

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Éder Ricardo Petry

Efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre e como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina em ratos submetidos a protocolo experimental de imobilização de membros: implicações sobre a degradação do conteúdo proteico muscular mediada pela ativação das vias de sinalização celular NF- κ B, p38 MAPK, FOXO3a e papel citoprotetor da proteína HSP70.

Porto Alegre

2019

Éder Ricardo Petry

Efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre e como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina em ratos submetidos a protocolo experimental de imobilização de membros: implicações sobre a degradação do conteúdo proteico muscular mediada pela ativação das vias de sinalização celular NF-kB, p38 MAPK, FOXO3a e papel citoprotetor da proteína HSP70.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientador Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Petry, Éder Ricardo

Efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre e como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina em ratos submetidos a protocolo experimental de imobilização de membros: implicações sobre a degradação do conteúdo proteico muscular mediada pela ativação das vias de sinalização celular NF- κ B, p38 MAPK, FOXO3a e papel citoprotetor da proteína HSP70 / Éder Ricardo Petry.

-- 2019.

197 f.

Orientador: Clóvis Milton Duval Wannmacher.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Imobilização de membros. 2. Glutamina. 3. GSH. 4. TNF- α . 5. HSP70. I. Wannmacher, Clóvis Milton Duval, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“...Abraçemos o caminho que o mestre nos aponta, embora, muitas vezes sentindo os ombros agoniados, sob a cruz das responsabilidades crescentes.

Não vacilemos, porém.

Associando paciência e ação, brandura e energia – e às vezes mais energia na brandura – sigamos à frente, convencidos de que o Senhor não nos desampara.

Recordemo-lo, sozinho e desfalecente, mas sereno e valoroso e prossigamos, de consciência erguida na paz do dever cumprido.”

Bezerra de Menezes – Espírito

Francisco Cândido Xavier - Médium

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda coragem, força, fé e determinação a mim dada e inspirada, o que, sem dúvida nenhuma, me permitiu chegar até este momento.

A meus pais (Gisela e José Marlei) pelo exemplo de dignidade, apoio e base familiar que me deram, fato que foi fundamental para minha educação. Não tenho palavras para definir o quanto vocês são importantes para mim e quanto eu os amo.

A minha irmã Liéji que, apesar de “todo ciúme” me ama tanto quanto eu a amo.

A minha esposa Maria Angélica, filhos Teresa e peludos (Fritz, Dita, Scarlet Little e Jordan Bafudão [*in memorian*]; neto Matheus Nermall), que comigo estiveram no transcurso desta caminhada, aceitando se privar da minha companhia pelos estudos e experimentos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar profissionalmente e como pessoa. Obrigado pela paciência, espera e pelo constante apoio para que eu chegasse até aqui. Também amo muito todos vocês!!

Ao time de colaboradores (Diego, Clarice, Patricia, Tatiana) que montei no entorno desta ideia, que só amadureceu e frutificou, devido ao fundamental e indispensável auxílio, apoio e dedicação de vocês. Obrigado mesmo!!

Aos amigos, parceiros e iguais colaboradores do laboratório 21 Leo e Cleverson, pelo apoio, companheirismo e auxílio, na reta final deste trabalho.

Aos inúmeros professores e treinadores que tive na minha caminhada educacional e desportiva, os quais, muito me inspiraram a chegar até este momento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher, pela confiança depositada na minha pessoa, durante todo o transcorrer deste trabalho, bem como pela amizade, compreensão, paciência e ensinamentos, refletidos em palavras de apoio em

todos os momentos, sejam eles bons ou difíceis, fato que me fez crescer muito profissionalmente.

Aos colegas com quem convivi ao longo deste período de doutoramento junto ao laboratório 34, pela troca de ideias e compartilhamento de conhecimentos mútuos.

Aos amigos e colaboradores, em especial a Profa. Dra. Norma Possas Marroni, chefe do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo auxílio na aquisição de parte dos anticorpos utilizados na presente pesquisa.

As empresas que contribuíram com a realização desta pesquisa, em especial a Ajinomoto do Brasil, pela doação dos aminoácidos L-glutamina e L-alanina.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação (Cléia, Giordano, Lucas) pela paciência e imprescindível apoio, aos alunos, tais como eu.

A todos os docentes do PPG Bioquímica da UFRGS, em especial a Profa. Dra. Fátima Guma, que gentilmente permitiu que eu utilizasse seu laboratório e os seus equipamentos, durante a execução das análises de Western Blot.

Às agências de fomento à pesquisa: Cnpq, Capes, FAPERGS, Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, process: 17-0671) e Propesq/UFRGS.

Obrigado a todos aqui citados ou não, por fazerem parte dessa fase tão especial e importante da minha vida!

SUMÁRIO

Resumo.....	X
Abstract.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XVI
Lista de Figuras.....	XVII
PARTE I	
CAPÍTULO I	
1. Introdução.....	2
CAPÍTULO II	
2. Revisão da Literatura.....	7
2.1. Glutamina: aspectos metabólicos e bioquímicos.....	7
2.2. Atrofia muscular e imobilização de membros.....	16
2.3. Atrofia muscular, estado redox celular e vias de sinalização celular.....	17
2.4. Glutamina, funções biológicas, estado redox celular e citoproteção.....	26
2.5. Mecanismos de absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos.....	29
2.6. Especificidades da absorção de L-glutamina e L-alanil-L-glutamina.....	33
CAPÍTULO III	
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo Geral.....	36
3.2. Objetivos Específicos.....	36
PARTE II	
CAPÍTULO I	
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Condições Experimentais.....	39
4.1.1. Animais.....	39

4.1.2. Protocolo Experimental de Imobilização Bilateral de Membros.....	40
4.1.3. Dieta e Suplementação.....	43
4.1.4. Grupos Experimentais.....	43
4.2. Métodos Laboratoriais.....	44
4.2.1. Coletas de sangue e tecidos.....	44
4.2.2. Parâmetros Plasmáticos e Séricos.....	45
4.2.2.1. Glutamina e Glutamato.....	45
4.2.2.2. Íon amônio plasmático.....	46
4.2.2.3. Glutathione reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathione (GSSG) eritrocitária.....	46
4.2.2.4. Fator de necrose Tumoral- α (TNF- α).....	48
4.2.2.5. Análise plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	48
4.2.2.6. Cortisol plasmático.....	49
4.2.3. Parâmetros teciduais.....	50
4.2.3.1. Glutamina e glutamato.....	50
4.2.3.2. Glutathione reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathione (GSSG) muscular.....	51
4.2.3.3. Proteínas carbonilas.....	52
4.2.3.4. Análise da concentração muscular de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	53
4.2.3.5. Análise da concentração muscular de TNF- α	53
4.2.3.6. Determinação da expressão proteica de HSP70, NF- κ B, IKK α / β , p38 MAPK e FOXO3a, por Western blot.....	54
4.2.3.7. Determinação da atividade muscular de Caspase-3.....	56
4.2.3.8. Determinação do conteúdo proteico miofibrilar e da área de secção transversa muscular.....	57
4.3. Análise Estatística.....	58

CAPÍTULO II

5. RESULTADOS.....	59
5.1. Artigo 1 intitulado: Oral glutamine supplementation attenuate inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: role of 70 kDa heat shock protein, publicado no periódico Free Radical Biology and Medicine, edição nº 145, páginas 87-102, dezembro de 2019.....	59
5.2. Rascunho do manuscrito do Artigo 2 intitulado: Oral L-glutamine supplementation prevents rat's skeletal muscle mass wasting induced by immobilized-disuse muscle atrophy, a ser submetido ao periódico Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.....	109
6. DISCUSSÃO.....	149
7. CONCLUSÃO.....	175
8. PESPECTIVAS FUTURAS.....	177
9. REFERÊNCIAS.....	180
10. ANEXOS.....	197
ANEXO I - Carta de aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Ética em Uso de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEUA/UFRGS.....	197

PETRY, É.R. Efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre e como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina em ratos submetidos a protocolo experimental de imobilização de membros: implicações sobre a degradação do conteúdo proteico muscular mediada pela ativação das vias de sinalização celular NF-kB, p38 MAPK, FOXO3a e papel citoprotetor da proteína HSP70 [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; 2019, 197 p.

RESUMO

Períodos de inatividade ou desuso da musculatura esquelética, em decorrência de situações, incluindo, imobilização de membros, têm sido associados a redução da tensão sobre os músculos, menor resistência à fadiga, redução no conteúdo proteico, diâmetro da fibra e da produção de força muscular. Adicionalmente, indivíduos submetidos a períodos de desuso da musculatura esquelética, podem ser acometidos por uma série de fisiopatologias secundárias, dentre elas, uma maior incidência de infecções, fato que, além de retardar a sua recuperação, contribui para a elevação da morbidade e, até mesmo, para um maior grau de mortalidade, entre esta população. Perfazendo cerca de 20% do pool total de aminoácidos livres no plasma e entre 50% a 60% no músculo esquelético, a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no organismo, sendo a musculatura esquelética, o seu principal sítio de síntese, estoque e liberação endógena. Entretanto, sob condições de estresse fisiológico, incluindo câncer, sepse e exercícios físicos intensos, prolongados ou exaustivos, entre outras, ocorre considerável redução na disponibilidade de glutamina corporal, fato que decorre de um desequilíbrio entre a síntese e o consumo deste aminoácido, pelo organismo. Tal fato tem se correlacionado, de forma direta, ao desencadeamento de ações desagregadoras a homeostasia celular, incluindo a ativação de vias de sinalização celular com potencial proteolítico e pró-apoptótico, como as do fator nuclear Kappa B (NF-kB), da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), subunidade p38 (p38 MAPK) e do fator transcricional Forkhead box O, subunidade 3a (FOXO3a) em decorrência de um desequilíbrio no estado redox celular, advindo da elevada síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO), em relação a sua neutralização pelo sistema antioxidante celular, situação conhecida como estresse oxidativo. Por estas razões, a suplementação com L-glutamina, tanto na forma livre, conjugada com L-alanina (solução GLN+ALA), bem como na forma de dipeptídeos contendo este aminoácido, como o L-alanil-

L-glutamina (DIP) tem sido investigada, por representar uma maneira eficiente de fornecimento de glutamina, por via oral, ao organismo. Logo, no presente estudo, ratos Wistar machos adultos, foram submetidos a um período de 14 dias de imobilização bilateral dos membros posteriores, por meio de um novo modelo experimental de imobilização de membros e suplementados, concomitantemente, de maneira oral, com DIP (1,49 g/Kg⁻¹/d, grupo DIP-IMOB) e com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina (1 g/Kg⁻¹/d) e L-alanina (0,61 g/Kg⁻¹/d) na forma livre (grupo GLN+ALA-IMOB) ou água (grupo IMOB). Parâmetros basais foram obtidos de animais não imobilizados e suplementados com DIP (grupo DIP), GLN+ALA (grupo GLN+ALA) e água (grupo CONTR), na mesma posologia dos grupos submetidos a imobilização. Os animais foram sacrificados 10 horas após a última sessão de gavagem, onde o plasma e os músculos sóleo e gastrocnêmio foram coletados para análise. No plasma, foram mensuradas as concentrações de glutamina, glutamato, amônia, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), cortisol, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a concentração de glutatona (GSH) e dissulfeto de GSH (GSSG), nos eritrócitos. Nos músculos sóleo e gastrocnêmio foram analisadas as concentrações de glutamina, glutamato, GSH, GSSG, razão GSSG/GSH, TBARS, proteínas carbonilas, TNF- α , caspase 3 e o imunocontéudo de NF- κ B, heterodímero p65, IKK α / β , p38 MAPK e FOXO3a, nas suas isoformas total e fosforilada, bem como o imunocontéudo total, de HSP70. Ainda nos músculos sóleo e gastrocnêmio, foram analisados o conteúdo proteico e área de secção transversa miofibrilar, bem como parâmetros morfológicos, incluindo: peso corporal total, % de ganho de peso durante o período experimental, peso muscular total, relação peso muscular/peso corporal total e o grau de atrofia e/ou % de alteração do peso muscular, de ambos os membros submetidos a imobilização. Quatorze dias de imobilização de membros promoveram significativa redução da concentração de glutamina no plasma e nos músculos sóleo e gastrocnêmio de animais IMOB, quando comparados aos grupos basais do estudo. Tal situação foi atenuada e reestabelecida nos grupos DIP-IMOB e GLN+ALA-IMOB ($p < 0,05$), fato que atenuou a redução de GSH e seu estado redox (razão GSSG/GSH) em eritrócitos circulantes e nos respectivos músculos esqueléticos ($p < 0,05$). A concentração plasmática e muscular de TNF- α , bem como as concentrações de cortisol no plasma, TBARS no plasma e músculos, proteínas carbonilas e caspase 3, nos músculos sóleo e gastrocnêmio foram significativamente elevadas durante o período de imobilização, em animais IMOB, fato que foi atenuado pelo emprego de ambas as formas de suplementação com GLN, administradas no presente estudo ($p < 0,05$). Igualmente, 14 dias de imobilização dos membros posteriores, induziram significativo aumento no imunocontéudo de NF- κ B, heterodímero p65, IKK α / β ,

p38 MAPK e FOXO3a, nas suas isoformas total e fosforilada, ao mesmo tempo em que se observou significativa redução no imunoconteúdo, total, de HSP70, nos músculos sóleo e gastrocnêmio, de animais IMOB. Por outro lado, ao mesmo tempo em que promoveu significativo aumento no imunoconteúdo de HSP70, ambas as suplementações com DIP e/ou com a solução GLN+ALA atenuaram a expressão proteica de NF-kB p65, IKK α/β , p38 MAPK e FOXO3a, isoformas total e fosforilada, em ambos os músculos analisados, em animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB. Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a suplementação por via oral com L-glutamina, tanto na forma de DIP, quanto na forma de solução GLN+ALA, configura-se em alternativa nutricionalmente eficaz, no intuito de se atenuar a redução dos estoques de glutamina corporal, em ratos submetidos a 14 dias de desuso ou inatividade da musculatura esquelética, por meio de imobilização de membros. Tal efeito demonstra estar associado, ao aumento da capacidade de defesa antioxidante, mediada pelo eixo glutamina-glutationa, menor processo inflamatório e danos a proteínas teciduais, bem como a redução da expressão proteica de constituintes chaves, de vias de sinalização celular com potencial proteolítico e pró-apoptótico, em detrimento de significativo aumento na expressão proteica da proteína citoprotetora HSP70.

Palavras-Chave: Imobilização de membros. Glutamina. GSH. TNF- α . HSP70. Degradação do Conteúdo Proteico Muscular.

PETRY, É.R. Effect of L-glutamine supplementation in free form and as dipeptide L-alanyl-L-glutamine in rats subjected to experimental limb immobilization protocol: implications on muscle protein content degradation mediated by activation of NF- κ B, p38 MAPK and FOXO3a cell signaling pathways and cytoprotective role of HSP70 [Doctoral Thesis]. Porto Alegre: UFRGS Institute of Basic Health Sciences; 2019, 197 p.

ABSTRACT

Periods of inactivity or skeletal muscle disuse by situations including limb immobilization have been associated with reduced muscle tension, protein content, fiber diameter and muscle strength production even as, lower muscle fatigue resistance. Additionally, individuals undergoing to skeletal muscle disuse periods may be affected by a series of secondary pathophysiology, among them, a higher incidence of infections, which, in addition to delaying their recovery, contributes to increased morbidity even as, for a higher degree of mortality among this population. Making up about 20% of the total pool of free amino acids in plasma and among 50% to 60% in skeletal muscle, glutamine is the body's most abundant free amino, being skeletal muscle its main site of synthesis, stock and endogenous release of this amino acid to the body. However, under stressfull physiological conditions, including cancer, sepsis and intense, prolonged or exhaustive physical exercise, among others, there is a considerable reduction in the availability of body glutamine, fact that results from an imbalance among the synthesis and body needs of this amino acid. This fact has been directly correlated to the triggering of disintegrating actions to cellular homeostasis maintenance, including the activation of cell signaling pathways with proteolytic and pro-apoptotic potential, such as the nuclear factor Kappa B (NF- κ B), mitogen-activated kinase, subunit p38 (p38 MAPK) and the transcriptional factor Forkhead box O, subunit 3a (FOXO3a), due to an imbalance in the cellular redox state resulting from increased synthesis of reactive oxygen species (ROS), regarding its neutralization by the cellular antioxidant

system, a situation known as oxidative stress. For these reasons, supplementation with L-glutamine, both in free form, conjugated to L-alanine (GLN+ALA solution), as well as dipeptides containing this amino acid, such as L-alanyl-L-glutamine (DIP) has been investigated as an efficient way to deliver glutamine to the body. That way, in the present study, adult male Wistar rats were subject to 14-days period of bilateral hindlimb immobilization, using a new experimental model of limb immobilization and, orally supplemented with DIP (1.49 g/kg⁻¹/d, DIP-IMOB group) and with a solution containing the amino acids L-glutamine (1g/kg⁻¹/d) and L-alanine (0.61g/kg⁻¹/d) in their free forms (GLN+ALA-IMOB group) or water (IMOB group). Baselines parameters were obtained from non-immobilized and supplemented with DIP (DIP group), GLN+ALA solution (GLN+ALA group) and water (CONTR group) animals, in the same dosage of the immobilized groups. The animals were sacrificed 10 hours after the last gavage session, where plasma and the soleus and gastrocnemius muscle were collected for analysis. Plasma concentrations of glutamine, glutamate, ammonia, tumor necrosis factor- α (TNF- α), cortisol, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured even as, glutathione (GSH) and GSH disulfide (GSSG) concentrations were measured in erythrocytes. Glutamine, glutamate, GSH, GSSG, GSSG/GSH ratio, TBARS, carbonyl proteins, TNF- α , caspase 3 and the immunecontent of NF-kB, heterodimer p65, IKK α / β , p38 MAPK and FOXO3a in their total and phosphorylated isoforms, as well as the total immunecontent of HSP70 were analyzed in soleus and gastrocnemius muscle. Morphological parameters including: protein content and myofibrillar cross-sectional area as well as, total body weight, % of weight gain during the experimental period, total muscle weight and muscle weight/body weight ratio and the degree of atrophy and/or % change in muscle weight of both limbs subjected to immobilization period were analyzed, equally in soleus and gastrocnemius muscle. Fourteen days of hindlimb immobilization promoted a significant reduction in glutamine concentration in plasma and in soleus and gastrocnemius muscle of IMOB animals, compared to the

baselines groups. This situation was attenuated and reestablished in the DIP-IMOB and GLN+ALA-IMOB rats ($p < 0.05$), which attenuated the reduction of GSH and its redox state (GSSG/GSH ratio) in circulating erythrocytes even as, in skeletal muscle ($p < 0.05$). Plasma and muscle TNF- α concentrations as well as, plasma cortisol, plasma and muscle TBARS, carbonyl protein and caspase 3 concentrations were significantly higher in soleus and gastrocnemius muscle in IMOB animals, which was attenuated by the both GLN supplementation forms administered in the present study ($p < 0.05$). Equally, 14-days of hindlimb immobilization induced a significant increase in the immunecontent of NF- κ B, heterodimer p65, IKK α/β , p38 MAPK and FOXO3a, in their total and phosphorylated isoforms, at same time that a significant decrease in immunocontent of HSP70 was observed in the soleus and gastrocnemius muscles of IMOB animals. On the other hand, both oral supplementation with DIP and/or GLN+ALA solution promoting a significant increase in HSP70 immunocontent, fact that reverberated in attenuated total and phosphorylated NF- κ B p65, IKK α/β , p38 MAPK and FOXO3a protein expression, in both muscle analyzes in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals. In conclusion, the results of the present study demonstrate that oral L-glutamine supplementation, either in DIP and/or GLN+ALA solution form, if configure in a nutritionally effective alternative to mitigate the reduction of body glutamine stores in rats subjected to 14 days of disuse or inactivity of skeletal muscles through limb immobilization. This effect has been shown to be associated with increased antioxidant defense capacity mediated by the glutamine-glutathione axis, lower inflammatory process and damage to tissue proteins as well as, reduced protein expression of key constituents of proteolytic and pro-apoptotic cell signaling pathways, in detriment of a significant increase in cytoprotective HSP70 protein expression.

Keywords: Limbs immobilization. Glutamine. GSH. TNF- α . HSP70. Skeletal muscle protein content degradation.

