Eggerman et al., 2014). O complexo de mTOR 1 está apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Complexo da mTOR1 (mTORC1).

Abreviaturas: *mammalian target of rapamycin* (mTOR); *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor); *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8); *proline-rich AKT substrate 40 kDa* (PRAS40); *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor); guanosine triphosphatases (GTPases, RagA, RagB, RagC, and RagD). Figura preparada a partir de informações obtidas e modificadas de Laplante et al., 2009; Dodd et al., 2012; Proença et al., 2014.

As proteínas Raptor e Deptor apresentam função importante na regulação da atividade da mTORC1. Raptor ativa mTORC1 atuando na montagem do complexo e recrutando substratos como 4E-BP1 e p70S6K (Hara et al., 2002). DEPTOR é uma proteína reguladora negativa de mTORC1, esta interage com mTOR inibindo mTORC1 e atividades quinases (Haar et al., 2007; Peterson et al., 2009; Sancak et al., 2007). Quando DEPTOR é recrutada para o complexo, ocorre inibição da atividade da mTORC1. Após a ativação, mTORC1 juntamente com a caseína cinase I, fosforila DEPTOR na presença de sinais de crescimento, o que leva à degradação da DEPTOR reduzindo sua interação física com mTORC1 (Laplante et al., 2009; Peterson et al., 2009; Wang et al., 2007).

Outros fatores importantes deste sistema são as Rags, uma família de quatro pequenas GTPases (Rag A, Rag B, Rag C e Rag D) que interagem com mTORC1, sendo necessárias para a ativação da mTORC1 via aminoácidos (Kim, Sancak, 2008). Na presença de todos os aminoácidos encontrados em cultura, as proteínas Rag se ligam ao regulador do complexo e promovem a translocação da mTORC1 a

uma região específica do lisossomo que contém o seu ativador Rheb (Sancak et al., 2008; Thomas et., 2014).

Outro sinalizador importante no controle da síntese proteica é a Akt, sendo sua ativação suficiente para induzir hipertrofia *in vivo*, como demonstrada no músculo esquelético de camundongos transgênicos que indutivamente expressam a forma ativa de Akt. A ativação da Akt em um animal adulto, por duas semanas, aumenta em duas vezes o tamanho do músculo tibial. Tal fato ocorre por aumento do número das fibras musculares, causado por elevação na expressão das proteínas sinalizadoras da via de síntese de proteínas tais como mTOR e p70S6K (Lai et al., 2004).

A proteína mTOR, por sua vez, fosforila 4E-BP1 (*eIF4E-binding protein-1*) e a proteína ribossomal S6 quinase-1 (S6K1), promovendo o início da síntese proteica (Kimball et al., 2014; Sarbassov et al., 2005; Weigl et al., 2012). Por outro lado, em condições de atrofia do músculo esquelético, a ativação da Akt é reprimida (Sugita et al., 2005). A atrofia do músculo esquelético ocorre em várias situações tais como: desuso, desnervação, caquexia, insuficiência renal e queimaduras (Glass, 2003, 2005, 2010; Frost et al., 2011). Nestas condições a produção de cortisol está elevada (Jasper et al., 1986) e, provavelmente, o cortisol é o fator principal na indução de atrofia do músculo esquelético. O mecanismo de síntese e degradação no músculo esquelético está apresentado na Figura 3.

Figura 3- Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético.

Abreviaturas: PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*; Akt, *protein kinase B*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; TSC2, *tuberous sclerosis complex*; 4E-BP1, *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*; RHEB, *Ras homolog enriched with brain*; Raptor, *regulatory-associated protein of mTOR*; mLST8 *mammalian lethal with Sec13 protein 8*; PRAS40 *proline-rich AKT substrate 40 kDa*; Deptor *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*; *guanosine triphosphatases*, GTPases, RagA, RagB, RagC, and RagD. Figura preparada a partir de informações obtidas e modificadas de Laplante et al., 2009; Dodd et al., 2012; Proença et al., 2014.

A proteína Akt fosforilada inibe GSK3 e ativa o fator de iniciação eucariótico (eIF-2B) induzindo síntese protéica (Kubica et al., 2005; Adegoke et al., 2012; Egerman et al., 2014). Por outro lado, a Akt fosforila e ativa mTOR por inativação de TSC2. Já a proteína mTOR inibe 4E-BP1 (regulador negativo de eIF-4E) (Hara et al., 1997; Proud et al., 2004). Quando não fosforilada, 4E-BP1 forma um complexo inativo com eIF4E, resultando em inibição da iniciação da tradução. Quando fosforilada, 4E-BP1 se liga a eIF4E, permitindo que eIF4E se ligue a eIF4G para formar o complexo ativo (Egerman et al., 2014). A insulina e os aminoácidos tais

como, leucina e arginina, induzem fosforilação de 4E-BP1 via mTOR (Proud et al., 2004). Em estudos utilizando porcos recém-nascidos, a infusão de uma mistura de aminoácidos (leucina, isoleucina, valina) ou de leucina apenas aumenta significativamente a fosforilação de 4E-BP1 no músculo esquelético (Escobar et al., 2005; Proud et al., 2004). Outro mecanismo que regula a seleção dos mRNAs para a tradução (Kimball et al., 2004) envolve a modulação da atividade da proteína ribossômica S6K1. A proteína alvo desta é a S6 que participa da regulação da tradução de mRNAs. Assim, a ativação de S6K1 promove aumento da síntese de proteínas. A leucina ativa a S6K1 aumentando a sua fosforilação (Anthony et al., 2000; Escobar et al., 2005; Proud et al., 2004). Contudo, apesar de fortes evidências que apoiam a afirmação de que os aminoácidos utilizam componentes de sinalização semelhantes à mTOR, o mecanismo pelo qual os aminoácidos transmitem o sinal a partir da membrana celular para mTOR ainda está em discussão (Avruch et al., 2009; Proud et al., 2002).

Além de estimular a síntese de proteínas, Akt também inibe as vias de perda de massa muscular esquelética, como atrogina 1 e MuRF-1 (*Muscle Ring Finger 1*). O bloqueio desta via está relacionado com o fator de transcrição FOXO. A Akt fosforila FOXO promovendo sua translocação do núcleo da célula para o citossol. Essa translocação inativa FOXO e inibe a transcrição de MAF-bx/atrogina 1 e MuRF-1 (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001; Sandri et al., 2004; Schiaffino et al., 2011). Ambos, MuRF-1 e atrogina são ubiquitinas ligases E3. Essa via é estimulada em vários modelos de atrofia muscular tais como: jejum, suspensão e imobilização das patas traseiras (Bodine et al., 2001; Lambertucci et al., 2012; Pasiakos 2012).

Considerando a importância da manutenção da musculatura esquelética na homeostase energética e a relevância do entendimento dos mecanismos envolvidos na síntese e degradação de proteínas como aqueles regulados pela glutamina, cujas ações foram ainda pouco exploradas, decidiu-se realizar o presente trabalho. Neste estudo, investigamos os efeitos da suplementação com glutamina associada ou não com o treinamento físico resistido sobre a expressão das proteínas de sinalização das vias de síntese (Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , pEIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1, p4E-BP1) bem como de degradação (FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogina-1 e

MuRF-1) de proteínas no EDL. Este músculo apresenta uma grande quantidade de fibras do tipo II predominantemente glicolíticas e de contrações rápidas que são mais responsivas ao treinamento resistido. No músculo sóleo, encontram-se predominantemente fibras oxidativas e de contração lenta, mais responsivas ao treinamento físico aeróbio (Schiaffino et al., 2010, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

O músculo esquelético é o principal sítio produtor de glutamina no organismo (Shanware et al., 2011). Condições que causam perda de massa muscular afetam a produção deste aminoácido (Curi et al., 2005). Contudo, ainda são controversos os efeitos da suplementação com glutamina em pacientes com perda de massa muscular (Golding et al., 2006; Lancey et al., 1990). Portanto, é relevante verificar se a suplementação com glutamina associada ou não ao treinamento físico resistido pode regular as vias de sinalização de atrofia e hipertrofia musculares.

3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi o de avaliar os efeitos do programa de treinamento físico resistido e/ou da suplementação com glutamina na expressão dos mRNAs e das proteínas das vias de sinalização de síntese (Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , peIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1, p4E-BP1 e degradação (FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogina-1 e MuRF-1) de proteínas nos músculos EDL e sóleo de ratos.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) controle (C), 2) treinado (T), 3) suplementado com glutamina (G) e 4) treinado e suplementado com glutamina (TG).

Os ratos foram treinados a subir uma escada vertical de 110 cm e 80° de inclinação horizontal com pesos amarrados à cauda. O esforço físico foi aplicado uma vez a cada três dias durante cinco semanas. Cada sessão de treino consistiu de seis subidas na escada. O peso carregado em cada sessão foi progressivamente aumentado e ajustado para a massa corpórea de cada animal durante o período de treinamento. A quantidade máxima de peso transportada por cada rato não foi inferior a 50% da sua massa corporal. Após a conclusão do treinamento, os ratos foram eutanasiados e os músculos sóleo e EDL removidos de ambas as patas e processados para análise histológica ou extração de proteínas e mRNA.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: Área de secção transversa da fibra (AST), concentração de glutamina muscular, atividade do sistema ubiquitina proteassoma (SUP), expressão do mRNA e expressão de proteínas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com massa de 120 ± 20 gramas (animais com 45 dias de vida). Os ratos foram mantidos em ciclo invertido, claro/escuro de 12/12 h, temperatura de 23 °C, umidade relativa do ar de 55%, no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, onde permaneceram em gaiolas coletivas (máximo de três animais por gaiola) com livre acesso à alimentação e água.

Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (C), suplementado com glutamina (G), treinado (T) e treinado e suplementado com glutamina (GT). Duas séries de experimentos foram realizadas em diferentes períodos do ano com 5-6 animais na primeira (novembro a dezembro de 2012) e 3-4 ratos na segunda (janeiro a fevereiro de 2014).

5.2 Determinação da massa corpórea e dos músculos sóleo e EDL

A avaliação da massa corpórea dos animais foi realizada na 5ª semana do protocolo de treinamento. Após a eutanásia dos animais, os músculos (EDL e sóleo) foram removidos, pesados e congelados para análises posteriores.

5.3 Protocolo de treinamento físico resistido

5.3.1 Seleção dos animais

Foi realizada pré-seleção dos animais antes do início do protocolo de treinamento físico resistido. Para isso, os ratos foram adaptados por uma semana ao equipamento utilizado no protocolo de treinamento de hipertrofia muscular.

O equipamento para a realização do treinamento físico resistido foi utilizado nos experimentos da dissertação de mestrado de Marco Bucci (2006) e foi construído conforme descrito por Hornberger e Farrar (2004). O equipamento consiste de uma escada de madeira medindo 110 cm de altura, com degraus de

ferro e inclinação de 80 graus (Figura 4). Os animais escalaram o equipamento com a finalidade de alcançar uma área de descanso no topo.

Figura 4 - Equipamento utilizado para o treinamento de força dos animais.

O equipamento foi confeccionado em madeira com degraus de ferro. A altura do equipamento é de 110 cm com inclinação de 80°. Este equipamento foi utilizado nos experimentos da dissertação de mestrado de Marco Bucci (2006) e foi construído conforme descrito por Hornberger e Farrar (2004).

5.3.2 Protocolo de treinamento de hipertrofia muscular

O treinamento dos animais foi realizado durante o período vespertino, três vezes por semana, durante cinco semanas. Os animais realizaram o treinamento resistido no equipamento citado acima (Figura 4), seguindo adaptação do protocolo de treinamento de força proposto por Hornberger e Farrar (2004).

No primeiro dia do treinamento, cada rato realizou de 4 a 6 escaladas consecutivas com uma carga extra equivalente a 50%, 75%, 90% e 100% da massa corpórea, o que representou o mesmo índice de carga relativa de treinamento para

cada animal. Nas escaladas subsequentes foram acrescentados, a cada subida, 20 g de sobrecarga na cauda do animal. No segundo treino e nos treinos subsequentes, os ratos realizaram de 4 a 6 escaladas consecutivas com uma carga extra equivalente a 50%, 75%, 90% e 100% da carga máxima alcançada no último treino e nas escaladas subsequentes foram acrescentados, a cada subida, 20 g de sobrecarga. Para isso, utilizamos pedaços de chumbo presos à cauda por uma fita adesiva (Figura 5).

Figura 5 – As massas de chumbo foram presas a cauda dos animais por meio de fita adesiva (3M).

Observam-se os diferentes pesos utilizados para aplicar a carga respectiva na cauda do animal. Foram utilizadas massas de chumbo para acrescentar peso aos tubos *falcon* que posteriormente foram anexados na cauda dos animais por fitas adesivas.

5.4 Suplementação com glutamina

Os animais foram suplementados diariamente durante cinco semanas com L-glutamina (um g por quilograma de massa corporal por dia). A mesma dose de glutamina foi administrada para ratos, por períodos de tempo mais curtos, por outros pesquisadores (Cruzat et al., 2010; Lambertucci et al., 2012; Rogero et al., 2004).

5.5 Determinação dos conteúdos de glutamina e glutamato no músculo esquelético

A determinação de glutamina e glutamato muscular (EDL e sóleo) foi realizada conforme descrita por Lund (1986). Após remoção, os tecidos foram congelados e armazenados a -80 °C. O processamento e a análise foram realizados a temperatura de 4 °C. Os tecidos, ainda congelados, foram homogeneizados utilizando *polytron* em tampão Tris EDTA (proporção 1 massa : 10 volume do tampão Tris-EDTA). A precipitação de proteínas foi realizada na proporção 1:1 de ácido perclórico (PCA) a 10%. Imediatamente após a precipitação com PCA, foi realizada a neutralização do pH das amostras, adicionando-se cerca de 1/3 do volume de PCA de solução de KOH a 30%. Esse procedimento foi monitorado colorimetricamente por meio do uso de indicador universal de pH. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x *g* por 10 min., a 4 °C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. O volume de KOH utilizado foi suficiente para levar o pH das amostras para cerca de 6,5 indicado pela coloração verde. Para o ensaio de glutamina e glutamato, foram utilizados 20 µL do s sobrenadantes de cada amostra em triplicata.

A primeira reação do ensaio de glutamina/glutamato consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por ação da glutaminase, gerando quantidades estequiométricas de amônio (NH₄⁺) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato é desidrogenado e convertido a α-cetoglutarato (2-oxoglutarato) via glutamato desidrogenase (GDH), na presença de NAD⁺. As quantidades de L-glutamina e/ou glutamato das amostras são proporcionais às quantidades de NADH formado, avaliado a 340 nm em leitoras de microplaca de ELISA (Biorad Benchmark Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

Reação 1: L-glutamina + H₂O → L-glutamato⁻ + NH₄⁺ por ação da glutaminase (L-glutamina amidoidrolase, EC 3.5.1.2)

Reação 2: L-glutamato⁻ + NAD⁺ + H₂O → 2-oxoglutarato⁻ + NH₄⁺ + NADH por ação da glutamato desidrogenase (L-glutamato: NAD(P)⁺ oxidorredutase, EC 1.4.1.3)

5.6 Análises histológicas do músculo esquelético e determinação da área da secção transversa da fibra (AST).

Quarenta e oito horas após o último treino de resistência, os ratos foram eutanasiados e os músculos EDL cuidadosamente retirados, congelados em isopentano e armazenados em nitrogênio líquido ou à 80 °C. Um criostato foi utilizado para realizar as secções dos músculos (10 µm de espessura).

As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para o exame da área da secção transversa da fibra (AST). As secções foram fotografadas usando um microscópio vertical equipado com uma câmara fotográfica (Nikon DXM 1200, Japão). As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando o *software Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), por um único observador. A AST média da fibra foi determinada por medição da circunferência de mil fibras adjacentes a partir do centro de cada secção transversa por grupo de quatro músculos, sendo analisadas 250 fibras por tecido muscular.

5.7 Avaliação da atividade do proteassoma 26S

A atividade quimotripsina do proteassoma foi avaliada utilizando o peptídeo fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (LLVY-MCA; Sigma - S6510). Os ensaios foram realizados em uma placa de 96 poços, diluindo 50 µg de proteína citossólica em 200 mL de MOPS a 10 mM, pH 7,4, contendo 25 mM De LLVY-MCA, 2,5 microM de ATP e 5,0 mM de Mg²⁺. A velocidade de formação do produto foi avaliada por fluorescência de excitação e emissão em comprimentos de onda de 350 e 440 nm, respectivamente. As atividades das peptidases foram avaliadas na ausência ou presença de 20 µM do inibidor específico de proteassoma, epoxomicina (Sigma-E3652). A diferença entre as duas taxas foi atribuída à atividade do proteassoma, sendo essa linear durante quarenta minutos sob as condições dos ensaios (Cunha et al., 2012).

5.8 Determinação do conteúdo de proteínas envolvidas na sinalização das vias de síntese e degradação de proteínas nos músculos esqueléticos por *western blotting*

A determinação dos conteúdos Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , peIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1, p4E-BP1, FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogina-1, MuRF-1, Ciclina D1, HSP70, COX4, GPX-1, AIF e HTRA2 foi realizada utilizando a técnica de *western blotting* (Towbin et al., 1979).

Os músculos foram homogeneizados em tampão de extração (100 mM Trizma, pH 7,5, 10 mM ortovanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,01 mg/mL aprotinina), a 4 °C, por 30 segundos. Após a homogeneização, foi adicionado Triton-X-100 a 1% e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado e 5 μ L foram utilizados para a determinação do conteúdo total de proteínas utilizando o método de Bradford 1976.

