

**DIOGO ANTONIO ALVES DE VASCONCELOS**

**Efeitos da L-glutamina sobre a atividade das vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de camundongos e no conteúdo intracelular de aminoácidos em miotubos cultivados**

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadores: Prof. Dr. Rui Curi

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tania Cristina Pithon-Curi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2015

## RESUMO

VASCONCELOS DAA. Efeitos da L-glutamina sobre a atividade das vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético de camundongos e no conteúdo intracelular de aminoácidos em miotubos cultivados. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma e no músculo esquelético de mamíferos e desempenha funções importantes em diversos tecidos como a preservação da massa muscular. A manutenção do tecido muscular esquelético ocorre pelo balanço entre síntese e degradação de proteínas. Alguns aminoácidos (como a leucina) estimulam a via de síntese de proteínas. Por outro lado, a glutamina parece ser necessária para que a síntese de proteínas, estimulada por fatores de crescimento, ocorra nas células. No presente estudo, investigou-se os efeitos da administração de L-glutamina (1g/kg de massa corpórea) em camundongos submetidos a 24 horas de jejum e avaliou-se: massa seca dos músculos sóleo, extensor longo dos dedos (EDL), gastrocnêmio e tibial anterior, áreas da secção transversa (AST) das fibras dos músculos sóleo e EDL e conteúdos de proteínas totais e fosforiladas das vias de sinalização da síntese (Akt-Ser473, S6-Ser240/244, 4E-BP1-Thr37/46) e degradação (*MuRF-1* e atrogina-1) de proteínas. A suplementação de L-glutamina atenuou a perda de massa muscular e a diminuição da AST das fibras musculares esqueléticas causadas pelo jejum. Essa atenuação ocorreu pela via Akt-mTOR, porém, atuando em proteínas diferentes dependendo do tipo de fibra muscular. No músculo vermelho (sóleo), a suplementação de L-glutamina estimulou a proteína Akt (início da via), enquanto que no músculo branco (EDL) ativou a proteína S6 (final da via). Investigou-se também os efeitos de diferentes concentrações de L-glutamina (ausência, ausência com inibidor de glutamina sintetase (MSO), 2, 8 e 16 mM) em miotubos ( $C_2C_{12}$ ) cultivados por 48 horas. Os seguintes parâmetros foram estudados: composição dos aminoácidos no interior da célula, avaliada por cromatografia líquida e espectrometria de massa, e conteúdos de Akt (Ser-473), S6K (Thr-380) e eIF2 $\alpha$  (Ser-51) fosforiladas. A diminuição de L-glutamina no meio de cultura (de 2 para zero mM) causou balanço proteico negativo e aumento do conteúdo de todos os aminoácidos livres, exceto glutamato, aspartato, asparagina, alanina e prolina, que são produtos da

glutaminólise, indicando estimulação de proteólise ou inibição de síntese proteica. O aumento da concentração de L-glutamina no meio de cultura (de 2 para 8 e 16 mM) não alterou o conteúdo intracelular de proteínas e dos aminoácidos livres. Na presença de 2 mM de glutamina no meio de cultura, a insulina apresentou efeito positivo sobre o balanço proteico via Akt/mTOR/S6K, estimulando a S6K. Por sua vez, na ausência de glutamina, houve maior fosforilação de eIF2 $\alpha$  estimulada por dexametasona e, portanto, menor síntese proteica.

**Palavras-chave:** Massa muscular esquelética. Metabolismo de aminoácidos. Balanço proteico muscular. S6K. Akt. eIF2 $\alpha$ . 4E-BP1. Leucina. Isoleucina. Valina. Insulina. Dexametasona.

## ABSTRACT

VASCONCELOS DAA. Effects of L-glutamine on the signaling pathways of protein synthesis and degradation in skeletal muscle and intracellular free amino acids content in cultured myotubes. [Ph. D. thesis (Human Physiology). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Glutamine is the most abundant amino acid in plasma and skeletal muscle of mammals and plays important roles in several tissues such as preservation of the muscle mass. The maintenance of muscle tissue mass occurs through the balance between synthesis and degradation of proteins. Some amino acids (such as leucine) stimulate protein synthesis pathway. On the other hand, glutamine seems to be necessary for growth factor-stimulated protein synthesis to occur in the cells. In this study, we investigated the effects of L-glutamine administration (1g/kg of body mass) on 24 h fasted mice and the following parameters were measured: dry of soleus, extensor digitorum longus, gastrocnemius and tibialis anterior muscles, the cross-sectional areas (CSA) of soleus and EDL muscles fibers, and total and phosphorylated protein contents of the signaling pathways involved in protein synthesis (Akt-Ser473, Ser240-S6/244, 4E-BP1-Thr37/46) and degradation (*MuRF*-1 and atrogin-1). L-Glutamine supplementation attenuated the loss of muscle mass and the reduction of the CSA skeletal muscle fibers caused by fasting. This attenuation occurred via Akt-mTOR, however, glutamine affected different signaling proteins depending on the type of skeletal muscle fiber. Supplementation with L-glutamine stimulated Akt (upstream) in the red muscle (soleus), whereas it activated S6 (downstream) in the white muscle (EDL). The effects of different concentrations of L-glutamine (zero, zero with glutamine synthetase inhibitor (MSO), 2, 8 and 16 mM) on myotubes (*C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>*) cultured for 48 hours were examined. The following parameters were measured: intracellular amino acid composition by liquid chromatography and mass spectrometry and levels of phosphorylated Akt (Ser-473), S6K (Thr-380) and eIF2 $\alpha$  (Ser-51). The reduction of L-glutamine concentration in the culture medium (from 2 to zero mM) decreased protein content and increased contents of all amino acids except glutamate, aspartate, and asparagine, alanine and proline that are produced through glutaminolysis, indicating stimulation of proteolysis or inhibition of protein synthesis. The increased L-glutamine levels in the culture medium (from 2 to 8 and 16 mM) did not change the intracellular contents of protein and free amino

acids. In the presence of 2 mM glutamine in the culture medium, insulin had a positive effect on total protein content through Akt/ mTOR/S6K pathway, stimulating S6K. In turn, in the absence of L-glutamine, there was increased eIF2 $\alpha$  phosphorylation stimulated by dexamethasone and thus less protein synthesis.