LISTA DE ABREVIATURAS

GLN – aminoácido L-glutamina

ALA – aminoácido L-alanina

GLU - amino acid L-glutamate

GLN+ALA – solução contendo os aminoácidos L-glutamina mais L-alanina, ambos em suas respectivas formas livre

DIP- dipeptídeo L-alanil-L-glutamina

NF-kB – fator nuclear kappa B

TNF- α - citosina pró-inflamatória factor de necrose tumoral- α

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Proteína quinase IKK/IkB – principal complexo enzimático de inibição do fator nuclear kappa B

IKK- α e IKK- β – subunidades catalíticas da proteína quinase IKK/IkB

HSP70 – proteína de choque térmico de 70 kDa

HSF-1 – fator transcricional de choque térmico-1

HSE – elementos ligantes de fatores transcricionais de choque

GSH – forma reduzida do tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina-glutationa

GSSG – dissulfeto de glutaciona

-SH – grupo tiol thiol

Pept-1 – proteína transportadora de glicopeptídeos-1

GLS – enzima glutaminase

GLUD1 - enzima glutamato desidrogenase

X-ag – transportador do aminoácido L-glutamato

ATP – adenosina trifosfato

GCLC - enzima glutamato cisteína ligase, subunidade catalítica

GSR – enzima glutaciona redutase

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogênio fosfato

MCSA – área de secção transversa miofibrilar

FOXO3a - forkhead member of the class O3a

MAPKs – família de proteínas quinases ativadas por mitógenos

p38 MAPK – fator transcricional componente da família de proteínas quinase ativadas por mitógenos p38

Caspase 3 - protease aspartato-específica dependente de cisteína

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese e degradação de glutamina e enzimas envolvidas.....	10
Figura 2. Síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase.....	10
Figura 3. Hidrólise de glutamina a glutamato catalisada pela enzima glutaminase.....	11
Figura 4. Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo.....	13
Figura 5. Destinos e funções da glutamina na célula.....	27
Figura 6. Detalhamento do protocolo experimental de imobilização bilateral de membros, em ratos, empregado no presente estudo.....	42
Figura 7 – Perspectivas Futuras - esquema ilustrativo de estudos a partir dos resultados da presente pesquisa, partes A e B.....	178

PARTE I

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A redução do conteúdo proteico muscular, em situações de estresse metabólico representa um problema ainda não resolvido e de considerável pertinência, para o processo de recuperação de pacientes, tanto agudo, quanto cronicamente enfermos, incluindo indivíduos politraumatizados e/ou acometidos por sepse e câncer, entre outras injúrias. A degradação do conteúdo proteico muscular é um processo complexo atribuído fortemente, à inatividade ou atrofia da musculatura esquelética, por desuso, tanto em humanos, quanto em animais. Dentre os principais fatores indutores de tal condição deletéria, destacam-se a redução da tensão sobre os músculos, derivada de situações catabólicas como deservação, subnutrição, exposição à microgravidade, traumas cirúrgicos e imobilização de membros (ADAMS et al., 2003; FITTS et al., 2001; HESPEL et al., 2001). De maneira geral, o processo de atrofia muscular é caracterizado por uma menor resistência a fadiga, redução no conteúdo proteico, diâmetro da fibra e da produção de força muscular (JACKMAN & KAMDARIAN, 2004). Não obstante, tal situação tem sido implicada no disparo de respostas neuroendócrinas, inflamatórias, imunes e de sinalização intracelular, que, em última instância, culminam na exacerbação da depleção do pool de nitrogênio corporal (PLANK & HILL, 2000), em decorrência do decandadeamento de uma série de alterações metabólicas, advindas da instalação de um quadro de hipercatabolismo.

Até pouco tempo, estudos com o intuito de analisar o impacto da atrofia muscular sobre o organismo, tinham seu foco, voltado, apenas para os aspectos metabólicos e bioquímicos inerentes a este processo. No entanto, diversos estudos têm apontado que tanto o anabolismo quanto o catabolismo muscular podem decorrer pela ativação de diferentes vias de sinalização celular (LECKER et al., 2004; SALEM et al., 2006; CHEN et al., 2007; ELEY & TISDALE, 2007; KAVAZIS et al., 2007). Dentre estas vias, a ativação da

via do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), dos membros da família de fatores de transcrição da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), em especial da subunidade p38 MAPK e do fator transcricional Forkhead box O, subunidade 3a (FOXO3a), que em última instância, culminam na ativação do principal complexo de degradação proteico do organismo, o complexo 20S/26S ubiquitina-proteasoma, tem apresentado considerável participação no processo de degradação do conteúdo proteico muscular. Neste contexto, o desbalanço entre a síntese e a degradação/remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO), situação conhecida como estresse oxidativo, associado a exacerbação da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), tem sido implicada como importantes contribuintes e fatores desencadeadores da ativação destas vias de sinalização celular, durante períodos de desuso da musculatura esquelética (POWERS et al., 2007).

No intuito de se contrapor aos efeitos deletérios da atrofia muscular sobre a funcionalidade orgânica, diversas estratégias terapêuticas, que previnam ou revertam às ações adversas de tal processo, incluindo intervenções nutricionais, tem sido estudadas (AOKI et al., 2004; BAJOTTO et al., 2011; SAVARY-AUZÉLOUX et al., 2013; SHIBAGUCHI et al., 2016). No entanto, apesar de se configurar em uma das estratégias nutricionais mais divulgadas na área da nutrição, sobretudo em situações de elevado catabolismo (D'SOUZA & TUCK, 2004; PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015), até o momento, nenhum estudo, onde intervenções nutricionais tenham sido testadas, incluíram a suplementação com o aminoácido L-glutamina, como fator de atenuação dos efeitos deletérios advindos da atrofia muscular, por desuso.

Nutricionalmente classificada como um aminoácido não essencial, uma vez que pode ser sintetizada pelo organismo, de acordo com sua necessidade (NEWSHOLME et al., 2003b), a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido

muscular esquelético (RENNIE et al., 2001). Dentre as funções em que a glutamina está envolvida na célula destacam-se: processos de proliferação celular, em especial de células do sistema imune, balanço ácido básico, transporte de amônia entre os tecidos, doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese e síntese de glutamato, entre outros (NEWSHOLME et al., 2003a; CURI et al., 2005; RUTTEN et al., 2005). Não obstante, a glutamina, também tem demonstrado exercer proteção a células e tecidos, através da modulação sobre funções fundamentais à manutenção da homeostasia celular, incluindo sistemas antioxidantes, tal como o representado pelo principal e em maior concentração, antioxidante não enzimático do organismo, o tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, comumente denominado como glutathiona (GSH) (RENNIE et al., 2001; MEISTER & ANDERSON 1983). Recentemente, a glutamina também tem demonstrado exercer importante função modulatória sobre vias de sinalização celular, com especial destaque, para aquelas relacionadas à resposta celular de estresse (PETRY et al., 2014, PETRY et al., 2015, RAIZEL et al., 2016). Neste contexto, pesquisas tem destacado a decisiva ação modulatória, proverida pela glutamina, sobre a maquinaria ribossomal, responsável pelo processo transcricional e de expressão gênica, das proteínas de choque térmico (HSPs; GABAI & SHERMAN, 2002; ROPELESKI et al., 2005; SINGLETON & WISHMEYER et al., 2007; HAMIEL et al., 2009). As HSPs, entre outras funções, têm sido implicadas em processos de citoproteção e antiapoptóticos (SINGLETON & WISHMEYER et al., 2007). Com base nestes novos achados, tem ganho força a proposição da reclassificação nutricional da glutamina, de aminoácido não essencial, para aminoácido condicionalmente essencial, sobretudo em situações catabólicas (LANCEY & WILMORE, 1990). Tal fato tem sido enfatizado, em decorrência de diversas pesquisas (FLARING et al., 2003; CRUZAT et al., 2014b; PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015) apontarem que sob condições de estresse fisiológico, como traumas, sepse e exercícios físicos intensos, prolongados ou exaustivos, entre outras, ocorre considerável redução na disponibilidade de glutamina

corporal, em virtude de um desequilíbrio entre a síntese deste aminoácido e seu consumo/utilização pelo organismo. Tal situação tem sido correlacionada, de forma direta, como fator desencadeador de ações desagregadoras a homeostasia celular.

Deste modo, com base nestas premissas, infere-se ser importante o desenvolvimento de estratégias, economicamente viáveis, que possam contribuir para a manutenção da glutaminemia, sob condições de elevado catabolismo, incluindo episódios de atrofia muscular por desuso. Diversos estudos, entretanto, demonstram baixa efetividade da suplementação com L-glutamina, quando empregada de forma isolada (CASTELL et al., 1997; ROHDE et al., 1998; KRYWKOWSKI et al., 2001a; KRYWKOWSKI et al., 2001b; VALENCIA, MARIN & HARDY, 2002a). Por outro lado, diversas outras pesquisas têm sugerido que a utilização de dipeptídeos de L-glutamina tais como o L-alanil-L-glutamina pode representar uma alternativa nutricional eficiente, de aumentar a disponibilidade de L-glutamina às células, quando comparada à utilização de L-glutamina na forma livre, tanto em situações de estresse metabólico, quanto em situações de repouso (KLASSEN et al., 2000, ROGERO et al., 2004, ROGERO et al., 2006). Em dois prévios estudos, evidenciamos que a administração de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, em uma posologia semelhante ao dipeptídeo ($1\text{g}/\text{kg}^{-1}/\text{d}$ de peso corporal), também se mostrou eficiente, em prover maior disponibilidade de glutamina, glutamato, GSH e beneficiar o estado redox celular, mensurado a partir da razão entre a forma oxidada ou dissulfeto de GSH (GSSG), pela própria GSH (razão $[\text{GSSG}]/[\text{GSH}]$), além de induzir maior expressão das isoformas constitutiva de 73 kDa (HSP73) e induzível, de 72 kDa (HSP72), da HSP de 70 kDa (HSP70), bem como de seu principal fator de transcrição, o fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1), no citoplasma e núcleo celular, no tecido muscular e hepático, de ratos submetidos a exercício aeróbio intenso (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da suplementação oral com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e/ou, com uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na sua forma livre, sobre o sistema antioxidante, mediado pelo eixo glutamina-GSH, sistema inflamatório, apoptose celular, mediada pela via das caspases, especialmente caspase 3, resposta celular de estresse, mediada pela expressão gênica da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), bem como na modulação de vias de sinalização celular, respectivamente: NF-kB, p38 MAPK e FOXO3a, relacionadas a regulação do processo de degradação do conteúdo proteico muscular, em ratos submetidos a 14 dias de imobilização, bilateral, dos membros posteriores, por meio da utilização de um novo modelo experimental de imobilização de membros.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Glutamina: aspectos metabólicos e bioquímicos

A existência da glutamina e sua significância como uma molécula com propriedades biologicamente importantes foi considerada, pela primeira vez, em 1873, por Hlasiwetz e Habermann que sugeriram à época, que a amônia oriunda de hidrolisados proteicos, resultava da liberação de glutamina e asparagina (CURI, 2000, HISCOCK & PEDERSEN, 2002). Posteriormente, em 1935, Krebs demonstrou, em tecidos, a presença de enzimas que possuíam tanto a capacidade de sintetizar, quanto de degradar glutamina (HISCOCK & PEDERSEN, 2002). A partir destes estudos, observou-se um considerável incremento nos conhecimentos dos aspectos relacionados à participação da glutamina no metabolismo celular.

Durante a Segunda Guerra Mundial, contudo, tais conhecimentos foram bastante prejudicados, vindo a ganhar novo impulso, somente na metade final da década de 1950, a partir dos trabalhos desenvolvidos por Eagle (1955). Este pesquisador demonstrou que células, em cultura, utilizam glutamina em quantidades superiores a qualquer outro aminoácido. Recentes trabalhos, com diferentes tipos de células, tais como linfócitos, macrófagos, enterócitos e células HeLa, entre outras, têm demonstrado que tanto a proliferação celular pode ser aumentada, quanto a manutenção de estruturas e funções celulares pode ser mantida em meios de cultura contendo glutamina (CURI et al., 2005).

Em todas as células, a glutamina pode ceder átomos de nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas e aminoaçúcares (NEWSHOLME et al., 2003b). Tais resultados evidenciam que a glutamina não apenas participa da síntese proteica, mas também desempenha papel importante, em um grande número de vias metabólicas. Mediante tal

evidência, esses mecanismos, dependentes de glutamina, passaram a ser denominados como vias glutaminolíticas (LACEY & WILMORE, 1990).

Através do emprego de técnicas de biologia molecular, estudos têm evidenciado que a glutamina não apenas participa de múltiplas reações bioquímicas dentro da célula, mas também é importante para a manutenção de inúmeras funções celulares. Dentre estas, destacam-se a modulação sobre vias de sinalização celular, relacionadas, entre outras funções, com a expressão de genes envolvidos com a síntese e degradação de proteínas, regulação de fatores de crescimento, resposta inflamatória e imunológica, proliferação e apoptose celular (NEWSHOLME et al., 2003b; CURI et al., 2005; SINGLETON et al., 2005; SINGLETON & WISCHMEYER, 2007).

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, com peso molecular de 147,1 kilodaltons (kDa), que pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo (CURI, 2000, NEWSHOLME et al., 2003b). Em sua composição química é encontrada, nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%) (LACEY & WILMORE, 1990, CURI, 2000). A glutamina é classificada de acordo com seu grupamento R como não carregada, mas é polar, o que significa uma característica mais hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (ROGERO & TIRAPEGUI, 2003).

Como o organismo pode sintetizar glutamina, esta é classificada, nutricionalmente, como um aminoácido não essencial (LACEY & WILMORE, 1990). Contudo, em algumas situações catabólicas como traumas, sepse, câncer e no exercício intenso e prolongado, entre outras, a concentração intracelular e plasmática de glutamina pode diminuir em até 50%, fato que leva a um desbalanço entre a síntese e a demanda deste aminoácido pelo organismo. Por esta razão, a classificação da glutamina como um aminoácido não essencial, tem sido bastante questionada, sendo que diversos autores sugerem a sua

reclassificação como um aminoácido “condicionalmente essencial” (WRAY, MAMMEN & HASSELGREN, 2002; SANTOS, CAPERUTO & COSTA ROSA, 2007).

Presente em diversas proteínas, e encontrada em concentrações relativamente elevadas em diversos tecidos corporais, a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no organismo (ROWBOTTOM et al., 1996). No plasma humano, em concentrações que variam entre 0,5 a 0,9 mM, a glutamina representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres, enquanto que no tecido muscular esquelético, seu conteúdo intracelular corresponde a cerca de 50% a 60% do total de aminoácidos livres (WALSH et al., 1998; NIEMAN & PEDERSEN, 1999).

O metabolismo da glutamina é influenciado por diversas enzimas intracelulares. Contudo, apenas duas enzimas guardam relação direta com este processo, sendo elas a enzima glutamina sintetase (GS), responsável pela síntese deste aminoácido, a partir do glutamato e a enzima glutaminase (GA), responsável pela degradação (hidrólise) de glutamina, também em glutamato, (ROWBOTTOM et al., 1996) (figura 1). Cabe ressaltar que o glutamato, por sua vez é sintetizado a partir do α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs e amônia (NH_3) (LACEY & WILMORE, 1990; NEU, SHENOY & CHAKRABARTI, 1996).

Com distribuição generalizada entre os organismos vivos, a GS é uma aminotransferase cuja atividade é regulada por diversos fatores tais como glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina. Localizada, de forma intracelular no citosol (LABOW, SOUBA & ABCOUWER, 2001), a GS é responsável pela catálise da reação que converte glutamato em glutamina. Para tanto a enzima utiliza amônia como fonte de nitrogênio num processo onde há gasto de trifosfato de adenosina (ATP) conforme demonstrado na figura 2. Por realizar tal tarefa, a GS, também é considerada uma enzima chave para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio, fato fundamental para

a manutenção da vida de microrganismos, plantas e animais (CURI, 2000, HISCOCK & PEDERSEN, 2002).

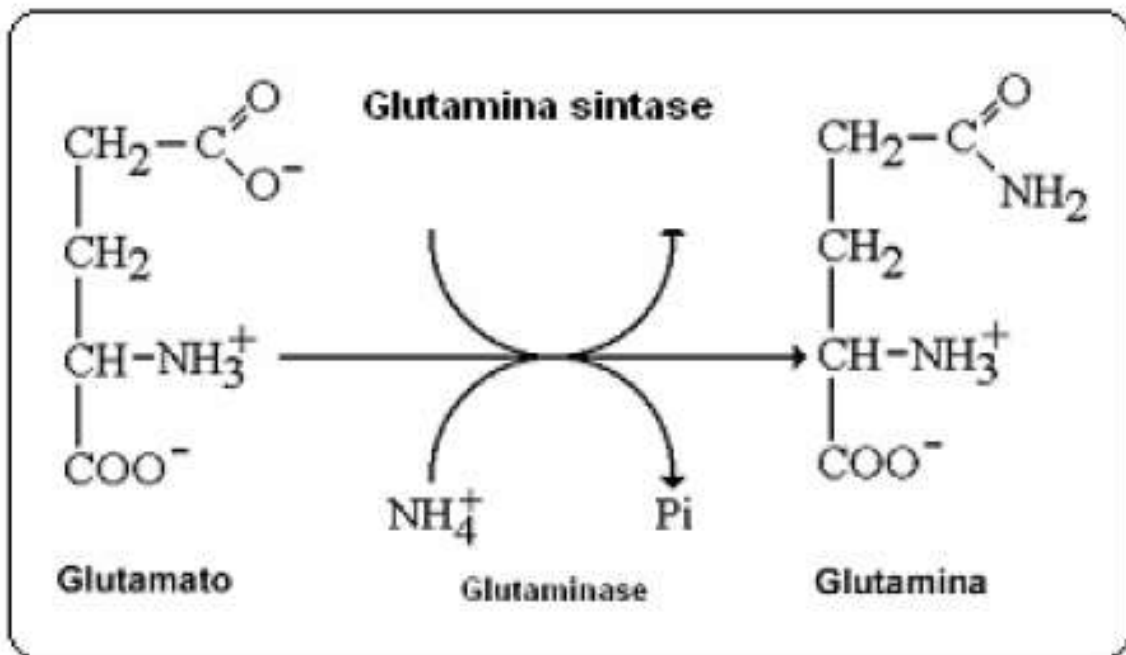
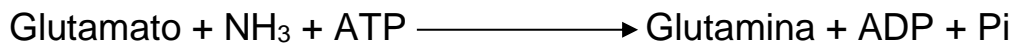


Figura 1 – Síntese e degradação de glutamina e enzimas envolvidas. (Adaptado de DI PASQUALE et al., 1981).



Glutamina Sintetase

Figura 2 – Síntese de glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase. (Adaptado de NEWSHOLME et al., 2003b).

Dependendo do tecido ou órgão, a GS desempenha diferentes funções (LABOW, SOUBA & ABCOUWER, 2001). No cérebro, é utilizada como um importante agente na redução da concentração de amônia, com conseqüente desintoxicação e síntese de glutamina para a síntese de novo de glutamato (CURI, 2000). No pulmão e no músculo esquelético, é responsável pela manutenção da concentração de glutamina plasmática, sendo essencial em situações patológicas ou de estresse (PINEL et al., 2006). Nos rins, a

GS é imprescindível pelo controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo (CURI, 2000; LABOW, SOUBA & ABCOUWER, 2001) .

Na contração da GS, a glutaminase (GA) é a enzima que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio (Figura 3). Tal fato representa o primeiro passo na utilização de glutamina a partir da síntese do glutamato. A partir desta reação, outras reações podem ocorrer, principalmente, na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico (RENNIE et al., 2001), onde a reação catalisada pela GA limita o fluxo pela via glutaminolítica, de modo que há uma correlação entre a presença de GA e a utilização de glutamina, por certo tipo celular (CURI, 2000).

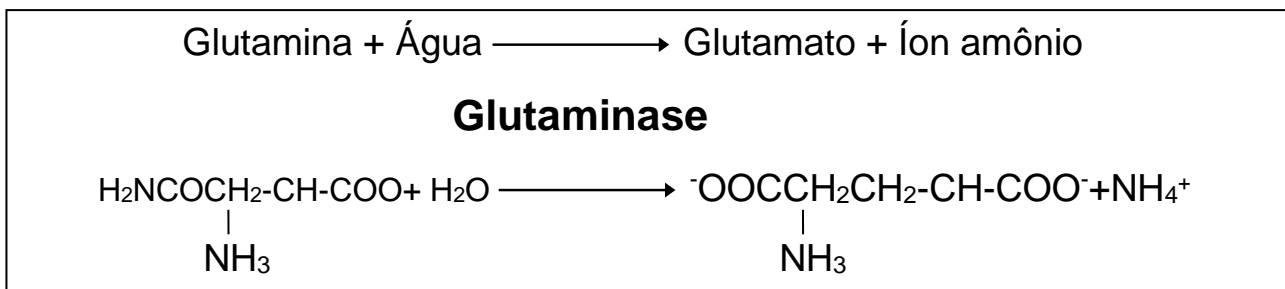


Figura 3 – Hidrólise de glutamina a glutamato catalisada pela enzima glutaminase. (Adaptado de CURI, 2000).

Encontrada em bactérias, plantas e animais, a GA atua em diversos processos metabólicos. Em mamíferos, a GA pode ser encontrada sob duas isoformas, uma (menos abundante) no fígado, conhecida como glutaminase hepática e, outra nos demais tecidos, tais como rins, cérebro, leucócitos e trato gastrintestinal, denominada glutaminase renal. Contudo, a sua forma mais ativa apresenta-se, sobretudo, nas mitocôndrias (LABOW, SOUBA & ABCOUWER, 2001).