Quantidades iguais (75 μ g) de proteínas de cada amostra foram diluídas em tampão Laemmli contendo DTT (1 M), fervidas em banho seco e as proteínas separadas de acordo com o peso molecular, utilizando eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Realizada a separação, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 120 V por 1 hora. Ligações inespecíficas foram bloqueadas incubando a membrana em solução basal (10 mM Trizma, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) à temperatura ambiente, por 2 horas, acrescida de albumina a 5%. As membranas foram lavadas por 3 vezes (10 minutos cada) com solução basal e então incubadas por 3 horas a temperatura ambiente em solução basal acrescida de albumina a 3% contendo os anticorpos primários Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , peIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1, p4E-BP1, FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogina-1, MuRF-1, Ciclina D1, HSP70, COX4, GPX-1, AIF e HTRA2. As membranas foram lavadas 3 vezes, por 10 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário ligado a uma peroxidase, em solução acrescida de albumina a 1%, à temperatura ambiente, por 1 hora. As membranas foram lavadas novamente e então

incubadas com solução contendo substrato para a peroxidase ligada ao anticorpo secundário e um *enhancer* quimioluminescente (ECL *western Blotting System Kit*, GE Health Care, Little Chalfont, Buckinghamshire, England), por 1 minuto, e imediatamente exposto a um filme de raio-X. O filme foi então revelado e as intensidades das bandas quantificadas por densitometria óptica pelo programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). A normalização da determinação do conteúdo total das proteínas analisadas foi realizada pela proteína constitutiva GAPDH. A expressão dessa proteína não foi afetada pelas condições experimentais do presente estudo conforme observado em experimentos preliminares.

Figura 6 – Imagem da expressão de eIF2 α normalizado pelo GAPDH

5.9 Extração do RNA total

O RNA total foi obtido a partir de 100 µg de músculo esquelético utilizando reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, EUA). Os músculos EDL e sóleo foram lisados usando 1mL de Trizol (Chomczynski e Sacchi 1987). Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos tubos e centrifugados a 12.000 x *g*. Ao final da centrifugação, foram visualizadas três fases distintas. A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para outro tubo, adicionando-se igual volume de isopropanol. O tubo permaneceu em congelador a -20 °C por no mínimo 1h para a precipitação do RNA. Após esse período, foi realizada uma centrifugação a 10.000 x *g*, a 4 °C, por 20 min. O precipitado foi ressuspenso em etanol a 75% e incubado por 15 min à temperatura ambiente, seguindo-se nova centrifugação a 10.000 x *g* por 5 min. O precipitado foi submetido à secagem no *speed vac* e posteriormente dissolvido em 50 µL de água contendo DEPC (dietilpirocarbonato, 0,1%) e levado ao banho-maria, a 65 °C, por 15 min. Este material foi estocado a -70 °C para análise posterior.

A concentração de RNA foi estimada por densidade óptica, utilizando NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). A leitura da absorbância foi realizada a 260 nm para o cálculo de concentração do RNA, tendo como referência o valor de 40 µg/mL para cada unidade de densitometria óptica.

5.10 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR)

Para estimar a abundância relativa de mRNAs da Akt, mTOR, 4EBP-1, S6, atrogina-1 e MuRF-1 nos músculos sóleo e EDL dos animais, foi utilizado o método de detecção em tempo real do produto da PCR pela quantificação de fluorescência em detector de sequência *ROTOR GENE 3000* da *Corbett Research* (Mortlake, NSW, Australia). As amplificações da RT-PCR foram realizadas com 2 µL do produto da reação de transcrição reversa diluídos em um tampão de reação contendo: 5 µL de *SYBR Green* (*Applied Biosystems*) e 1 µL (10 µM) de cada *primer*, os quais estão listados na Tabela 1. Os ciclos consistiram de duas fases: uma a 50 °C por 2 min (ativação da enzima) e outra a 95 °C por 10 min (desnaturação), seguidas por 45 ciclos de duas fases: a primeira a 95 °C por 20 s (desnaturação) e a segunda a 60

°C por 60 s (anelamento). Os *primers* utilizados na PCR em tempo real foram da Akt, mTOR, 4E-BP1, S6, atrogina-1 e MuRF-1.

O ponto inicial do ciclo (CT) da RT-PCR foi avaliado em triplicata para cada amostra. Os valores de CT correspondem ao número do ciclo da PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto amplificado do gene alvo e são inversamente proporcionais ao conteúdo do mRNA da amostra. O valor da variação de CT (Δ CT) foi calculado subtraindo-se o valor do CT do gene de interesse daquele gene usado como referência (GAPDH). As amostras foram normalizadas pela média da variação do valor de CT (Δ CT) dos animais controle, gerando um valor chamado de $\Delta\Delta$ CT.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na PCR em tempo real.

Gene	<i>Primers Sense (forward)</i>	<i>Primers Antisense (reverse)</i>
IGF1	5'- AAGCCTACAAAGTCAGCTCG- 3'	5'GGTCTTGTTTCCTGCACTT- 3'
Akt1	5'-GCCCAAGCACCGTGTGACCA-3'	5'-GCGACCTGTGGCCTTCTCCT-3'
S6	5'-AGGGACCACTGTGCCAGAATCCA-3'	5'-TGAGAGAAATCCCGACCAGTGAGC-3'
4E-BP1	5'-TCCCATGCAGGCCAGCCAGA-3	5'-ACTCTTCACCACCTGCCCCGC-3'
Fox01a	5'-GCCCAACCAAGCTTCCCGC-3'	5'-ATGTTGCCTGCTCACTAACTCCTAGC-3'
MuRF-1	5'-GGACCGGCATGGGGTGTACG-3'	5'-TTTCTGCAGGGGCCGACTGG-3'
Atrogina 1	5'-CGGCACCTTCGTGAGCGACC-3'	5'-GTGCAGTATCCATGGCGCTCCT-3'
GPX-1	5'- GTCCACCGTGTATGCCTTC- 3'	5'- CTCTTCATTCTTGCCATTCTC- 3'
TGF- beta	5'- GCTAATGGTGGACCGCAACAAC- 3'	5'- CTGGCACTGCTTCCCGAATG- 3'
IL-6	5'- CCTTCTTGGGACTGATGTTGTTGA- 3'	5'- GGGTGGTATCCTCTGTGAAGTCTCC- 3'
GAPDH	5'-GATGGGTGTGAACCACGAGAAA-3'	5'-ACGGATACATTGGGGGTAGGA-3'

5.11 Avaliação da expressão do mRNA por PCR array

Para a avaliação da expressão do mRNA no músculo EDL foi também utilizada uma plataforma de arranjo de genes baseado em PCR, o PCR array. O array específico utilizado foi o *RT² Profiler Rat PI3K-AKT Signaling Pathway PCR Array* (SABiosciences, Qiagen, Valencia, CA, EUA). Este arranjo permite analisar 84 genes específicos das vias associadas ao metabolismo de proteínas e cinco genes constitutivos, utilizados como normalizadores e apresentados em anexo na Tabela 7. Para a conversão de RNA a cDNA foi utilizado o *RT² First Strand cDNA Kit*

(SABiosciences, Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi diluído 5,55 vezes (20 µL de cDNA + 91 µL de H₂O). Posteriormente, foram misturados 102 µL de cDNA diluído em 1350 µL de 2X *RT² qPCR Master Mix* e 1248 µL de H₂O. Finalmente, foram colocados 25 µL da mistura da reação em cada poço da placa.

Tabela 2 - Lista dos genes incluídos em *RT² Profiler Rat PI3K-AKT Signaling Pathway PCR ArrayTM*, classificados conforme o grupo funcional.

AKT e PI3K e seus reguladores: Akt1, Akt2, Akt3, Btk, Grb10, Grb2, Hspb1, Ilk, Mtcp1, Pdk2, Pdpk1, Pik3ca, Pik3cg, Pik3r1, Pik3r2, Prkca, Prkcb, Prkcz, Pten, Tcl1a.
Via de sinalização do IGF-1: Csnk2a1, Fos, Grb2, Hras, Igf1, Igf1r, Irs1, Jun, Kcnh8 (Elk1), Map2k1, Mapk3, Mapk8, Ptpn11, Raf1, Rasa1, Shc1, Sos1, Srf.
Inativação de GSK3 e acúmulo de β-Catenina: Adar, Akt1, Apc, Ccnd1, Cd14, Ctnnb1, Eif2ak2, Gja1, Gsk3b, Irak1, Myd88, Nfkb1, Pdk1, Tirap, Tlr4, Tollip.
Genes de regulação, organização da actina e migração celular: Cdc42, Pak1, Pdgfra, Rac1, Rhoa, Wasl.
PTEN, interrupção do ciclo celular e apoptose: Akt1, Cdkn1b, Faslg, Foxo3, Grb2, Ilk, Itgb1, Mapk1, Mapk3, Pdk1, Pdk2, Pten, Ptk2, Rbl2, Shc1, Sos1.
Vias de fosforilação da BAD e anti-apoptótica: Akt1, Bad, Grb2, Hras, Igf1r, Irs1, Map2k1, Mapk1, Mapk3, Rps6ka1, Shc1, Sos1, Ywhah.
Genes envolvidos na sinalização da via de mTOR: Akt1, Eif4b, Eif4e, Eif4ebp1, Eif4g1, Fkbp1a, Mtor, Pdk1, Pdk2, Pten, Rheb, Rps6kb1, Tsc1, Tsc2.
Regulação da eIF4e e p70S6 quinase: Akt1, Eif4e, Eif4ebp1, Eif4g1, Mtor, Irs1, Mapk1, Mapk14, Mapk14, Mapk3, Pabpc1, Pdk1, Pdk2, Prkca, Pten, Rps6kb1.
Outros genes envolvidos na sinalização da via da Akt: Casp9, Chuk, Foxg1, Nfkbia.

A reação da PCR *array* foi realizada no equipamento *ABI 7500 Fast* (Life Technologies, CO., Carlsbad, CA, EUA) seguindo o protocolo de ciclagem mostrado na Tabela 3. Ao final da ciclagem, foi realizada uma curva de dissociação para comprovar a ausência de amplificação inespecífica.

Quadro 1 - Esquema de ciclagem utilizado no PCR *array*.

Quantidade de ciclos	Duração	Temperatura
1	10 minutos	95 °C
40	15 segundos	95 °C
	40 segundos	55 °C
	30 segundos	72 °C

Os dados foram analisados utilizando o programa *data analysis online* da Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>).

5.12 Determinação de proteína totais

A quantificação de proteínas nos músculos esqueléticos foi realizada segundo método proposto por Bradford (1976). A reação é colorimétrica e a absorbância determinada a 595 nm. Os resultados da absorbância foram utilizados no cálculo da concentração de proteínas das amostras conforme equação da reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina. Para elaboração da curva padrão de proteínas, foram utilizadas as seguintes concentrações de albumina: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg/mL.

5.13 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$. Uma vez que os valores de secção transversa de área das fibras musculares não apresentam distribuição normal entre os grupos, estes foram analisados no intervalo de confiança (IC) de 95%. Foram consideradas diferenças significativas aquelas em que não houve sobreposição entre os intervalos de confiança (Gehrig et al., 2008). Os experimentos foram realizados em nove animais por grupo.

6 RESULTADOS

6.1 Massa corpórea e dos músculos sóleo e EDL dos animais

O protocolo de treinamento físico e a suplementação com glutamina não alteraram significativamente a massa corpórea dos animais (Figura 7A e Quadro A1). Em contrapartida, foi observado aumento de até 200% na carga extra dos pesos amarrados à cauda dos animais ao longo do período de treinamento (Figura 7B e Quadro A2). Os protocolos de treinamento físico resistido e de suplementação com L-glutamina não modificaram as massas dos músculos EDL e sóleo, normalizadas pelo comprimento da tíbia (Figura 8A e Quadro A3 e Figura 8B e A4, respectivamente) e pela massa corporal dos animais (Figura 9A e Quadro A5 e Figura 9B e Quadro A6, respectivamente).

6.2 Conteúdos de glutamina e glutamato no músculo EDL.

De acordo com a Figura 10A e Quadro A7, a suplementação com L-glutamina na forma livre promoveu aumento na concentração de glutamina no músculo EDL em relação ao grupo controle. Já nos animais treinados e suplementados, houve aumento na concentração de glutamato (Figura 10B e Quadro A8).

6.3 Área de secção transversa do músculo EDL

A suplementação de glutamina, o treinamento físico e ambos associados causaram aumento significativo na área de secção transversa das fibras musculares do músculo EDL (Figura 12).

6.4 Atividade do sistema ubiquitina proteassoma (SUP)

A atividade do principal elemento do SUP, a subunidade 20S do proteassoma, está na Figura 13 e Quadro A11. Houve diminuição de 28% na atividade do proteassoma nos animais treinados. Já a suplementação com glutamina não alterou significativamente a atividade do proteassoma. Quando suplementação e treinamento foram associados não foi observado efeito aditivo.

6.5 Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo EDL

O treinamento físico e a suplementação com glutamina por 5 semanas não modificaram a expressão do mRNA (Figura 14A e Quadro A12) e da proteína (Figura 14B e Quadro A13) e a fosforilação em serina 473 da Akt (Figura 14C e Quadro A14) no músculo EDL. O mesmo ocorreu com os conteúdos de proteína de ciclina D1 (Figura 15A e Quadro A15). Com relação à TSC1, houve aumento no conteúdo da proteína (Figura 15B e Quadro A16) nos animais suplementados com glutamina em relação ao controle. Não houve alteração nas proteínas total (Figura 16A e Quadro A17) e fosforilada (Figura 16B e Quadro A18) de TSC2. Com relação a mTOR, não houve alteração no mRNA (Figura 17A e Quadro A19), proteína (Figura 17B e Quadro A20) e proteína fosforilada (Figura 17C e Quadro A21). Referente a Deptor (Figura 18A e Quadro A22) e a Raptor (Figura 18B e Quadro A23), houve aumento significativo no conteúdo proteico total no grupo suplementado com glutamina em relação ao controle. Na proteína Rictor, não houve diferença significativa no conteúdo total (Figura 19A e Quadro A24). No tocante ao conteúdo total de proteína (Figura 19B e Quadro A25) de Rheb, houve diminuição no grupo treinado e suplementado com glutamina em relação ao grupo que apenas exercitou. Na proteína Rag A, houve diminuição no conteúdo total (Figura 20A e Quadro A26) no grupo suplementado em relação ao controle. Na proteína Rag B, não houve alteração significativa no conteúdo total (Figura 20B e Quadro A27). No conteúdo de proteína total (Figura 20C e Quadro A28) de Rag C, houve aumento significativo nos grupos suplementado e treinado em relação ao treinado. Em foxO1, não houve alteração nos conteúdos de mRNA (Figura 21A e Quadro A29), proteína total (Figura 21B e Quadro A30) e fosforilada (21C e Quadro A31).

O treinamento físico e a suplementação com glutamina não alteraram a expressão do mRNA (Figura 22A e Quadro A32) e de proteína da 4E-BP1 (Figuras 22B e Quadro A33). Entretanto, o treinamento e a suplementação aumentaram em 60 e 70%, respectivamente, o grau de fosforilação da 4E-BP1 (Figura 22C e Quadro A34) quando comparada ao grupo controle. Não houve alteração na expressão do mRNA de S6 (Figura 24A e Quadro A37), proteínas totais de p70S6k (Figura 23A e Quadro A33) e S6K (Figura 24B e Quadro A38), no músculo EDL de ratos submetidos ao treinamento físico resistido, suplementados ou não com glutamina. Houve aumento de 50% no grau de fosforilação de p70S6K (Figura 23B e Quadro A36) e de S6 (Figura 24C e Quadro A39) no grupo de animais suplementados com glutamina em relação ao controle.

A expressão do mRNA (Figura 25A e Quadro A40) e da proteína (Figura 25B e Quadro A41) da ubiquitina-ligase MuRF-1 não se mostrou alterada no músculo EDL dos grupos estudados. A expressão do mRNA (Figura 26A e Quadro A42) e da proteína (Figura 26B e Quadro A43) de atrogina 1 não foi alterada pelo protocolo de treinamento físico resistido.

Não houve alteração significativa na proteína total (Figura 27A e Quadro A44) e fosforilada (Figura 27B e Quadro A45) de GSK3-beta como consequência do treinamento físico e da suplementação com glutamina. Na Figura 28, estão apresentados os dados referentes aos efeitos do treinamento, associado ou não à suplementação com glutamina, sobre o conteúdo das proteínas total (Figura 28A e Quadro A46) e fosforilada (Figura 28B e Quadro A47) de eIF2A no músculo EDL. Os ratos submetidos ao protocolo de treinamento, suplementados ou não com glutamina, não apresentaram alteração significativa nos conteúdos de eIF2A. Os conteúdos das demais proteínas eIF4E (Figura 29A e Quadro A48); HSP70 (70 *kilodalton heat shock proteins*) (Figura 29B e Quadro A49); COX4 (Figura 30A e Quadro A50); Caveolina (Figura 30B e Quadro A51) GPX-1 (Figura 31B e Quadro A53); MAPK1 (Figura 32A e Quadro A54); pMAPK1 (Figura 32B e Quadro A55); MAPK3 (Figura 33A e Quadro A56); pMAPK3 (Figura 33B e Quadro A57); p38 (Figura 34A e Quadro A58); pp38 (Figura 34B e Quadro A59) e os conteúdos de mRNA de GPX-1 (Figura 31A e Quadro A52); IGF-1 (Figura 35A e Quadro A60); TGF- beta (Figura 36A e Quadro A61) e IL-6 (Figura 36B e Quadro A62) também não foram alterados pelos protocolos experimentais utilizados. Houve uma

correlação positiva da concentração de glutamina muscular com a fosforilação das proteínas Akt, 4E-BP1, p70S6k e S6 (Figura 37 e Quadro A63).