**Keywords:** Skeletal muscle mass. Amino acid metabolism. Protein turnover of skeletal muscle. S6K. Akt. eIF2 $\alpha$ . 4E-BP1. Leucine. Isoleucine. Valine. Insulin. Dexamethasone.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Função metabólica do músculo esquelético

O tecido muscular representa 40-50% do peso corporal e é responsável por metabolizar 70-80% da glicose plasmática disponível em estados pós-prandiais (Goodman et al., 2011; Kleinert et al., 2011). Esse tecido desempenha função importante na integração do metabolismo intermediário. O músculo esquelético representa 60% da massa proteica do organismo humano (Wu, 2013). Em condições catabólicas, há degradação de proteínas e liberação de aminoácidos para o plasma. Por outro lado, durante condições anabólicas, ocorre captação de aminoácidos e síntese de proteínas (Garber et al., 1976). Assim, o músculo esquelético é também um reservatório de compostos nitrogenados em forma de aminoácidos e proteínas.

A redução da massa muscular é determinada por fatores extracelulares e intracelulares que modulam vias de sinalização e regulam o balanço proteico. Dentre esses fatores, destacam-se o aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, a redução da sobrecarga funcional, disponibilidade de nutrientes no interior das células, atividade neural e a concentração plasmática de fatores de crescimento, testosterona, GH (hormônio do crescimento), desidroepiandrosterona (DHEA), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), estradiol, progesterona e glicocorticoides (Egerman, Glass, 2014; Goodman; Mayhew et al., 2011; Welle, 2002; Wu, 2013).

## 1.2 Atrofia do músculo esquelético no jejum

Em diversas condições e doenças ocorre diminuição da massa muscular como no diabetes, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), septicemia, doença renal crônica, cardiopatias e envelhecimento, assim como no jejum prolongado (Dehoux et al., 2004; Schiaffino; Mammucari, 2011).

Durante o jejum, há diminuição das concentrações plasmáticas de insulina devido à redução da sua secreção. Isso é causado pela baixa glicemia e aumento da atividade simpática e liberação de noradrenalina (Jensen et al., 2013). Esta última

promove hidrólise de triacilgliceróis no tecido adiposo branco, liberação e aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea (Jensen; Kiersgaard et al., 2013). A condição de jejum é acompanhada de resistência à insulina no músculo esquelético (Silveira et al., 2008). Também ocorre aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticoides, o que promove degradação de proteínas e aumento do conteúdo total de aminoácidos livres no músculo esquelético (Busquets et al., 2002; Garber; Karl et al., 1976; Jensen; Kiersgaard et al., 2013; Jagoe et al., 2002; Long et al., 2001). Em diversos estudos, a intensidade da proteólise foi estimada pelo conteúdo dos aminoácidos leucina, tirosina e fenilalanina no músculo esquelético (Evans et al., 2007; Garber; Karl et al., 1976).

Durante jejum de 24 horas, a célula muscular utiliza de modo intenso o metabolismo oxidativo mitocondrial para a produção de ATP. De Lange et al. (2007) demonstraram que o conteúdo de AMP aumenta, bem como a ativação de AMPK em células musculares esqueléticas submetidas ao jejum de 6 horas. À medida que a concentração intracelular de ácidos graxos aumenta, diminui a ativação de AMPK, o que é observado após 12 horas de jejum. Por sua vez, o conteúdo de AMP se mantém aumentado durante este período. Em 24 horas de jejum, há aumento ainda mais acentuado da concentração intracelular de ácidos graxos, e queda abrupta de AMP e da fosforilação de AMPK. Esses achados demonstram a intensa utilização de ácidos graxos pela célula muscular esquelética (de Lange et al., 2007). Dessa maneira, o ácido graxo passa a ser o substrato preferencial para produção de ATP, diminuindo o consumo de glicose (Silveira; Fiamoncini et al., 2008; Randle et al., 1963). Vale salientar que a utilização de ácidos graxos é substancialmente favorecida pela geração de intermediários do ciclo de Krebs (piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato e oxaloacetato) a partir do metabolismo de aminoácidos advindos da proteólise muscular ou da corrente sanguínea. Assim, durante o jejum de 24 horas, há oxidação de ácidos graxos e dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina (BCAAs), asparagina, aspartato e glutamato para geração de ATP na mitocôndria. A partir da metabolização dos aminoácidos de cadeia ramificada, são sintetizadas alanina e glutamina que são liberadas para a corrente sanguínea. Os glicocorticoides agem também aumentando a expressão da glutamina sintetase e, dessa forma, a síntese de glutamina (Jagoe; Lecker et al., 2002).