Para Neu, Shenoy & Chakrabarti (1996) tanto a localização da GS no citosol, quanto à localização da GA nas mitocôndrias estão compatíveis com suas respectivas funções, ou seja, a GA catalisando a hidrólise de glutamina como fonte de energia e a GS catalisando

a reação de síntese de glutamina, o que contribui para uma maior síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleotídeos.

Tanto a concentração tecidual, quanto a concentração sanguínea de glutamina, que num indivíduo de aproximadamente 70 Kg pode variar em torno de 500-700 $\mu\text{mol/L}$ (D'SOUZA & TUCK, 2004), podem ser influenciadas de acordo com a atividade da GS ou da GA. Alguns tipos de células, tais como células do sistema imune, rins e intestino, apresentam elevada atividade da enzima GA, sendo assim considerados tecidos consumidores de glutamina (VAN DE POLL et al., 2004). Por outro lado, a musculatura esquelética, os pulmões, o fígado, o cérebro e, possivelmente, o tecido adiposo apresentam elevada atividade da enzima GS, sendo assim considerados tecidos sintetizadores de glutamina (figura 4) (ROWBOTTON et al., 1996; WALSH et al., 1998).

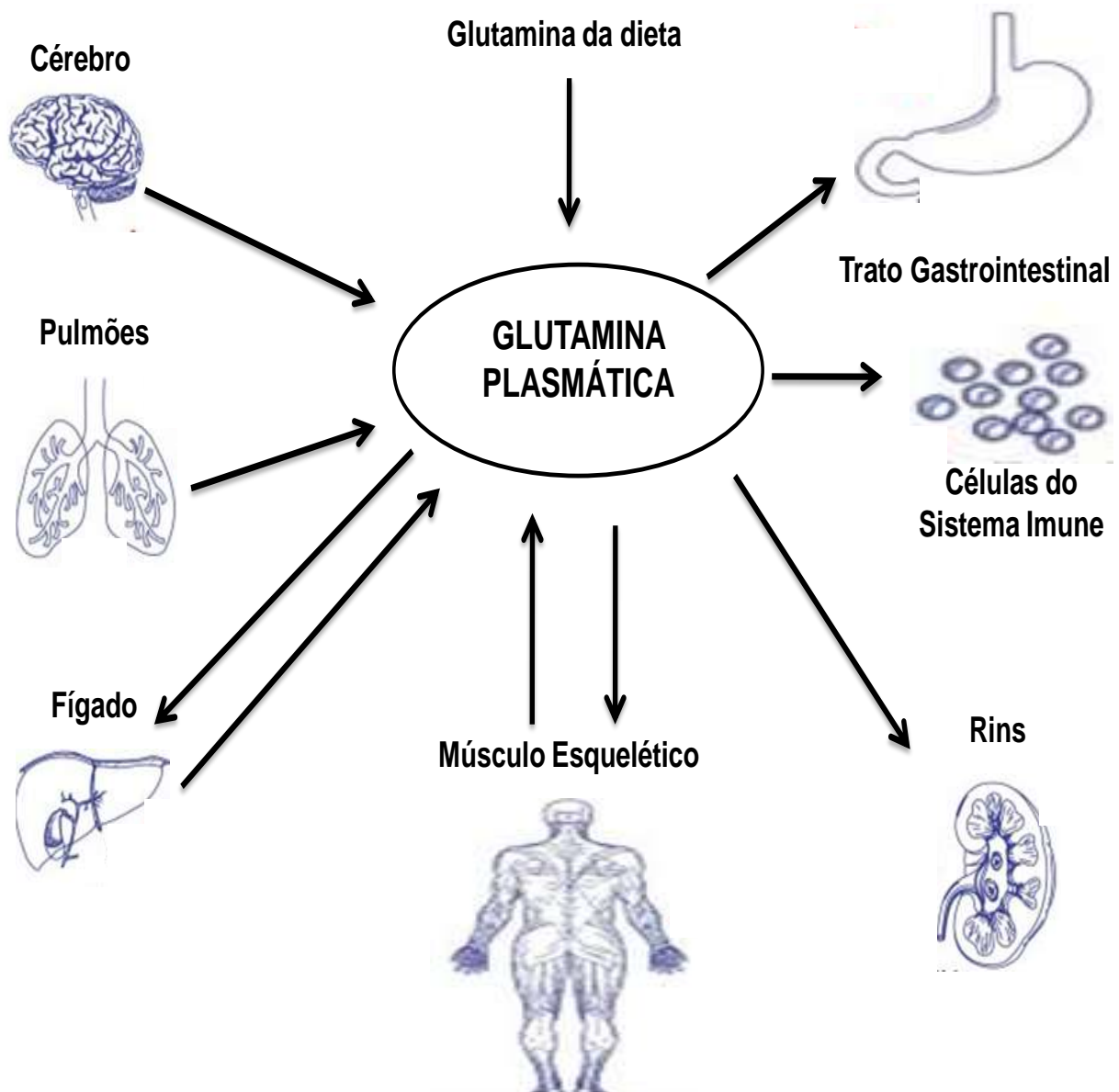


Figura 4 – Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo. (Adaptado de ROWBOTTON et al., 1996).

Representando, em média, cerca de 40% da massa corporal total, o tecido muscular esquelético, quantitativamente, configura-se no principal tecido de síntese, estoque e liberação endógena de glutamina. Tal capacidade está relacionada à alta atividade das enzimas aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) e GS, apresentada por este tecido (VAN DE POLL et al., 2004). Embora possa variar, a taxa de síntese de glutamina, no músculo esquelético é de aproximadamente 50 mmol/h, a maior taxa encontrada

entre todos os aminoácidos (NEWSHOLME et al., 2003b). Além disso, o músculo esquelético é capaz de elevar a taxa de síntese e liberação de glutamina, principalmente em resposta a situações em que há aumento de sua demanda por outros órgãos e tecidos, fato que confere a este tecido um papel metabólico essencial na homeostasia corporal. Diversos eventos catabólicos, tais como traumas, queimaduras, cirurgias, câncer, sepse e exercícios intensos e prolongados, levam a uma diminuição na concentração intramuscular de glutamina, em decorrência do consumo deste aminoácido, pelo organismo, exceder a sua capacidade de síntese de novo (DOHM et al., 1985; PARRY-BILLINGS et al., 1990; SANTOS et al., 2004).

Do ponto de vista metabólico, as fibras musculares podem ser classificadas em tipo I (oxidativas - caracterizadas por um grande número de mitocôndrias e elevada atividade de enzimas da cadeia respiratória) e tipo II (glicolíticas - caracterizadas por serem pobres em mitocôndrias e contribuírem para a dotação energética, principalmente, por meio da via anaeróbia ou glicolítica). Tal classificação exerce influência direta sobre a capacidade de estoque e síntese intramuscular de glutamina (WALSH et al., 1998). Evidências experimentais apontam que fibras do tipo I podem apresentar cerca de três vezes mais estoques de glutamina em comparação a fibras do tipo II (ROWBOTTOM, KEAST & MORTON, 1996; WALSH et al., 1998). Tal fato é atribuído, entre outros fatores, a uma maior disponibilidade de ATP e atividade da enzima GS neste tipo de fibra muscular. Dados experimentais apontam ainda que, dependendo do músculo estudado, quando a síntese de novo de glutamina é inibida, os estoques intramusculares deste aminoácido podem ser depletados em aproximadamente 7 horas (RENNIE et al., 2001).

A síntese de glutamina no músculo esquelético, durante o estado pós-absortivo ocorre por meio da captação de glutamato, a partir da circulação sanguínea. O glutamato é responsável por 40% da síntese de glutamina (NEWSHOLME et al., 2003b). O catabolismo proteico leva à produção de glutamina de forma direta e também à síntese de ACR, glutamato,

aspartato e asparagina (ROGERO & TIRAPEGUI, 2000). Os esqueletos de carbono destes aminoácidos são utilizados para a síntese de novo de glutamina (HALL & WAGENMAKERS, 1998). Estudos em ratos demonstram que os ACR são transaminados, quase que exclusivamente como α -cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode fornecer seu grupo amino para formar piruvato, gerando alanina, ou incorporar amônia livre, dando origem à glutamina (HALL & WAGENMAKERS, 1998, ROGERO & TIRAPEGUI, 2003). Entretanto, os ACR não são completamente metabolizados, porque a enzima chave de controle da sua taxa de oxidação, respectivamente, a enzima 2-oxoisovalerato desidrogenase, apresenta-se quase que totalmente na forma inativa, no músculo esquelético. Consequentemente, no tecido muscular, os aminoácidos de cadeia ramificada captados inicialmente são utilizados como fornecedores de nitrogênio na formação de glutamina e alanina (MEIJER, 2003).

A glutamina apresenta um gradiente transmembrana através da célula muscular elevado, o que torna sua difusão livre através da membrana celular, restrita (ROGERO & TIRAPEGUI, 2003). Desta forma, a glutamina necessita ser transportada de forma ativa para o interior das células, por meio de um sistema dependente de sódio (Na^+), fato que resulta em gasto de ATP (WINDMUELLER, 1982). Cabe salientar que o transporte de glutamina através da membrana da célula muscular é o mais veloz dentre todos os vinte aminoácidos (NEWSHOLME et. al., 2003a) e que a estabilidade da concentração deste aminoácido no fluido intracelular e o gradiente de concentração através da membrana representam um efeito combinado de diversos fatores, como: afinidade do sistema de transporte, influência da competição entre aminoácidos por moléculas carreadoras, razão intracelular de síntese e degradação, taxa de fornecimento extracelular, taxa de fluxo através da membrana celular, quantidades intra e extracelulares de Na^+ .

A entrada de glutamina na célula muscular é estimulada pela ação de hormônios como a insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs); os hormônios

contrarreguladores como os glicocorticoides, por outro lado, em virtude de um estímulo do aumento da atividade da enzima GA, sobretudo durante estados de intenso catabolismo, conduzem a um efluxo máximo de glutamina para o meio extracelular, mesmo em situações onde as concentrações intracelulares deste aminoácido encontrem-se reduzidas. Tal fato leva a uma diminuição dos estoques intracelulares de glutamina e a alterações no transporte cinético deste aminoácido (WINDMUELLER, 1982, ROGERO & TIRAPEGUI, 2003).

Alguns estudos apontam que a glutamina, ao ser transportada para o ambiente intracelular, promove, concomitantemente, a absorção de água e a liberação de potássio (K^+), fato que aumenta o estado de hidratação e influencia o volume celular (WINDMUELLER, 1982, PARRY-BILLINGS et al., 1991, ROGERO & TIRAPEGUI, 2003). Embora ainda controverso, o aumento no volume celular pode estimular a síntese proteica, o que é considerado como um sinal anabólico (HÄUSSINGER, LANG & GEROK, 1994, ROWBOTTOM, KEAST & MORTON, 1996, MEIJER, 2003).

2.2. Atrofia muscular e imobilização de membros

A atrofia da musculatura esquelética tem sido caracterizada como um fenômeno com significativo impacto sobre a funcionalidade muscular e das atividades da vida diária (HORTOBÁGYU et al., 2000). Períodos de inatividade por fatores como imobilização de membros, permanência em repouso na cama ou exposição à microgravidade, entre outros, induzem a uma redução no conteúdo proteico, no diâmetro da fibra e da produção de força muscular (ADAMS et al., 2003; FITTS et al., 2001). Segundo Yue et al. (1997), especificamente, a imobilização de membros implica em considerável redução da atividade eletromiográfica e do recrutamento de unidades motoras, fato que, por sua vez, leva a uma substancial redução na área de secção transversa muscular, por conta da atrofia das fibras musculares, sobretudo de fibras glicolíticas ou de contração rápida (tipo IIa e IIb).

2.3. Atrofia muscular, estado redox celular e vias de sinalização celular

Durante o processo evolutivo, um dos principais avanços dos seres vivos foi à capacidade de utilização do oxigênio (O_2) no processo de síntese de energia intracelular. Tal fato permitiu que a quantidade de energia sintetizada por estes seres aumentasse em mais de dez vezes, corroborando, desta forma, para que tais organismos evoluíssem e atingissem o estágio em que nos encontramos atualmente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991). Entretanto, ao mesmo tempo em que a utilização do O_2 se tornou fundamental no desenvolvimento de organismos mais complexos, tal situação trouxe consigo, um efeito indesejável denominado paradoxo do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1991). A molécula de O_2 , além de agir como um aceptor universal de elétrons permitindo que organismos aeróbios catabolizem de forma oxidativa, substratos como carboidratos, lipídios e proteínas, também pode desencadear ações prejudiciais às células, representadas pela síntese de diversas substâncias com propriedades tóxicas, as quais compreendem os radicais livres (RL), as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (BEJMA & JI, 1999; JI, 1999).

ERO e ERN, mesmo tendo meia-vida curta possuem uma configuração eletrônica instável, fato que as tornam altamente reativas e, deste modo, capazes de reagir com outras moléculas ou metais a partir de reações em cadeia, na tentativa de obter uma estrutura eletrônica mais estável. Tal fato tem sido apontado como o principal fator indutor de danos à estrutura e funcionalidade da célula, por meio de mecanismos bioquímicos em cascata, com destaque para o processo de peroxidação lipídica, que em última instância levam a degeneração dos fosfolipídios da bicamada lipídica que compõem as membranas celulares e subcelulares, lesões ao DNA e a oxidação de proteínas celulares (DRÖGE, 2002; FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006; DALLE-DONNE et al., 2006).

Sob condições fisiológicas normais, o organismo encontra-se em equilíbrio entre a síntese e a degradação de ERO (DRÖGE, 2002; FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006). Contudo,

durante situações catabólicas, a síntese de ERO supera a capacidade endógena antioxidante, instalando-se um processo denominado de estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio pró-síntese em relação à degradação de ERO (JI, 1999; DRÖGE, 2002; FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006). Estudos in vivo e in vitro sugerem que o desbalanço entre a síntese e a remoção de ERO, ou seja, uma situação de estresse oxidativo, quando ocorrido cronicamente, configura-se em fator de grande contribuição para a atrofia e redução do conteúdo proteico muscular, por contribuir no processo de redução da massa e força muscular, bem como, aumentando a gravidade de lesões às células, resultando em menor capacidade de recuperação, fadiga crônica, depressão do sistema imune e fraqueza muscular (BOOTH, 1982; THOMASON & BOOTH, 1996; JI, 1999; FITTS et al., 2001; ADAMS et al., 2003; GLASS, 2003; WHITEHOUSE & TISDALE, 2003; JACKMAN & KANDARIAN, 2004; CHEN et al., 2007; ELEY & TISDALE, 2007; POWERS et al., 2007). Cabe salientar, entretanto, que as ERO exercem diversas funções fundamentais para a vida, incluindo atividades microbidas e de biogênese celular. Desta forma, as ERO fazem parte do metabolismo celular normal (FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006).

De acordo com Dröge (2002) o desequilíbrio pró síntese de ERO, induz alterações no estado redox das células. Tal situação tem demonstrado poder agir como segundo mensageiro, em vias de sinalização e tradução celular, que regulam condições patológicas, dentre as quais incluem-se, algumas, que conduzem a proteólise muscular, por atrofia, e morte celular, por apoptose. Neste contexto, segundo Powers et al. (2007) as ERO contribuem para a atrofia e redução do conteúdo proteico muscular, por desuso, por uma ação direta sobre o controle da ativação transcricional citoplasmática e translocação nuclear do fator nuclear Kappa B (NF-kB). O NF-kB compreende uma família de cinco proteínas reguladoras de genes (fatores de transcrição): p65, Rel B, c-rel, p52 e p50, os quais são expressos, sobretudo, no músculo esquelético (POWERS et al., 2007). Esta família de fatores de transcrição pode mediar uma variedade de processos celulares, dependendo do

tipo de célula. Dentre estes processos destacam-se: inflamação, resposta imune, desenvolvimento, diferenciação e apoptose celular (POWERS et al., 2007).

A ativação do NF- κ B se dá pela fosforilação, por diversas serinas quinases, da proteína inibidora I κ B, sobretudo da sua subunidade α (I κ B- α) e pelo transporte nuclear de heterodímeros dos membros da família deste fator transcricional, como a subunidade p65, que é liberada pela fosforilação e subsequente ubiquitinação e degradação do I κ B- α (HUNTER et al., 2002). A subunidade p65, após liberar-se do I κ B- α liga-se, no citoplasma, a subunidade p50 formando, assim, o fator de transcrição NF- κ B ativo (WHITEHOUSE & TISDALE, 2003). Uma vez ativo, o NF- κ B ganha a condição de poder se translocar para o núcleo celular e lá, se ligar à região reguladora, junto a dupla fita de DNA, induzindo a expressão de genes associados com inúmeras respostas fisiológicas, incluindo resposta imune, resposta inflamatória de fase aguda, metabolismo redox, diferenciação, angiogênese adesão e apoptose celular (JACKMAN & KANDARIAN, 2004). De acordo com Powers et al. (2007); Whitehouse & Tisdale (2003); Li & Reid (2000), o NF- κ B é ativado durante estados catabólicos que levam a atrofia e redução do conteúdo proteico muscular pela ativação de um outro fator de transcrição nuclear, denominado fator de indução de proteólise (PIF). A ativação do PIF resulta do aumento da síntese de interleucinas como a interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa e de citosinas pró-inflamatórias, principalmente, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

A ativação sequencial das três proteínas quinases intracelulares que compõem a cascata de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), a citar: a c-JUN NH₂ - terminal quinase (JNK), a quinase extracelular sinal-regulada (ERK), a qual se subdivide em duas isoformas, ERK1 e ERK2, coletivamente denominadas de ERK1/2 e, principalmente, o p38 MAPK provê outra potencial ligação entre estresse oxidativo, atrofia e redução do conteúdo proteico muscular. As MAPK são proteínas serina/treonina quinases, que desempenham importante papel em uma variedade de processos, uma vez

que a ativação destas proteínas quinases, controlam e/ou regulam o processo de transcrição, tradução ribossomal e ativação de numerosas outras proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, incluindo, por exemplo, o NF- κ B (PEARSON et al., 2001; CUSCHIERI & MAIER, 2005).

Especificamente em relação a proteína quinase p38 MAPK, de acordo com Li et al. (2005), a expressão gênica e proteica desta quinase é estimulada por ERO e TNF- α , durante diversas situações deletérias e catabólicas, que levam a degradação do conteúdo proteico muscular. O exato mecanismo por detrás desta estimulação do processo de transcrição, tradução e ativação desta proteína quinase, durante episódios de estresse oxidativo e sob um estado pró-inflamatório, no entanto, ainda não se encontra totalmente esclarecido. Apesar disto, Li et al. (2005) e Moylan & Reid (2007) destacam que a semelhança com que ocorre com o NF- κ B, uma ação estimulatória da tioredoxina pode estar envolvida neste mecanismo oxidativo-inflamatório-mediado, pró-ativação da p38 MAPK, durante situações deletérias que levam a degradação do conteúdo proteico muscular. Segundo estes autores, sob condições metabólicas normais, a tioredoxina se liga e exerce uma ação inibitória sobre a proteína quinase estimulatória de apoptose ASK1 (do inglês apoptosis stimulating kinase 1). No entanto, sob situações que levem ao aumento exarcebado da síntese de ERO em relação a sua degradação/remoção, ou da síntese e liberação de TNF- α , a tioredoxina é oxidada e se disassocia da proteína ASK1, fato que induz a fosforilação e, subsequente, ativação do p38 MAPK (MOYLAN & REID, 2007). Não obstante, Powers et al. (2007) destacam que a ativação do p38 MAPK por ERO, regula a atividade transcricional do fator de transcrição AP-1 que, por sua vez, é capaz de ativar o NF- κ B. Deste modo, conforme Li et al. (2005), tanto a via da MAPK, quanto e, principalmente, a do NF- κ B, desempenham papel chave na indução da atrofia e consequente degradação do conteúdo proteico muscular. Tal situação, segundo Kavazis et al. (2007) e Herrmann, Lerman & Lerman (2007), se deve ao fato destas duas famílias de

proteínas quinase e fatores de transcrição celular, possuem a capacidade de ativar a transcrição de proteínas do complexo ubiquitina-proteasoma, o qual configura-se no principal sistema proteolítico do organismo, responsável pela degradação de proteínas celulares, no músculo esquelético.

Um outro grupo de proteínas que tem sido substancialmente correlacionado a indução da atrofia e ao disparo do processo de degradação do conteúdo proteico muscular, corresponde a superfamília de fatores de transcrição Forkhead box O, do inglês Forkhead box O transcription factors (FOXO) também conhecidos por FKHR (HUANG & TINDALL, 2007). Compostas por 110 aminoácidos, as proteínas da família FOXO são caracterizadas por possuírem um arranjo molecular em três estruturas alfa-hélices dispostas em forma elíptica, em torno de uma hélice central a qual é rodeada de alças, formando uma estrutura referida como “hélice alada” ou “cabeça em forquilha”. Em relação a sua função como fatores de transcrição, as proteínas da superfamília FOXO são reconhecidas como fatores de transcrição “pioneiros” (FRIEDMAN & KAESTNER, 2006; GRINIUS et al., 2006). Tal denominação se vincula ao fato destas proteínas atuarem facilitando a ligação de outros fatores de transcrição, a região promotora, junto a dupla fita de DNA, responsáveis pela transcrição de diversos genes, entre os quais, alguns relacionados a funções fundamentais a manutenção da homeostasia celular, como: proliferação, diferenciação e apoptose celular (BIRKENKAMP & COFFER, 2003). Não obstante, a ação transcricional dos membros da família de fatores de transcrição FOXO, também tem sido correlacionada ao disparo de processos catabólicos e proteolíticos, especialmente, por meio da ativação dos componentes do sistema proteolítico, coordenado pelo sistema ubiquitina-proteossoma (VAN DER HEIDE et al., 2004).