6.6 Avaliação da expressão do mRNA por PCR *array* da via de sinalização da PI3K-Akt no músculo EDL

No Quadro 4 estão apresentas os resultados do *RT² Profiler Rat PI3K-AKT Signaling Pathway PCR array* (SABiosciences-Qiagen) dos genes que tiveram expressão alterada pelos protocolos experimentais utilizados. Dos 84 genes analisados, houve diferença significativa em 9 deles (Ccnd1, Gja1, Igf1, MapK1, Pabpc1, Pik3cg, Prkcb, Rheb e Tlr4). O Quadro 6 apresenta todos os genes analisados pelo método de *PCR array*. Os genes que tiveram alterações significativas na expressão estão em negrito.

Figura 7 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) sobre a massa corporal (A) e carga de peso extra corpóreo preso à cauda dos animais ao longo do período de treinamento (B).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A1 e A2 do Apêndice.

Figura 8 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) sobre a massa do músculo EDL normalizada pelo comprimento da tíbia (A) e pela massa corpórea final (B).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A3 e A4 do Apêndice.

Figura 9 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na massa do músculo sóleo normalizada pelo comprimento da tíbia (A) e pela massa corpórea final (B).

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A5 e A6 do Apêndice.

Figura 10 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) sobre a concentração de glutamina (A) e de glutamato (B) no músculo EDL dos animais.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A7 e A8 do Apêndice.

Figura 11 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) sobre a concentração de glutamina (A) e de glutamato (B) no músculo sóleo dos animais.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A9 e A10 do Apêndice.

Figura 12 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não a suplementação de L-glutamina durante cinco semanas sobre a área de secção transversa das fibras musculares do músculo EDL (A) e imagens dos cortes em aumento de 20X obtidas com coloração hematoxilina e eosina (HE) em microscopia ótica (B).

Foram analisadas 1000 fibras por grupo. Diferença significativa segundo análise do intervalo de confiança de 95%, conforme descrito em material e métodos.

Figura 13 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) sobre a atividade do sistema ubiquitina proteassoma (SUP) no músculo EDL.

Não ocorreu diferença no SUP nos animais suplementados com glutamina, em contrapartida houve diminuição nos animais treinados. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram comparados utilizando o teste ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A11 do Apêndice.

Figura 14 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) da Akt-1 no músculo EDL dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de nove animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A12, A13 e A14 do Apêndice.

Figura 15 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total de Ciclina D1 (A) e *Tuberous sclerosis complex 1* (TSC1) (B) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Não ocorreu diferença na expressão da proteína total Ciclina D1 pela suplementação com glutamina. Em contrapartida, houve aumento da TSC1 em comparação ao controle nos animais suplementados com glutamina. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram comparados utilizando o teste ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A15 e A16 do Apêndice.

Figura 16 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão de proteínas total (B) e fosforilada (C) da *Tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A17 e A18 do Apêndice.

Figura 17 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) da *The mammalian target of rapamycin* (mTOR) no músculo EDL dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A19, A20 e A21 do Apêndice.

Figura 18 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total Deptor (A) e Raptor (B) no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Houve diferença na expressão das proteínas totais de Deptor e Raptor pela suplementação com glutamina em comparação ao controle. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram comparados utilizando ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A22 e A23 do Apêndice.

Figura 19 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas totais Rictor (A) e Rheb (B) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais. Não houve diferença entre os grupos conforme indicado por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A24 e A25 do Apêndice.

Figura 20 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total Rag A (A), Rag B (B) e Rag C (C) no músculo EDL dos animais. Em (D), (E) e (F) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais. Não ocorreu diferença nos conteúdos da proteína total Rag B na suplementação de glutamina, em contrapartida houve diminuição da Rag A em comparação aos controles nos animais suplementados com glutamina e aumento da Rag C nos animais treinados suplementados em comparação aos treinados. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) comparados utilizando o teste ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A26, A27 e A28 do Apêndice.

Figura 21 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) da *Forkhead box protein O1* (FoxO1) no músculo EDL dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A29, A30 e A31 do Apêndice.

Figura 22 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) sobre a expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) de *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) no músculo EDL dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Não ocorreu diferença na expressão do mRNA e proteína total de 4EBP-1 com a suplementação de glutamina, em contrapartida houve aumento da p4EBP-1 em comparação ao controle nos animais treinados e nos suplementados com glutamina. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de nove animais e foram comparados utilizando o teste ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A32, A33 e A34 do Apêndice.

Figura 23 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total (B) e fosforilada (C) da p70 S6 *kinase* (p70S6K) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Não ocorreu diferença nos conteúdos da expressão da proteína total p70S6K com a suplementação de glutamina, em contrapartida houve aumento da pp70S6K em comparação ao controle nos animais suplementados com glutamina. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de nove animais e foram comparados utilizando o teste ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A35 e A36 do Apêndice.

Figura 24 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) da S6 no músculo EDL dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Não ocorreu diferença na expressão do mRNA e proteína total de *S6 ribosomal protein* (S6) com a suplementação de glutamina, em contrapartida houve aumento da pS6 em comparação ao controle nos animais suplementados com glutamina. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de nove animais e foram comparados utilizando o teste ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A37, A38 e A39 do Apêndice.

Figura 25 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A) e proteína total (B) de *Muscle RING-finger protein-1* (MuRF1) no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A40 e A41 do Apêndice.

Figura 26 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal) na expressão do mRNA (A) e proteínas total (B) de atrogina-1 no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais. Não houve diferença entre os grupos conforme indicado por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A42 e A43 do Apêndice.

Figura 27 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total (A) e fosforilada (B) de *Glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK3B) no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro 44 e A45 do Apêndice.

Figura 28 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total (A) e fosforilada (B) de *Eukaryotic Initiation Factor 2 A* (EIF2A) no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais. Não houve diferença entre os grupos conforme indicado por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A46 e A47 do Apêndice.

Figura 29 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas totais *Eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E) (A) e *70 kilodalton heat shock proteins* (Hsp70) (B) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A48 e A49 do Apêndice.

Figura 30 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas *Citocromo c oxidase* (COX 4) (A) e caveolina 1 (B) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A50 e A51 do Apêndice.

Figura 31 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A) e proteína total (B) de glutathiona peroxidase 1 (GPX-1) no músculo EDL dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A52 e A53 do Apêndice.

Figura 32 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total (A) e fosforilada (B) *Mitogen-Activated Protein Kinase 1* (MAPK1) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A54 e A55 do Apêndice.

Figura 33 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total (A) e fosforilada (B) de *Mitogen-Activated Protein Kinase 3* (MAPK3) no músculo EDL dos animais. Em (C) e (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A56 e A57 do Apêndice.

Figura 34 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão da proteínas total (A) e fosforilada (B) de p38 no músculo EDL dos animais. Em (C) e estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A58 e A59 do Apêndice.

Figura 35 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA de IGF-1 (A) no músculo EDL dos animais.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de cinco animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A60 do Apêndice.

Figura 36 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA de TGF-Beta (A) e IL-6 (B) no músculo EDL dos animais.

Houve diferença na expressão do mRNA de IL-6 com o treinamento físico resistido. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram comparados utilizando o teste ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão no Quadro A61 e A62 do Apêndice.

Figura 37 - Correlação entre o conteúdo de glutamina e o grau de fosforilação de pAkt (A), pp70s6k (B), p4E-BP1 e pS6 (D) no músculo EDL dos animais.

Quadro 2 - Resumo dos principais achados no músculo EDL

	Treinamento	Glutamina	Glutamina/Treinamento
[] glutamina
[] glutamato
AST
SUP
TSC1
Deptor
Raptor
Rheb
Rag A
Rag C
IGF1
pAkt
p4EBP-1
pp70SK
pS6

Aumento
 Diminuição
 Inalterado

6.7 Vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo sóleo

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à concentração de glutamina e glutamato no músculo sóleo (Figura 11A e Quadro A9) e (Figura 11B e Quadro A10). Não foram observadas diferenças significativas nos conteúdos de mRNA de 4E-BP1 (Figura 39A e Quadro A66), S6 (Figura 40A e Quadro A69), MuRF-1 (Figura 41A e Quadro A72), atrogina 1 (Figura 42A e Quadro A74), IGF-1 (Figura 44B e Quadro A79) e de proteínas de Akt-1 (Figura 38A e Quadro A64), pAkt-1 (Figura 38B e Quadro A65), 4E-BP1 (Figura 39B e Quadro A67), p4E-BP1 (39C e Quadro A68), S6 (figura 40B e Quadro A70), pS6 (Figura 40C e Quadro A71), MuRF-1 (Figura 41B e Quadro A73) e atrogina 1 (Figura 42B e Quadro A75) no músculo sóleo de ratos submetidos ao treinamento e suplementados ou não com glutamina quando comparados com os animais controles. Entretanto, o treinamento por si só aumentou os conteúdos de GPX-1 (Figura 43A e Quadro A76), COX-4 (Figura 43B e A77), AIF (Figura 45A e Quadro A80) e HTRA2 (Figura 45B e Quadro A81) e diminuiu de TSC1 (Figura 44A e Quadro A78) quando comparado ao grupo controle. Não houve correlação entre a concentração da glutamina muscular e a fosforilação das proteínas Akt, 4E-BP1 e S6 no músculo sóleo (Figura 45 e Quadro A82).

Figura 38 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas total (A) e fosforilada (B) de Akt-1 no músculo sóleo dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A64 e A65 do Apêndice.

Figura 39 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) de *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) no músculo sóleo dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A66, A67 e A68 do Apêndice.

Figura 40 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A), proteínas total (B) e fosforilada (C) de *S6 ribosomal protein* no músculo sóleo dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A69, A70 e A71 do Apêndice.

Figura 41 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A) e proteína total (B) de *Muscle Ring-Finger protein-1* (MuRF1) no músculo sóleo dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A72 e A73 do Apêndice.

Figura 42 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão do mRNA (A) e proteína total (B) de atrogina-1 no músculo sóleo dos animais. Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A74 e A75 do Apêndice.

Figura 43 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas totais glutationala peroxidase 1 (GPX-1) (A) e extenso - Cytochrome c oxidase (B) no músculo sóleo dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de nove animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A76 e A77 do Apêndice.

Figura 44 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) no conteúdo do mRNA de IGF-1 (A) e da proteína (B) no músculo sóleo dos animais. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Em (C) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de seis animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A78 e A79 do Apêndice.

Figura 45 - Efeito do treinamento físico resistido associado ou não à suplementação com L-glutamina (doses diárias de 1 g/kg de peso corporal durante cinco semanas) na expressão das proteínas totais AIF (A) e HTRA2 (B) no músculo sóleo dos animais. Em (D) estão apresentadas as bandas representativas das proteínas avaliadas.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) de nove animais e foram avaliados por ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni. Os dados individuais estão apresentados no Quadro A80 e A81 do Apêndice.

Figura 46 - Correlação entre o conteúdo de glutamina e o grau de fosforilação de pAkt (A), pS6 (B) e p4E-BP1 no músculo sóleo dos animais.

Quadro 3 - Resumo dos principais achados no músculo sóleo

	Treinamento	Glutamina	Glutamina/Treinamento
GPX-1	↑	=	↓
COX4	↑	=	↓
TSC1	↓	=	↓
AIF	↑	=	=
HTRA2	↑	=	=

↑ Aumento ↓ Diminuição = Inalterado

7 DISCUSSÃO

Embora os efeitos da glutamina e do exercício físico na síntese proteica tenham sido evidenciados em vários estudos, pouco se conhecia sobre as bases moleculares envolvidas nesses efeitos. Além disso, as respostas dos músculos branco e vermelho não haviam sido comparadas. No presente estudo, avaliou-se se a suplementação de glutamina e o treinamento físico resistido controlam a expressão e atividade das proteínas das vias de sinalização de síntese (Akt, pAkt, TSC1, TSC2, pTSC2, mTOR, pmTOR, Deptor, Raptor, Rictor, Rheb, Rag A, Rag B, Rac C, GSK3-beta, pGSK3-beta, p70S6k, pp70S6k, eIF2 α , pEIF2 α , eIF4E, MAPK1, pMAPK1, MAPK3, pMAPK3, S6, pS6, 4E-BP1, p4E-BP1) bem como de degradação (FoxO1, pFoxO1, p38, pp38, atrogin-1 e MuRF-1) de proteínas no músculos EDL e sóleo.

A suplementação com L-glutamina na forma livre resultou em elevação da concentração de glutamina no músculo EDL dos animais suplementados em relação ao grupo controle. Já nos animais que foram suplementados com glutamina e treinados, houve elevação da concentração de glutamato. Deve ser observado que, na reação catalisada pela glutaminase, a glutamina é convertida em glutamato (Neu et al., 1996). Assim, pode-se supor que a maior oferta de glutamina levou à formação de glutamato no músculo EDL do grupo treinado e suplementado. Cabe salientar que, em nosso estudo, tal efeito foi encontrado somente no músculo EDL, estando ausente no sóleo.

O treinamento físico resistido utilizado neste estudo elevou o conteúdo das proteínas da via de síntese proteica e a área de secção transversa das fibras em um período curto de tempo, semelhante ao observado no treinamento físico em humanos (Gundermann et al., 2012; Wang et al., 2011). Em nosso estudo foi observado aumento da carga adicionada à cauda que atingiu até 200% do peso corpóreo. Hornberger e Farrar (2004) alcançaram com treinamento resistido de escalada um aumento de carga de 332% do peso corporal dos ratos após 8 semanas. Em um programa de 8 semanas de treinamento com ratos de 3 semanas de idade utilizando um aparelho de escalada com pesos adicionados a cauda semelhante aos nossos estudos, foi relatado por Yarasheski et al. (1990) aumento

de cerca de 15% na área de secção transversa da fibra e de 250 % da carga em relação a massa corporal dos ratos.

Duncan et al (1998) realizaram treinamento resistido em ratos de três semanas de idade e chegaram a uma carga estimada de 140% da massa corporal. Neste estudo, foi observado aumento na AST das fibras musculares do EDL nos animais treinados. Em trabalhos anteriores também foi observada hipertrofia do músculo EDL dos animais (Duncan et al., 1998; Farrell et al., 1999; Tamaki et al., 1992). Na maioria dos trabalhos com hipertrofia muscular, foram utilizados protocolos de treinamento físico por períodos prolongados (Duncan et al., 1998; Klitgaard et al., 1998). Roy et al., 1997) especularam que os aumentos de desempenho no exercício físico de hipertrofia em ratos, antes de seis semanas de treinamento, ocorrem devido a adaptações neurais, mais especificamente no recrutamento das unidades motoras, melhorando a sincronização e coordenação motora (Komi et al., 1986). Em nosso estudo, houve aumento da AST e da expressão das principais moléculas sinalizadoras envolvidas na síntese de proteínas, pS6 e p4EBP-1, em apenas cinco semanas de treinamento de treinamento físico.

Na Figura 47 está mostrado o possível mecanismo de ação do treinamento físico resistido no treinamento de escalada.

Nos estudos com protocolos de treinamento resistido, como as escaladas com animais, vários pesquisadores investigaram o grau de hipertrofia muscular (Duncan et al., 1998; Hornberger et al., 2002; Yarasheski et al., 1990). Contudo, poucos autores estudaram as vias intracelulares envolvidas no ganho de massa muscular (Hellyer et al., 2012).

p4E-BP1 e pS6 são moléculas sinalizadoras importantes da via de síntese de proteínas (Schiaffino et al., 2011). Houve ativação da p4E-BP1 nos animais treinados. Estes resultados reforçam a proposição de que a via da síntese proteica está ativada, causando aumento da AST das fibras musculares. A via da Akt, além de regular a síntese proteica, é conhecida por controlar a expressão de FOXO-1 (Glass et al., 2010) que, por sua vez, regula a expressão das E3 ligases (Murf-1 e atrogina-1). As proteínas Murf-1 e atrogina-1 estão envolvidas na degradação proteica pelo sistema ubiquitina proteassoma (SUP). Elas atuam na marcação das proteínas a serem degradadas e são encontradas predominantemente na musculatura esquelética, tendo expressão aumentada em condições como jejum, câncer, diabetes e imobilização das patas traseiras (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001). A perda de massa muscular durante estados catabólicos está diretamente relacionada com a ativação do SUP, sendo caracterizada por degradação acelerada de proteínas na musculatura esquelética, causando diminuição no conteúdo proteico e no diâmetro das fibras.

Neste estudo não foram observadas variações na expressão de proteínas associadas a atrofia muscular (MURF-1 e atrogina-1). Contudo, ao final das cinco semanas de treinamento, houve diminuição significativa da atividade do SUP, levando provavelmente à diminuição da degradação de proteínas e da perda de massa muscular. A suplementação com glutamina não alterou a atividade do SUP.