O jejum promove perda de massa muscular, porém, músculos com predominância de fibras oxidativas são mais resistentes comparados aos músculos com predominância de fibras glicolíticas (Sandri et al., 2006). Augusto et al. (2004) determinaram a caracterização de predominância em fibras dos músculos sóleo, EDL (extensor longos dos dedos), tibial anterior e gastrocnêmio em camundongos C57/Black6 adultos (12 semanas de idade). Os autores reportaram que o músculo sóleo apresenta predominância de fibras do tipo I (37%) e IIA (38%); EDL IIB (66%) e IIDB (28%); tibial anterior IIB (59%) e IIDB (33%) e gastrocnêmio IIB (54%) e IIDB (19%). As características metabólicas e funcionais das fibras são: tipo I – contração lenta, metabolismo predominantemente oxidativo e alto conteúdo de mioglobina; tipo IIA – contração rápida, metabolismo oxidativo e glicolítico e conteúdo intermediário de mioglobina; fibra do tipo IIB – contração rápida, metabolismo predominantemente glicolítico e baixo conteúdo de mioglobina. A seguir está a representação da transição dos tipos de fibras musculares:  $I \leftrightarrow IC \leftrightarrow IIC \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIAD \leftrightarrow IID \leftrightarrow IIDB \leftrightarrow IIB$  (Augusto et al., 2004; Schiaffino, Reggiani, 2011).

O sóleo é um músculo vermelho devido à predominância de fibras IA com alto conteúdo de mioglobina (Schiaffino; Reggiani, 2011). As propriedades oxidativas que esse músculo apresenta estão associadas à menor vulnerabilidade à atrofia muscular comparado aos outros tipos de músculos. Além de apresentarem menor quantidade de receptores para glicocorticoides, os músculos vermelhos possuem maior número de mitocôndrias e conteúdo mais elevado de PGC1- $\alpha$  (Sandri; Lin et al., 2006). Este fator inibe a indução de atrofia muscular via Foxo (Sandri; Lin et al., 2006). Os músculos EDL e tibial anterior são brancos por apresentarem predominância de fibras do tipo IIB. O músculo gastrocnêmio é considerado misto pois, apesar de apresentar predominância de fibras IIB, observam-se também presença significativa de fibras dos tipos I (mioglobinas e mitocôndrias) e IIA, maior porcentagem em relação aos músculos EDL e tibial anterior (Augusto; Padovani et al., 2004; Sandri; Lin et al., 2006; Schiaffino, Reggiani, 2011).

No jejum, os miócitos apresentam captação reduzida de glicose e aminoácidos, degradação aumentada de glicogênio e de proteínas, além de liberação elevada de aminoácidos (Mutel et al., 2011; Ruderman, 1975) pela ação do cortisol e/ou epinefrina. Ao contrário de situações anabólicas, como, por exemplo, no estado pós-prandial, as células musculares esqueléticas, quando estimuladas pela



insulina ou IGF-1, aumentam a captação de glicose e aminoácidos, além de elevarem a síntese de glicogênio e de proteínas (Dehoux; Van Beneden et al. 2004).

### *1.3 Vias de síntese e degradação de proteínas no músculo esquelético*

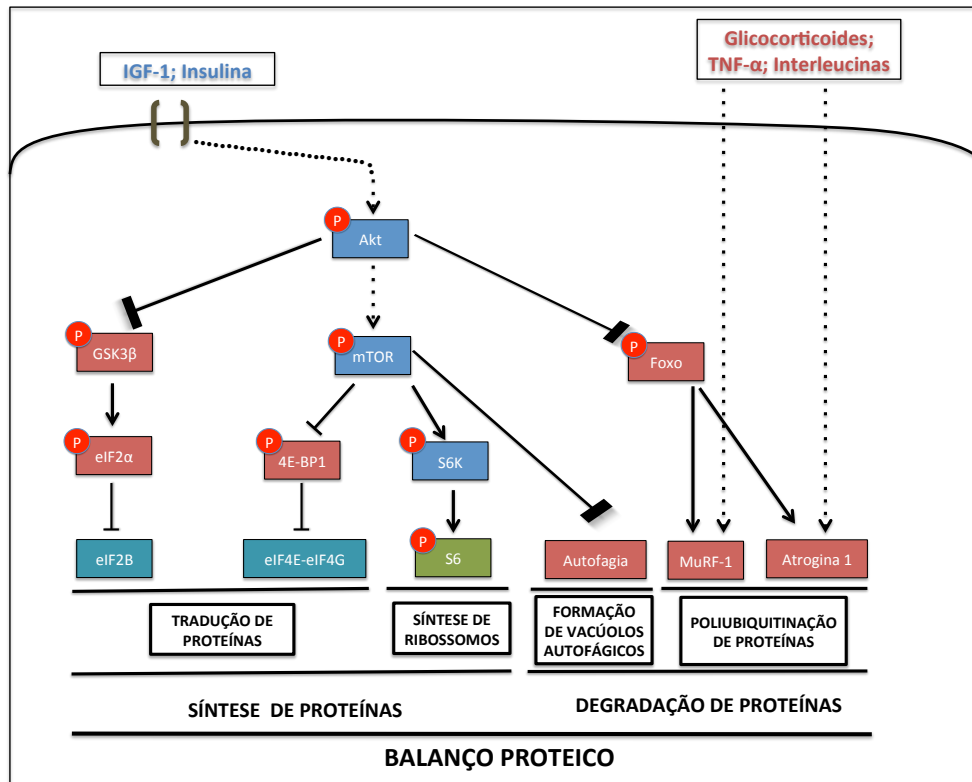
As vias de degradação proteica são estimuladas pelo aumento da concentração plasmática de glicocorticoides e TNF- $\alpha$ , por exemplo (Bailey, 2013, Egerman, Glass, 2013, Furlow et al., 2013). Nessas condições, há aumento da expressão de ubiquitinas ligases E3 específicas do músculo esquelético, *MuRF-1* e atrogina-1, as quais fazem parte da regulação da degradação proteossomal, além de outras proteases (catepsinas e calpaínas) que também participam desse processo ativamente (Bodine et al., 2001; Clarke et al., 2007; Gomes et al., 2001; Jagoe; Lecker et al., 2002). A baixa insulinemia, o aumento da resistência à ação da insulina e a baixa concentração plasmática de IGF-1 (Dehoux; Van Beneden et al., 2004), observados no jejum, elevam a proteólise intralisossomal pela formação de vacúolos autofágicos, além de inibir a via de sinalização da síntese de proteínas (Diagrama 1) (Jagoe; Lecker et al., 2002; Glass, 2005).