A superfamília de fatores de transcrição FOXO é composta por diversas isoformas proteicas. Destas, três isoformas têm sido amplamente investigadas e relativamente bem caracterizadas, quanto a sua funcionalidade na célula, sendo elas: FOXO1, FOXO3a e

FOXO4 (BIGGS III; CAVENEE & ARDEN, 2001). Todas estas isoformas de FOXO, são amplamente expressas no tecido muscular esquelético e localizadas no núcleo celular, onde encontram-se expressas na sua forma não-fosforilada e ativa (SANDRI et al., 2004). Porém, quando fosforiladas, principalmente pela ação da proteína serina/treonina quinase Akt, também conhecida como proteína quinase B (PKB), as isoformas da superfamília FOXO, por serem um dos principais substratos downstream desta proteína quinase, em resposta, à estimulação celular por fatores de crescimento ou insulina, são seqüestradas para o citosol, onde tornam-se incapazes de regular a transcrição de genes envolvidos, entre outros fatores, com o processo de atrofia e degradação do conteúdo proteico muscular, com destaque para a transcrição da atrogin-1 (também conhecida como MAFbx – do inglês muscle atrophy F-box) e MuRF1 (do inglês - muscle RING finger 1), dois específicos componentes, expressos na musculatura esquelética, do sistema proteolítico ubiquitina-proteossoma (LECKER et al., 2004; SANDRI et al., 2004; SENF et al., 2010; FOLETTA et al., 2011; BODINE & BAEHR, 2014; MOCHALOVA et al., 2019).

Prévios estudos têm destacado que durante situações em que o desuso da musculatura esquelética é induzido, o aumento do estresse oxidativo e da síntese e liberação de TNF- α , estimulada pela atrofia do músculo esquelético, leva ao interrompimento da regulação negativa, efetivada pela Akt, sobre os fatores transcricionais da superfamília FOXO, principalmente sobre a isoforma FOXO3a (SANDRI et al., 2004). Tal situação tem se correlacionado, de forma direta, ao desencadeando da translocação deste fator de transcrição para o núcleo celular e, a subsequente transcrição de genes relacionados à atrofia e degradação do conteúdo proteico muscular, como Atrogin-1 e MuRF-1, o que, por sua vez se correlacionou de forma íntima, com à redução nas dimensões da fibra muscular (STITT et al., 2004; FURUKAWA-HIBI et al., 2005; GLASS, 2005).

O aumento exarcebado da síntese de ERO, sobrepujando os sistemas responsáveis

pela sua remoção e/ou degradação (estresse oxidativo), conjugado com uma igual exarcebada síntese e liberação de TNF- α , também tem se correlacionado ao desencadeamento da proteólise muscular, por disparar, entre outras, uma resposta celular de estresse denominada estresse do retículo sarcoplasmático (POWERS et al., 2007). Tal resposta de estresse é caracterizada por: 1) acúmulo exarcebado de íons cálcio (Ca^{2+}) no interior do retículo sarcoplasmático, seguido por; 2) exarcebado efluxo destes íons Ca^{2+} para o citoplasma da célula muscular, fato que tem se correlacionado a ativação de proteases ativadas por Ca^{2+} , entre elas a via das calpaínas e, principalmente a via dos principais elementos indutores de morte celular programada (apoptose), as caspases (POWERS, KAVAZIS & DERUISSEAU, 2005). As caspases constituem uma família de proteases de cisteína peptidases que se utilizam de um resíduo de cisteína como nucleófilo catalítico, para clivar proteínas alvos nos sítios próximos ao ácido aspártico (LEE U WENBURGH et al., 2005).

A importância relacional das caspases para o desencadeamento do processo de degradação do conteúdo proteico muscular reside no fato de que se tem argumentado que o sistema ubiquitina-proteassoma, embora desempenhe um papel dominante durante a atrofia muscular induzida por desuso, uma vez que este sistema, é responsável pela degradação da maioria das proteínas sarcoméricas, não seja o passo limitador da taxa de atrofia muscular (TALBERT et al., 2013). Tal proposição, vincula-se a observação de que o sistema ubiquitina-proteassoma mostrou-se ser incapaz de degradar diretamente os miofilamentos de actina e de miosina, devido ao arranjo bem compactado dessas proteínas em um complexo conhecido como complexo actomiosina, dentro dos sarcômeros do músculo estriado (DU et al., 2004). Deste modo, a prévia liberação ou ruptura destes miofilamentos de actina e miosina, a partir do complexo actomiosina-sarcômero, para uma conformação de proteínas monoméricas, antes de sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, mostrou-se ser um pré-requisito e o real passo limitador da taxa

de degradação do conteúdo proteico muscular mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma, durante períodos de desuso da musculatura esquelética (TALBERT et al., 2013). Neste contexto, estudos *in vitro* e *in vivo* têm destacado o papel crítico desempenhado pela ativação da caspase-3 (uma protease aspartato-específica dependente de cisteína) na promoção da degradação do complexo actomiosina-sarcômero (DU et al., 2004; McCLUNG et al. 2007). Nesse processo, atuando como um elemento upstream, a caspase-3 demonstrou ser capaz de induzir e ser primordial para a liberação dos miofilamentos musculares, especialmente actina e miosina, para sua subsequente degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Não obstante, tal ação da caspase-3 mostrou-se intimamente relacionada a indução da apoptose das células músculo-esqueléticas, uma vez que a caspase-3 demonstrou ser capaz de ativar a endonuclease G, que desencadeou a fragmentação do DNA e a posterior formação, de corpos pró-apoptóticos (DU et al., 2004; McCLUNG et al., 2007). Vale ressaltar que, no músculo esquelético, apoptose é denominada de apoptose mioclear, uma vez que nesse tecido esse processo celular possui características distintas em comparação à apoptose de outras células, já que as fibras musculares são células multinucleadas (DU et al., 2004).

Com bases nestes pressupostos evidencia-se ser o complexo de proteínas quinases e de fatores de transcrição das famílias da MAPK, FOXO e NF- κ B, bem como as proteases aspartato-específicas dependentes de cisteína, da família das caspases, alvos chave na proposição de estratégias que visem atenuar ou reverter os efeitos deletérios, a funcionalidade orgânica, advindas da atrofia da musculatura esquelética e subsequente redução do conteúdo proteico muscular.

Como já relatado anteriormente, sob condições fisiológicas normais, o organismo encontra-se em equilíbrio entre a síntese e a degradação de ERO (DRÖGE, 2002; FINAUD, LAC & FILAIRE, 2006). Contudo, durante situações catabólicas, incluindo a atrofia muscular, por desuso, ocorre um desequilíbrio pró-síntese em relação à degradação de

ERO, fato que culmina em um quadro de exacerbado estresse oxidativo (POWERS et al., 2007). Neste contexto, no intuito de neutralizar a aumentada síntese de ERO, e assim atenuar o estresse oxidativo celular durante e após períodos de estresse fisiológico, as células dispõem de um sistema antioxidante classificado como enzimático e não enzimático (JI, 1999; DRÖGE, 2002).

Dentro do sistema antioxidante não enzimático, o tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, conhecido como glutathiona (GSH), corresponde ao principal e em maior concentração, antioxidante celular não enzimático do organismo (MEISTER & ANDERSON, 1983). Composta por resíduos de cisteína, ácido glutâmico e glicina (MEISTER & ANDERSON, 1983), a GSH é encontrada em elevadas concentrações nas células. De maneira geral, a ação da GSH contra os efeitos deletérios das ERO pode se dar de maneira direta, mediante reações não enzimáticas, onde esta, a fim de reduzir a interação das ERO com as células passa de sua forma reduzida para sua forma oxidada (GSSG), ou indireta, onde este antioxidante age como doadora de elétrons na redução de peróxidos catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) (SEN, 1995; JI, 1999). Neste contexto de reações redox, cabe ressaltar que a GSSG, pela ação da enzima glutathiona redutase (GR), utilizando NADPH, como fonte de poder redutor, é enzimaticamente reconvertida a GSH. Em resumo, mediante diversos mecanismos, a GSH protege as células mantendo a concentração de muitas proteínas e de seus grupamentos sulfidrilas (-SH) na forma reduzida, os quais são necessários para o funcionamento normal das células (MEISTER & ANDERSON, 1983; BEUTLER, 1989; VALENCIA, MARIN & HARDY, 2001a; VALENCIA, MARIN & HARDY, 2001c).

2.4. Glutamina, funções biológicas, estado redox celular e citoproteção

Conforme ilustra a figura 5, a glutamina está envolvida em diversas funções na célula. Dentre estas se destacam: regulação do equilíbrio ácido base, sendo precursor de uréia na urina; principal carreador de nitrogênio entre os tecidos; precursor de ácidos nucleicos, purinas e pirimidinas; principal intermediário na síntese de glutamato e do ácido γ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor cerebral, com atividade tanto inibitória quanto excitatória; principal doador de esqueletos de carbono para a gliconeogênese hepática; regulador da síntese de glicogênio; participação na composição de peptídeos, na proliferação de células do sistema imune e em processos de recuperação de estresses fisiológicos, tais como cirurgias, ferimentos e jejum prolongado (LANCEY & WILMORE, 1990; NEWSHOLME et al., 2003a; ROGERO & TIRAPEGUI, 2003).

Não obstante, estudos têm indicado que a cinética da concentração de glutamina na célula pode modular a concentração intracelular de GSH (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015). Fläring et al. (2003), Valencia, Marin & Hardy (2001b) e Ji (1999) destacam que a síntese de GSH apresenta uma considerada dependência da concentração de cisteína, glicina e principalmente de glutamato, sendo este aminoácido, a primeira e provavelmente a mais importante etapa na síntese dos compostos integrantes da GSH (ANTONIO & STREET, 1999; JI, 1999; FLÄRING et al., 2003). Considerando-se o fato de que o glutamato é dependente da disponibilidade de glutamina, o transporte deste aminoácido para dentro das células mantém a concentração de glutamato e, conseqüentemente, de GSH. Deste modo, uma diminuição do fornecimento de glutamina às células, durante e após situações de elevado catabolismo tem sido associada à maior suscetibilidade a lesões oxidativas por promover ou exacerbar um quadro de estresse oxidativo celular, em decorrência de alterações no estado redox celular (BABIJ et al., 1983; BEST et al., 1999). Tal fato resulta em maior síntese de ERO, inibição da síntese da enzima glutamina sintetase e aumento do consumo de glutamina pelo trato gastrointestinal (ROWBOTTOM, KEAST & MORTON,

1996), além de representar um dos principais estímulos à ativação de vias de sinalização celular, que em última instância, podem levar a apoptose da célula, incluindo a via da MAPK e, principalmente, a do NF- κ B (SINGLETON & WISCHMEYER, 2007; CURI et al., 2005; SINGLETON et al., 2005; NEWSHOLME et al., 2003b; PITHON-CURI et al., 2002).

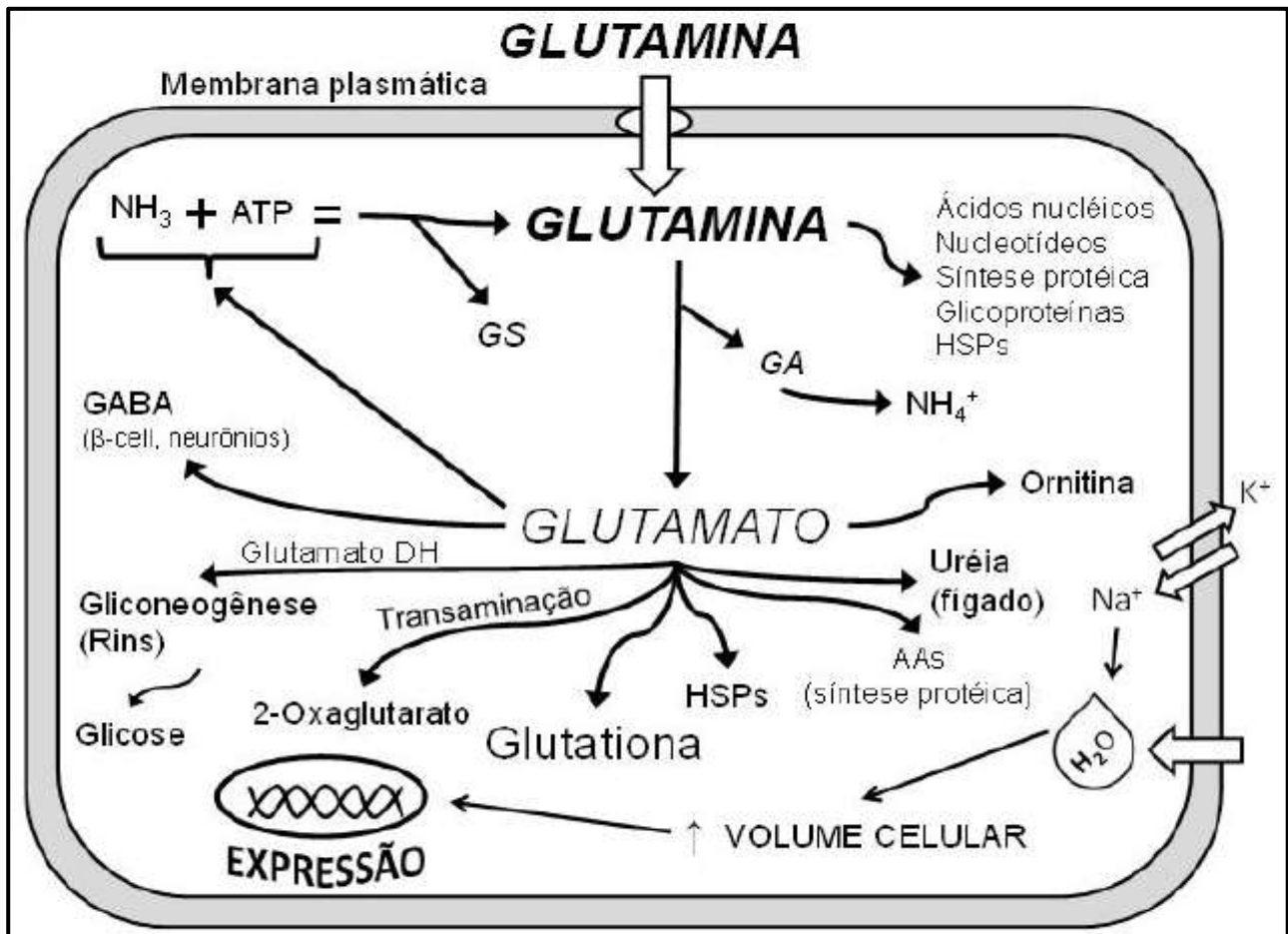


Figura 5 - Destinos e funções da glutamina na célula. GS = Enzima Glutamina Sintetase; GA = Enzima Glutaminase. (Adaptado de CRUZAT, PETRY & TIRAPEGUI, 2009).

A glutamina também tem sido implicada em importantes mecanismos antiapoptóticos (ATALAY et al., 2004; GABAI & SHERMAN, 2002). Dentre estes mecanismos a inibição da ativação e liberação de citosinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , fato que esta intimamente relacionado com a ativação da cascata de sinalização do NF- κ B, da p38 MAPK, FOXO3a e da via das caspases, tem sido destacado, em diversos estudos

(LAGRANHA et al., 2007; SENF et al., 2008; CRUZAT et al., 2014 a,b; RAIZEL et al., 2016; PETRY et al., 2019) . De acordo com Wernerman & Hammarqvist (1999), a síntese de citosinas pró-inflamatórias é dependente da ativação do fator NF-kB, que por sua vez, depende do potencial redox celular que, em última instância é regulado pela razão intracelular, entre a concentração de GSSG e a concentração de GSH a qual, como mencionado anteriormente, é modulada pela concentração intracelular de glutamina.

Outro processo antiapoptótico, em que a glutamina tem sido implicada, esta relacionado à ação deste aminoácido, em associação, ou não, a algum estressor fisiológico, como um agente fármaco-nutricional (WISCHMEYER, 2002), capaz de modular um importante mecanismo de citoproteção, denominado resposta celular de estresse (ROPELESKI et al., 2005; GABAI & SHERMAN, 2002). De acordo com Singleton & Wischmeyer (2007) e Wischmeyer (2006), agindo desta forma, a glutamina tem demonstrado ser vital para o processo de O-glicosilação e fosforilação dos fatores transcricionais de choque térmico, sobretudo do fator de choque térmico 1 (HSF-1). Tal situação tem se correlacionado a estimulação da expressão gênica de uma variedade de proteínas envolvidas com a elevação da capacidade da célula de resistir a lesões, denominadas proteínas de estresse ou de choque térmico (do inglês heat shock proteins - HSPs) (SANDRES & KON, 1991; ROPELESKI et al., 2005; CRUZAT, PETRY & TIRAPEGUI, 2009).

Agrupadas em 6 subfamílias, classificadas de acordo com sua sequência de aminoácidos e peso molecular, em quilodaltons (kDa) (MORIMOTO, 1993), as HSPs, correspondem a uma das principais vias de sinalização que contribuem para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostasia (SAMELMAN, 2000; GABAI & SHERMAN, 2002; VENOJÄRVI et al., 2007; CRUZAT, PETRY & TIRAPEGUI, 2009). Dentre todas as subfamílias de HSPs, os membros da subfamília da HSP70, com

destaque para sua isoforma induzível (HSP72) e constitutiva (HSP73) configuram-se na subfamília de HSPs mais abundante nas células eucariotas (LOCKE, 2002). Em dois prévios estudos Petry et al. (2014) e Petry et al. (2015) observaram que a administração de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, em uma posologia semelhante ao dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, 1g/kg de peso corporal, se mostrou eficiente, em prover maior disponibilidade de glutamina, glutamato, GSH, bem como atenuada razão GSSG/GSH, além de induzir maior expressão proteica de HSP70 (HSP73 + HSP72), bem como do fator HSF-1, no citoplasma e núcleo celular, no tecido muscular e hepático, de ratos submetidos a exercício aeróbio intenso.

2.5. Mecanismos de absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos

Sob condições fisiológicas normais, as necessidades nutricionais proteicas de seres humanos e animais são plenamente supridas pela absorção de aminoácidos e pequenos peptídeos oriundos da dieta. Deste modo, o processo que envolve a digestão e os mecanismos de absorção de aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos possuem implicações diretas sobre a nutrição humana.

O processo de digestão de proteínas é iniciado na boca, embora nesse sítio não sofram nenhuma modificação química, sendo apenas reduzidas a partículas menores. Já no estômago, pela ação do ácido clorídrico e da pepsina, proteínas e polipeptídios são desnaturados e hidrolisados. Contudo, a digestão estomacal, representa somente de 10 a 20% da digestão proteica total. Com efeito, a maior parte da digestão proteica ocorre no lúmen do duodeno e jejuno, finalizando-se, quase que completamente no íleo terminal. Posteriormente, no intestino delgado, sob a ação da enteropeptidase, que em pH neutro ativa o tripsinogênio e a tripsina, ocorre a hidrólise luminal de proteínas e polipeptídeos, fato que leva à síntese de aminoácidos livres e pequenos peptídeos, que são hidrolisados

a aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos, por peptidases presentes na membrana borda em escova dos enterócitos (FRENHANI & BURINI, 1999).

O intestino delgado dispõe de grande capacidade de absorver dipeptídeos. Contudo, variações regionais nesta capacidade, são observadas. Estudos demonstram que a capacidade absorptiva de dipeptídeos é maior na fração proximal do intestino delgado em relação à fração distal. Tal fato está relacionado a uma maior presença e atividade de peptidases citosólicas que atuam sobre dipeptídeos, no segmento proximal deste órgão. Por outro lado, a capacidade absorptiva de aminoácidos livres é maior na fração distal do intestino delgado, quando comparada à fração proximal (GANAPATHY & BRANDSCH; LEIBACH, 1994; ADIBI, 2003).