Ratos tratados com dexametasona e alimentados com uma dieta rica em soro de leite à base de proteína e suplementados com glutamina apresentam taxa de síntese proteica mais elevada no músculo esquelético quando comparados aos não suplementados (Boza et al., 2001). Em outro estudo com o músculo sóleo de ratos diabéticos e suplementados com glutamina foi observado uma redução significativa no conteúdo de glutamina muscular nos animais induzidos a diabetes e aumento nos que receberam suplementação com glutamina, além disso, os ratos diabéticos apresentaram uma redução na expressão do mRNA e das proteínas da via de

síntese proteica e um aumento na expressão das proteínas de degradação proteica (Lambertucci et al., 2012). No presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas na expressão das moléculas sinalizadoras das vias de síntese e degradação de proteínas no músculo sóleo. Outros autores também utilizaram o treinamento físico de escalada durante 12 semanas (48 sessões), duas vezes ao dia, e observaram que não há alteração nos conteúdos das proteínas GSK-3beta, Akt e p70SK no músculo plantar de ratos wistar (Zanchi et al 2009).

Dieta rica em glutamina, em combinação ou não com leucina, aumenta a síntese de proteínas no músculo gastrocnêmico em ratos submetidos à natação, sem alteração na massa do músculo e na degradação proteica (Salomão et al., 2012). A leucina induz a síntese de proteínas no músculo EDL incubado, obtido de ratos, aumentando a fosforilação de mTOR e de 70S6. Estas são importantes reguladores da via de síntese de proteínas (Saha et al., 2010). Em suínos alimentados com dieta de baixo teor proteico, a suplementação com leucina aumenta a síntese proteica nos músculos gastrocnêmio e latíssimo do dorso bem como o grau de fosforilação de mTOR, S6 e 4E-BP1 (Murgas et al., 2010). Em porcos tratados com diferentes aminoácidos (leucina, isoleucina e valina), observou-se que a suplementação somente com leucina aumenta a síntese proteica em relação ao grupo tratado com salina (Suryawan et al., 2011). Neste mesmo estudo foi observado aumento da fosforilação das principais proteínas da via de síntese proteica (4E-BP1 e S6) nos animais infundidos com leucina por 60 minutos. A arginina é outro aminoácido que apresenta efeito anabólico importante. Em suínos suplementados com arginina por 7 dias, foi observado aumento na massa e na fosforilação das proteínas da via de síntese proteica (mTOR, 4E-BP1 e eIF4G-eIF4E) no músculo latíssimo do dorso (Yao et al., 2008). No presente estudo, demonstramos que a suplementação de glutamina aumenta a atividade da via de síntese de proteínas no músculo EDL de ratos, conforme indicado pelos dados de aumentos da fosforilação de S6 e 4EBP-1.

Um possível motivo pelo qual a glutamina não exerceu efeito sinergista com o treinamento físico foi a ação anti-inflamatória do aminoácido no músculo EDL. Observamos que o conteúdo de mRNA da IL-6 aumentou no grupo treinado, o que não foi observado nos animais treinados e suplementados com glutamina. Em ratos suplementados com lipopolissacáridos (LPS) (5 mg por kg de peso corpóreo) em

associação com glutamina (1 g por kg de peso corpóreo), foi observada redução de 33% na força máxima e aumento das concentrações de TNF-alfa e IL-6 no soro dos animais tratados somente com LPS.

Nos animais suplementados com LPS e glutamina, foi observada diminuição no decréscimo da força e redução de IL-6 e TNF-alfa no soro e músculo esquelético. Em camundongos com transecção medular suplementados com glutamina, foi observada melhora significativa da perda de proteínas miofibrilares e diminuição dos conteúdos de IL-6 e TNF-alfa (Chamney et al., 2013).

O aumento no conteúdo de mRNA de TLR4 nos animais treinados e a não alteração no grupo treinado e suplementado é outro achado que reforça nossa proposta. Quando as células são expostas aos lipopolissacarídeos, a expressão de TLR4 é aumentada, o que leva à indução da produção de citocinas tais como: TNF- α , IL-1 e IL-6 (Cario et al., 2000). A suplementação com glutamina reduz a expressão do mRNA de TLR4 na membrana da mucosa do intestino delgado elevada por inflamação induzida pela administração de LPS em ratos (Kessel et al., 2008). A suplementação com glutamina também diminui a expressão de TLR4 em células epiteliais intestinais infectadas com bactérias gram-negativas (Abreu et al., 2001). Efeitos anti-inflamatórios da suplementação com glutamina foram observados em pacientes com sepse (Ślotwiński et al 2011). Desta forma, há evidências de que a glutamina diminui a produção de citocinas no estado inflamatório (Meador et al., 2009). Outro possível motivo por não ter ocorrido sinergismo entre treinamento físico e a suplementação de glutamina é a inibição da expressão de IGF-1 nos animais suplementados e treinados. Houve aumento do conteúdo de mRNA de IGF-1 no músculo EDL no grupo treinado, o que não foi observado nos animais treinados e suplementados. A suplementação com glutamina provavelmente ativa as vias de sinalização diferentes daquelas induzidas pelo treinamento físico, aumentando a expressão de genes em determinadas situações e diminuindo em outras. Os resultados do *array* são indicativos de diminuição próxima do significativo no conteúdo de mRNA de Grb10 (Tabela 5) nos animais treinados em comparação aos controles. A Grb10 é uma proteína adaptadora que regula negativamente os efeitos da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). A deleção de Grb10 em ratos provoca crescimento da musculatura esquelética. Comparados aos controles do tipo selvagem (wt), camundongos adultos deficientes de Grb10

apresentam massa corporal e massa muscular elevadas, aumento da massa corpórea e da área da secção transversal de membros posteriores (Holt et al., 2012).

No PCR *array* observou-se aumento no conteúdo de mRNA da MAPK3 no grupo suplementado e treinado. Houve diminuição da MAPK1 nos ratos submetidos somente ao treinamento, sem alteração no conteúdo de proteínas total e fosforilada. Outra quinase importante é a MAP4K3, outro componente envolvido na via de ativação da mTOR por aminoácidos (Findlay et al., 2007). Esta quinase ativa a S6K por meio da mTOR (Findlay et al., 2007). Experimentos em linhagens celulares de mamíferos forneceram evidências convincentes de que a MAP4K3 é um sensor de aminoácidos que ativam a mTOR e que, ao contrário de Rheb, não é regulada pela insulina (Lam et al., 2009). Contudo, o mecanismo molecular exato pelo qual a MAP4K3 ativa mTOR não é sabido. *Drosophila* mutantes para MAP4K3 apresentam fenótipo característico com baixa atividade de mTOR, ou seja, apresenta taxa de crescimento reduzido, pequeno tamanho do corpo e baixas reservas de lipídios (Bryk et al., 2010). O possível papel de MAP4K3 na regulação do crescimento em mamíferos ainda não foi estudado em detalhes.

Na Figura 48 estão apresentados os possíveis mecanismos de ação da suplementação de glutamina no músculo esquelético.

Figura 48 - Proposta do efeito da suplementação de glutamina na síntese proteica em músculo EDL.

Estimuladores da síntese de proteína muscular representado com setas verdes, enquanto que as proteínas inibidoras são representadas com setas vermelhas. Conteúdo de mRNA que não teve aumento em cinza claro, que teve aumento em cinza escuro. Conteúdo de proteína que não foi alterado em verde escuro, que foi alterado em verde claro. Abreviaturas: SNAT2, sodium-coupled neutral AA transporters; Lat1, L-type amino acid transporter 1; MAP4K3, mitogen activated protein kinase kinase kinase-3; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, protein kinase B; mTOR, mammalian target of rapamycin; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1, p70 S6K1, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1; rpS6, ribosomal protein S6. Figura preparada a partir de informações obtidas e modificadas de Laplante et al., 2009; Dodd et al., 2012; Proença et al., 2014 bem como dos resultados do presente estudo.

A infusão de uma mistura equilibrada de aminoácidos ou de leucina somente pode regular a síntese de proteínas musculares por estimulação da fosforilação de 4E-BP1 e S6K1 (Escobar et al., 2005; Wray et al., 1998). Estes resultados são consistentes com os relatos de outros estudos *in vivo* (Anthony et al., 2000). A maioria dos estudos que descrevem os mecanismos responsivos da mTOR aos aminoácidos foram gerados em células cultivadas. É importante citar que a maioria dos estudos indica que os aminoácidos não ativam mTOR por meio de Akt (Avruch et al., 2009). Este fato corrobora com os nossos achados, uma vez que não foi encontrado aumento nos conteúdos de mRNA, proteínas total e fosforilada de Akt nos grupos suplementados. Contudo, foi observada diminuição de Akt fosforilada nos animais suplementados e treinados em comparação aos que somente treinaram. Em um estudo usando a técnica de *clamp* de pâncreas, foi demonstrado que a insulina, mas não os aminoácidos, ativa a Akt (Suryawan et al., 2004). A ativação de mTORC1 pelos aminoácidos é independente de TSC1 e TSC2. A via de ativação de mTORC1 permanece sensível à privação de aminoácidos nas células mesmo na ausência de TSC1 e TSC2 (Jozwiak et al., 2005; Nobukuni et al., 2005). Assim, os sensores para os aminoácidos estão localizados abaixo de Akt (Avruch et al., 2009). Em nosso estudo, não houve alteração no conteúdo das proteínas total e fosforilada de TSC2, mas foi observado aumento de TSC1 nos animais suplementados com glutamina, indicando um aumento da maquinaria de síntese proteica. Embora a concentração de aminoácidos no sistema circulatório é relativamente constante, a falta de aminoácidos essenciais especialmente a de leucina priva o músculo esquelético da sua capacidade de reagir a estímulos hipertróficos, mesmo quando o conteúdo intracelular de ATP está elevado. Desta forma, mTORC1 não pode ser ativada por fatores de crescimento na ausência de aminoácidos. As proteínas Rag, uma família de quatro pequenas GTPases (Rag A, Rag B, Rag C e Rag D) interagem com mTORC1, sendo necessárias para a ativação desta por aminoácidos (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008). Na presença de aminoácidos como leucina e glutamina as proteínas Rag se ligam a raptor e promovem a translocação da mTORC1 a uma região lisossomal que contém o seu ativador Rheb (Sancak et al., 2008). A dissociação física da mTORC1 e Rheb com a privação de aminoácidos pode explicar porque os ativadores de Rheb, tais como os fatores de crescimento, não podem estimular a sinalização mTORC1 na ausência

dos aminoácidos. Houve aumento no conteúdo das proteínas Raptor e Deptor nos animais suplementados com glutamina em relação ao controle e diminuição de Rheb nos animais suplementados e treinados em comparação aos que somente treinaram. O aumento da proteína Raptor indica uma alta ativação de mTORC1, pois esta recrutando proteínas como 4E-BP1 e p70S6 para desencadear a síntese de proteínas. Foi observado aumento da Rag C nos animais treinados e suplementados em comparação aos treinados e diminuição de Rag A nos suplementados em comparação ao controle, o aumento das Rags pode indicar um aumento de recrutamento de mTORC1 pela ação indireta da glutamina que favorece a entrada de outros aminoácidos como a leucina. Desta forma, mesmo com a ausência de alteração na expressão de mTOR, o conteúdo das proteínas que compõem o complexo mTORC1 está aumentado nos animais suplementados com glutamina, indicando uma alta solicitação de síntese proteica. Nos animais treinados e suplementados houve diminuição no conteúdo das principais proteínas (Akt, Deptor, Raptor e pp70S6K) envolvidas na síntese proteica. Em contrapartida, houve aumento no conteúdo da proteína Rag C que exerce efeito fundamental na ativação de mTORC1 sob a ação dos aminoácidos (Weigl et al., 2012). Este efeito pode compensar parcialmente a diminuição no conteúdo das demais proteínas.

Nos dados de concentração de glutamina, uma menor concentração da mesma, alterou o conteúdo intracelular da mesma, dificultando a entrada de outros aminoácidos como a leucina para o interior do músculo. Isto ocorreu pelo fato, do aumento da glutamina intramuscular gerado pela proteólise e pela suplementação, ter favorecido a reação para formação de mais glutamato. Assim, prejudicando a síntese proteica muscular, uma vez que na ausência dos aminoácidos a síntese não ocorre de forma eficaz, visto que os aminoácidos são necessários para que as RagGTPases (Rags) recrutem mTORC1 para o lisossomo e consequentemente seja ativado por RHEB (Zoncu et al., 2011). Outros estudos recentes, mostraram a importância de outras GTPases no recrutamento de mTORC1. A primeira é sensível à presença de glutamina, conhecida como Arf1 (Jewell et al., 2015). A segunda é sensível a presença de aminoácidos em geral, sendo chamada de Rab1A (Thomas et al., 2014). Outros estudos mostraram a importância da presença de transceptores para o monitoramento dos aminoácidos (arginina, glutamina e leucina) ancorados no lumen do lisossomo para ativação da mTORC1 (Rebsamen et al., 2015; Wang et al.,

2015). Estes dados são reforçados pela correlação da concentração de glutamina muscular com a fosforilação das proteínas chaves da síntese proteica (pAkt, pp70SK1, p4E-BP1 e pS6). Um estudo com músculos gastrocnêmio de ratos perfundidos com glutamina mostrou um efeito inibitório sobre a quebra de proteína muscular, quando utilizou-se o método de medição por fenilalanina, sugerindo uma correlação entre a perda de massa muscular e baixa concentração glutamina intramuscular, bem como a demonstração de uma relação positiva entre glutamina muscular e a taxa de síntese de proteínas, mostrando que a concentração de glutamina intramuscular desempenha um papel importante no controle da massa muscular (MacLennan et al., 1988). Outro estudo com músculo gastrocnêmio de ratos na presença ou ausência de insulina mostrou novamente uma correlação positiva entre a taxa de síntese de proteínas e a concentração intramuscular de glutamina (MacLennan et al., 1987). Estes resultados corroboram com o presente estudo, comprovando que há uma forte correlação entre glutamina muscular e síntese proteica.

O possível mecanismo envolvido na associação do exercício físico e da suplementação com glutamina na via de síntese proteica está na Figura 49.

Figura 49 - Efeito da suplementação de glutamina com o treinamento físico na síntese proteica no músculo EDL.

Estimuladores da síntese de proteína muscular representado com setas verdes, enquanto que as proteínas inibidoras são representadas com setas vermelhas. Conteúdo de mRNA que não teve alteração em cinza claro, que teve alteração em cinza escuro. Conteúdo de proteína que não foi alterado em verde escuro, que foi alterado em verde claro. Abreviaturas: SNAT2, sodium-coupled neutral AA transporters; Lat1, L-type amino acid transporter 1; MAP4K3, mitogen activated protein kinase kinase kinase-3; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, protein kinase B; mTOR, mammalian target of rapamycin; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1, p70 S6K1, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1; rpS6, ribosomal protein S6. Figura preparada a partir de informações obtidas e modificadas de Laplante et al., 2009; Dodd et al., 2012; Proença et al., 2014 bem como dos resultados do presente estudo.

No músculo sóleo, não houve alteração nas vias de síntese e degradação proteica nos protocolos experimentais utilizados nesse estudo. Assim, investigamos outras alterações que poderiam ocorrer no músculo sóleo e que diferem daquelas do músculo EDL nos ratos submetidos ao exercício físico. A expressão das proteínas da via da apoptose é mais elevada no músculo vermelho em relação ao branco (Mcmilan et al., 2011). A mitocôndria é considerada o principal sítio regulador da apoptose, contendo fatores importantes da sinalização apoptótica. Um dos mediadores mais importante da apoptose é o citocromo c, uma proteína transportadora de elétrons da cadeia respiratória, localizada no espaço intermembranar mitocondrial (Schägger et al., 2002), sendo liberado a partir da mitocôndria por meio de estímulos pró-apoptóticos. Após a estimulação apoptótica, o citocromo c liberado da mitocôndria associa-se com a pró-caspase-9/1 Apaf e causa ativação da caspase-3, levando a célula à apoptose (Li et al., 1997; Barrientos et al., 2002). O segundo ativador derivado das mitocôndrias, a proteína *High temperature requirement protein A2 (HtrA2)*, é liberada e inativa a *X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)* (Du et al., 2000), cuja função é inibir a atividade das caspases 3 e 9 (Deveraux et al., 1997). O fator de indução de apoptose (AIF) é uma flavoproteína que também pode ser liberada da mitocôndria e desempenha função crucial na apoptose independente de caspase (Daugas et al., 2000, Lipton et al., 2002). Entre suas ações está a condensação da cromatina, fragmentação do DNA e atividade oxidoreductase (Susin et al., 1999). Como agente oxirredutor, o AIF atua como a NADH oxidase (Miramar et al., 2001). Outros pesquisadores sugerem que o AIF tem função dupla; apresenta uma atividade pro-apoptótica no núcleo por meio da ligação ao DNA e uma atividade anti-apoptótica por eliminação de radicais livres, por sua atividade de oxidoreductase (Lipton et al., 2002).

Em nosso estudo, verificamos que o efeito anti-apoptótico da suplementação de glutamina não ocorre apenas em neutrófilos (Lagranha et al., 2007), mas também no músculo sóleo de ratos wistar, músculo predominantemente oxidativo de fibras vermelhas e de contração lenta, mais solicitado no exercício aeróbio (Schiaffino et al 2010, 2011). Sabe-se que a suplementação com glutamina impede o aumento da fosforilação da MAPK p38, JNK e p53 e abole o aumento da expressão da caspase 3 em neutrófilos de ratos submetidos a uma sessão de exercício, o que sugere que a suplementação de glutamina previne os efeitos do exercício e reduz a apoptose

(Lagranha et al., 2007). Nós observamos no presente estudo aumento na expressão das proteínas de apoptose AIF e HtrA2 no grupo de animais submetidos ao exercício físico de escalada, mostrando um efeito apoptótico, que foi atenuado pela suplementação com glutamina. Entretanto, não está claro até o presente momento se o aumento do conteúdo das proteínas da via da apoptose aumenta a degradação das proteínas da musculatura esquelética (Quadrilatero et al., 2011). Muitos autores mostram que o aumento da apoptose induzido pelo exercício físico é importante para a diferenciação e miogênese da musculatura esquelética e não só para ativar a morte da célula muscular, como em um estudo com cavalos que demonstraram que a indução da apoptose é importante para formação e regeneração do músculo esquelético, permitindo que as células musculares ativas a morte celular programada e sejam substituídas por células novas e mais fortes (Boffi et al., 2002) Fernando et al., 2002). Outros estudos mostraram também que a caspase-9 é um iniciador na via de morte mitocondrial e responsável pela ativação da caspase-3 na diferenciação das células C2C12 (Mcmilan et al., 2014; Murray et al 2008) e que a fusão de células musculares fundamenta a geração e manutenção do músculo esquelético ao longo da vida de um animal, indicando que a morte celular atua como um sinal para melhorar esses processos em mamíferos (Yu et al., 2014).