Bodine et al. (2001) e Glass (2003) descreveram a sequência da via IGF-1/Akt/mTOR. Esses pesquisadores demonstraram que a via do IGF-1/Akt/mTOR, frente a um estímulo hipertrófico, induz síntese de proteínas e aumento do diâmetro da fibra muscular esquelética (Bodine et al., 2001, Glass, 2003, 2010). A via de IGF-1/Akt/mTOR inicia-se com a ligação do IGF-1 ao seu receptor IGF-IR, induzindo mudança na sua conformação e autofosforilação da subunidade tirosina quinase.

O IRS-1 (substrato do receptor de insulina 1) ancora-se à subunidade tirosina quinase do receptor de IGF-1, sendo ativado (Egerman, Glass, 2013). O IRS-1 liga-se à subunidade p85 da proteína PI3K (fosfatidil inositol 3 quinase), que se encontra na membrana plasmática, fosforilando-a. Em seguida, PI3K fosforila PIP2 (fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato) a PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5-trisfosfato). O PIP3 recruta duas proteínas quinases, a Akt (também denominada de proteína quinase B ou PKB) e a proteína-quinase 1 dependente de fosfatídeos (PDK1), para a membrana plasmática. Esse mecanismo leva à ativação da Akt por fosforilação na serina 473. A

Akt é uma proteína citoplasmática e fosforila proteínas específicas (Egerman; Glass, 2013).

A proteína quinase Akt fosforila TSC2, o que interrompe a interação do complexo TSC (TSC1-TSC2) com a mTOR1 (Diagrama 1). O complexo TSC1-TSC2 inibe o complexo mTOR 1 quando não está fosforilado (Laplante; Sabatini, 2012). A proteína mTOR é uma serina-treonina quinase de 289 KDa composta por dois complexos mTOR 1 e mTOR 2. O complexo mTOR2 está relacionado com a sobrevivência e a proliferação das células, enquanto que o complexo mTOR1 está envolvido com o crescimento e o metabolismo celulares (Laplante; Sabatini, 2012). Já está bem estabelecido que a via da mTOR1 é sensível a nutrientes independente de estímulos (Han et al., 2012; Meijer; Dubbelhuis, 2004). A leucina ativa o complexo mTOR1 e aumenta a síntese de proteínas (Egerman; Glass, 2014). O mecanismo de ação envolve a enzima leucil-tRNA sintetase que atua como sensora da concentração intracelular de leucina (Egerman; Glass, 2014).



**Diagrama 1. Esquema representativo das vias de síntese e degradação de proteínas que determinam o balanço proteico muscular.** Na cor vermelha estão representados proteínas e fatores negativos para o balanço proteico, e em azul ou verde, são representados proteínas e fatores que induzem balanço proteico positivo. As setas (cheias) em cor preta indicam que a ativação ocorre de forma direta, as setas tracejadas indicam que a estimulação é indireta (ocorrem passos anteriores para ativação da proteína apontada). **Akt** – *protein kinase B*; **mTOR** - *Mammalian target of rapamycin*; **S6K ou P70S6K** - *ribosomal protein kinase*; **S6** - *ribosomal protein*; **eIF2B** - *eukaryotic Initiation factor 2B*; **GSK3-β** - *glycogen synthase kinase 3-β*; **MuRF-1** - *muscle RING-finger protein-1*; **TNF-α** - *tumor necrosis factor – α*; **Foxo** - *forkhead box O*; **4E-BP1** - *4E-binding protein 1*; **eIF2α** - *eukaryotic initiation factor 2 α*. Figura modificada de Glass (2005). Os dados apresentados foram obtidos dos seguintes trabalhos publicados: (Glass, 2005; Miyazaki; Esser, 2009; Nicklin et al., 2009).

A proteína mTOR1 fosforila as proteínas S6K e 4EBP1 (Glass, 2003; Laplante; Sabatini, 2009). A S6K, também chamada de P70S6K, quando ativada, induz fosforilação da proteína ribossomal S6. A última proteína está envolvida diretamente com a síntese dos ribossomos, promovendo, dessa maneira, aumento da síntese de proteínas (Hu et al., 2012; Schiaffino; Mammucari, 2011). A proteína 4E-BP1 é um fator inibitório da síntese proteica e favorece a tradução de proteínas quando apresenta-se inibida por fosforilação. Quando a 4E-BP1 está na forma ativa

(não fosforilada), se liga ao fator de iniciação de tradução eIF4E, impedindo a sua interação com eIF4G (Richter; Sonenberg, 2005). Porém, quando a mesma é hiperfosforilada por mTORC1 e inibida, evita-se que a 4E-BP1 se ligue a eIF4E (fator de iniciação de tradução). Dessa maneira, a formação do complexo eIF4E-eIF4G permite que ocorra a tradução de proteínas (Bodine; Stitt et al., 2001; Hu; Katz et al., 2012; Richter; Sonenberg, 2005).

Além disso, quando mTOR1 está ativada e conseqüentemente a S6 está fosforilada, há a diminuição de autofagia (Nicklin; Bergman et al., 2009). Autofagia que é um processo de degradação lisossomal que ajusta a resposta celular à disponibilidade de nutrientes por degradar e reciclar conteúdos intracelulares não essenciais (Chen et al., 2014).