Os produtos finais da digestão proteica consistem de uma mistura de 40% de aminoácidos livres e de 60% de pequenos dipeptídeos e tripeptídeos (ROGERO & TIRAPEGUI, 2003). Apesar disto, até o início da década de 50 acreditava-se que os produtos finais da digestão proteica consistiam única e exclusivamente de aminoácidos livres, para os quais havia diversos mecanismos de transporte. Contudo, a partir de estudos de absorção de aminoácidos, observou-se que os enterócitos, a partir do lúmen intestinal, dispõem de eficientes mecanismos de transporte e absorção de dipeptídeos e tripeptídeos (GANAPATHY & BRANDSCH; LEIBACH, 1994; TEMPLE et al., 1998). De forma geral, estes mecanismos são controlados por um sistema específico de absorção de aminoácidos e dipeptídeos através da membrana borda em escova. Este sistema pode ser dividido da seguinte forma:

a) aminoácidos livres liberados pela digestão no trato gastrointestinal ou na membrana borda em escova dos enterócitos são absorvidos via sistema de transporte específicos para aminoácidos livres. (ROGERO et al., 2006).

b) dipeptídeos que permanecem após a digestão por peptidases luminiais e ligados à membrana borda em escova, que podem ser absorvidos de forma intacta pelo intestino

delgado de duas maneiras: 1) transportados como dipeptídeos intactos ou clivados por peptidases dentro do citoplasma das células da mucosa intestinal; 2) clivados em aminoácidos livres por hidrolases de peptídeos presente na membrana borda em escova e posteriormente transportados para dentro do citoplasma das células intestinais como aminoácidos, pela proteína transportadora de oligopeptídeos (PepT-1) (CASPARY, 1992; ADIBI, 2003; ROGERO & TIRAPEGUI, 2003).

Localizada exclusivamente na membrana borda em escova do epitélio intestinal, a PepT-1 possui ampla especificidade por substratos e transporta ativamente dipeptídeos e tripeptídeos, tanto no intestino de humanos como de animais. Deste modo, a PepT-1 é considerada a principal via de absorção dos produtos finais da digestão proteica. A atividade desta proteína permite que dipeptídeos transitem da mucosa intestinal, que apresenta reduzida atividade de hidrolases, para o citosol e conseqüentemente sejam utilizados pela própria célula ou, liberados diretamente na circulação portal, através dos transportadores de aminoácidos localizados na membrana basolateral (ADIBI, 2003).

A membrana basolateral dos enterócitos também possui ao menos outros cinco sistemas de transporte de aminoácidos, sendo dois destes dependentes de sódio (Na^+) e três independentes. Estudos demonstram que os sistemas dependentes de Na^+ apresentam importante papel no fornecimento de aminoácidos para as células do próprio intestino, enquanto que os sistemas independentes de Na^+ são responsáveis pelo transporte de aminoácidos para a circulação sanguínea. Tanto os transportadores de aminoácidos presentes na membrana borda em escova (PepT-1), quanto na membrana basolateral têm sua funcionalidade distinguida mediante seus mecanismos de transporte e por sua afinidade por substratos. Tais diferenças são responsáveis pela eficiência do fluxo transcelular, ou seja, pela absorção intestinal de peptídeos.

Frenhani & Burini (1999) relatam que aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos ao serem transportados, atravessam as membranas borda em escova e basolateral

mediante mecanismos de transferência passiva, por difusão simples ou facilitada, ou, ainda, por meio de um sistema ativo, através de co-transportadores dependentes de hidrogênio (H^+) ou Na^+ . Aminoácidos livres são transportados, tanto por meio do sistema passivo quanto pelo ativo, enquanto que dipeptídeos e tripeptídeos são transportados, quase que preferencialmente, por meio do sistema ativo dependente de H^+ . Cabe salientar que o sistema ativo dependente de Na^+ ocorre principalmente na membrana borda em escova, enquanto que o transporte por difusão simples se dá na membrana basolateral, sendo que ambas as membranas apresentam o transporte passivo facilitado (FRENHANI & BURINI, 1999).

A utilização destes dois sistemas, dependentes de Na^+ e H^+ , para a absorção ativa de aminoácidos e dipeptídeos, respectivamente, é vantajosa para o organismo, uma vez que auxilia a manter adequada a nutrição proteica. Tal fato está relacionado à ausência de competição entre aminoácidos e dipeptídeos pelo gradiente energético que permite que estes sejam absorvidos. Deste modo, a absorção de aminoácidos e dipeptídeos pode ocorrer paralelamente (GANAPATHY, BRANDSCH & LEIBACH, 1994).

Estudos por meio de perfusão jejunal, inclusive com humanos, demonstraram que a competição entre aminoácidos livres durante o processo de captação é evitada ou reduzida, quando estes se apresentam sob a forma de dipeptídeos ou tripeptídeos (TEMPLE et al., 1998). Outros estudos observaram maior e mais rápida absorção de aminoácidos a partir de soluções com dipeptídeos, quando comparado a soluções com aminoácidos livres de igual composição. Tal fato foi creditado, entre outros fatores, à capacidade demonstrada por estes dipeptídeos, de chegarem intactos ao intestino delgado (GANAPATHY, BRANDSCH & LEIBACH, 1994; ROGERO & TIRAPEGUI, 2003).

2.6. Especificidades da absorção de L-glutamina e L-alanil-L-glutamina

Cerca de 50% da glutamina presente no lúmen intestinal que atravessa a membrana borda em escova dos enterócitos, advinda do estado pós-prandial, é utilizada ou consumida pelo trato gastrointestinal. Cabe salientar que em situações em que não haja suficiente aporte de glutamina a partir do lúmen intestinal, o trato gastrointestinal também pode obter glutamina a partir da circulação sanguínea, graças a transportadores específicos presentes na membrana basolateral (LEIBACH & GANAPATHY, 1996; ROGERO & TIRAPEGUI, 2000). Estudos demonstram que a presença de glutamina no lúmen intestinal diminui em até 40% a taxa de captação e utilização de glutamina, pelos enterócitos, a partir da circulação sanguínea (WINDMUELLER, 1982).

A glutamina na forma livre dispõe de um transportador Na^+ dependente na superfície da membrana borda em escova. Este aminoácido é absorvido in vivo, pelo jejuno, sendo posteriormente, metabolizada, pelo intestino e pelo fígado (D'SOUZA & TUCK, 2004). Estudos com animais experimentais demonstram que a taxa de utilização de glutamina pelas células epiteliais jejunais é semelhante tanto para a glutamina advinda da circulação sanguínea, quanto para a advinda do lúmen intestinal (MINAMI, MORSE & ADIBI, 1992).

A mucosa intestinal pode obter glutamina ainda, a partir de dipeptídeos presentes no lúmen intestinal, mediante a hidrólise extracelular de peptídeos contendo este aminoácido, seguido de sua respectiva absorção, ou pela absorção de peptídeos de glutamina seguida pela hidrólise intracelular dos mesmos. Contudo, ainda é desconhecido se o desaparecimento luminal de dipeptídeos contendo glutamina na mucosa intestinal ocorra, predominantemente, por transporte na forma intacta destes dipeptídeos, ou, então, por hidrólise dos mesmos, via peptidases presentes na membrana borda em escova. Minami, Morse & Adibi (1992) verificaram que, especificamente, o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, no intestino delgado, é preferivelmente absorvido como dipeptídeo intacto, e subsequentemente hidrolisado a glutamina livre nos enterócitos, ao invés de ser

previamente hidrolisado na membrana luminal. Estudos *in vitro*, onde dipeptídeos de glutamina foram marcados radioativamente, demonstram que mais de 90% da radioatividade ficou acumulada no citosol dos enterócitos e de forma intacta (FRENHANI & BURINI, 1999).

Em um estudo de resposta cinética de absorção, Klassen et al. (2000), observaram aumento significativo na concentração plasmática de glutamina quando indivíduos foram submetidos à ingestão oral de 20g de L-alanil-L-glutamina em uma única dose ou de maneira intermitente. Outros estudos observaram que todas as frações celulares apresentam atividade hidrolítica para o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, demonstrando assim, ser, o uso deste dipeptídeo uma estratégia nutricional eficiente para ofertar glutamina às células, tanto *in vitro* como *in vivo* (MINAMI, MORSE & ADIBI, 1992; ADIBI, SCHENKER & MORSE, 1996; ADIBI, 2003).

Embora a captação de glutamina pelos enterócitos a partir do lúmen intestinal seja prioritária, acredita-se que a presença de outros aminoácidos, tais como a alanina possa alterar esse mecanismo. Em estudos onde a glutamina foi oferecida por via oral em conjunto com a alanina, ambas na sua forma livre, verificou-se efeito metabólico similar à administração com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015; RAIZEL et al., 2016, PETRY et al., 2019). Em alguns estudos similares, no entanto, apesar do cálculo da quantidade de glutamina oferecida ser igual, não havia uma equivalência de aminoácidos entre os grupos (KLASSEN et al., 2000; ROGERO et al., 2004; ROGERO et al., 2006). Em nossos estudos (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015; PETRY et al., 2019) é provável que a adição de L-alanina livre à solução contendo L-glutamina, tenha elevado a concentração deste aminoácido no plasma rapidamente, uma vez que seu transporte através da célula epitelial intestinal ocorre de forma preferencial pelo transportador (BRÖER, 2008). Estudos avaliando o transporte de L-alanina em células do epitélio intestinal verificaram que sua absorção pode ser reduzida quando em conjunto com

alguns aminoácidos neutros, contudo, dentre estes aminoácidos não estava incluída a L-glutamina (SIGRIST-NELSON, MURER & HOPFER, 1975).

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e/ou uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na sua forma livre sobre o sistema antioxidante, mediado pelo eixo glutamina-GSH, sistema inflamatório, apoptose celular, mediada pela via das caspases, especialmente caspase 3, resposta celular de estresse, mediada pela expressão gênica da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), bem como na modulação de vias de sinalização celular relacionadas a regulação do processo de degradação do conteúdo proteico muscular, respectivamente: NF- κ B, p38 MAPK e FOXO3a, bem como sobre o conteúdo proteico miofibrilar e a área de secção transversa muscular, em ratos submetidos a 14 dias de imobilização, bilateral, dos membros posteriores, por meio da utilização de um novo modelo experimental de imobilização de membros.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito das intervenções nutricionais sobre:

3.2.1. a concentração plasmática e tecidual (músculos sóleo e gastrocnêmio) de glutamina e glutamato;

3.2.2. a concentração plasmática do íon amônio;

3.2.3. a concentração tecidual (músculos sóleo e gastrocnêmio) de glutathiona (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG);

3.2.4. a concentração eritrocitária de GSH e GSSG;

- 3.2.5. o conteúdo tecidual (músculos sóleo e gastrocnêmio) de proteínas carbonilas;
- 3.2.6. a concentração plasmática e tecidual (músculos sóleo e gastrocnêmio) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- 3.2.7. a concentração plasmática e tecidual (músculos sóleo e gastrocnêmio) da citosina pró-inflamatória fator de necrose tumoral- α (TNF- α);
- 3.2.8. a concentração plasmática de cortisol;
- 3.2.9. a imunodeteção, por Western Blot, da expressão proteica de HSP70, nos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- 3.2.10. a imunodeteção, por Western Blot, da expressão proteica do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), mais precisamente de seu constituinte p65, nas frações total e fosforilada, nos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- 3.2.11. a imunodeteção, por Western Blot, da expressão proteica da proteína inibitória do fator nuclear NF- κ B, proteína IKK, subunidades IKK α e IKK β , total e fosforilada nas serinas 176 e 180 (IKK α/β -Ser176/180), nos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- 3.2.12. a imunodeteção, por Western Blot, da expressão proteica da proteína p-38 MAPK nas frações total e fosforilada, nos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- 3.2.13. a imunodeteção, por Western Blot, da expressão proteica de Foxo3a na sua fração fosforilada, nos músculos sóleo e gastrocnêmio;
- 3.2.14. a determinação do conteúdo proteico miofibrilar e da área de secção transversa muscular, nos músculos sóleo e gastrocnêmio.

PARTE II

CAPÍTULO I

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Condições Experimentais

4.1.1. Animais

O presente estudo foi realizado com ratos Wistar, machos, adultos, com idade entre 55 e 60 dias e peso médio de 199 ± 37 g, cedidos pelo biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Creal). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (projeto nº 29389), conforme carta de aprovação, em anexo. O período total de experimento, incluindo uma semana de aclimatação, dos animais as caixas, foi de 3 semanas. Durante todo este período, os animais foram mantidos em caixas individuais, apropriadas para sua acomodação, sob condições de luz, obedecendo a um ciclo invertido de 12 horas claro, 12 horas escuro (luz acesa às 7:00hrs). A temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa do ar (60%) também foram controladas durante este período. A pesagem, bem como o cálculo do consumo de ração pelos animais, foi realizada, diariamente, durante todo o período experimental. A eutanásia (sacrifício) dos animais foi realizada 10 horas após a última sessão de gavagem. Para tanto, o método adotado foi o de decapitação, em guilhotina, sem anestesia e sem sofrimento (HOLSON, 1992). A escolha deste período de tempo se deu com base no estudo de Silver, Kowalchuk & Noble (2012), os quais indicam ser este o tempo máximo de estabilidade da expressão do RNA mensageiro (mRNA) de HSP70, principal alvo molecular do estudo. Do mesmo modo, a escolha deste meio de eutanásia baseou-se no fato do mesmo ser um método eficaz, que induz a perda imediata de reflexos, além de produzir mudanças fisiológicas e bioquímicas mínimas nos tecidos. Não obstante, em nosso estudo, devido ao fato de necessitarmos realizar a coleta de sangue periférico e a realização de análises celulares e bioquímicas, além de medidas de

estresse oxidativo, a utilização de anestesia, no momento da eutanásia dos animais, apesar de desejável, torna-se inviável. Tal situação justifica-se no fato de que todos os anestésicos comumente utilizados em estudos com animais experimentais levarem a uma intensa hiperglicemia, fato que poderia interferir nos resultados das respectivas análises (FEBBRAIO et al., 2004). Além disso, a morte dos animais sob anestesia, em nossa pesquisa, tornou-se incompatível devido ao fato de que tal procedimento exerce influência sobre células envolvidas na síntese de HSP70 (FEBBRAIO et al., 2004). Concomitante ao sacrifício de cada animal dos grupos suplementados foi realizado o sacrifício de um animal dos grupos controle.

4.1.2. Protocolo Experimental de Imobilização Bilateral de Membros

No presente estudo desenvolvemos um novo modelo experimental de imobilização bilateral dos membros (patas) traseiros, em ratos. Este novo modelo, trata-se de uma completa adaptação de prévios protocolos experimentais. Deste modo, ratos Wistar machos adultos foram, primeiramente, anestesiados pela utilização de 1,4 ml/Kg de peso corporal, de solução/coquetel anestésico, composta por xilazina (2,2 mg/ml) e quetamina (54 mg/ml), conforme indicado por Booth et al. (1996). Uma vez anestesiados, os animais tiveram suas patas e porção caudal média, do dorso, depilados, por meio do emprego de uma tosquiadeira elétrica (figura 6 a). Após a depilação, se deu o procedimento de imobilização de membros. Para tanto, foram utilizadas talas metálicas, de alumínio, revestidas com espuma, no lado que se manteve em contato com o seguimento corporal a ser imobilizado (figura 6 b). Tais talas foram moldadas conforme a anatomia e angulação em que as articulações do quadril e joelho ($\sim 160^\circ$ e $\sim 180^\circ$, respectivamente) e do tornozelo ($\sim 115^\circ$ - $\sim 120^\circ$) deveriam ser fixadas, de modo a deixar, ambas as patas traseiras, em extensão total das articulações do quadril e joelho e, a articulação do tornozelo, em flexão plantar (figuras 6 b, c). A escolha pelo uso destas angulações de fixação articular, se deu

devido o fato destas levarem ao encurtamento/aproximação dos sarcômeros, originando uma robusta atrofia, em especial, dos músculos sóleo e gastrocnêmio conforme previamente preconizado por FRIMEL et al. (2005). Não obstante, a escolha pela utilização de talas metálicas, em detrimento de talas de gesso, comumente utilizadas em outros modelos experimentais, de imobilização de membros, para roedores, encontrados na literatura, se deu em decorrência deste tipo de tala se mostrar, consideravelmente, mais leve, impactando, assim, minimamente, sobre o peso corporal dos animais.

No intuito de se evitar lacerações e abrasões de pele, as pontas das talas metálicas foram revestidas com esparadrapo hipoalérgico (figura 6 b). O mesmo procedimento foi adotado em relação ao dorso dos animais, antes de se proceder com a fixação das talas, a este seguimento corporal (figura 6 d). Na figura 6d, também se observa que foram tomados cuidados quanto a evitar-se a obstrução da micção e defecção dos animais. Do mesmo modo, a fim de se evitar uma situação de “garrote”, e conseqüente oclusão venosa, as talas foram fixadas, a cada membro, utilizando-se tiras de esparadrapo, as quais foram afixadas em formato de “X” (figura 6 e).

Posteriormente, a fim de limitar o movimento de abdução do quadril, dos animais, um calço abductor, o qual consistia de um pequeno cilindro plástico, foi afixado ao aparato imobilizatório (figura 6 f). Por fim, no intuito de impedir que os animais roessem/mastigassem o aparato imobilizatório, bem como para se realizar a fixação total das talas, ao dorso dos animais, este seguimento corpóreo, foi envolvido, com uma camada de fita adesiva, do tipo silver tape (figuras 6 f, g, h).

Durante todo o período em que os animais foram submetidos ao procedimento imobilizatório, o qual perdurou por 14 dias, com vistas à observação de possíveis intercorrências, entre as quais se incluem: mastigação das talas, abrasões, oclusão venosa e problemas com locomoção, os animais foram monitorados diariamente. Deste modo, no

caso de observação de qualquer sinal de deterioração do aparato imobilizatório, o mesmo era reajustado e/ou reforçado.

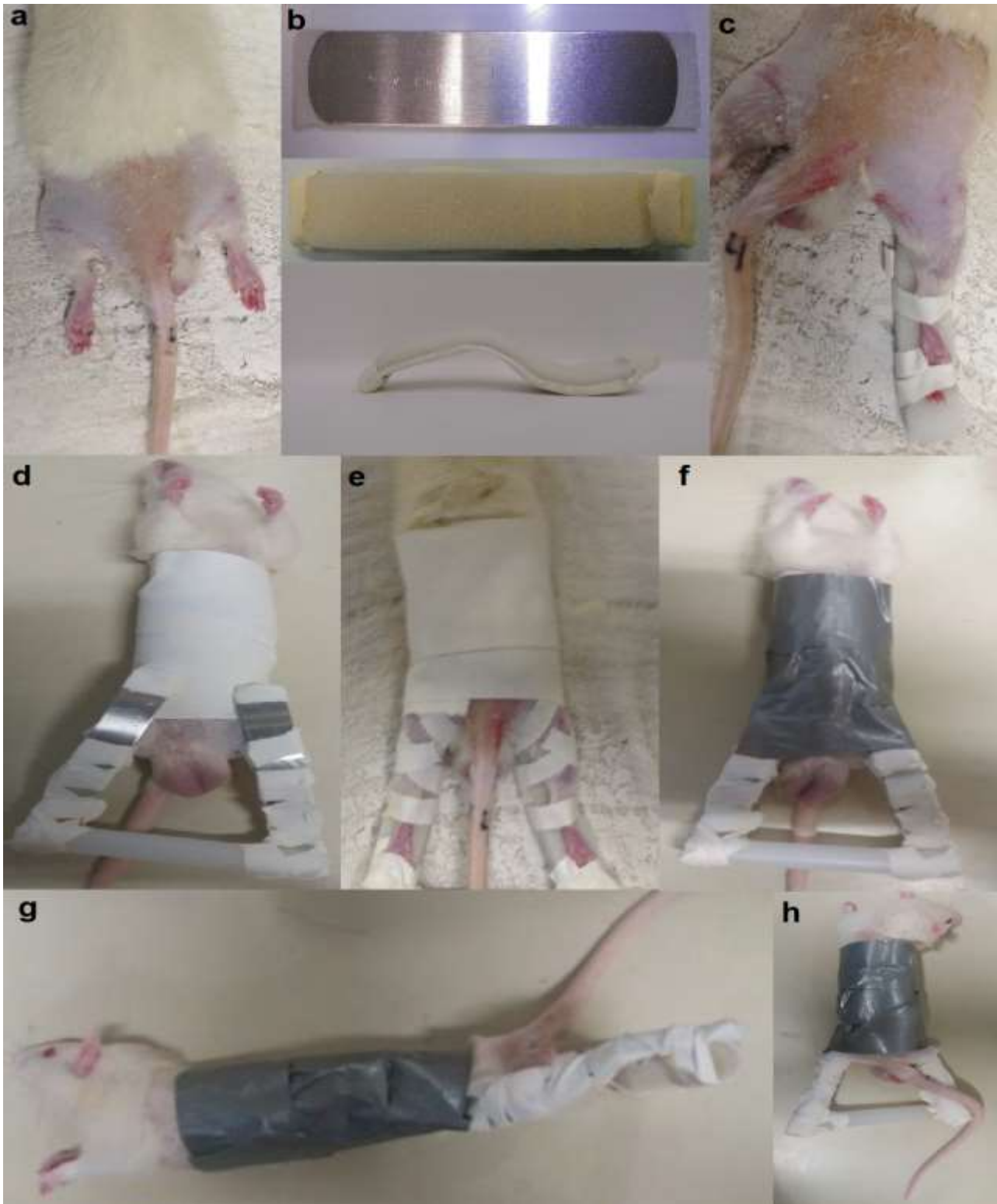


Figura 6 – Detalhamento do protocolo experimental de imobilização bilateral de membros, em ratos, empregado no presente estudo.