A suplementação com L-glutamina atenua o estresse oxidativo, mediado por glutathione (GSH) no músculo sóleo de ratos submetidos ao exercício físico aeróbico de alta intensidade, aumentando as proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) e o fator 1 de choque térmico (HSF1) (Petry et al., 2014). Em nosso estudo, verificamos que não houve aumento da expressão das proteínas GPX-1 e COX-IV nos animais treinados e suplementados em relação aos animais que foram apenas treinados, evidenciando que a glutamina tem um efeito antioxidante ao estresse causado pelo exercício. Efeitos da associação do exercício físico e da suplementação com glutamina na via da apoptose estão apresentados na Figura 50.

Figura 50 - Efeito da suplementação de glutamina com o treinamento na via da apoptose no músculo sóleo.

Fatores ativadores da apoptose muscular representado com setas verdes, Abreviaturas: *HtrA2*, *High temperature requirement protein A2*; *XIAP*, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*; *AIF*, *apoptosis-inducing fator*; *COX*, *cytochrome c*. Figura preparada a partir de informações obtidas e modificadas de Laplante et al., 2009; Dodd et al., 2012; Proença et al., 2014 e <http://www.cellsignal.com/> bem como dos resultados do presente estudo.

No músculo sóleo, não foi observado aumento das proteínas GPX-1 e COX-4 nos animais que treinaram e receberam suplementação de glutamina em comparação aos que apenas treinaram. Em contrapartida, houve aumento do conteúdo das proteínas AIF e HTRA2 e diminuição de TSC2 nos animais que treinaram em relação ao controle. A suplementação com glutamina parece exercer um efeito antioxidante e antiapoptótico frente ao treinamento físico resistido. Esta conclusão corrobora com os dados obtidos por outros autores (Cruzat et al., 2014; Petry et al., 2014; Ristow et al., 2009)

8 CONCLUSÃO

Cinco semanas de suplementação com glutamina ou treinamento físico resistido induziram hipertrofia muscular, conforme indicado pelo aumento da área de secção transversa da fibra. O aumento da massa muscular foi mediado pela elevação da fosforilação de 4E-BP1 e S6 na suplementação com glutamina e de 4E-BP1 no treinamento. No músculo EDL dos animais exercitados, houve diminuição da atividade da SUP favorecendo ainda mais o aumento da área de secção transversa (AST). No músculo sóleo, o treinamento resistido induziu aumento das proteínas HtrA2 e AIF da via de sinalização da apoptose e de GPX-1 e COX-IV na regulação do estresse oxidativo, sendo revertido pela suplementação com glutamina. Assim, o protocolo de cinco semanas de treinamento físico em ratos, deste estudo, permite investigações adicionais de vias moleculares subjacentes ao aumento da massa muscular.

A suplementação com glutamina apresentou efeitos parecidos ao do exercício físico sobre a área transversa da fibra e fosforilação da proteína 4E-BP1, contudo, não causou efeito aditivo quando combinado com o exercício de escalada devido provavelmente à diminuição intracelular de glutamina e aumento do glutamato e redução do conteúdo de IL-6 (grau de inflamação).

REFERÊNCIAS*

- Abraham RT. Making sense of amino acid sensing. *Science*. 2015 Jan 9;347(6218):128-9. doi: 10.1126/science.aaa4570.
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1609-16.
- Adegoke OA, Abdullahi A, Tavajohi-Fini P. mTORC1 and the regulation of skeletal muscle anabolism and mass. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012 Jun;37(3):395-406. doi: 10.1139/h2012-009.
- 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. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2):139-45.
- Avruch J, Long X, Ortiz-Vega S, Rapley J, Papageorgiou A, Dai N. Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Apr;296(4):E592-602. doi: 10.1152/ajpendo.90645.2008.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rötig A, Rustin P, Tzagoloff A. Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene*. 2002 Mar 6;286(1):53-63.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
- Boffi FM, Cittar J, Balskus G, Muriel M, Desmaras E. Training-induced apoptosis in skeletal muscle. *Equine Vet J Suppl*. 2002 Sep;(34):275-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
- Boza JJ, Turini M, Moënnos D, Montigon F, Vuichoud J, Gueissaz N, Gremaud G, Pouteau E, Piguët-Welsch C, Finot PA, Ballèvre O. Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats. *Nutrition*. 2001 Jan;17(1):35-40.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Baird FE, Bett KJ, MacLean C, Tee AR, Hundal HS, Taylor PM. Tertiary active transport of amino acids reconstituted by coexpression of System A and L transporters in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Sep;297(3):E822-9. doi: 10.1152/ajpendo.00330.2009.

Bevington A1, Brown J, Butler H, Govindji S, M-Khalid K, Sheridan K, Walls J. Impaired system A amino acid transport mimics the catabolic effects of acid in L6 cells. *Eur J Clin Invest*. 2002 Aug;32(8):590-602.

Bryk B, Hahn K, Cohen SM, Teleman AA. MAP4K3 regulates body size and metabolism in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2010 Aug 1;344(1):150-7. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.027. Epub 2010 May 10.

Bucci M. Efeitos do treinamento concomitante e suplementação de glutamina sobre a hipertrofia do músculo esquelético em ratos. [dissertação (Mestrado em Educação Física)]. Piracicaba: Universidade Metodista de Piracicaba; 2006.

Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):966-72.

Castell LM, Poortmans JR, Newsholme EA. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996;73: 488–490.

Chaillou T, Kirby TJ, McCarthy JJ. Ribosome biogenesis: emerging evidence for a central role in the regulation of skeletal muscle mass. *J Cell Physiol*. 2014 Nov;229(11):1584-94. doi: 10.1002/jcp.24604.

Chamney C, Godar M, Garrigan E, Huey KA. Effects of glutamine supplementation on muscle function and stress responses in a mouse model of spinal cord injury. *Exp Physiol*. 2013 Mar;98(3):796-806. doi: 10.1113/expphysiol.2012.069658.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581-5.

Choo AY, Kim SG, Vander Heiden MG, Mahoney SJ, Vu H, Yoon SO, Cantley LC, Blenis J. Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol Cell*. 2010 May 28;38(4):487-99. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.007.

Coëffier M, Claeysens S, Heeketsweiler B, Lavoinne A, Ducrotté P, Déchelotte P. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003 Aug;285(2):G266-73.

Cholewa J, Guimarães-Ferreira L, da Silva Teixeira T, Naimo MA, Zhi X, de Sá RB, Lodetti A, Cardozo MQ, Zanchi NE. Basic models modeling resistance training: an

update for basic scientists interested in study skeletal muscle hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2014 Sep;229(9):1148-56. doi: 10.1002/jcp.24542.

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol.* 2005 Aug;204(2):392-401.

Curi R. Glutamina: Metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Editora Sprint; 2000. 261 p.

Curi TC, De Melo MP, De Azevedo RB, Zorn TM, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am J Physiol.* 1997 Oct;273(4 Pt 1):C1124-9.

Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:133-59.

Cunha TF, Moreira JB, Paixão NA, Campos JC, Monteiro AW, Bacurau AV, Bueno CR Jr, Ferreira JC, Brum PC. Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Jun;112(11):1839-46. doi: 10.1152/japplphysiol.00346.2011.

Cruzat VF, Rogero MM, Tirapegui J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. *Cell Biochem Funct.* 2010 Jan;28(1):24-30. doi: 10.1002/cbf.1611.

Cruzat VF, Tirapegui J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition.* 2009 Apr;25(4):428-35. doi: 10.1016/j.nut.2008.09.014.

Cruzat VF, Bittencourt A, Scmazzon SP, Leite JS, de Bittencourt PI Jr, Tirapegui J. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. *Nutrition.* 2014 May;30(5):602-11. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.019.

Cruzat VF, Pantaleão LC, Donato J Jr, de Bittencourt PI Jr, Tirapegui J. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. *J Nutr Biochem.* 2014 Mar;25(3):345-52. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.11.009.

Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 May;13(3):225-9.

Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 2000 Jul 7;476(3):118-23.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. 1997 Jul 17;388(6639):300-4.

Dickinson JM, Rasmussen BB. Amino acid transporters in the regulation of human skeletal muscle protein metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013 Nov;16(6):638-44. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283653ec5.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.

Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998 Mar;77(4):372-8.

Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, Hall MN. Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell*. 2012 Aug 10;47(3):349-58. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.043. Epub 2012 Jun 29.

Dodd KM, Tee AR. Leucine and mTORC1: a complex relationship. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 1;302(11):E1329-42. doi: 10.1152/ajpendo.00525.2011.

Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014 Jan-Feb;49(1):59-68. doi: 10.3109/10409238.2013.857291.

Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 May;288(5):E914-21.

Escobar J, Frank JW, Suryawan A, Nguyen HV, Kimball SR, Jefferson LS, Davis TA. Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Apr;290(4):E612-21.

Evans K, Nasim Z, Brown J, Butler H, Kauser S, Varoqui H, Erickson JD, Herbert TP, Bevington A. Acidosis-sensing glutamine pump SNAT2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in L6 muscle cells. *J Am Soc Nephrol*. 2007 May;18(5):1426-36.

Evans K, Nasim Z, Brown J, Clapp E, Amin A, Yang B, Herbert TP, Bevington A. Inhibition of SNAT2 by metabolic acidosis enhances proteolysis in skeletal muscle. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;19(11):2119-29. doi: 10.1681/ASN.2007101108.

Farrell PA, Fedele MJ, Vary TC, Kimball SR, Lang CH, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis after acute resistance exercise in diabetic rats. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 1):E721-7.

Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11025-30.

Findlay GM, Yan L, Procter J, Mieulet V, Lamb RF. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J*. 2007 Apr 1;403(1):13-20.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006;36(4):327-58.

Flaring UB, Rooyackers OE, Wernerman J, Hammarqvist F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:275–82.

Flynn NE, Bird JG, Guthrie AS. Glucocorticoid regulation of amino acid and polyamine metabolism in the small intestine. *Amino Acids*. 2009 May;37(1):123-9. doi: 10.1007/s00726-008-0206-7.

Frost RA, Lang CH. mTor signaling in skeletal muscle during sepsis and inflammation: where does it all go wrong? *Physiology (Bethesda)*. 2011 Apr;26(2):83-96. doi: 10.1152/physiol.00044.2010.

Garner RP, Terracio L, Borg TK, Buggy J. Intracranial self-stimulation motivates weight-lifting exercise in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 1991 Oct;71(4):1627-31.

Galassetti P, Gibbons FK, Hamilton KS, Lacy DB, Cherrington AD, Wasserman DH. Enhanced muscle glucose uptake facilitates nitrogen efflux from exercised muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 1998 Jun;84(6):1952-9.

Gehrig SM, Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Insulin-like growth factor-I analogue protects muscles of dystrophic mdx mice from contraction-mediated damage. *Exp Physiol*. 2008 Nov;93(11):1190-8. doi: 10.1113/expphysiol.2008.042838. Epub 2008 Jun 20.

Gordon EE, Kowalski K, Fritts M. Changes in rat muscle fiber with forceful exercises. *Arch Phys Med Rehabil*. 1967 Nov;48(11):577-82.

Golding JD, Rigley MacDonald ST, Juurlink BH, Rosser BW. The effect of glutamine on locomotor performance and skeletal muscle myosins following spinal cord injury in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2006 Oct;101(4):1045-52.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14440-5.

Guttridge DC. Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 Jul;7(4):443-50.

Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*. 2003 Aug;9(8):344-50.

Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Oct;37(10):1974-84.

Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 May;13(3):225-9.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):177-89.

Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*. 2004 Jul 19;166(2):213-23.

Heck RW, McKeever KH, Alway SE, Auge WK, Whitehead R, Bertone AL, Lombardo JA. Resistance training-induced increases in muscle mass and performance in ponies. *Med Sci Sports Exerc*. 1996 Jul;28(7):877-83.

Hellyer NJ, Nokleby JJ, Thicke BM, Zhan WZ, Sieck GC, Mantilla CB. Reduced ribosomal protein s6 phosphorylation after progressive resistance exercise in growing adolescent rats. *J Strength Cond Res*. 2012 Jun;26(6):1657-66. doi: 10.1519/JSC.0b013e318231abc9.

Hickson RC, Wegrzyn LE, Osborne DF, Karl IE. Glutamine interferes with glucocorticoid-induced expression of glutamine synthetase in skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 1):E912-7.

Hickson RC, Oehler DT, Byerly RJ, Unterman TG. Protective effect of glutamine from glucocorticoid-induced muscle atrophy occurs without alterations in circulating insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein levels. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Oct;216(1):65-71.

Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004 Feb;29(1):16-31.

Ho KW, Roy RR, Tweedle CD, Heusner WW, Van Huss WD, Carrow RE. Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. *Am J Anat*. 1980 Apr;157(4):433-40.

Holt LJ, Turner N, Mokbel N, Trefely S, Kanzleiter T, Kaplan W, Ormandy CJ, Daly RJ, Cooney GJ. Grb10 regulates the development of fiber number in skeletal muscle. *FASEB J*. 2012 Sep;26(9):3658-69. doi: 10.1096/fj.11-199349. Epub 2012 May 23.

Holecek M. Side effects of long-term glutamine supplementation. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2013 Sep;37(5):607-16. doi: 10.1177/0148607112460682.

Hyde R, Hajdich E, Powell DJ, Taylor PM, Hundal HS. Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. FASEB J. 2005 Mar;19(3):461-3.

Jaspers SR, Tischler ME. Role of glucocorticoids in the response of rat leg muscles to reduced activity. Muscle Nerve. 1986 Jul-Aug;9(6):554-61.

Jaweed MM, Herbison GJ, Ditunno JF. Myosin ATPase activity after strengthening exercise. J Anat. 1977 Nov;124(Pt 2):371-81.

Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu FX, Park HW, Plouffe SW, Tagliabracci Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. Science. 2015 Jan 9;347(6218):194-8. doi: 10.1126/science.1259472.

Jozwiak J, Jozwiak S, Grzela T, Lazarczyk M. Positive and negative regulation of TSC2 activity and its effects on downstream effectors of the mTOR pathway. Neuromolecular Med. 2005;7(4):287-96.

Kessel A, Toubi E, Pavlotzky E, Mogilner J, Coran AG, Lurie M, Karry R, Sukhotnik I. Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxaemia in a rat. Clin Exp Immunol. 2008 Feb;151(2):341-7.

Kimball SR, Jefferson LS. Regulation of global and specific mRNA translation by oral administration of branched-chain amino acids. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jan 9;313(2):423-7.

Kimball SR. Integration of signals generated by nutrients, hormones, and exercise in skeletal muscle. Am J Clin Nutr. 2014 Jan;99(1):237S-242S. doi: 10.3945/ajcn.113.068387.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Oct 4;102(40):14238-43.

Kim SG, Hoffman GR, Poulogiannis G, Buel GR, Jang YJ, Lee KW, Kim BY, Erikson RL, Cantley LC, Choo AY, Blenis J. Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. Mol Cell. 2013 Jan 10;49(1):172-85. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.003.

Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, Fleck SJ, Franklin B, Fry AC, Hoffman JR, Newton RU, Pottenger J, Stone MH, Ratamess NA, Triplett-McBride T; American College of Sports Medicine. American College of Sports

Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Feb;34(2):364-80.

Klitgaard H.A. model for quantitative strength training of hindlimb muscles of the rat. *J Appl Physiol* (1985). 1988 Apr;64(4):1740-5.

Komi PV. Training of muscle strength and power: interaction of neuromotoric, hypertrophic, and mechanical factors. *Int J Sports Med.* 1986 Jun;7 Suppl 1:10-5

Klitgaard H, Zhou M, Richter EA. Myosin heavy chain composition of single fibres from m. biceps brachii of male body builders. *Acta Physiol Scand.* 1990 Oct;140(2):175-80.

Lagranha CJ, Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem Funct* 2005;23: 101–107.

Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, Silva E, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 Feb;36(2):210-7.

Lagranha CJ, Alba-Loureiro TC, Martins EF, Pithon-Curi TC, Curi R. Neutrophil fatty acid composition: effect of a single session of exercise and glutamine supplementation. *Amino Acids.* 2008 Jun;35(1):243-5.

Lagranha CJ, Hirabara SM, Curi R, Pithon-Curi TC. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell Biochem Funct.* 2007 Sep-Oct;25(5):563-9.

Lagranha CJ, de Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem Funct.* 2005 Mar-Apr;23(2):101-7.

Laplane M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Oct 15;122(Pt 20):3589-94. doi: 10.1242/jcs.051011.

Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov;24(21):9295-304.

Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev.* 1990 Aug;48(8):297-309.

Lam D, Martins LM. MAP4K3 enhances the expression of the BH3-only protein BID. *Cell Cycle.* 2009 Oct 15;8(20):3248-9.