A AKT, enquanto fosforilada e ativada por um estímulo anabólico, inibe a proteína GSK3- $\beta$  por fosforilação (Schiaffino; Mammucari, 2011). Esta última, quando ativada, impede a formação do complexo eIF2B por fosforilação da proteína eIF2 $\alpha$  (Proud, 2006). Portanto, a proteína GSK3- $\beta$  é um regulador negativo da síntese de proteínas. Contudo, a participação da via da GSK3- $\beta$  na indução da hipertrofia muscular é significativamente menos relevante quando comparada à indução via mTOR (Bodine; Stitt et al., 2001). Quando o complexo eIF2B está ativado, há também ativação do fator de transcrição ATF-4, o qual promove aumento da expressão do RNAm de transportadores intracelulares de aminoácidos e, conseqüentemente, permite que a síntese de proteínas ocorra (Adams, 2007; Ebert; Monteys et al., 2010). Por outro lado, sob um estímulo catabólico, a proteína GSK3- $\beta$  não é inibida, portanto, essa proteína fosforila a proteína eIF2 $\alpha$ , havendo, então, inibição do complexo eIF2B para inicializar a tradução parcial de proteínas. Dessa forma, interrompem-se a síntese de proteínas e a ativação de ATF-4 (Adams, 2007; Ebert; Monteys et al., 2010; Harding et al., 2000; Proud, 2006).

A proteína Akt também atua concomitantemente nas vias de degradação e de síntese de proteínas (Schiaffino; Mammucari, 2011). A Akt inibe as proteínas Foxo (Foxo3; Foxo1) que regulam a expressão das ubiquitinas ligases, *MuRF-1* e atrogina-1, causando atrofia muscular (Diagrama 1) (Hu; Katz et al., 2012; Sandri; Lin et al., 2006).

#### 1.4 Controle das atividades das vias de síntese e degradação de proteínas por aminoácidos

Os aminoácidos não participam na síntese de proteínas apenas como substrato, mas também modulam a atividade das vias de sinalização que regulam esse processo. A proteína mTOR é alvo do efeito de aminoácidos por diferentes mecanismos (Han; Jeong et al., 2012; Liu et al., 2002; Miyazaki; Esser, 2009). Há relatos de que os aminoácidos de cadeia ramificada ativam fatores de iniciação de tradução (tais como: eIF4E; eIF4G; eIF2B) e as proteínas abaixo da via da mTOR (tais como: S6K; S6; 4E-BP1), promovendo assim a síntese proteica (Liu; Jahn et al., 2002). O aminoácido mais estudado que ativa a mTOR é a leucina. Porém, em estudos recentes, foram demonstrados que outros aminoácidos, como, por exemplo, glutamina e arginina, também ativam mTOR (Jewell et al., 2015; Wang et al., 2015).

Duran et al. (2012) demonstraram que o  $\alpha$ -cetoglutarato gerado na glutamonólise ativa mTOR e inibe a autofagia em células tumorais HeLa e U2OS. Nicklin et al. (2009) mostraram que a L-glutamina é essencial para a ativação de proteínas *downstream* da via de sinalização Akt/mTOR por aminoácidos essenciais (L-leucina, L-triptofano, L-fenilalanina e L-arginina) e inibição da autofagia em células HeLa (Nicklin; Bergman et al., 2009). Nesse estudo foi demonstrado que a L-glutamina é liberada para o meio extracelular em um sistema de troca com aminoácidos essenciais (L-leucina, L-triptofano, L-fenilalanina e L-arginina), permitindo a entrada desses para o meio intracelular via contra transporte (Nicklin; Bergman et al., 2009). Alguns pesquisadores especulam que o mesmo sistema de contra transporte deve ocorrer em miócitos (Frost; Lang, 2011; Xi et al., 2011), porém, isso ainda permanece para ser esclarecido. Há relatos na literatura de forte correlação entre a concentração intracelular de L-glutamina e o balanço proteico positivo no músculo esquelético (MacLennan et al., 1987; Rennie et al., 1989).

#### 1.5 Glutamina

A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma humano (0,5-1,0 mM; 20% dos aminoácidos livres) como também no tecido muscular esquelético (5-20 mM; 60% do total presente concentra-se no meio intracelular da célula muscular esquelética) (Curi et al., 2005; Xi; Jiang et al., 2011). É uma molécula composta por

cinco átomos de carbono, dez de hidrogênio e dois grupamentos nitrogenados (uma amida e uma amina -  $C_5H_{10}N_2O_3$ ).

A glutamina é classificada como um aminoácido condicionalmente essencial pelo fato de que sua administração é necessária quando a sua síntese não é suficiente para atender à demanda aumentada do organismo (Wu, 2010). Isso ocorre em estados catabólicos intensos, como em condições de infecção, septicemia e queimaduras graves ou na gestação e lactação. Por outro lado, a L-glutamina não é essencial quando a sua produção endógena consegue suprir as necessidades do organismo (Wu, 2010; Newsholme et al., 2011). Todavia, a glutamina se insere no grupo de aminoácidos funcionais (Curi et al., 2005; Wu, 2010). Classificam-se como aminoácidos funcionais aqueles que participam na regulação da expressão gênica e da atividade de vias metabólicas (Wu, 2010).

A glutamina é importante na função de diversos tipos celulares e órgãos, tais como: músculo esquelético, intestino, fígado, rim, coração, neurônios, linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células  $\beta$ -pancreáticas e adipócitos (Curi; Lagranha et al., 2005; Curi; Lagranha et al., 2005; Curi et al., 2007; Newsholme et al., 2003; Pithon-Curi et al., 2003). Em miócitos, hepatócitos e astrócitos, a glutamina pode ser sintetizada a partir de uma molécula de glutamato e outra de amônia livre ( $NH_3$ ) e então ser exportada da célula (Hu; Katz et al., 2012; Newsholme; Procopio et al., 2003). A síntese de glutamina é catalisada pela enzima glutamina sintetase havendo gasto de ATP (Krebs, 1935). Essa enzima está presente em mitocôndrias de todos os órgãos, exceto no fígado, onde encontra-se apenas nas células paravenosas. Em condições catabólicas, há síntese de glutamina no fígado, intestino e rim a partir dos aminoácidos derivados da proteólise muscular e sua consequente liberação no sangue (Garber; Karl et al., 1976; Garber et al., 1976). Assim, a glutamina e alanina atuam como transportadores de grupamentos amino entre órgãos (van Acker et al., 1999), já que a amônia livre é tóxica aos tecidos e células (Ruderman, 1975).