4.1.3. Dieta e Suplementação

Os animais dos grupos suplementados receberam o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina ($1,49 \text{ g/Kg}^{-1}$ de peso/dia) ou os aminoácidos L-glutamina (1 g/Kg^{-1} de peso/dia) e L-alanina ($0,61 \text{ g/Kg}^{-1}$ de peso/dia) na forma livre, por via oral, utilizando-se sonda gástrica (gavagem). As respectivas suplementações foram ofertadas, concomitantemente aos 14 dias do período de imobilização de membros. O dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, fabricado por Fresenius Kabi do Brasil Ltda., foi fornecido pela empresa Casa do Paciente Ltda., São Paulo, Brasil. Já os aminoácidos L-glutamina e L-alanina foram fabricados e cedidos pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. do Brasil. A quantidade do dipeptídeo administrada, foi calculada para que o total de glutamina fosse à mesma administrada na sua forma isolada, ou seja, $1 \text{ g de glutamina/kg}^{-1}$ de massa corporal/dia. Os grupos controle receberam o mesmo volume em água, por meio de gavagem. A escolha por este protocolo de suplementação baseou-se em prévios estudos (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015). Igualmente, durante todo o período experimental, os animais foram alimentados de forma *ad libitum* por meio da oferta de ração comercial, da marca Supra, contendo 20,5% de proteína (predominantemente de soja com suplementação de metionina), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% de cinzas e 10% de umidade, para ratos adultos, oferecida pelo Creal/UFRGS. A oferta de água, aos animais, também foi de maneira *ad libitum*.

4.1.4. Grupos Experimentais

A divisão dos animais em grupos foi feita de forma randomizada e aleatória. Para tanto, o peso corporal dos animais foi utilizado como parâmetro de divisão, sendo que não houve diferença entre os grupos. A divisão dos grupos, foi realizada no último dia da semana de aclimatação, do período experimental, ou seja, 1 dia antes da realização do processo de imobilização de membros. Desta forma, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- ✓ **CONTR** – ratos não imobilizados, que receberam equivalentes quantidades de água, via sonda gástrica gavagem, durante 14 dias (n =8).
- ✓ **GLN+ALA** - ratos não imobilizados, submetidos à gavagem com solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na sua forma livre (n =8).
- ✓ **DIP** - ratos não imobilizados, submetidos à gavagem com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (n = 8).
- ✓ **IMOB** – ratos imobilizados, que receberam equivalentes quantidades de água, via sonda gástrica gavagem, durante 14 dias (n =8).
- ✓ **GLN+ALA-IMOB** – ratos imobilizados, submetidos à gavagem com solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na sua forma livre (n =8).
- ✓ **DIP-IMOB** – ratos imobilizados, submetidos à gavagem com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (n = 8).

4.2. Métodos Laboratoriais

4.2.1. Coletas de sangue e tecidos

Todos os animais foram eutanasiados no 14^o dia de imobilização, 10 horas após a última sessão de gavagem, por meio de decaptação, em guilhotina, para roedores. Posterior à eutanásia, o sangue foi coletado em tubos heparinizados (500U/L) e centrifugado a 1000 x g, por 5 minutos. Após este procedimento, amostras de plasma e papa de hemácias contendo os eritrócitos foram coletadas e armazenadas em freezer - 80°C, para posterior determinação da concentração de glutamina, glutamato, íon amônio, substâncias reativas ao ácido tiobartúrico (TBARS), cortisol e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), bem como de glutathiona reduzida e dissulfeto de glutathiona, em eritrócitos. Igualmente, após a decaptação dos animais, os músculos sóleo e gastrocnêmio foram cirurgicamente dissecados e imediatamente submetidos a procedimento de “*freeze clamp*”, em nitrogênio líquido, visando à imediata estagnação da atividade metabólica destes

tecidos. Na sequência, os respectivos tecidos foram armazenados em freezer -80°C , para posterior determinação tecidual, da concentração de glutamina, glutamato, proteínas totais e carbonilas, glutatona reduzida e dissulfeto de glutatona, TBARS e $\text{TNF-}\alpha$. Além destes procedimentos iniciais, as amostras destinadas à eletroforese/Western Blot foram armazenadas em tubos de microcentrífuga, na presença de inibidores de proteases e fosfatases.

4.2.2. Parâmetros Plasmáticos e Séricos

4.2.2.1. Glutamina e Glutamato

A determinação de glutamina e glutamato plasmáticos foram realizadas por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), seguindo a metodologia descrita por Lund (1985). Para tanto, no dia da determinação dos conteúdos de glutamina e/ou glutamato os plasmas foram descongelados e misturados a ácido tricloroacético (TCA) a 5% numa proporção 1:1. Imediatamente após a homogeneização em TCA, os plasmas foram centrifugados a $16.000 \times g$, por 2 minutos, a 4°C . Na sequência, o sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo de microcentrífuga e realizado a neutralização dos mesmos utilizando-se $6\mu\text{l}$ de carbonato de sódio (Na_2CO_3), para cada $100\mu\text{l}$ de sobrenadante coletado. O volume de Na_2CO_3 utilizado, foi suficiente para trazer o pH das amostras, para cerca de 6,5. Para o ensaio foram utilizados $20\mu\text{l}$ dos sobrenadantes, em duplicata. A primeira reação do ensaio de glutamina/glutamato consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por meio da enzima glutaminase (GA), gerando quantidades estequiométricas de amônio (NH_4^+) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato é desidrogenado e convertido a α -cetoglutarato (2-oxoglutarato) por meio da ação da enzima glutamato desidrogenase (GDH), na presença de NAD^+ . As quantidades de L-glutamina e/ou glutamato das amostras são proporcionais à

quantidade de NADH formado, medido a 340 nm em leitoras de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

4.2.2.2. Íon amônio plasmático

A determinação plasmática do íon amônio foi realizada por meio do kit comercial para determinação de íon amônio (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA, cód. AA-0100), que segue a metodologia descrita por Neeley & Phillipson (1988). A amônia reage com o 2-oxoglutarato e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para formar glutamato e NADP, na reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase. A quantidade de NADPH oxidada é igual ao conteúdo de íon amônio da amostra, lida em espectrofotômetro, a 340 nm. A diminuição na quantidade de luminosidade óptica é proporcional à concentração plasmática de íon amônio presente na amostra.

4.2.2.3. Glutationa reduzida (GSH) e dissulfeto de glutatona (GSSG) eritrocitária

A determinação de GSH e GSSG em eritrócitos foi realizada utilizando-se a papa de hemácias, contendo os eritrócitos, obtida a partir da centrifugação dos plasmas dos animais, de acordo com metodologia descrita por Rahman, Kode & Biswas (2006). Para tanto, a papa de hemácias (1 ml) obtida a partir da separação do plasma sanguíneo foi homogeneizada em 4 volumes de ácido metafosfórico (MPA) (4ml), gelado (0 - 4°C), com o auxílio de um pistilo de teflon, de maneira suave. Cabe ressaltar, que se a análise não for realizada imediatamente, o pellet de eritrócitos, ou seja, a papa de hemácias, pode ser armazenado/congelado a -80°C, para análise a posteriori, por até 15 dias.

Posteriormente a homogeneização com MPA, as amostras foram centrifugadas (3.000 x g), por 10 minutos a 4°C, em microcentrífuga. Após esta centrifugação, com o auxílio de uma pipeta de vidro de 3ml, do tipo paster, foi coletado a camada clara e aquosa, superior, do sobrenadante, a qual foi colocada em um novo tubo, de microcentrífuga, do tipo

Eppendorf, previamente resfriado, o qual foi mantido em gelo (0 - 4°C), até a realização da análise para a determinação de GSH.

Para o ensaio de GSSG, após a centrifugação da mistura de papas de hemácias com MPA, 100µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga, do tipo Eppendorf, pré resfriado. A estes 100µl de sobrenadante, foram adicionados 2µl de 2-vinilpiridina. Tal procedimento visa permitir a reação de derivação da GSH, presente nas amostras e evitar a oxidação/transformação de GSH em GSSG, fato que ocorre muito rapidamente, e que pode levar a um resultado falso positivo, da concentração de GSSG. Na sequência, foram adicionados 6µl de trietanolamina, junto à parede dos tubos, com vistas a se permitir a completa neutralização, do processo de derivação da GSH.

As determinações das concentrações de GSH e GSSG foram realizadas, separadamente, em microplacas de ELISA. Para cada determinação foram pipetados 20µl de amostra. Na sequência, foram adicionados 120µl de solução contendo quantidades iguais de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico - DTNB), conjugado a enzima glutationa redutase (GR - 250 unidades/ml⁻¹, Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA cat. nº L-3664), diluídos em tampão KPE (Fosfato de Potássio 0,1M com 5 mM de EDTA sal dissódico, pH 7,5). Após estes procedimentos, para a determinação de GSH, a placa foi deixada em temperatura ambiente, por 30 segundos, para que ocorresse a conversão total da GSSG, presente nas amostras, em GSH. Transcorrido este tempo, foi adicionado 60µl de β-NADPH, igualmente dissolvido em tampão KPE.

Imediatamente após o término das reações acima descritas, as concentrações de GSH e GSSG foram analisadas a 412nm, em leitora de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA). Para tanto, foram realizadas 5 leituras cinéticas, de absorbância, aos 0, 30, 60, 90 e 120 segundos, as quais proporcionam o conhecimento da taxa média de formação do ácido 2-tio-5-nitrobenzóico

(TNB), que é proporcional a concentração de GSH e GSSG na amostra. Com base nesta média, foi realizado o cálculo da concentração de GSH e GSSG nas amostras, através de regressão linear, a partir da equação da reta, obtida pela plotagem das absorbâncias dos pontos de curvas padrão de GSH e GSSG, respectivamente.

As respectivas concentrações de GSH e GSSG foram expressas em $\mu\text{mol/ml}$ de sangue coletado.

4.2.2.4. Fator de necrose Tumoral- α (TNF- α)

Para a determinação da concentração plasmática do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) foi utilizado o kit comercial Elisa Ready-Set-Go eBiosciencie, seguindo as instruções do fabricante. Neste processo, foram realizadas duas leituras a 450nm e 570nm, em leitora de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA). Na sequência, realizou-se a subtração das absorbâncias obtidas a 570 nm, das obtidas a 450 nm. Os resultados desta subtração substanciaram o cálculo da concentração de TNF- α nas amostras, por regressão linear, utilizando-se a equação da reta. Os resultados foram expressos em picogramas por ml (pg/ml).

4.2.2.5. Análise plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de TBARS, no plasma, foi realizada adaptando-se a metodologia descrita por Dräper & Hadley (1991). Para tanto, 60 μl de plasma, com concentração proteica a cerca de 1mg/ml, foram misturados a 10 μl de hidroxitolueno butilado (BHT) 4,5mM/ml em etanol, 200 μl de ácido tricloroacético a 30%, 200 μl de Tris-HCl 10mM, pH 7,4 e 330 μl de ácido tiobarbitúrico a 0,73%. Posteriormente, as amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C, por 1 hora e centrifugadas, ainda quentes, por 2 minutos a 15.000 x g, a 4°C, sendo coletado o sobrenadante. Na sequência, 200 μl do sobrenadante coletado, foram pipetados em uma microplaca de ELISA, a qual foi lida em leitora de microplaca

(Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA), a 535 nm, em triplicata. A concentração plasmática de TBARS foi expressa em nmol de equivalentes de MDA/ml⁻¹/cm⁻¹ por mg de proteína.

4.2.2.6. Cortisol plasmático

A determinação de cortisol plasmático foi realizada por meio do kit comercial para determinação de cortisol (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA, cód. SE - 120082). Este kit é projetado para a mensuração quantitativa de cortisol, através do método de fase sólida, em microplaca de ELISA. Neste processo, amostras e a enzima cortisol conjugada, fornecida pelo kit, foram adicionadas a uma microplaca, igualmente fornecida pelo kit, com poços revestidos com o anticorpo, monoclonal, anticortisol. Deste modo, o conteúdo de cortisol presente nas amostras, compete com a enzima cortisol conjugada, pelos sítios de ligação presentes, nos poços. Na sequência, o cortisol e a enzima cortisol conjugada, não ligados aos sítios de ligação, são removidos por lavagem. Ao final, sob adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB), a intensidade de cor produzida é inversamente proporcional à concentração de cortisol presente nas amostras. Neste contexto, uma curva padrão é preparada relacionando-se a intensidade de cor produzida pelas reações, à concentração de cortisol, presente no ensaio, a partir da leitura da placa a 450nm, em leitora de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em nanogramas por ml (ng/ml).

4.2.3. Parâmetros teciduais

4.2.3.1. Glutamina e glutamato

A determinação de glutamina e glutamato no tecido muscular esquelético (músculos sóleo e gastrocnêmio) foi realizada utilizando-se o kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), que recomenda a metodologia descrita por Lund (1985). Após a obtenção cirúrgica, os tecidos foram pesados e, em seguida, congelados com auxílio de um “*freeze-clamp*” e mantidos em freezer -80°C. Cabe salientar que amostras podem ser mantidas por cerca de dois meses nesta temperatura (LUND, 1985). No dia dos experimentos, o processamento e ensaios foram realizados a temperatura de 4°C, onde os tecidos, ainda congelados, foram homogeneizados em TCA 5% à razão de 6ml por grama de tecido. Para tal um homogeneizador de facas (Ultra Turrax) foi utilizado. Imediatamente após a homogeneização em TCA foi feita a neutralização dos homogenatos, utilizando-se 6µl de Na₂CO₃ para cada 100µl de sobrenadante coletado, pós centrifugação a 16.000 x g, por 2 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga, previamente resfriado. O volume de Na₂CO₃ utilizado é suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5. Para os ensaios foram utilizados 20µl do sobrenadante em triplicata.

A primeira reação consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por meio da enzima glutaminase (GA), 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 nas amostras é proporcional à quantidade de NADH formado, medido a 340 nm em leitora de microplacas de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

Os valores médios, de concentração, tanto de glutamina, quanto de glutamato, foram expressos em micromols (μmols) de glutamina e/ou glutamato por grama de tecido fresco e em nanomols (nmols) por miligrama (mg) de proteína.

4.2.3.2. Glutathiona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG) muscular

A determinação de GSH e GSSG nos músculos sóleo e gastrocnêmio foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rahman, Kode & Biswas (2006). Para tanto, os tecidos obtidos cirurgicamente e imediatamente pesados e congelados utilizando um *freeze-clamp*, em nitrogênio líquido, foram homogeneizados em solução ácida (ácido sulfossalicílico a 0,6% + Triton-X100 a 0,01% em tampão KPE - fosfato de potássio 0,1M com 5 mM de EDTA sal dissódico, pH 7,5), numa proporção de 5 - 10ml/g de tecido. O ácido sulfossalicílico inibe a atividade da enzima γ -glutamil transferase (γ -GT) e assim evita a perda/oxidação de GSH. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a $8.000 \times g$, por 10 minutos, a 4°C . Com o auxílio de uma pipeta de vidro de 3ml, do tipo paster, a camada clara e aquosa, superior, do sobrenadante, foi coletada, sendo imediatamente transferida para um novo tubo, de microcentrífuga, do tipo Eppendorf, mantido em gelo ($0 - 4^{\circ}\text{C}$), até a realização da determinação de GSH.

Para o ensaio de GSSG, 100 μl do sobrenadante coletado após a centrifugação dos homogenatos teciduais foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga, do tipo Eppendorf, pré resfriado. A estes 100 μl de sobrenadante, foram adicionados 2 μl de 2-vinilpiridina. Tal procedimento visa permitir a reação de derivação da GSH, presente nas amostras e evitar a oxidação/transformação de GSH em GSSG, fato que ocorre muito rapidamente e, que pode levar a um resultado falso positivo, da concentração de GSSG. Na sequência, foram adicionados 6 μl de trietanolamina, junto à parede dos tubos, com vistas a se permitir a completa neutralização, do processo de derivação da GSH.

As determinações das concentrações de GSH e GSSG foram realizadas em microplaca de ELISA, sendo pipetados 20µl de amostra. Posteriormente, as amostras, foram adicionados 120µl de uma solução contendo quantidades iguais (1:1), de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico - DTNB), e pela enzima glutationa redutase (GR - 250 unidades ml⁻¹ - Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA, cat. nº L-3664), diluídos em tampão KPE (fosfato de potássio 0,1M com 5 mM de EDTA sal dissódico, pH 7,5). Após estes procedimentos, para a determinação de GSH a placa foi deixada em temperatura ambiente, por 30 segundos, para que ocorresse a conversão total da GSSG, presente nas amostras, em GSH. Transcorrido este tempo, foi adicionado, as amostras, 60µl de β-NADPH, igualmente dissolvido em tampão KPE.

Imediatamente após o término das reações acima descritas, as concentrações de GSH e GSSG foram medidas a 412nm, em leitora de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA). Para tanto, foram realizadas 5 leituras cinéticas, de absorbância, aos 0, 30, 60, 90 e 120 segundos, as quais proporcionam o conhecimento da taxa média de formação do ácido 2-tio-5-nitrobenzóico (TNB), que é proporcional a concentração de GSH e GSSG nas amostras, respectivamente. Com base nesta média, foi realizado o cálculo da concentração de GSH e GSSG, através de regressão linear, a partir da equação da reta, obtida pela plotagem das absorbâncias dos pontos de curvas padrão de GSH e GSSG, respectivamente.

As respectivas concentrações de GSH e GSSG, foram expressas em µmol/g de tecido fresco e nmol/mg de proteína.

4.2.3.3. Proteínas carbonilas

A determinação da concentração tecidual de proteínas carbonilas foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito por Reznick & Packer (1994). O princípio deste método consiste na reação dos grupos carbonilas, presentes em resíduos de aminoácidos,

de proteínas, modificadas oxidativamente, com o reagente dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando uma dinitrofenilhidrazona, correspondente, cujo conteúdo é medido a 370nm, em leitora de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA).

A concentração de proteínas carbonilas nos músculos sóleo e gastrocnêmio, respectivamente, foi expressa em nmol/mg de proteína.

4.2.3.4. Análise da concentração muscular de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Neste estudo, os níveis de TBARS foram analisados com um índice de lipoperoxidação nos músculos sóleo e gastrocnêmio. Para tanto foi empregado a mesma técnica utilizada para a análise da concentração plasmática de TBARS descrita, previamente, por Dräper & Hadley (1991). A concentração de TBARS em ambos os músculos analisados foi determinada em microplacas de 96 poços de poliestireno (SpectraMax, Leitor de Microplacas Molecular Devices 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, EUA) a 535nm, em triplicata. A concentração muscular de TBARS foi expressa em nmol de equivalentes de MDA/ml⁻¹/cm⁻¹ por g de tecido fresco.

4.2.3.5. Análise da concentração muscular de TNF- α

No presente estudo, lisados de proteínas musculares obtidos da homogeneização de amostras dos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos imobilizados e não imobilizados, submetidos ou não a suplementação com a solução GLN+ALA e DIP, foram analisados para a determinação da concentração muscular de TNF- α . Para tanto, foi utilizando o kit Elisa Ready-Set-Go (88-7340 eBioscience, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Neste processo, foram realizadas duas leituras a 450nm e 570nm, em leitora de microplaca de ELISA (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS,

Califórnia, EUA). Na sequência, realizou-se a subtração das absorvâncias obtidas a 570 nm, das obtidas a 450 nm. Os resultados desta subtração substanciaram o cálculo da concentração de TNF- α nas amostras, por regressão linear, utilizando-se a equação da reta. Cada amostra foi analisada em duplicata, sem a concentração de TNF- α muscular, expressa em picogramas por miligrama de proteína (pg/mg de proteína).