Lambertucci AC, Lambertucci RH, Hirabara SM, Curi R, Moriscot AS, Alba-Loureiro TC, Guimarães-Ferreira L, Levada-Pires AC, Vasconcelos DA, Sellitti DF, Pithon-Curi TC. Glutamine supplementation stimulates protein-synthetic and inhibits protein-degradative signaling pathways in skeletal muscle of diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(12):e50390. doi: 10.1371/journal.pone.0050390.

Legerlotz K, Schjerling P, Langberg H, Brüggemann GP, Niehoff A. The effect of running, strength, and vibration strength training on the mechanical, morphological, and biochemical properties of the Achilles tendon in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Feb;102(2):564-72.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):479-89.

Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell*. 2002 Oct 18;111(2):147-50.

MacLennan PA, Smith K, Weryk B, Watt PW, Rennie MJ. Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1988 Sep 12;237(1-2):133-6.

MacLennan PA, Brown RA, Rennie MJ. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1987 May 4;215(1):187-91.

Makanae Y, Kawada S, Sasaki K, Nakazato K, Ishii N. Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013 May;208(1):57-65.

Meador BM, Huey KA. Glutamine preserves skeletal muscle force during an inflammatory insult. *Muscle Nerve*. 2009 Dec;40(6):1000-7. doi: 10.1002/mus.21430.

McMillan EM, Quadrilatero J. Differential apoptosis-related protein expression, mitochondrial properties, proteolytic enzyme activity, and DNA fragmentation between skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011 Mar;300(3):R531-43. doi: 10.1152/ajpregu.00488.2010. Epub 2010 Dec 9.

McMillan EM, Quadrilatero J. Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. *Biochem J*. 2014 Sep 1;462(2):267-77. doi: 10.1042/BJ20140312.

Murgas Torrazza R, Suryawan A, Gazzaneo MC, Orellana RA, Frank JW, Nguyen HV, Fiorotto ML, El-Kadi S, Davis TA. Leucine supplementation of a low-protein meal increases skeletal muscle and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs by stimulating mTOR-dependent translation initiation. *J Nutr*. 2010 Dec;140(12):2145-52. doi: 10.3945/jn.110.128421.

Meijer AJ, Dubbelhuis PF. Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 9;313(2):397-403.

Mittendorfer B, Volpi E, Wolfe RR. Whole body and skeletal muscle glutamine metabolism in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Feb;280(2):E323-33.

Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, Penninger JM, Peleato ML, Kroemer G, Susin SA. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*. 2001 May 11;276(19):16391-8.

Marc Rhoads J, Wu G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*. 2009 May;37(1):111-22. doi: 10.1007/s00726-008-0225-4.

Murray TV, McMahon JM, Howley BA, Stanley A, Ritter T, Mohr A, Zwacka R, Fearnhead HO. A non-apoptotic role for caspase-9 in muscle differentiation. *J Cell Sci*. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3786-93. doi: 10.1242/jcs.024547.

Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Mar;108(3):185-94.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14238-43.

Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJ, Zandstra DF. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*. 2001 Jan;27(1):84-90.

Odedra BR, Bates PC, Millward DJ. Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem J*. 1983 Aug 15;214(2):617-27.

Pasiakos SM. Exercise and amino acid anabolic cell signaling and the regulation of skeletal muscle mass. *Nutrients*. 2012 Jul;4(7):740-58. doi: 10.3390/nu4070740.

Pasiakos SM, Lieberman HR, McLellan TM. Effects of protein supplements on muscle damage, soreness and recovery of muscle function and physical performance: a systematic review. *Sports Med*. 2014 May;44(5):655-70. doi: 10.1007/s40279-013-0137-7.

Parry DJ, Wilkinson RS. The effect of reinnervation on the distribution of muscle fibre types in the tibialis anterior muscle of the mouse. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990 May;68(5):596-602.

Park JH, McCusker RH, Mohammadpour H, Blackwood DJ, Hrbek M, Vanderhoof JA. Dexamethasone inhibits mucosal adaptation after small bowel resection. *Am J Physiol*. 1994 Mar;266(3 Pt 1):G497-503.

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009 May 29;137(5):873-86. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.046.

Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Leite JS, Homem de Bittencourt PI Jr, Tirapegui J. Alanine-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life Sci*. 2014 Jan 17;94(2):130-6. doi: 10.1016/j.lfs.2013.11.009.

Pithon-Curi TC, De Melo MP, Curi R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct*. 2004 Sep-Oct;22(5):321-6.

Pithon-Curi TC, Trezena AG, Tavares-Lima W, Curi R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. *Cell Biochem Funct*. 2002 Jun;20(2):81-6.

Proença AR, Sertié RA, Oliveira AC, Campaña AB, Caminhotto RO, Chimin P, Lima FB. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res*. 2014 Feb;47(3):192-205.

Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem*. 2014 Aug 11;2:61. doi: 10.3389/fchem.2014.00061. eCollection 2014.

Proud CG. Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;279:215-44.

Proud CG. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem*. 2002 Nov;269(22):5338-49.

Rebsamen M, Pochini L, Stasyk T, de Araújo ME, Galluccio M, Kandasamy RK, Snijder B, Fauster A, Rudashevskaya EL, Bruckner M, Scorzoni S, Filipek PA3, Huber KV, Bigenzahn JW, Heinz LX, Kraft C, Bennett KL, Indiveri C, Huber LA, Superti-Furga G. SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature*. 2015 Jan 7. doi: 10.1038/nature14107.

Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 26;106(21):8665-70. doi: 10.1073/pnas.0903485106.

Roy RR, Wilson R, Edgerton VR. Architectural and mechanical properties of the rat adductor longus: response to weight-lifting training. *Anat Rec.* 1997 Feb;247(2):170-8.

Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG, Castro IA, Pires IS. Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. *Nutrition.* 2006 May;22(5):564-71.

Rogero Mm, Tirapegui JO, Pedrosa RG, Pires ISO, Castro IA. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. *Nutr Res.* 24: 261–270. 2004.

Salomão EM, Gomes-Marcondes MC. Light aerobic physical exercise in combination with leucine and/or glutamine-rich diet can improve the body composition and muscle protein metabolism in young tumor-bearing rats. *J Physiol Biochem.* 2012 Dec;68(4):493-501. doi: 10.1007/s13105-012-0164-0.

Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 2007 Jan;21(1):140-55.

Saha AK, Xu XJ, Lawson E, Deoliveira R, Brandon AE, Kraegen EW, Ruderman NB. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes.* 2010 Oct;59(10):2426-34. doi: 10.2337/db09-1870.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007 Mar 23;25(6):903-15.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004 Apr 30;117(3):399-412.

Sanchez AM, Bernardi H, Py G, Candau RB. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014 Oct 15;307(8):R956-R969.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

Santos RV, Caperuto EC, Costa Rosa LF. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci.* 2007 Jan 16;80(6):573-8.

Schägger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 10;1555(1-3):154-9.

Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Aug;199(4):451-63. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02130.x.

Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011 Oct;91(4):1447-531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010.

Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*. 2011 Jan 24;1(1):4. doi: 10.1186/2044-5040-1-4.

Shanware NP, Mullen AR, DeBerardinis RJ, Abraham RT. Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Mar;89(3):229-36. doi: 10.1007/s00109-011-0731-9.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.

Ślotwiński R, Ślotwińska S, Kędziora S, Bałan BJ. Innate immunity signaling pathways: links between immunonutrition and responses to sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011 Apr;59(2):139-50. doi: 10.1007/s00005-011-0117-2.

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004 May 7;14(3):395-403.

Sugita H, Kaneki M, Sugita M, Yasukawa T, Yasuhara S, Martyn JA. Burn injury impairs insulin-stimulated Akt/PKB activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Mar;288(3):E585-91.

Suryawan A, O'Connor PM, Kimball SR, Bush JA, Nguyen HV, Jefferson LS, Davis TA. Amino acids do not alter the insulin-induced activation of the insulin signaling pathway in neonatal pigs. *J Nutr*. 2004 Jan;134(1):24-30.

Suryawan A, Orellana RA, Fiorotto ML, Davis TA. Triennial Growth Symposium: leucine acts as a nutrient signal to stimulate protein synthesis in neonatal pigs. *J Anim Sci*. 2011 Jul;89(7):2004-16. doi: 10.2527/jas.2010-3400.

Tamaki, T., Uchiyama, S. & Nakano, S. A. 1992. weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc* 24, 881-886.

Taylor PM. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. *Am J Clin Nutr.* 2014 Jan;99(1):223S-230S. doi: 10.3945/ajcn.113.070086.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.

Thomas JD, Zhang YJ, Wei YH, Cho JH, Morris LE, Wang HY, Zheng XF. Rab1A Is an mTORC1 Activator and a Colorectal Oncogene. *Cancer Cell.* 2014 Nov 10;26(5):754-69. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.008.

Watford M, Wu G. Glutamine metabolism in uricotelic species: variation in skeletal muscle glutamine synthetase, glutaminase, glutamine levels and rates of protein synthesis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2005 Apr;140(4):607-14.

Weigl LG. Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Jun;12(3):377-82. doi: 10.1016/j.coph.2012.02.017.

Wray-Cahen D, Nguyen HV, Burrin DG, Beckett PR, Fiorotto ML, Reeds PJ, Wester TJ, Davis TA. Response of skeletal muscle protein synthesis to insulin in suckling pigs decreases with development. *Am J Physiol.* 1998 Oct;275(4 Pt 1):E602-9.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007 Mar;9(3):316-23.

Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC Jr. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem.* 2007 Jul 6;282(27):20036-44.

Wang S, Tsun ZY, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovanich ME, Yuan ED, Jones TD, Chantranupong L, Comb W1, Wang T, Bar-Peled L, Zoncu R, Straub C, Kim C, Park J, Sabatini BL, Sabatini DM. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter SLC38A9 signals arginine sufficiency to mTORC1. *Science.* 2015 Jan 9;347(6218):188-94. doi: 10.1126/science.1257132.

Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise. *Diabetes Nutr Metab.* 1999 Oct;12(5):316-22.

Weigl LG. Lost in translation: regulation of skeletal muscle protein synthesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2012 Jun;12(3):377-82. doi: 10.1016/j.coph.2012.02.017.

Wilmore DW, Shabert JK. Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition.* 1998 Jul-Aug;14(7-8):618-26.

Wong TS, Booth FW. Skeletal muscle enlargement with weight-lifting exercise by rats. *J Appl Physiol (1985).* 1988 Aug;65(2):950-4.

Wu GY, Thompson JR. The effect of glutamine on protein turnover in chick skeletal muscle in vitro. *Biochem J.* 1990 Jan 15;265(2):593-8.

Wu GY, Thompson JR, Baracos VE. Glutamine metabolism in skeletal muscles from the broiler chick (*Gallus domesticus*) and the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Biochem J.* 1991 Mar 15;274 (Pt 3):769-74.

Wu G. Amino Acids. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. 2009 May;37(1):1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.

Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998 Nov 15;336 (Pt 1):1-17.

Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RM, McDonald JG, DeBerardinis RJ. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* 2009 Oct 15;69(20):7986-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2266.

Yao K, Yin YL, Chu W, Liu Z, Deng D, Li T, Huang R, Zhang J, Tan B, Wang W, Wu G. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr.* 2008 May;138(5):867-72.

Yarasheski KE, Lemon PW, Gilloteaux J. Effect of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. *J Appl Physiol* (1985). 1990 Aug;69(2):434-7.

Yu SF, Baylies MK. Cell biology: Death brings new life to muscle. *Nature.* 2013 May 9;497(7448):196-7. doi: 10.1038/nature12097.

Zanchi NE, de Siqueira Filho MA, Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, de Oliveira Carvalho CR, Seelaender M, Lancha-Jr AH. Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3beta and p70S6K levels in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2009 Jun;106(3):415-23. doi: 10.1007/s00421-009-1033-6.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jan;12(1):21-35. doi: 10.1038/nrm3025.

APÊNDICE - Quadros

Quadro A1- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à massa corpórea final - inicial apresentados na Figura 7A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,016	0,954	1,007	1,016	1,007		1,000	$\pm 0,012$
Treinado	0,751	1,025	0,857	0,945	0,901		0,896	$\pm 0,046$
Glutamina	0,892	0,963	0,989	0,998	0,769		0,922	$\pm 0,043$
Glutamina Treinado	1,025	0,919	0,910	0,716	0,919		0,898	$\pm 0,050$

Quadro A2- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à carga extra empregada ao longo do período de treinamento na figura 7B.

Carga Máxima											
Semana	Treinado						T. Glutamina				
1ª	182	200	222	224	168	182	182	182	196	196	135
2ª	182	154	208	222	210	200	210	210	252	196	182
3ª	264	264	224	264	238	250	182	182	168	210	212
4ª	284	285	250	283	260	270	220	230	240	222	224
5ª	300	310	302	330	300	350	280	300	330	270	284
6ª	360	340	318	370	370	370	300	370	362	300	318
7ª	360	370	324	400	400	370	330	425	390	334	350
8ª	400	384	324	460	434	404	360	430	434	358	322
9ª	440	430	390	500	460	430	420	460	460	435	400
10ª	460	438	430	500	500	484	430	500	500	462	430
11ª	500	503	520	530	530	550	540	525	516	532	500
12ª	570	573	590	580	600	600	590	590	570	600	550

Quadro A3- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à massa de EDL/comprimento da tibia (mg/cm) apresentados na Figura 8A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,034	0,997	1,005	0,985	0,963	1,016	1,000	$\pm 0,010$
Treinado	1,183	0,970	0,858	1,175	1,022	0,890	1,017	$\pm 0,057$
Glutamina	0,927	0,955	1,012	0,914	0,836		0,929	$\pm 0,029$
Glutamina Treinado	0,924	0,937	0,974	0,967	0,985		0,958	$\pm 0,012$

Quadro A4- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à massa EDL/ massa corpórea (mg/g) apresentados na Figura 8B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,984	1,039	0,954	0,984	0,940	1,099	1,000	$\pm 0,024$
Treinado	1,195	1,017	0,844	1,311	0,968	1,019	1,059	$\pm 0,068$
Glutamina	0,941	0,954	0,988	0,877	0,911		0,934	$\pm 0,019$
Glutamina Treinado	0,836	0,954	1,021	0,959	0,957		0,945	$\pm 0,030$

Quadro A5- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à massa soleo/ Tíbia (mg/cm) apresentados na Figura 9A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,247	1,035	1,089	0,863	0,852	0,915	1,000	0,063
Treinado	1,064	1,027	1,089	0,911	0,860	0,813	0,961	0,047
Glutamina	0,869	0,985	1,092	0,929	0,906		0,956	0,039
Glutamina Treinado	1,224	1,026	1,062	0,907	0,969		1,037	0,054

Quadro A6- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à massa soleo/ massa corpórea (mg/g) apresentados na Figura 9B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,190	1,082	1,037	0,865	0,834	0,993	1,000	0,055
Treinado	1,078	1,080	1,074	1,020	0,817	0,934	1,000	0,043
Glutamina	0,885	0,987	1,070	0,894	0,990		0,965	0,034
Glutamina Treinado	1,110	1,048	1,116	0,902	0,944		1,024	0,044

Quadro A7- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à concentração de glutamina muscular no músculo EDL apresentados na figura 10A.

Grupos							Média	$\pm$ EP M
Controle	1,072	1,690	6,974	2,574	3,740		3,210	1,043
Treinado	6,678	1,994	5,624	7,090	4,970		5,271	0,901
Glutamina	9,122	5,473	5,952	5,729	7,513	6,668	6,743	0,563
Glutamina Treinado	1,938	0,152	3,871	2,585	3,996	9,493	3,672	1,299

Quadro A8- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à concentração de glutamato muscular no músculo EDL apresentados na figura 10B.

Grupos							Média	$\pm$ EP M
Controle	10,430	8,127	7,034	9,185	7,600	6,083	8,077	0,634
Treinado	4,277	6,924	13,031	10,562	3,301	6,417	7,419	1,522
Glutamina	10,414	8,762	10,370	7,771	8,735	8,654	9,118	0,430
Glutamina Treinado	14,300	17,435	6,751	6,899	15,716		12,220	2,258

Quadro A9- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à concentração de glutamina muscular no músculo sóleo apresentados na figura 11A.

Grupos									Média	$\pm$ EPM
Controle	14,9	19,0	14,6	17,3	5,3	0,3	17,5	14,4	12,9	2,3
Treinado	6,4	17,4	9,7	17,0	24,0	26,8	11,5	25,3	17,3	2,7
Glutamina	21,2	19,0	12,3	10,1	14,3	10,9	12,6		14,3	1,6
Glutamina Treinado	20,6	10,3	18,6	9,3	23,0	10,7	19,9	9,2	15,2	2,1

Quadro A10- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à concentração de glutamato muscular no músculo sóleo apresentados na figura 11B.