A glutamina é precursora de peptídeos e proteínas, outros aminoácidos, purinas e pirimidinas e ácidos nucleicos (Xi; Jiang et al., 2011). Além de ser precursora de intermediários do Ciclo de Krebs via glutamato e  $\alpha$ -cetoglutarato, servindo também como substrato energético importante para a geração de ATP (Newsholme; Procopio et al., 2003). Em hepatócitos, quando há baixa concentração

de glutamina, ocorre diminuição da expressão de mRNA da PEPCK (enzima importante da gliconeogênese). É precursora dos neurotransmissores mais abundantes do sistema nervoso central, o glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). Além disso, a glutamina é um metabólito importante para a função de linfócitos, macrófagos e neutrófilos e está envolvida em processos inflamatórios e imunes (Curi et al., 1997; Newsholme et al., 1999).

A glutamina participa da transferência de amônia entre moléculas juntamente com o glutamato, alanina, aspartato e asparagina (Krebs, 1935). Esses aminoácidos são direcionados, via transaminações, para formar cetoácidos como o piruvato e o 2-oxoglutarato e, portanto, para o ciclo de Krebs (Garber; Karl et al., 1976; Ruderman, 1975). O glutamato representa um produto comum de convergência do metabolismo dos aminoácidos, a partir do qual são formados  $\alpha$ -cetoglutarato, aspartato, prolina, serina ou ácido gama-aminobutírico (GABA) (Newsholme; Procopio et al., 2003).

O principal sítio de reserva e produção de glutamina no organismo é o músculo esquelético. A taxa de síntese de glutamina no músculo é maior do que a de qualquer outro aminoácido (cerca de 50-200 vezes) (Wagenmakers, 1999). Esse tecido produz glutamina em quantidade suficiente para suprir a demanda de outros órgãos como rins, sistema nervoso central e leucócitos em condições normais (Wagenmakers, 1999).

A concentração plasmática de L-glutamina pode ser reduzida em até 50% quando há demanda muito aumentada pelo organismo (Curi; Lagranha et al., 2005). Essa diminuição é proporcional à severidade do quadro catabólico (Oudemans-van Straaten et al., 2001). Em doenças como câncer, diabetes, doença renal crônica e mesmo no jejum prolongado há redução da concentração plasmática desse aminoácido (Argiles et al., 2014; Xi; Jiang et al., 2011), podendo assim causar redução da massa muscular do indivíduo.

Em estudos recentes foi mostrado que a glutamina pode atuar na ativação da mTOR e, ao mesmo tempo, na inibição da autofagia em células tumorais e em fibroblastos (Nicklin; Bergman et al., 2009; Duran et al., 2012; Jewell; Kim et al., 2015). Porém, ainda não foram investigados tais efeitos no músculo esquelético. Em uma tese de doutorado orientada pela Dra. Tania Cristina Pithon Curi foram investigados os efeitos da administração de L-glutamina no músculo esquelético de

ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (Lambertucci, 2012). Nesse estudo, demonstrou-se que a suplementação de L-glutamina atenua o catabolismo intenso observado nessa doença, por atuar nas vias de sinalização de síntese e de degradação de proteínas (Lambertucci et al., 2012).

No presente estudo, investigamos se a L-glutamina modula a atividade das vias de sinalização da síntese e degradação de proteínas e mantém a massa do músculo esquelético em camundongos jejuados por 24 horas. Além disso, foram investigados os efeitos da adição de glutamina (em várias concentrações) ao meio de cultura de miotubos (células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) sobre o conteúdo de outros aminoácidos e de proteínas, bem como na via de síntese de proteínas em células tratadas com insulina ou dexametasona.



## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Experimentos realizados em camundongos jejuados por 24 horas

- A suplementação de L-glutamina atenuou a perda de massa muscular causada pelo jejum. Essa atenuação ocorreu pela via Akt-mTOR, porém, atuando em proteínas diferentes dependendo do tipo de fibra muscular. No músculo vermelho (sóleo), a suplementação de L-glutamina estimulou a Akt (início da via), enquanto que no músculo branco (EDL), ativou S6 (final da via).
- No músculo branco (EDL), a proteína 4E-BP1 parece estar associada à maior susceptibilidade à atrofia durante o jejum, em relação ao músculo vermelho (sóleo).

### 6.2 Experimentos realizados em miotubos (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) cultivados por 48 horas na presença de diferentes concentrações de glutamina

- A concentração intracelular dos produtos da glutaminólise: glutamato, alanina, aspartato, asparagina e prolina acompanhou o aumento na de L-glutamina no meio de cultura.
- A diminuição de L-glutamina no meio extracelular (de 2 para zero mM) elevou o conteúdo dos aminoácidos livres (leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, lisina, treonina, arginina, histidina, glicina, fosfoetanolamina e taurina), indicando estimulação da proteólise ou inibição de síntese proteica.
- O aumento da concentração de L-glutamina no meio de cultura (de 2 para 8 e 16 mM) não alterou o conteúdo intracelular de proteínas e dos aminoácidos livres, demonstrando que o balanço nitrogenado da célula é mantido na concentração extracelular em torno de 2 mM. Esta concentração está bem próxima daquela observada no plasma humano.
- Na presença de 2 mM de glutamina no meio de cultura, a insulina teve efeito positivo no balanço proteico via Akt/mTOR/S6K, estimulando a S6K. Por sua vez, na ausência de glutamina, houve maior fosforilação de eIF2 $\alpha$  estimulada por dexametasona e, portanto, menor síntese proteica.