4.2.3.6. Determinação da expressão proteica de HSP70, NF- κ B, IKK α / β , p38 MAPK e FOXO3a, por Western blot

O imunocnteúdo das proteínas HSP70, NF- κ B, IKK α / β , p38 MAPK e FOXO3a foi determinado em amostras de músculo esquelético, empregando-se a análise de Western Blot. Resumidamente, amostras de tecido de músculo sóleo e gastrocnêmio congeladas, foram mecanicamente homogeneizadas 1:10 (p/vol) em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) gelado (NaCl 150 mM, desoxicolato de sódio a 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 1% NP-40), na presença de cocktail inibidor de fosfatase 1:100 (Sigma-Aldrich) e cocktail inibidor de protease 1:100 (Sigma-Aldrich). O homogenato resultante foi então centrifugado a 14000 x g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi descartado. Na sequência foi realizado a determinação da concentração proteica de cada amostra, de forma espectrofotométrica, a 595 nm, em um leitor de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV / VIS, Sunnyvale, CA, EUA) pelo emprego do método previamente preconizado por Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) para confecção de uma curva padrão. Realizados estes procedimentos prévios, os lisados foram então combinados 1:1 com 1x tampão de amostra Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,05% de azul de bromofenol, 10% de glicerol e 5% de β -mercaptoetanol) e fervidos a 100°C, por 10 minutos, com vistas a proceder-se com a desnaturação das proteínas musculares. Em seguida, os extratos de proteínas (60 μ g em amostras oriundas do músculo sóleo e 150 μ g

em amostras oriundas do músculo gastrocnêmio) foram carregados em géis pré-moldados verticais de 4-12% e submetidos a eletroforese em dodecilsulfato-poliacrilamida de sódio (SDS/PAGE), em temperatura ambiente por 30 minutos a 80V, seguido por 2h a 100V (BioRad, Mini-PROTEAN®, Tetra Cell), na presença de mercador de peso molecular (arco-íris ECL, RNE-800E Amersham-GE Healthcare Life Sciences). Em sequência, os géis foram removidos do aparelho de eletroforese e as proteínas transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (tamanho dos poros: 0,45 µm; GE Healthcare Life Sciences) usando um tampão de transferência contendo Tris 48mM, 38mM de glicina, 0,02% de SDS e 20% de metanol (pH 8,3) a 100V, por 2h. A solução de vermelho *Ponceau* (0,1% em ácido acético a 0,5%) foi utilizada para verificar a integridade da transferência. As membranas foram então, lavadas com tampão Tris salina contendo 20% de Tween 20 (TTBS) para remover a coloração da solução vermelha *Ponceau*. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com BSA a 5% (p/v) dissolvida em tampão de bloqueio TTBS, à temperatura ambiente, por 1h. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas por 10 minutos, três vezes com TTBS e incubadas *overnight* a 4°C, com os seguintes anticorpos primários: HSP70 (1:1000, #4872 Cell Signaling Technology), NF-KB subunidade p65, fração total (1:1000, #6956 Cell Signaling Technology), NF-KB subunidade p65, fração fosforilada na serina 536 (Ser 536, 1:1000, #3033 Cell Signaling Technology), IKKα/β fração total (clone B-8, 1:1000, SC-7606 Santa Cruz Biotechnology), IKKα/β fração fosforilada nas serinas 176 e 177 (Phospho Chuk/IKBKB, Ser 176/177, 1:1000, CSB-PA 006829 Cusabio Technology), p38 MAPKα/β fração total (clone A-12, 1:1000, SC-7972 Santa Cruz Biotechnology), p38 MAPK fração fosforilada nas treoninas 180 e 182 (Thr 180/182, 1:1000, #9211 Cell Signaling Technology) e FOXO3a fração fosforilada na treonina 32 e serina 253 (p-FKHRL1, Thr32/Ser253, 1:1000, SC-112357 Santa Cruz Biotechnology). Após a sondagem *overnight* com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas por 10 minutos, quatro vezes, com TTBS e incubadas, por 2h em temperatura ambiente, com apropriados anticorpos

secundários, sendo eles: IgG anti-coelho de rato conjugado com peroxidase (1: 10.000, SC-2357 Santa Cruz Biotechnology) e IgGk anti-camundongo (1: 10.000, SC-516102 Santa Cruz Biotechnology), diluídos em TTBS e 1% de BSA. Após quatro lavagens adicionais, por 10 minutos, com TTBS, os blots foram visualizados durante 5 minutos em um sistema de imagem *Image Quant 400* (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido), utilizando-se uma solução preparada com reagente de quimio-luminescência ECL-Western blotting, seguindo as instruções do fabricante (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA). O correto carregamento das proteínas de interesse, foi realizado utilizando-se um *housekeeping* via incubação das membranas com anticorpo monoclonal anti- β -actina de camundongo (clone AC-15, 1: 5000, A-1978 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.2.3.7. Determinação da atividade muscular de Caspase-3

No presente estudo, o nível de atividade de caspase-3 foi analisado com um marcador de apoptose celular induzida pela atrofia muscular, no músculo sóleo e gastrocnêmio. Dessa forma, seguindo o protocolo previamente descrito por Kaushal et al. (2014), 10 a 20mg de amostras de tecido de sóleo e gastrocnêmio congeladas foram mecanicamente homogeneizadas 1:10 (p/vol) em tampão de lise gelado (HEPES 50 mM, pH 7,5, 0,1% 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propano sulfato (CHAPS), 0,1% Igepal NP-40, 2 mM DTT e 1 mM EDTA), na presença de cockteis de inibidores de protease e fosfatase (1:100, Sigma-Aldrich). Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 min., a 4°C, e os sobrenadantes foram removidos e os *pellets* descartados. O método de ensaio para detecção da concentração proteica de Bradford (1976), foi utilizado para a determinação da concentração de proteína nos sobrenadantes, utilizando-se BSA, para confecção da curva padrão. Posteriormente, quantidades proteicas iguais (50 μ g) dos sobrenadantes, foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços, de cor preta, juntamente com 100 μ l de tampão de ensaio para caspases (HEPES 100mM, pH 7,2,

CHAPS 0,1%, sacarose 10%, DTT 2mM e 1mM de Na-EDTA) e 50 μ M do substrato sintético peptídeo DEVD-AMC, específico para caspase-3 (Cayman, N-7505). A seguir, a placa contendo esta mistura foi incubada no escuro, por 1h a 37°C. Transcorrido este tempo, a quantidade média de fluorescência liberada pelo grupo AMC fluorescente foi medida cineticamente em um leitor de microplacas (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV / VIS, Califórnia, EUA) em 5 leituras realizadas aos 0, 30, 60, 90 e 120 segundos, usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 380 e 460nm, respectivamente. Com base na curva padrão feita a partir da leitura de fluorescência com os padrões AMC livres (50 μ M a 100nM/ml⁻¹), os valores médios dos níveis de atividade de caspase-3, nos músculos sóleo e gastrocnêmio, foram expressos em nmol de AMC liberado/mg de proteína.

4.2.3.8. Determinação do conteúdo proteico miofibrilar e da área de secção transversa muscular

As extrações de proteínas para a determinação do conteúdo proteico miofibrilar foi realizada como previamente descrito por Chamney et al. (2013), sendo a concentração final de proteína determinada por meio do método de Bradford (1976), usando BSA para confecção de uma curva padrão.

Já para a determinação da área de secção transversa muscular (ASTM) foi realizada seguindo-se o método descrito por Macedo et al. (2016). Para tanto, amostras musculares de sóleo e gastrocnêmio, obtidos imediatamente após a eutanásia, foram colocadas em tubos do tipo Falcon de 15ml e embebidas em solução de paraformaldeído a 4%, por 24 horas, a 4°C. Para obtenção da desidratação total das amostras, as mesmas foram incubadas, por 24h, a 4°C, em solução de sacarose a 30%. Posteriormente, as respectivas amostras foram fixadas em parafina para a produção de blocos, os quais foram cortados em secções de 5 μ m de espessura, perpendicularmente ao eixo principal das fibras, utilizando-se um micrótom (Lupetec, MRP2015). As secções musculares foram, então,

coletadas e fixadas em lâminas de vidro e submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (H&E). A seguir, as secções foram fotografadas utilizando-se um microscópio óptico equipado com uma câmera (Nikon DXM 1200) com ampliação de 20x. Neste procedimento, foram capturadas dez fotomicrografias, de forma aleatória, de cada lâmina. As imagens digitalizadas foram então, analisadas manual e aleatoriamente, utilizando-se o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA), de maneira cega, por um único analisador. Por fim, a ASTM média foi determinada mensurando-se a circunferência de 50 fibras adjacentes do centro de cada seção transversal, totalizando 250 fibras por tecido/lâmina, sendo estes valores expressos em micrômetros quadrados (μm^2).

4.3. Análise Estatística

Os dados coletados na presente pesquisa foram expressos em média e erro padrão da média (\pm EPM). A normalidade do conjunto de dados foi verificada por meio da utilização do teste de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para cada variável dependente, foram realizadas comparações entre os grupos, por meio da análise de variância de ANOVA de uma via (*ANOVA One Way*). Quando este teste detectou valor F significativo, o teste de diferença de homoscedasticidade de Tukey (HSD) foi realizado como post hoc. Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Todos os procedimentos para análise estatística, empregados no presente estudo, foram realizados utilizando-se o software SPSS v.21.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA).

CAPÍTULO II

5. RESULTADOS

5.1. Artigo 1 intitulado: Oral glutamine supplementation attenuate inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: role of 70 kDa heat shock protein, publicado no periódico Free Radical Biology and Medicine, edição nº 145, páginas 87-102, dezembro de 2019.

DOI: <https://doi.org/10.106/j.freeradbiomed.2019.08.033>

Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31505269

Oral glutamine supplementation attenuate inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein content degradation in immobilized rats: role of 70 kDa heat shock protein

AUTHORS

Éder Ricardo Petry^{1,2*}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99509-6903. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: eder.petry@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0003-3786-3187

Diego de Freitas Dresch², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99202-6303. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: diego.fisio@gmail.com

Clarice Carvalho², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99326-8988. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: claricecarvalho.martins@gmail.com

Patricia Calçada Medeiros², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 98533-0700. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: pacame.patricia@hotmail.com

Tatiana Gomes Rosa², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99194-0248. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: tatianagr3@hotmail.com

Cleverson Morais de Oliveira^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99662-0715, email address: cleveson.oliveira@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0003-0861-6136

Leo Anderson Meira Martins^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99662-0715, email address: leo.meira@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0003-0878-0489

Elizângela Schemitt^{3,4}, postal address: 2350, Ramiro Barcelos Street, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-903. Phone number: +55 51 99896-7872, email address: elizschemitt@yahoo.com.br, Orcid ID: 0000-0003-3015-0192

Silvia Bona^{3,4}, postal address: 2350, Ramiro Barcelos Street, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-903. Phone number: +55 51 99649-0806, email address: silvia.rbona@gmail.com.

Fátima Costa Rodrigues Guma^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99984-5841, email address: fatima.guma@ufrgs.br

Norma Possas Marroni^{3,4}, postal address: 2350, Ramiro Barcelos Street, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-903. Phone number: +55 51 99964-3011, email address: nmarroni@terra.com.br, Orcid ID: 0000-0001-7856-7953

Clóvis Milton Duval Wannmacher^{1,2*}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 3308-5575, email address: clovisdw@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0002-7826-8416

*Correspondent authors

AFFILIATIONS

¹ Post-Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Skeletal muscle disuse results in myofibrillar atrophy and protein degradation, via inflammatory and oxidative stress-mediated NF- κ B signaling pathway activation. Nutritional interventions, such as L-glutamine (GLN) supplementation have shown antioxidant properties and cytoprotective effects through the modulation on the 70-kDa heat shock protein (HSP70) expression. However, these GLN-mediated effects on cell signaling pathways and biochemical mechanisms that control the myofibrillar protein content degradation in muscle disuse situations are poorly known yet. This study investigated the effects of oral GLN plus L-alanine (ALA; GLN+ALA-solution) supplementation, either in their free or dipeptide (L-alanyl-L-glutamine-DIP) form, on GLN-glutathione (GSH) axis and cytoprotection mediated by HSP70 protein expression in the slow-twitch soleus and fast-twitch gastrocnemius skeletal muscle of rats submitted to 14-days of hindlimb immobilization-induced disuse muscle atrophy. Forty-eight Wistar rats were distributed into 6 groups: hindlimb immobilized (IMOB group) and hindlimb immobilized orally supplemented with either GLN (1 g.kg⁻¹) plus ALA (0.61 g.kg⁻¹) (GLN+ALA-IMOB group) or 1.49 g.kg⁻¹ of DIP (DIP-IMOB group) and; no-immobilized (CTRL) and no-immobilized supplemented GLN+ALA and DIP baselines groups. All animals, including CTRL and IMOB rats (water), were supplemented via intragastric gavage for 14 days, concomitantly to immobilization period. Plasma and muscle GLN levels, lipid (thiobarbituric acid reactive substances-TBARS) and protein (carbonyl) peroxidation, erythrocyte concentration of reduced GSH and GSH disulfide (GSSG), plasma and muscle pro-inflammatory TNF- α levels, muscle IKK α / β -NF- κ B signaling pathway and, the myofibrillar protein content (MPC) were measured. The MPC was significantly lower in IMOB rats, compared to CTRL, GLN+ALA, and DIP animals ($p < 0.05$). This finding was associated with reduced plasma and muscle GLN concentration, equally in IMOB animals. Conversely, both GLN+ALA and DIP supplementation restored plasma and muscle GLN levels, which equilibrated GSH and intracellular redox status (GSSG/GSH ratio) in erythrocytes and skeletal muscle even as, increased muscle HSP70 protein expression; attenuating oxidative stress and TNF- α -mediated NF- κ B pathway activation, fact that reverberated on reduction of MPC degradation in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals ($p < 0.05$). In conclusion, the findings shown herein support the oral GLN+ALA and DIP supplementations as a therapeutic and effective nutritional alternative to attenuate the deleterious effects of the skeletal muscle protein degradation induced by muscle disuse.

Key Words: Glutamine supplementation, muscle atrophy, muscle protein content degradation, HSP70, GSH, hindlimb immobilization.

ABBREVIATIONS

GLN – amino acid L-glutamine

ALA – amino acid L-alanine

GLU - amino acid L-glutamate

GLN+ALA – solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine, both in their free forms

DIP- dipeptide L-alanyl-L-glutamine

NF- κ B – nuclear factor kappa B

TNF- α – pro-inflammatory cytokine
necrosis tumoral factor- α

TBARS - tiobarbituric acid reactive substances

IKK/I κ B kinase protein - main inhibitory enzymatic complex of the factor Kappa B

IKK- α and IKK- β - catalytic subunits of IKK/I κ B kinase protein

HSP70 – 70 kDa heat shock protein

HSF-1 - heat shock transcriptional factor-1

HSE - heat shock transcriptional factors elements

MPC – myofibrillar protein content

GSH – reduced form of tripeptide γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine-glutathione

GSSG – glutathione disulfide

-SH - thiol group

Pept-1 - glycopeptide transport protein-1

GLS - glutaminase enzyme

GLUD1 - glutamate dehydrogenase enzyme

X-ag – amino acid L-glutamate transporter

ATP – adenosine triphosphate

GCLC - glutamate cysteine ligase enzyme, catalytic subunit

GSR - glutathione reductase enzyme

NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen

EMG – electromyographic activity

1. INTRODUCTION

Skeletal muscle protein content degradation is a catabolic response that commonly accompanies systemic illnesses including sepsis, aids, cancer, diabetes, or disuse situations such as limb immobilization periods, prolonged bed rest, denervation and surgical trauma [1]. Although multiple cell signaling pathways can be activated through distinct upstream mechanisms, a substantial amount of research has shown that the nuclear factor Kappa B (NF- κ B) signaling pathway activation is required and contributes decisively to the muscle protein content loss observed in the above-mentioned situations [2-4]. In those disorders, stimuli like oxidative stress, increased synthesis and pro-inflammatory cytokines release, particularly necrosis tumoral factor- α (TNF- α) induced the phosphorylation and subsequent degradation of the main inhibitory enzymatic complex of the factor Kappa B, the I κ B kinase (IKK) protein, which among others, consists of two catalytic subunits (IKK- α and IKK- β) [5]. When free of the inhibitory I κ B protein, the active NF- κ B can be translocated to the cell nuclei, and coordinates the transcriptional of several genes related to the regulation of pro-inflammatory and pro-apoptotic responses, as well as the overactivation of the main protein degradation complex of the body, the 20S/26S ubiquitin-proteasome system [1-3, 6-8].

Glutamine (GLN) is the body's most abundant amino acid [9]. This amino acid plays a critical role in muscle protein turnover, as well as in the modulation of cell signaling pathways, especially those related to the expression of genes involved in the regulation of inflammatory and immunological responses [10]. Several studies, however, have shown that stressful catabolic situations including sepsis, traumas, spinal cord injury, burns and intense, prolonged or exhaustive physical exercises [11-15], both in humans and animals, leads to an imbalance among the body GLN requirement and, its de novo synthesis ability, resulting in the reduction by more than 50% [16] in plasma and, especially skeletal muscle (primary tissue of synthesis, stock and endogenous release of GLN to the body) GLN concentrations [9, 17]. Because its critical role in diverse cell functions, including inter-organ nitrogen transport, intermediate amino acid metabolism and cell proliferation (especially cells of the immune system), among others [9], low plasma and skeletal muscle GLN concentrations have been directly related to trigger the disaggregating actions to cellular homeostasis [18, 19]. That way, under stressful disorders, GLN has been termed as a conditionally essential amino acid [16].

Previous studies suggest that when the body GLN requirement exceeds its de novo synthesis, GLN supplementation provides an exogenous source of this amino acid, improving GLN "status" [20, 21], attenuating inflammation [22] and, protecting a wide range

of cell and tissues against injuries and insults [14, 15, 23]. The mechanism involved in these protective effects of GLN supplementation includes antioxidant properties of this amino acid, by means of the primary and highest concentration non-enzymatic soluble intracellular antioxidant of the body, the tripeptide γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, glutathione (GSH) [11] once, GLN is an essential component and modulator of the synthesis of this antioxidant [18]. Nonetheless, in the last years, through the use of molecular biology techniques, it was evident that GLN also exerts a decisive modulatory action on heat shock proteins (HSP) expression [24]. HSPs, especially the 70-kDa family (73-kDa-HSP73 constitutively isoform and the 72-kDa-HSP72 inducible isoform) are known as "stress response proteins" whose expression is highly induced by different types of agents and catabolic stimuli, such as oxidative, thermal and metabolic stresses as well as, infection, inflammation and intense exercise [14, 15, 22]. Acting as molecular chaperones, the HSPs contribute to the cellular homeostasis maintenance, providing cytoprotection and or "stress tolerance" to cells and tissues, against continued injury, a fact that could cause cell death by apoptosis or impair the recovery process [24]. The exact mechanism underlying this GLN-modulation on HSP expression is not entirely known yet. However, previous studies showed that in part, this modulation is associated to GLN-induced O-glycosylation and phosphorylation of main heat shock transcriptional factor, HSF-1, fact that induces the nuclear translocation of this transcriptional factor and its binding, into the cell nucleus, to heat shock transcriptional factors elements (HSEs), resulting on trigger the HSP-ribosomal transcriptional machinery expression [25].

Although GLN supplementation has shown these outcomes, because its extensive intestinal metabolism, both in humans and animals, the GLN supplementation efficacy, mainly when administrated orally or enterally pathway, in its free form, is still a target of controversy and questionings [20, 21]. On the other hand, previous studies have shown that the supplementation with dipeptides containing GLN, such as L-alanyl-L-glutamine (DIP) has shown a more effective and stable non-invasive nutritional alternative to increase the availability of GLN to the body, both in metabolic stress and in rest situations [14, 15, 21]. The higher efficiency of supplementation rendered by DIP is a result of its most hydrolytically stable molecular structure and mitigated use by enterocytes through glycopeptide transport protein-1 (Pept-1) [26]. In previous studies with animal models subjected to intense and prolonged aerobic exercise, it was also observed that oral GLN supplementation either in DIP form or as a solution containing L-glutamine along with L-alanine (GLN+ALA solution), both in their free forms, in a dipeptide-like dosage (1g/kg of body weight) was efficient in re-establishing the GLN availability. This fact improved the intracellular redox status, via GLN-

GSH axis, as well as induced an increase in cytoplasmatic and nuclear protein content of HSP73 and HSP72 isoforms of HSP70 and HSF-1 transcriptional factor, in skeletal muscle and liver of these animals [14, 15]. Despite these benefits of GLN supplementation, its effects on skeletal muscle integrity, function, and metabolism even as, on cell signaling pathways that control muscle protein degradation, in situations of disuse such as limb immobilization are little known yet. Hence, in the present study it was hypothesized that oral GLN supplementation, either in the DIP form or GLN+ALA solution form would protect and/or prevent the skeletal muscle protein content degradation attenuating the hindlimb immobilization-induced release of pro-inflammatory TNF- α cytokine and the proteolytic NF- κ B signaling pathway activation, by means of a modulation on antioxidant GLN-GSH axis system and cytoprotective HSP70 expression. To test this hypothesis, male Wistar rats were supplemented with DIP and GLN+ALA solution and, concomitantly, subjected to 14-days of immobilization using a new experimental hindlimb immobilization model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental design

All procedures and experiments were conducted with the approval of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA - protocol n^o 29389), and were performed according to the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation. Forty-eight male adult Wistar rats (55-60 d-old, 199 ± 37 g body wt) obtained from the Central Animal House (Creal) of UFRGS, were housed in individual cages and maintained under a 12:12h light-dark cycle, room temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of 60%. Food (standard laboratory rat chow - SUPRA) and water were provided ad libitum throughout the experimental period. The animal's body weight and food intake were monitored daily during the whole experimental period. After 1 week of acclimation to the cage (one rat per cage), the animals were weighed and randomly distributed into six experimental groups (n = 8/group). Group 1) IMOB group - immobilized rats which received equivalent amounts of water, by 14 days, via gastric gavage. Group 2) GLN+ALA-IMOB group - immobilized rats, which were subjected to 14 days of oral supplementation, via gastric gavage, with a solution containing L-glutamine (1 g/Kg^{-1} of body weight per day) and L-alanine (0.61 g/Kg^{-1} of body weight per day) both in their free forms. Group 3) DIP-IMOB group – immobilized rats, which were submitted to 14 days of oral supplementation, via gastric gavage, with the dipeptide L-alanyl-L-glutamine (1.49 g/Kg^{-1} of

body weight per day). Baseline parameters were obtained from control animals. Group 4) CTRL group – non-immobilized rats, which received equivalent amounts of water, by 14 days, via gastric gavage. Group 5) GLN+ALA group – non-immobilized rats, which were submitted to 14 days of oral supplementation, via gastric gavage, with a solution containing L-glutamine (1 g/Kg^{-1} of body weight per day) and L-alanine (0.61 g/Kg^{-1} of body weight per day) both in their free forms. Group 6) DIP group - non-immobilized rats, which were submitted to 14 days of oral supplementation, via gastric gavage, with the dipeptide L-alanyl-L-glutamine (1.49 g/Kg^{-1} of body weight per day). The amount of DIP was calculated so that the total amount of GLN administered to the animals was the same in its isolated form, i.e., 1 g of GLN/kg body weight/day. The choice for this supplement protocol was based in our previous studies [14, 15] when this same dosage was used, finding effects on plasma and tissue GLN concentration. In this sense and consequently, GLN+ALA, GLN+ALA-IMOB, DIP, and DIP-IMOB groups received isocaloric and isonitrogenous treatments, respectively. Daily supplementations, including CTRL and IMOB groups, were administered through gastric gavage for a total period of 14 days concomitantly to immobilization period, which also lasted 14 days. The supplements were carefully provided to the animals using gastric gavage cleaned and sterilized at every supplementation time. The first gavage started 6h after the immobilization induction, followed by once a day in the afternoon, till the 14th day of the immobilization period. This time-schedule was followed in order to eliminate results that reflected an acute single dose effect [20]. For more details about the experimental design, please check figure 1.