Grupos									Média	$\pm$ EPM
Controle	16,8	11,0	10,3	16,2	4,5	34,6	35,4	17,0	18,22	3,95
Treinado	20,4	14,0	8,0	25,3	20,0	32,4	9,8	17,7	18,44	2,84
Glutamina	30,8	19,6	13,6	17,6	16,9	7,9	16,7		17,56	2,63
Glutamina Treinado	12,0	4,1	17,3	36,3	32,7	9,9	17,7	8,7	17,33	4,08

Quadro A11- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a atividade do sistema ubiquitina proteassoma (SUP) no músculo EDL apresentados na Figura 12.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	5833,6	6013,5	7551,3	6550,5	6038,8		6397,6	312,1
Treinado	4638,3	6885,9 *	4775,6	4911,8	4543,1	4276,6	4629,1	107,9
Glutamina	5318,2	5104,0	6662,3	5401,3			5621,5	352,5
Glutamina Treinado	4953,6	3273,7	4032,1	6391,9 *			4086,5	485,6

Quadro A12- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Akt no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 14A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,859	0,977	1,236	1,126	1,054	0,748	1,000	0,073
Treinado	1,271	1,182	1,084	0,886	0,911	1,138	1,079	0,062
Glutamina	0,908	1,008	1,018	1,022	1,330		1,057	0,071
Glutamina Treinado	1,289	0,865	1,620	0,997	0,827		0,995	0,105

Quadro A13- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Akt no músculo EDL apresentados na figura 14B.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	0,75	0,91	1,34	1,22	0,78	0,56	0,69	2,03	0,71	1,000	0,154
Treinado	0,69	0,73	1,29	1,22	0,78	0,51	0,81	0,89	1,36	0,920	0,100
Glutamina	0,73	0,68	1,23	1,05	0,47	0,85	1,45	1,01	0,70	0,910	0,102
Glutamina Treinado	0,65	0,81	1,03	0,51	0,86	0,86	1,14	0,65		0,814	0,073

Quadro A14- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína pAkt no músculo EDL apresentados na figura 14C.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	0,90	1,06	1,04	0,63	1,37	1,73*	0,84	0,86	0,57	0,91	0,09
Treinado	0,74	1,03	1,00	3,51*	1,79	1,27	1,14	1,19	0,86	1,13	0,11
Glutamina	0,92	0,93	1,48	2,22	2,94	0,82*	1,05	1,00		1,50	0,30
Glutamina Treinado	0,84	0,40	0,71	3,93*	0,85	1,25*	1,04	1,08		0,82	0,10

Quadro A15- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína Cyclina D1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 15A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,028	0,980	0,991	1,325	0,675		1,000	0,103
Treinado	0,966	1,010	0,978	1,367	0,660	0,404	0,897	0,135
Glutamina	0,998	0,977	0,968	1,639	0,550		1,026	0,174
Glutamina Treinado	1,014	0,990	0,963	0,734	0,541		0,848	0,092

Quadro A16- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína TSC1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 15B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,740	1,474	0,786	0,784	1,216		1,000	0,147
Treinado	1,882	0,958	2,889	0,893	2,749	0,916	1,715	0,381
Glutamina	2,613	0,808	2,957	1,476	2,593		2,410	0,322
Glutamina Treinado	1,042	0,957	1,050	1,896	2,651		1,519	0,331

Quadro A17- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína TSC2 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 16A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,965	0,654	1,381	1,504	0,496		1,000	0,197
Treinado	1,178	1,192	2,430	0,846	0,519	0,355	1,087	0,302
Glutamina	0,890	0,867	2,642	1,433	0,657		1,298	0,360
Glutamina Treinado	1,107	1,181	1,453	0,943	0,387		1,014	0,177

Quadro A18- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína pTSC2 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 16B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,855	0,940	1,205	1,477	0,523		1,000	0,161
Treinado	0,395	1,072	1,457	0,909	0,351	0,507	0,782	0,180
Glutamina	0,993	1,034	2,047	0,500	0,740		1,063	0,264
Glutamina Treinado	0,849	1,164	2,844*	0,423	0,419		0,714	0,181

Quadro A19- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de mTOR no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 17A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,736	1,034	0,962	1,269	1,144	0,855	1,000	0,079
Treinado	1,148	1,017	1,128	0,948	1,209	1,273	1,120	0,049
Glutamina	0,778	0,965	1,525	1,393	1,612		1,255	0,163
Glutamina Treinado	1,075	0,803	1,213	1,024	1,192		1,061	0,074

Quadro A20- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de mTOR no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 17B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle		1,577	1,423	0,707	1,293		1,250	0,190
Treinado	1,123	0,862	1,795	0,244	2,778	1,019	1,303	0,358
Glutamina	1,488	1,212	1,205	0,930	1,288		1,225	0,090
Glutamina Treinado	0,770	0,975	1,063	1,411	1,394		1,123	0,124

Quadro A21- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de pmTOR no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 17C.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle		1,470	0,530	1,613	0,387		1,000	0,315
Treinado	2,241	0,938	0,297	0,752	0,403	0,503	0,856	0,293
Glutamina	3,353	0,777	0,711	1,154	0,443		1,287	0,529
Glutamina Treinado	2,956	0,663	0,673	0,848	0,846		1,197	0,442

Quadro A22- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Deptor no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 18A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,729	1,144	1,127	0,753	1,247		1,000	0,108
Treinado	1,288	1,575	1,883	0,576	2,292	1,426	1,693	0,180
Glutamina	1,306	1,284	2,865	1,381	2,298		1,827	0,321
Glutamina Treinado	0,701	0,979	1,967	1,564	3,659		1,303	0,285

Quadro A23- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Raptor no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 18B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,655	0,847	1,498	0,614	1,386		1,000	0,186
Treinado	1,152	0,632	2,520	0,716	4,041	2,282	1,460	0,396
Glutamina	0,978	0,462	3,433	2,010	5,070		2,872	0,889
Glutamina Treinado	0,400	0,534	1,468	2,034	9,717		1,109	0,389

Quadro A24- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Rictor no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 19A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,174	1,438	0,389	0,470	1,530		1,000	0,241
Treinado	1,831	0,545	0,523	0,726	2,571	0,415	1,102	0,363
Glutamina	1,774	0,542	0,523	1,045	0,894		0,956	0,228
Glutamina Treinado	0,711	0,563	0,250	1,689	0,642		0,771	0,243

Quadro A25- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Rheb no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 19B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,535	1,115	0,351	1,182	0,818		1,000	0,198
Treinado	1,320	0,904	0,393	1,375	1,598	0,392	1,299	0,145
Glutamina	2,647	0,415	0,166	0,951	0,485		0,504	0,164
Glutamina Treinado	1,245	0,206	0,193	0,764	0,263		0,534	0,207

Quadro A26- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Rag A no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 20A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,246	0,908	0,846	1,227	0,773		1,000	0,099
Treinado	1,069	0,822	0,690	0,987	0,678	0,360	0,768	0,104
Glutamina	1,547	0,418	0,512	0,789	0,422		0,535	0,087
Glutamina Treinado	1,153	0,315	0,608	0,681	0,305		0,612	0,155

Quadro A27- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Rag B no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 20B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,659	0,662	1,680	1,015	0,985		1,000	0,186
Treinado	0,848	0,794	1,448	1,147	0,780	0,557	0,929	0,129
Glutamina	1,131	0,344	0,587	0,801	0,961		0,765	0,138
Glutamina Treinado	1,004	0,385	1,237	0,852	0,317		0,759	0,178

Quadro A28- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Rag C no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 20C.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,652	1,367	0,981	0,722	1,278		1,000	0,143
Treinado	1,724	1,104	1,994	0,500	2,161	2,355	1,640	0,289
Glutamina	0,986	0,593	3,497	1,572	3,009		1,932	0,567
Glutamina Treinado	0,555	0,550	3,106	1,906	6,403		3,805	1,344

Quadro A29- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Fox01 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 21A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,809	1,031	1,071	1,542*	0,982	0,564	0,892	0,093
Treinado	0,560	0,598	0,717	1,218	0,942	1,252	0,881	0,124
Glutamina	0,534	0,607	0,779	0,719	0,545		0,637	0,048
Glutamina Treinado	0,534	0,483	0,779	1,090	0,463		0,670	0,119

Quadro A30- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Fox01 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 21B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,183*	1,275	1,542	0,544	1,456		1,204	0,227
Treinado	0,991	1,053	1,497	0,749	1,290	1,455	1,173	0,119
Glutamina	0,875	1,471	1,031	2,276	1,736		1,278	0,198
Glutamina Treinado	0,970	1,129	2,119	0,778			1,249	0,299

Quadro A31- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de pFox01 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 21C.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	2,568*	0,224	0,208	1,884*	0,116		0,183	0,034
Treinado	0,305	0,270	0,231	0,614*	0,114	0,104	0,205	0,041
Glutamina	0,364	0,177	0,444	0,255	0,080		0,264	0,065
Glutamina Treinado	0,204	0,207	0,416	0,267			0,273	0,050

Quadro A32- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de 4E-BP-1 no músculo EDL apresentados na figura 22A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,897	0,840	1,020	1,657	0,870	0,716	1,000	$\pm 0,137$
Treinado	1,128	0,855	1,168	0,948	1,318	1,278	1,116	$\pm 0,074$
Glutamina	0,671	0,888	1,063	1,568	1,089		1,056	$\pm 0,148$
Glutamina Treinado	0,800	0,648	1,093	0,910	0,843		0,859	$\pm 0,072$

Quadro A33- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína 4E-BP-1 no músculo EDL apresentados na figura 22B.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	1,02	0,97	1,01	0,90	1,10	0,57	0,66	1,83	0,94	1,00	0,12
Treinado	1,28	1,03	1,03	0,95	1,22	0,76	0,66	0,92	1,42	1,03	0,08
Glutamina	1,28	0,98	1,02	1,04	0,99	0,77	0,66	1,23	1,07	1,00	0,07
Glutamina Treinado	1,13	0,85	0,99	0,91	0,86	0,81	0,96	0,98		0,94	0,04

Quadro A34- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína p4E-BP1 no músculo EDL apresentados na figura 22C.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	0,26	0,72	2,0*	0,88	1,12	1,9*	0,92	1,09	0,02	0,72	0,16
Treinado	1,79	1,95	2,02	1,31	1,03	1,45	1,46	1,56	1,36	1,55	0,11
Glutamina	2,10	2,04	2,22	1,31	1,26	1,49	2,89	1,40	0,18	1,65	0,26
Glutamina Treinado	1,80	1,42	2,49	1,43	1,31	2,00	1,59	0,36		1,55	0,22

Quadro A35- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de p70S6K no músculo EDL apresentados na figura 23A.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	0,33	1,72	0,95	1,00	1,00	0,69	0,50	2,04	0,77	1,00	0,18
Treinado	0,87	1,17	0,94	0,62	1,44	0,79	0,59	0,73	1,20	0,93	0,10
Glutamina	1,15	0,82	0,65	1,61	0,59	0,52	1,21	1,11	0,99	0,96	0,12
Glutamina Treinado	1,22	0,33	1,54	0,76	1,02	0,48	0,90	0,82		0,88	0,14

Quadro A36- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína pp70S6K no músculo EDL apresentados na figura 23B.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	1,44	0,53	1,03	0,39	1,61	0,84	1,44	1,16	0,56	1,00	0,15
Treinado	1,16	0,63	1,30	2,85	4,67	2,66	1,87	2,09	1,38	1,74	0,27
Glutamina	1,33	0,3*	1,80	4,6*	3,70	2,19	1,96	1,39		2,43	0,48
Glutamina Treinado	1,20	0,97	1,18	0,81	1,87	2,8*	1,85	1,21		1,30	0,15

Quadro A37- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de S6 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 24A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,801	0,895	1,201	1,314	1,097	0,692	1,000	$\pm$0,099
Treinado	1,071	1,269	1,056	0,910	1,038	0,929	1,046	$\pm$0,053
Glutamina	0,635	0,888	1,056	1,164	1,020		0,953	$\pm$0,091
Glutamina Treinado	0,744	0,820	1,239	1,180	0,657		0,928	$\pm$0,118

Quadro A38- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de S6 no músculo EDL apresentados na figura 24B.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	1,06	1,07	0,87	0,93	1,07	0,39	1,53	1,11	0,96	1	0,10
Treinado	1,26	0,97	0,98	0,72	1,17	0,81	0,23	1,70	1,11	1,0	0,13
Glutamina	1,21	0,90	0,84	0,91	1,05	0,57	1,76	0,46	1,50	1,02	0,14
Glutamina Treinado	0,96	0,79	0,81	0,96	0,94	0,79	0,33	1,01		0,82	0,08

Quadro A39- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de pS6 no músculo EDL apresentados na figura 24C.

Grupos										Média	$\pm$ EPM
Controle	0,65	1,35	0,99	0,68	1,32	3,6*	0,21	0,09	0,01	0,67	0,19
Treinado	1,08	1,35	1,59	0,80	1,19	1,43	0,72	0,38	0,77	1,03	0,13
Glutamina	1,81	1,28	2,21	1,07	2,07	0,81	0,52	0,91	0,0*	1,33	0,22
Glutamina Treinado	2,29	0,87	0,94	1,58	1,62	0,77	1,30	0,39		1,22	0,21

Quadro A40- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de MuRF-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 25A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,734	0,982	0,952	1,509	1,049	0,773	1,000	0,114
Treinado	0,894	0,795	1,265	1,356	1,629*	1,770*	1,078	0,137
Glutamina	0,709	0,843	0,864	1,839*	1,156		0,893	0,094
Glutamina Treinado	0,992	0,547	0,765	0,873	0,867		0,809	0,075

Quadro A41- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de MuRF-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 25B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,7106	1,2826	1,0067	1,0530	0,9469		1,000	$\pm$0,092
Treinado	0,8429	1,5171	1,2303	0,9358	0,8378	1,137	1,083	$\pm$0,108
Glutamina	0,7074	1,3912	1,1819	0,6484	1,0745		1,000	$\pm$0,141
Glutamina Treinado	1,036	0,786	0,363	0,8768	0,5034		0,713	$\pm$0,123

Quadro A42- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Atrogin-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 26A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,918	1,143	0,800	1,354	1,005	0,780	1,000	0,090
Treinado	1,237	0,797	1,096	1,272	0,318	1,225	0,991	0,152
Glutamina	0,392	0,328	0,746	1,416	1,982		0,973	0,318
Glutamina Treinado	1,446	0,298	0,387	0,845	1,661		0,928	0,274

Quadro A43- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de Atrogin-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 26B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,418	1,587	0,995	0,950	1,050		1,000	$\pm$0,186
Treinado	0,861	1,652	0,803	0,810	1,372	0,744	1,040	$\pm$0,154
Glutamina	1,271	1,754	0,502	0,638	1,104		1,054	$\pm$0,226
Glutamina Treinado	1,572	1,145	0,174	0,877	0,607		0,875	$\pm$0,237

Quadro A44- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de GSK3-beta no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 27A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,717	0,804	1,479	1,127	0,873		1,000	$\pm 0,138$
Treinado	0,688	0,679	1,360	0,734	0,872	0,784	0,853	$\pm 0,106$
Glutamina	0,674	0,680	1,390	1,066	0,929		0,948	$\pm 0,134$
Glutamina Treinado	0,570	0,757	1,150	0,920			0,850	$\pm 0,123$

Quadro A45- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de pGSK3-beta no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 27B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,969	1,066	0,965	1,125	0,875		1,000	$\pm 0,044$
Treinado	0,686	0,965	0,994	1,145	1,052	1,077	0,986	$\pm 0,065$
Glutamina	0,814	0,871	1,021	1,139	0,987		0,967	$\pm 0,057$
Glutamina Treinado	0,912	0,820	0,937	1,061			0,932	$\pm 0,050$

Quadro A46- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de EIF2A no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 28A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,788	0,600	1,612	1,138	0,862		1,000	$\pm 0,176$
Treinado	0,559	0,620	1,502	1,138	0,862	0,656	0,889	$\pm 0,150$
Glutamina	0,540	0,702	1,503	0,915	0,973		0,926	$\pm 0,163$
Glutamina Treinado	0,600	1,612	1,172	0,900			1,071	$\pm 0,215$

Quadro A47- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de pEIF2A no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 28B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,195	0,981	0,824	0,842	0,895		0,947	$\pm 0,068$
Treinado	1,130	0,957	0,865	0,829	1,223	1,223	1,038	$\pm 0,072$
Glutamina	1,078	0,814	0,951	0,899	1,164		0,063	$\pm 0,063$
Glutamina Treinado	1,100	0,856	0,880	0,895			0,056	$\pm 0,056$

Quadro A48- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de eIF4E no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 29A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,254	0,865	0,881	0,816	1,184		1,000	$\pm 0,091$
Treinado	1,409	0,967	0,922	0,770	1,285	1,134	1,081	$\pm 0,098$
Glutamina	1,340	0,514	1,041	0,895	1,125		0,138	$\pm 0,138$
Glutamina Treinado	1,075	0,693	0,747	0,708			0,090	$\pm 0,090$

Quadro A49- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de HSP70 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 29B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,200*	1,431	1,369	1,113	0,887		1,200	0,125
Treinado	1,084	1,659	2,336	1,239	0,846	0,866	1,338	0,234
Glutamina	0,955	1,170	3,272	2,279	1,215		1,778	0,439
Glutamina Treinado	1,130	1,305	4,198	1,511	1,744		1,977	0,564

Quadro A50- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína de COX4 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 30A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,002	1,065	0,571	0,719	1,281		0,927	0,126
Treinado	1,116	0,997	0,933	0,922	1,580	0,984	1,089	0,102
Glutamina	0,865	0,891	0,642	1,096	1,392		0,977	0,126
Glutamina Treinado	0,727	0,571	1,023		0,753		0,769	0,094

Quadro A51- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína Caveolin-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 30B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,099	1,022	0,879	0,857	1,143		1,000	0,057
Treinado	1,087	0,888	0,890	0,928	1,298	1,011	1,017	0,064
Glutamina	0,948	0,687	0,783	1,031	1,020		0,894	0,068
Glutamina Treinado	0,763	0,734	1,005	0,973			0,869	0,070