## REFERÊNCIAS\*

- Adams CM. Role of the transcription factor atf4 in the anabolic actions of insulin and the anti-anabolic actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 2007;282(23):16744-53.
- Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: Understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(11):754-62.
- Augusto V, Padovani CR, Campos GER. Skeletal muscle fiber types in c57bl6j mice. *Journal of morphological sciences.* 2004;Vol.12(21):89-94.
- Bailey JL. Insulin resistance and muscle metabolism in chronic kidney disease. *ISRN Endocrinol.* 2013;2013:329606.
- Beale RJ, Sherry T, Lei K, Campbell-Stephen L, McCook J, Smith J, et al. Early enteral supplementation with key pharmac nutrients improves sequential organ failure assessment score in critically ill patients with sepsis: Outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. *Crit Care Med.* 2008;36(1):131-44.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294(5547):1704-8.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9.
- 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;72:248-54.
- Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Branched-chain amino acids: A role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *J Cell Physiol.* 2002;191(3):283-9.
- Chen R, Zou Y, Mao D, Sun D, Gao G, Shi J, et al. The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *J Cell Biol.* 2014;206(2):173-82.

---

\*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](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et al. The e3 ligase murf1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*. 2007;6(5):376-85.

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;28(1):24-30.

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC. Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. *Cell Biochem Funct*. 2005;23(2):77-84.

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

Curi R, Newsholme P, Procopio J, Lagranha C, Gorjao R, Pithon-Curi TC. Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*. 2007;12:344-57.

Curi TC, de Melo MP, de Azevedo RB, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils. *Biochem Soc Trans*. 1997;25(2):249S.

de Lange P, Moreno M, Silvestri E, Lombardi A, Goglia F, Lanni A. Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: Signaling pathways and regulatory mechanisms. *Faseb J*. 2007;21(13):3431-41.

Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, et al. Role of the insulin-like growth factor i decline in the induction of atrogin-1/mafbox during fasting and diabetes. *Endocrinology*. 2004;145(11):4806-12.

Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, et al. Glutaminolysis activates rag-mtorc1 signaling. *Mol Cell*. 2012;47(3):349-58.

Ebert SM, Monteys AM, Fox DK, Bongers KS, Shields BE, Malmberg SE, et al. The transcription factor atf4 promotes skeletal myofiber atrophy during fasting. *Mol Endocrinol*. 2010;24(4):790-9.

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

Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013.

Evans K, Nasim Z, Brown J, Butler H, Kauser S, Varoqui H, et al. Acidosis-sensing glutamine pump snat2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in I6 muscle cells. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(5):1426-36.

Frost RA, Lang CH. Mtor signaling in skeletal muscle during sepsis and inflammation: Where does it all go wrong? *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(2):83-96.

Furlow JD, Watson ML, Waddell DS, Neff ES, Baehr LM, Ross AP, et al. Altered gene expression patterns in muscle ring finger 1 null mice during denervation and dexamethasone induced muscle atrophy. *Physiol Genomics*. 2013.

Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. I. Glycolysis and amino acid release. *J Biol Chem*. 1976;251(3):826-35.

Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis. *J Biol Chem*. 1976;251(3):836-43.

Garber AJ, Karl IE, Kipnis DM. Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle. IV. Beta-adrenergic inhibition of amino acid release. *J Biol Chem*. 1976;251(3):851-7.

Gilda JE, Gomes AV. Stain-free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for western blots. *Anal Biochem*. 2013;440(2):186-8.

Glass DJ. Pi3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;346:267-78.

Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol*. 2003;5(2):87-90.

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

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;98(25):14440-5.

Goodman CA, Mayhew DL, Hornberger TA. Recent progress toward understanding the molecular mechanisms that regulate skeletal muscle mass. *Cell Signal*. 2011;23(12):1896-906.

Griffiths RD, Jones C, Palmer TE. Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition*. 1997;13(4):295-302.

Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, et al. Leucyl-trna synthetase is an intracellular leucine sensor for the mtorc1-signaling pathway. *Cell*. 2012;149(2):410-24.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-108.

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;216(1):65-71.

Hou YC, Wu JM, Wang MY, Wu MH, Chen KY, Yeh SL, et al. Glutamine supplementation attenuates expressions of adhesion molecules and chemokine receptors on t cells in a murine model of acute colitis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:837107.

Hu SI, Katz M, Chin S, Qi X, Cruz J, Ibebunjo C, et al. Mnk2 inhibits eif4g activation through a pathway involving serine-arginine-rich protein kinase in skeletal muscle. *Sci Signal.* 2012;5(211):ra14.

Huang YF, Wang Y, Watford M. Glutamine directly downregulates glutamine synthetase protein levels in mouse c2c12 skeletal muscle myotubes. *J Nutr.* 2007;137(6):1357-62.

Jagoe RT, Lecker SH, Gomes M, Goldberg AL. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: Response to food deprivation. *Faseb J.* 2002;16(13):1697-712.

Jensen TL, Kiersgaard MK, Sorensen DB, Mikkelsen LF. Fasting of mice: A review. *Lab Anim.* 2013;47(4):225-40.

Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu FX, Park HW, Plouffe SW, et al. Metabolism. Differential regulation of mtorc1 by leucine and glutamine. *Science.* 2015;347(6218):194-8.

Kleinert M, Liao YH, Nelson JL, Bernard JR, Wang W, Ivy JL. An amino acid mixture enhances insulin-stimulated glucose uptake in isolated rat epitrochlearis muscle. *J Appl Physiol.* 2011;111(1):163-9.