Quadro A52- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de GPX-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 31A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,650	1,291	1,108	1,408	0,637	0,907	1,000	0,132
Treinado	1,606	0,747	1,346	0,664	1,108	1,819	1,094	0,178
Glutamina	0,604	0,885	1,452	1,234	1,584		1,044	0,187
Glutamina Treinado	1,067	0,843	1,341	0,982	0,907		1,028	0,087

Quadro A53- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de GPX-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 31B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,762	1,165	1,073	0,353	1,647		1,000	0,215
Treinado	1,170	0,811	1,097	0,725	1,662	1,308	1,129	0,139
Glutamina	1,124	0,369	0,864	0,998	1,616		0,994	0,201
Glutamina Treinado	0,732	0,394	1,468	1,305	0,124		0,805	0,258

Quadro A54- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de MAPK1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 32A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,853	1,212	0,934	0,888	1,112		1,000	0,069
Treinado	0,790	1,188	1,328	0,936	0,764	0,462	0,911	0,128
Glutamina	0,758	0,955	1,615	0,876	0,332		0,907	0,207
Glutamina Treinado	0,801	1,093	2,326	0,814	0,977		1,202	0,286

Quadro A55- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de pMAPK1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 32B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,882	1,199	0,919	1,524	0,476		1,000	0,175
Treinado	0,949	1,040	1,017	1,431	0,176	0,780	0,899	0,169
Glutamina	0,920	0,939	1,049	1,700	0,127		0,947	0,250
Glutamina Treinado	0,978	0,848	0,902	0,882	0,490		0,820	0,085

Quadro A56- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de MAPK3 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 33A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,867	1,151	0,982	1,123	0,877		1,000	0,060
Treinado	0,759	1,272	1,295	1,239	0,646	0,505	0,953	0,145
Glutamina	0,615	0,887	1,665	1,120	0,507		0,959	0,206
Glutamina Treinado	0,778	0,886	2,396	0,816	0,755		1,126	0,318

Quadro A57- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de pMAPK3 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 33B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,994	1,305	0,701	0,630	1,370		1,000	0,151
Treinado	0,948	1,190	0,718	1,189	0,985	0,135	0,861	0,162
Glutamina	0,934	0,777	0,731	1,932	0,967		1,068	0,221
Glutamina Treinado	1,044	0,525	0,476	1,424	0,355		0,765	0,203

Quadro A58- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de p38 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 34A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,415	1,530	1,054	0,901	1,099		1,000	0,180
Treinado	0,557	1,356	0,886	0,755	1,824		1,076	0,229
Glutamina	0,905	1,289	0,462	1,116	0,886		0,932	0,139
Glutamina Treinado	1,363	1,007	0,500	1,043			0,978	0,178

Quadro A59- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a proteína de pp38 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 34B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,613	1,392	0,995	0,759	1,241		1,000	0,145
Treinado	0,963	1,404	0,824	0,768	1,845	19,317	1,161	0,204
Glutamina	1,252	1,409	0,564	0,850	2,680		1,019	0,192
Glutamina Treinado	1,347	1,160	0,812	22,441			1,106	0,157

Quadro A60- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de IGF-1 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 35A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,365	0,730	1,170	0,981	0,931	1,780*	0,835	0,137
Treinado	1,363	2,261	1,259	2,465	1,401	0,845	1,599	0,256
Glutamina	0,994	1,436	2,080	0,802	0,777		1,218	0,246
Glutamina Treinado	1,081	1,312	1,768	1,471	0,640		1,254	0,190

Quadro A61- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de TGF-Beta no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 36A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,077	0,944	0,944	1,183	0,775	1,077	1,000	0,058
Treinado	0,772	0,938	0,964	0,899	0,733	0,825	0,855	0,038
Glutamina	0,684	1,030	1,008	0,726	0,336*		0,862	0,091
Glutamina Treinado	0,556	1,055	1,179	0,899			0,922	0,135

Quadro A62- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de IL-6 no músculo EDL (U.A) apresentados na Figura 36B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,997	1,121	0,549	1,157	1,822*	0,354	0,836	0,162
Treinado	2,387	0,674	1,334	1,712	9,549*	1,527	1,527	0,277
Glutamina	0,585	0,973	1,215	1,564	0,722		1,012	0,175
Glutamina Treinado	1,343	0,886	0,862	0,983	0,946		1,004	0,087

Quadro A63- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes a Correlação entre o conteúdo de glutamina e o grau de fosforilação de pAkt (A), pp70s6k (B), p4E-BP1 e pS6 (D) no músculo EDL apresentados na figura 37.

Correlação		Correlação	
[] glutamina	pAkt	[] glutamina	pp70S6k
1,071857	0,5717271	1,071857	0,3859021
1,689591	0,6273903	1,689591	0,5311077
6,974119	1,37261	6,974119	1,614098
2,574214	0,8390242	2,574214	1,438635
3,740237	0,8574782	3,740237	1,442538
6,677788	1,785968	6,677788	2,853678
1,994272	0,7409461	1,994272	1,872911
5,624057	1,269518	5,624057	2,663212
7,089653	3,51391	7,089653	4,66921
4,969769	1,135292	4,969769	2,089499
9,121946	2,943125	9,121946	4,642411
5,473167	0,9289021	5,473167	1,390897
5,952058	0,9961811	5,952058	1,956738
5,728602	1,05004	5,728602	1,802863
7,512558	2,216612	7,512558	3,701925
6,668298	1,480855	6,668298	2,185637
1,937868	0,8505196	1,937868	0,9738358
0,1516113	0,4025652	0,1516113	0,8115995
2,585443	0,8433271	3,870826	1,176371
3,995713	1,079599	2,585443	0,9738358
9,492702	3,937783	3,995713	1,200014

Correlação		Correlação	
[] glutamina	p4E-BP1	[] glutamina	pS6
1,071857	0,2626576	1,071857	0,6534495
1,689591	0,7186592	1,689591	0,6832098
6,974119	1,972691	6,974119	1,352748
2,574214	0,9170692	2,574214	0,9938027
3,740237	1,088183	3,740237	1,31679
6,677788	1,952667	6,677788	1,428447
1,994272	1,034601	1,994272	0,7189625
5,624057	1,462388	5,624057	1,594049
7,089653	1,952667	7,089653	1,189378
4,969769	1,359782	4,969769	1,352877
9,121946	2,889044	9,121946	2,206876
5,473167	2,099412	5,473167	1,280463
3,751498	1,258162	5,952058	1,074896
5,952058	1,487695	5,728602	0,9060218
5,728602	1,404084	7,512558	2,066415
7,512558	2,222065	6,668298	1,813441
1,937868	1,422192	1,937868	0,7732537
0,1516113	0,3579331	0,1516113	0,3946728
3,870826	1,800891	3,870826	0,9433405
2,585443	1,429933	2,585443	0,8679298
3,995713	1,59257	3,995713	1,296098

Quadro A64- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína Akt-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 38A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,424	0,794	0,782	0,260	1,444	1,296	1,000	$\pm 0,192$
Treinado	1,199	0,905	0,662	0,467	1,388	0,873	0,916	$\pm 0,138$
Glutamina	1,190	0,712	1,121	0,886	1,617		1,105	$\pm 0,154$
Glutamina Treinado	0,372	0,606	0,544	1,096	1,081		0,740	$\pm 0,147$

Quadro A65- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína pAkt-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 38B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,715	1,165	1,120	1,911	0,705	0,383	1,000	$\pm 0,218$
Treinado	0,708	1,059	1,496	1,927	0,714	0,326	1,038	$\pm 0,239$
Glutamina	0,812	1,376	1,041	0,942	0,894		1,013	$\pm 0,098$
Glutamina Treinado	1,545	1,633	1,291	1,110	0,546		1,225	$\pm 0,193$

Quadro A66- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de 4EBP1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 39A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,933	1,014	0,864	1,370	1,141	0,678	1,000	$\pm 0,097$
Treinado	0,847	1,338	1,090	1,049	0,745	1,469	1,090	$\pm 0,113$
Glutamina	1,338	0,709	0,946	1,796	0,949		1,148	$\pm 0,191$
Glutamina Treinado	0,926	0,983	1,444	0,774	1,068		1,039	$\pm 0,112$

Quadro A67- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína 4EBP-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 39B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,924	1,162	0,914	0,457	1,487	1,056	1,109	$\pm 0,105$
Treinado	1,244	1,335	1,244	1,412	1,440	0,980	1,276	$\pm 0,068$
Glutamina	1,100	1,163	1,206	1,533	1,238		1,248	$\pm 0,075$
Glutamina Treinado	0,975	1,025	0,989	1,345	0,969		1,061	$\pm 0,072$

Quadro A68- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína p4EBP-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 39C.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,425	0,701	0,874	0,773	0,727	1,499	1,000	$\pm 0,148$
Treinado	1,630	0,641	0,843	1,719	1,109	0,813	1,126	$\pm 0,184$
Glutamina	0,866	0,692	0,899	1,886	1,601		0,234	$\pm 0,234$
Glutamina Treinado	0,630	0,788	0,809	1,695	1,487		0,213	$\pm 0,213$

Quadro A69- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de S6 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 40A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,929	1,568	0,712	0,898	0,898	0,996	1,000	$\pm 0,120$
Treinado	0,913	1,132	0,939	1,172	0,910	1,152	1,036	$\pm 0,052$
Glutamina	0,817	0,936	0,798	1,351	0,904		0,961	$\pm 0,101$
Glutamina Treinado	0,637	0,635	0,644	0,348	0,929		0,639	$\pm 0,092$

Quadro A70- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína S6 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 40B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,136	0,730	0,980	0,890	1,147	0,963	0,974	$\pm 0,064$
Treinado	1,412	1,074	1,026	1,343	1,277	0,790	1,154	$\pm 0,095$
Glutamina	1,038	1,019	0,983	1,404	1,177		1,124	$\pm 0,077$
Glutamina Treinado	0,730	0,879	0,632	1,186	1,033		0,892	$\pm 0,100$

Quadro A71- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína pS6 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 40C.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,171	0,925	0,903	0,947	1,021	1,032	1,000	$\pm 0,040$
Treinado	1,110	0,613	0,828	1,202	1,052	0,847	0,942	$\pm 0,089$
Glutamina	0,851	0,665	0,923	1,158	1,299		0,979	$\pm 0,112$
Glutamina Treinado	0,874	0,748	0,585	1,092	1,130		0,886	$\pm 0,103$

Quadro A72- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Murf-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 41A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,521	1,039	0,946	1,079	1,141	1,274	1,000	$\pm 0,106$
Treinado	0,787	0,760	1,050	1,653	1,790	2,378	1,403	$\pm 0,263$
Glutamina	0,642	0,536	0,714	1,699	0,898		0,898	$\pm 0,209$
Glutamina Treinado	0,468	0,653	0,697	0,496	0,662		0,595	$\pm 0,047$

Quadro A73- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína Murf-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 41B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,201	0,876	0,923	0,528	1,414	1,059	1,000	$\pm 0,124$
Treinado	1,442	1,130	1,229	1,723	1,408	1,038	1,249	$\pm 0,078$
Glutamina	0,934	1,135	1,011	1,793	1,590		1,293	$\pm 0,169$
Glutamina Treinado	0,762	1,090	0,807	1,239	1,117		1,003	$\pm 0,093$

Quadro A74- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de Atrogin-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 42A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,680	1,222	0,594	1,071	1,265	1,168	1,000	$\pm 0,118$
Treinado	0,697	1,483	0,763	1,623	1,635		1,240	$\pm 0,210$
Glutamina	0,675	0,962	0,692	1,256	1,128		0,943	$\pm 0,116$
Glutamina Treinado	0,876	1,365	1,164	0,320	1,140		0,973	$\pm 0,181$

Quadro A75- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína Atrogin-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 42B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,276	1,831	0,894	0,426	1,627	0,947	1,000	$\pm 0,255$
Treinado	1,369	2,384	1,442	1,484	1,303	0,423	1,401	$\pm 0,255$
Glutamina	1,483	2,044	1,017	1,518	1,443		1,501	$\pm 0,163$
Glutamina Treinado	1,390	2,015	0,867	1,621	1,182		1,415	$\pm 0,195$

Quadro A76- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína GPX-1 no músculo sóleo apresentados na figura 43A.

Grupos												Média	$\pm$ EPM
Controle	1,51	1,05	0,44	1,16	1,26	0,57	0,63	1,07	1,47	1,13	0,70	1	0,109
Treinado	1,81	1,02	0,73	2,70	1,42	0,58	1,00	1,57	1,43			1,36	0,21
Glutamina	1,15	0,75	0,54	1,36	1,66	0,79	1,12	1,16				1,07	0,13
Glutamina Treinado	0,93	0,62	0,25	1,31	0,90	0,95	0,21	1,15				0,79	0,14

Quadro A77- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína COX4 no músculo sóleo apresentados na figura 43B.

Grupos												Média	$\pm$ EPM
Controle	0,94	0,93	1,13	1,10	1,00	0,90	0,34	1,09	1,65	1,17	0,76	1	0,096
Treinado	1,59	1,16	1,70	1,37	1,16	0,9*	0,90	1,44	1,73			1,38	0,10
Glutamina	0,95	1,28	1,42	0,94	1,19	0,71	1,04	1,17				1,09	0,08
Glutamina Treinado	0,75	1,34	0,97	0,93	1,07	0,83	0,80	1,20				0,99	0,07

Quadro A78- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína TSC1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 44A.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	1,124	0,963	0,912	1,485	1,034	0,481	1,104	0,102
Treinado	0,631	0,626	0,357	0,847	0,676	1,060	0,627	0,079
Glutamina	1,108	0,662	1,343	0,293	0,831		0,847	0,181
Glutamina Treinado	0,235	0,550	0,819	0,614	0,550		0,553	0,094

Quadro A79- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes ao mRNA de IGF-1 no músculo sóleo (U.A) apresentados na Figura 44B.

Grupos							Média	$\pm$ EPM
Controle	0,959	1,394	0,774	0,642	0,939	1,292	1,000	$\pm 0,119$
Treinado	0,952	1,905	1,039	0,669	1,007	0,930	1,084	$\pm 0,173$
Glutamina	0,966	1,121	1,090	0,648	0,420		0,849	$\pm 0,136$
Glutamina Treinado	0,750	0,983	1,292	0,375	0,969		0,874	$\pm 0,152$

Quadro A80- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína AIF no músculo sóleo apresentados na figura 45A.

Grupos												Média	$\pm$ EPM
Controle	0,97	1,18	0,85	0,87	1,1*	0,96	0,45	0,68	1,7*	1,60*	0,56	0,82	0,08
Treinado	1,30	0,7*	1,08	1,28	1,19	1,65	0,4*	1,05	0,94			1,21	0,09
Glutamina	1,07	0,96	0,90	1,18	1,00	0,0*	1,59	1,13				1,12	0,09
Glutamina Treinado	1,10	1,07	1,21	1,23	0,65	0,20	0,39	1,62				0,93	0,17

Quadro A81- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à proteína HTRA2 no músculo sóleo apresentados na figura 45B.

Grupos												Média	$\pm$ EPM
Controle	0,82	1,45	0,74	0,78	1,44	0,78	0,24	1,67	1,09	1,04	0,97	1,00	0,12
Treinado	0,67*	1,71	0,92	1,44	1,90	2,66	0,32	2,29	2,68			1,74	0,29
Glutamina	0,99	0,76	0,73	1,54	1,08	0,40	2,10	0,40				1,00	0,21
Glutamina Treinado	1,32	1,26	1,26	1,55	1,45	0,98	0,44	0,42				1,08	0,15

Quadro A82- Dados individuais e média $\pm$ EPM referentes à Correlação entre o conteúdo de glutamina e o grau de fosforilação de pAkt (A), pS6 (B) e p4E-BP1 no musculo sóleo dos animais na figura 46.

Correlação		Correlação	
[] glutamina	pAkt	[] glutamina	pS6
14,89973	0,7150936	14,89973	1,171445
18,99405	1,165335	18,99405	0,9253338
14,63049	1,119571	14,63049	0,9032212
17,28369	1,91141	17,28369	0,9466566
5,281126	0,7054606	5,281126	1,021255
0,2880614	0,3831292	0,2880614	1,032089
6,361357	0,7082312	6,361357	1,109932
17,39038	1,058711	17,39038	0,6127904
9,684825	1,496072	9,684825	0,8282725
16,99563	1,926679	16,99563	1,202418
23,96148	0,7144536	23,96148	1,052121
26,81187	0,3260001	26,81187	0,8472769
21,24453	0,8115155	21,24453	0,8513739
18,96405	1,375704	18,96405	0,6652555
12,28497	1,041373	12,28497	0,9231685
10,08215	0,9417282	10,08215	1,158496
14,27214	0,8936461	14,27214	1,298547
20,61913	1,544747	20,61913	0,8737684
10,28081	1,632833	10,28081	0,7482636
18,60397	1,290559	18,60397	0,58525
9,306601	1,109959	9,306601	1,091667
23,04492	0,5463131	23,04492	1,129908

Correlação	
[] glutamina	p4E-BP1
14,89973	1,424905
18,99405	0,7009357
14,63049	0,8741591
17,28369	0,7734056
5,281126	0,7271259
0,2880614	1,499469
6,361357	1,630074
17,39038	0,6410225
9,684825	0,8426821
16,99563	1,719284
23,96148	1,108957
26,81187	0,8131576
21,24453	0,8659548
18,96405	0,6917714
12,28497	0,8986863
10,08215	1,886472
14,27214	1,601431
20,61913	0,6295629
10,28081	0,7878741
18,60397	0,8087341
9,306601	1,694836
23,04492	1,486906