Krebs HA. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem J.* 1935;29(8):1951-69.

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

Lambertucci AC. Efeito da glutamina nas vias de síntese e degradação proteica do músculo esquelético. [dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano)] São Paulo: Instituto de Ciências da Atividade Física e do Esporte, Universidade Cruzeiro do Sul; 2009.

Lambertucci AC, Lambertucci RH, Hirabara SM, Curi R, Moriscot AS, Alba-Loureiro TC, et al. Glutamine supplementation stimulates protein-synthetic and inhibits protein-degradative signaling pathways in skeletal muscle of diabetic rats. *PLoS One.* 2012;7(12):e50390.

Laplante M, Sabatini DM. Mtor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2).

Laplante M, Sabatini DM. Mtor signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 20):3589-94.

Laplante M, Sabatini DM. Mtor signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-93.

Liu Z, Jahn LA, Wei L, Long W, Barrett EJ. Amino acids stimulate translation initiation and protein synthesis through an akt-independent pathway in human skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(12):5553-8.

Long W, Wei L, Barrett EJ. Dexamethasone inhibits the stimulation of muscle protein synthesis and p70 s6-kinase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(4):E570-5.

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;215(1):187-91.

Mattheus DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 419(28): 412-219.

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

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

Miyazaki M, Esser KA. Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol (1985).* 2009;106(4):1367-73.

Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ, Esser KA. Early activation of mtorc1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/akt signalling. *J Physiol-London.* 2011;589(7):1831-46.

Mutel E, Gautier-Stein A, Abdul-Wahed A, Amigo-Correig M, Zitoun C, Stefanutti A, et al. Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: Induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes.* 2011;60(12):3121-31.

Newsholme P, Abdulkader F, Rebelato E, Romanatto T, Pinheiro CH, Vitzel KF, et al. Amino acids and diabetes: Implications for endocrine, metabolic and immune function. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:315-39.

Newsholme P, Curi R, Pithon Curi TC, Murphy CJ, Garcia C, Pires de Melo M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: Its importance in health and disease. *J Nutr Biochem.* 1999;10(6):316-24.

Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 2003;21(1):1-9.

Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mtor and autophagy. *Cell.* 2009;136(3):521-34.

Opara EC, Petro A, Tevrizian A, Feinglos MN, Surwit RS. L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in c57bl/6j mice. *J Nutr.* 1996;126(1):273-9.

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;27(1):84-90.

Parry-Billings M, Leighton B, Dimitriadis GD, Bond J, Newsholme EA. Effects of physiological and pathological levels of glucocorticoids on skeletal muscle glutamine metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1990;40(5):1145-8.

Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC, et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(6):C1355-61.

Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J, et al. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia.* 2007;50(9):1949-59.

Proud CG. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 2):213-6.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963;1(7285):785-9.

Rennie MJ, MacLennan PA, Hundal HS, Weryk B, Smith K, Taylor PM, et al. Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration, and muscle-protein turnover. *Metabolism.* 1989;38(8 Suppl 1):47-51.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eif4e inhibitory proteins. *Nature.* 2005;433(7025):477-80.

Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Reversible ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots. *Anal Biochem.* 2010;401(2):318-20.

Ruderman NB. Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. *Annu Rev Med.* 1975;26:245-58.

Salehian B, Mahabadi V, Bilas J, Taylor WE, Ma K. The effect of glutamine on prevention of glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with myostatin suppression. *Metabolism*. 2006;55(9):1239-47.

Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. Pgc-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing foxo3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16260-5.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117(3):399-412.

Sailer M. Metabolic interrelationships of amino acid metabolism in health and disease [Ph. D. Thesis (Science)] Freising: Unidade de Nutrição Molecular, Universidade de Munique; 2013.

Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the igf1-akt/pkb pathway: Insights from genetic models. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):4.

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

Shen WH, Boyle DW, Wisniewski P, Bade A, Liechty EA. Insulin and igf-i stimulate the formation of the eukaryotic initiation factor 4f complex and protein synthesis in c2c12 myotubes independent of availability of external amino acids. *J Endocrinol*. 2005;185(2):275-89.

Shewchuk LD, Baracos VE, Field CJ. Dietary l-glutamine supplementation reduces the growth of the morris hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. *J Nutr*. 1997;127(1):158-66.

Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, Procopio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CH, et al. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol*. 2008;217(1):1-12.

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;76(9):4350-4.

van Acker BA, von Meyenfeldt MF, van der Hulst RR, Hulsewe KW, Wagenmakers AJ, Deutz NE, et al. Glutamine: The pivot of our nitrogen economy? *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999;23(5 Suppl):S45-8.

Wagenmakers AJ. Amino acid supplements to improve athletic performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999;2(6):539-44.

Wang S, Tsun ZY, Wolfson RL, Shen K, Wyant GA, Plovanich ME, et al. Metabolism. Lysosomal amino acid transporter slc38a9 signals arginine sufficiency to mtorc1. *Science*. 2015;347(6218):188-94.



Welle S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can J Appl Physiol.* 2002;27(1):19-41.

Wernerman J, Kirketeig T, Andersson B, Berthelson H, Ersson A, Friberg H, et al. Scandinavian glutamine trial: A pragmatic multi-centre randomised clinical trial of intensive care unit patients. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2011;55(7):812-8.

Wilmore DW. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr.* 2001;131(9 Suppl):2543S-9S; discussion 50S-1S.

Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv Nutr.* 2010;1(1):31-7.

Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids.* 2013;45(3):407-11.

Xi P, Jiang Z, Zheng C, Lin Y, Wu G. Regulation of protein metabolism by glutamine: Implications for nutrition and health. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011;16:578-97.