Free GLN and ALA were supplied by Ajinomoto Interamerican Industry and Commerce Ltd. (São Paulo, Brazil), whereas L-alanyl-L-glutamine DIP [Dipeptiven®; Fresenius Kabi S.A manufactured the solution, consisting of 20mg of L-alanyl-L-glutamine (which equals 8.2g of L-alanine and 13.46g of L-glutamine) dissolved in 100mL of H₂O. The euthanasia (sacrifice) of the animals was performed 10 hours after the last gavage session, employing decapitation in a guillotine, as previously described by Petry et al. [14]. The choice for this period was based on the study of Silver et al. [27], which described this to be the maximum time of HSP70 mRNA expression stability, the main molecular target of the present study.

2.2. Immobilization protocol

In the current study, it is presented a new bilateral hindlimb immobilization experimental model, to study the skeletal muscle response to immobilization-induced atrophy in rats. This model provides an advantage over other rodent-based models that

include economy, less impact about body weight when compared to traditional plaster-cast models and ease for in vivo study of molecular pathways involved in disuse atrophy. Briefly, the rats were anesthetized by the use of 1.4ml/kg^{-1} body weight of the anesthetic cocktail solution, composed of xylazine (2.2 mg/ml) and ketamine (54 mg/ml), as previously described by Booth et al. [28] . After, using aluminum stems, which were shaped in angulations of $\sim 160^\circ$, $\sim 180^\circ$ and $\sim 120^\circ$, respectively, hip, knee and ankle joints, of both hindlimb, were fix in full extension and plantar flexed positions, fact that takes to shortening and/or approximation of the sarcomeres, resulting in the induction of maximal atrophy of the soleus and gastrocnemius muscle. In order to avoid venous occlusion, the splints were fixed using strips of patch adhesive tape, which were affixed in "X" format. Likewise, in order to avoid lacerations and skin abrasions, the tips of the splints as well as, the supra-abdominal area, below the level of the ribs, until the infra-abdominal area and animals dorsum, were wrapped with a hypoallergenic adhesive tape, taking care not to obstruct the urinary and defecation tracts. The abduction movement of hip joints was limited, by the use of an abductor wedge, which consisted of a small plastic cylinder, attached to the immobilization apparatus. Finally, in order to promote the total fixation of the splints and also, preventing the animals from chewing the immobilization apparatus, their abdomen and dorsum were wrapped with a layer of adhesive tape, silver-tape type (Scotchcast Plus, 3M). The rats were monitored daily during the 14-days immobilization period. When observed any sign of deterioration of the immobilization apparatus, or interurrences, such as abrasions, venous occlusion, and locomotion problems, the immobilization apparatus was readjusted and or reinforced and, the animal was excluded of the experiment, respectively. Every phases of the immobilization protocol are shown, in details, in figure 2 steps a-h.

2.3. Biochemical analyses

Immediately after euthanasia, blood was collected in heparinized tubes (500U/L) and centrifuged at $1000 \times g$ for 5 minutes. After this procedure, plasma aliquots were collected and stored at -80°C for further determinations of the GLN, glutamate (GLU), ammonium, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and TNF- α concentrations. In this same procedure, the red blood cell buffy coat containing the erythrocytes was separated and collected. Afterward, the erythrocytes samples were prepared as described by Rahman et al. [29] to infer systemic oxidized GSH (GSSG) and reduced GSH ratio (GSSG/GSH ratio), an intracellular index that reflects the equilibrium among whole-body and tissue redox status [30]. On the day of measurements, plasma was TCA-deproteinized and immediately processed for GLN and GLU concentrations, which were determined spectrophotometrically

to 340nm [31] by using a commercial kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adapted for microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA). Plasma TNF- α was evaluated using a commercially available immunoassay kit enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) Ready-Set-Go (eBioscience, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Ammonium levels were measured using a commercial kit (AA-0100 - Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, MO, USA) following the methodology previously described by Neeley & Phillipson [32]. Plasma TBARS concentration was determined spectrophotometrically to 535nm, adapting the methodology described by Dräper & Hadley [33] for reading in 96 wells microplates reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA).

2.4. Erythrocyte preparation

On the day of measurements, 1ml of the red blood cell buffy coat, containing the erythrocytes samples was smoothly and carefully homogenized in 4 volumes (4mL) of 5% ice-cold (4°C) metaphosphoric acid (MPA), using a Teflon pistil. After the homogenization, the samples were centrifuged (3000 x g) for 10 minutes at 4°C and of the upper transparent aqueous layer of the supernatant was collected and transferred to two new fresh cooled microcentrifuge tubes, for the determination of GSH and GSSG content, respectively [29].

2.5. Muscle preparations

Immediately after the animal's sacrifice, soleus and gastrocnemius muscle were surgically excised and immediately frozen by freeze-clamped, in liquid nitrogen for the determination of the total myofibrillar and carbonyl protein contents, GLN, GLU, GSH, GSSG, TBARS, and TNF- α concentrations. Muscle samples destined to be electrophoresed and immunoblotted were immediately freeze-clamped and frozen in liquid nitrogen in the presence of protease and phosphatase inhibitors. Muscle GLN and GLU concentrations were TCA extracted and spectrophotometrically assayed to 340nm [31], using a commercial kit (Sigma-Aldrich Diagnostics kit, Saint Louis, MO, USA), adapted for microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA). Mean values are reported as micromoles of GLN and/or GLU per gram of fresh tissue ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue) and as nanomoles of GLN and/or GLU per milligram of protein (nmol/mg protein). For muscle GSH and GSSG measurement, soleus and gastrocnemius muscle were homogenized in an acid solution (0.6% sulfosalicylic acid + 0.01% Triton-X100 in 0.1M potassium KPE-phosphate buffer with 5 mM EDTA disodium salt, pH 7.5), in a ratio

of 5ml/g of fresh tissue. After homogenization, the samples were centrifuged at 8000 x g for 10 minutes at 4°C, and the supernatant fractions were assessed for GSH and GSSG content.

2.6. Erythrocyte and muscle GSH and GSSG measurement

After the preparation, the erythrocytes and muscle samples were assayed by GSH from GSSG enzymatic recycling method, using 2-vinylpyridine and triethanolamine (Sigma-Aldrich Chemical) for GSSG sample preparation. In this method, GSH reacts with 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid - DTNB) producing the TNB chromophore (5-thio-2-nitrobenzoic acid), by the glutathione reductase (GR) enzyme activity, in the presence of NADPH. The average formation rate of TNB, which is proportional to concentration of GSH and GSSG in the sample, was quantified kinetically (412nm) on a microplate reader (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, CA, USA, readings in 5 times to 0, 30, 60, 90 and 120 seconds). Mean values were reported as $\mu\text{mol/g}$ of fresh tissue and nmol/mg of protein, for GSH and GSSG muscle content determination and, $\mu\text{mol/ml}$ of blood collected, for GSH and GSSG erythrocyte content determination.

2.7. Muscle TBARS determination

In this study, TBARS levels were analyzed with an index of lipoperoxidation in soleus and gastrocnemius muscle. The production of TBARS consists on acid-heating the lipid peroxidation end product, malondialdehyde (MDA), and reaction with thiobarbituric acid (TBA) in muscle tissue homogenates, as previously described by Dräper & Hadley [33]. TBARS were determined in 96-well polystyrene plates (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA) at 535nm.

2.8. Muscle TNF- α Elisa analysis

Muscles protein lysates were analyzed for TNF- α using a commercially available Elisa kit Ready-Set-Go (88-7340 eBioscience, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's protocols. Each sample was run in duplicate. Muscle TNF- α concentration was expressed as picograms per milligram of protein (pg/mg protein).

2.9. Western blot analysis

Protein immunocontent was determined in skeletal muscle samples via Western Blot analysis. Briefly, frozen soleus and gastrocnemius tissue samples were mechanically homogenized 1:10 (wt/vol) in ice-cold radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150

mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40), with a 1:100 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), and 1:100 protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The resulting homogenate was then centrifuged at 14000 x g for 20 minutes at 4°C, and the supernatant was removed and the pellet discarded. Protein concentrations were determined spectrophotometrically to 595nm, in a microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA) by Bradford's protein assay method [34], using bovine serum albumin (BSA) for the standard curve. Afterward, the lysates were combined 1:1 with 1x Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.05% bromophenol blue, 10% glycerol and 5% β -mercaptoethanol) and boiled at 100°C for 10 minutes in order to denature muscle proteins. Then, the proteins extracts (60 μ g in soleus muscle and 150 μ g in gastrocnemius muscle) were loading into 4-12% vertical precast gels and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS/PAGE) electrophoresis, at room temperature for 30 min at 80V followed by 2h at 100V (BioRad, Mini-PROTEAN®, Tetra Cell), in the presence of molecular weight marker (ECL full-range rainbow, RNE-800E Amersham- GE Healthcare Life Sciences). In sequence, gels were removed of electrophoresis apparatus, and resolved proteins were electrically transferred onto a nitrocellulose membrane (pore size: 0.45 μ m; GE Healthcare Life Sciences) using a transfer buffer containing 48mM Tris, 38mM glycine, 0.02% SDS and 20% methanol (pH 8.3) at 100V for 2h. Ponceau red solution (0.1% in 0.5% acetic acid) was used to verify the completeness of the transfer. The membranes were then washed in Tris-buffered saline with 20% Tween 20 (TTBS) to remove the Ponceau red solution staining and, then were blocked in 5% (w/v) BSA in TTBS (blocking buffer) for 1h at room temperature (RT). After the block, the membranes were washed for 10 minutes, three times with TTBS and incubated, overnight at 4°C, with following appropriated primary antibodies: HSP70 (1:1000, #4872 Cell Signaling Technology), NF-KB p65 (1:1000, #6956 Cell Signaling Technology), phosphorylated-NF-KB p65 (Ser 536, 1:1000, #3033 Cell Signaling Technology), IKK α / β (clone B-8, 1:1000, SC-7606 Santa Cruz Biotechnology) and phosphorylated-IKK α / β (Phospho Chuk/IKBKB, Ser 176/177, 1:1000, CSB-PA 006829 Cusabio Technology). Following overnight primary antibody probing, the membranes were washed for 10 minutes, four times with TTBS and incubated, for 2h at RT with appropriated peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit IgG (1:10.000, SC-2357 Santa Cruz Biotechnology) and peroxidase-conjugated anti-mouse IgGk (1:10.000, SC-516102 Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies diluted in TTBS and 1% BSA. After four additional 10 minutes TTBS washes, blots were visualized for 5 minutes in an Image Quant 400 (GE Healthcare, Amersham, UK) image system, with a solution prepared with chemo-

luminescence ECL-Western blotting reagent, following manufacturer's instructions (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). A mouse monoclonal anti- β -actin antibody (clone AC-15, 1:5000, A-1978 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to verify the correct protein loading.

2.10. Myofibrillar, Carbonyl, and Total Protein determination

Myofibrillar protein extractions were performed as previously described by Chamney et al. [35], and the final protein concentration was determined by means of Bradford protein assay [34], using BSA for the standard curve. Carbonyl protein content was quantified spectrophotometrically to 370nm, in a microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA) using the colorimetric method described by Reznick & Packer [36]. The total protein concentration of muscle and plasma preparations were measured by the method described by Bradford [34] using BSA for the standard curve.

2.11. Statistical analysis

One-way ANOVA was used to perform comparisons between the groups, for each dependent variable and, when this test detected significance, Tukey's (HSD) honestly significant difference test was performed as a post hoc. Differences with p values <0.05 were considered statistically significant. All statistical calculation were performed using SPSS software v. 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), and all data are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M).

3. RESULTS

3.1. Body weight, body weight gain, and food intake

The initial body weight did not differ among the groups (weighing 207 ± 87 g). The final body weight, determined in the 14th day of immobilization period was significantly lower in IMOB group (178.7 ± 4.6 g) compared to non-immobilized groups ($p < 0.05$), while GLN supplements attenuated this scenario in GLN+ALA-IMOB (198.7 ± 10.3 g) and DIP-IMOB (197.0 ± 19.7 g) groups, compared to IMOB group ($p < 0.05$). As depicted in table 1, 14 days of hindlimb immobilization have reduced body weight gain in ~86% in IMOB group compared to CTRL, GLN+ALA, and DIP groups ($p < 0.05$). On the other hand, GLN+ALA solution administration to immobilized rats attenuated this scenario significantly, compared to IMOB animals ($p < 0.05$). Both 14 days of hindlimb immobilization and GLN supplements have not affected daily food intake (Table 1).

3.2. Plasma parameters

As shown in table 2, plasma GLN concentration was ~36.7% lower in the IMOB group compared to CTRL, GLN+ALA, and DIP groups ($p < 0.05$). In contrast, the nutritional interventions with GLN+ALA and DIP have reduced the immobilization effect and, re-established the plasma GLN levels in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals (an increase of 41.4% and 45% respectively vs. IMOB group; $p < 0.05$). Plasma GLU concentration was not affected by immobilization application either by GLN supplementations. Therefore, plasma L-Glutamine/L-Glutamate ratio (GLN/GLU ratio), which is an indicator of the potential ($\Delta G < 0$) for GLN flux through glutaminase and glutamate dehydrogenase pathways, was also recovered by both GLN supplementations in immobilized rats (Table 2). There was no significant difference in ammonium concentration among the groups (Table 2).

3.3. Glutamine and glutamate content in soleus and gastrocnemius muscle

As depicted in tables 3 and 4, 14 days of hindlimb immobilization evoked a decrease in GLN content in soleus (a predominantly slow twitch, oxidative-fiber-type muscle) and gastrocnemius (a fast-twitch-fiber-type, mostly glycolytic muscle) by 52% and 43.3%, respectively, as calculated in terms of μmol per gram of fresh tissue, as well as when expressed as nmol per mg of protein (by 39% and 73%, respectively) in comparison to the CTRL group ($p < 0.05$). Moreover, as observed for plasma, in both muscle types analyzed, GLN concentration was significantly restored (both in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue and nmol/mg protein) in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups (Tables 3 and 4; $p < 0.05$). Nonetheless, the GLN+ALA and DIP supplementations elicited an even higher amount of GLN in soleus (by 58% in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue by both supplementations administered and; 68% and 66.2% in nmol/mg protein, respectively) and gastrocnemius muscle (by 56% and 48% in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue, respectively and; 72% and 71% in nmol/mg protein, respectively) of immobilized animals, compared to IMOB group ($p < 0.05$). In soleus muscle, GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals, also present significantly increased GLN concentration, when compared to GLN+ALA and DIP supplemented rats (Table 3; $p < 0.05$). Because muscle GLU concentrations remained unaltered, in both muscles analyzed, the soleus and gastrocnemius GLN/GLU ratio, was significantly lower in IMOB group compared to CTRL group that was restored in immobilized animals treated with GLN supplements ($p < 0.05$).

3.4. Plasma and muscle oxidative stress parameters and glutamine effects on erythrocytes and muscle glutamine-glutathione axis

TBARS levels were analyzed as a lipoperoxidation index in plasma, soleus and gastrocnemius muscle, while carbonyl protein content was analyzed as muscle damage index in immobilized and non-immobilized rats, submitted or not to GLN supplements treatment. According to tables 2, 3, and 4 plasma and muscle TBARS levels in IMOB animals were significantly raised compared to CTRL, GLN+ALA, and DIP rats ($p < 0.05$). On the other hand, both GLN+ALA and DIP treatments to immobilized rats reduced plasma (by 65.3% and 70.5% respectively), soleus (by 31% and 34% respectively) and gastrocnemius (by 25% and 27.5% respectively) TBARS levels, compared to IMOB rats ($p < 0.05$). As carbonyl protein content, the animals of IMOB group have presented an enhanced average of 47% and 45% in this parameter in soleus and gastrocnemius muscle, respectively, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP animals ($p < 0.05$). Both GLN+ALA solution and DIP administration have attenuated this scenario in soleus (reduction of 56% and 59%, respectively) and, gastrocnemius muscle (reduction of 28% and 25%, respectively) of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB animals (Tables 3 and 4). These findings suggest a beneficial attenuated effect of GLN supplements on systemic and muscle lipid peroxidation as well as, on muscle protein damage induced by a stressful situation, as a limb immobilization period.

Concerning glutathione metabolism, immobilized rats presented an average reduction in GSH erythrocytes content of 19.3%, a fact that was accompanied by an average rise of 44.3% in GSSG content, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats (Table 2; $p < 0.05$). These findings suggest a reduction in the erythrocytes redox potential of IMOB-rats, a fact that is exposing these cells and consequently the whole-body, to a very harmful oxidative milieu. On the other hand, GLN supplementation attenuated this scenario significantly since GLN+ALA solution and DIP treatments provided an enhanced of 26.1% and 28%, respectively, in GSH content in erythrocytes of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats. This attenuation significantly reverberated on intracellular redox status of these animals, once the GSSG/GSH ratio, decreased by 62.3% and 64.1%, respectively in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups, compared to IMOB group ($p < 0.05$).

As GSH muscle metabolism, 14-days of hindlimb immobilization promoted a significant reduction (~24.1%) in the concentration of this non-enzymatic antioxidant in soleus muscle, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups, respectively, when this one was expressed in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue. Equally in soleus muscle, compared to CTRL group, 14-days of hindlimb immobilization induced a reduction of 36% in GSH concentration, when

this parameter was expressed in nmol/mg protein (Table 3, $p < 0.05$). In gastrocnemius muscle, the IMOB group presented a reduction of 24% in GSH concentration, when expressed in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue, compared to the CTRL group. Fourteen days of hindlimb immobilization also induced a $\sim 66.1\%$ decrease in GSH content, when expressed in nmol/mg protein, in gastrocnemius muscle of IMOB rats, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP animals, respectively, leading to a threatening extreme oxidative milieu. However, in such muscle analyzed, both nutritional interventions reduced the oxidative imbalance making GSSG/GSH ratio significantly lower compared with the IMOB group (Tables 3 and 4; $p < 0.05$). In gastrocnemius muscle DIP administration to immobilized rats also promoted a lower GSSG/GSH ratio, based in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups (Table 4; $p < 0.05$).

3.5. Immobilization and glutamine administration effects on plasma and skeletal muscle TNF- α inflammatory marker concentration

TNF- α was assessed as a pro-inflammatory biomarker in plasma and skeletal muscle. Fourteen days of hindlimb immobilization raised (by $\sim 28.5\%$) plasma TNF- α levels when compared to CTRL, GLN+ALA, and DIP groups ($p < 0.05$). However, both nutritional interventions attenuated (by 65.2% in GLN+ALA-IMOB group and 76.2% in DIP-IMOB group) plasma TNF- α -inflammatory response, when compared to the IMOB group ($p < 0.05$). Fourteen days of hindlimb immobilization were also raised TNF- α levels in soleus (by $\sim 58.2\%$) and gastrocnemius (by $\sim 10\%$) muscle, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups. As in the plasma, both GLN supplementations attenuated TNF- α levels (by 49% in GLN+ALA-IMOB group and 62% in DIP-IMOB group) in soleus muscle and (by 13% in GLN+ALA-IMOB group and 20.4% in DIP-IMOB group) in gastrocnemius muscle (Tables 3 and 4; $p < 0.05$). Gastrocnemius muscle TNF- α levels also were significantly lower in DIP-IMOB group, compared to CTRL, GLN+ALA, and DIP groups (Table 4).

3.6. Western Blot analysis of HSP70 and NF- κ B pathway protein content

Fourteen days of hindlimb immobilization reduced (by $\sim 55.4\%$) the HSP70 protein content in the soleus muscle of IMOB animals, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats (Figure 3A, $p < 0.05$). On the other hand, GLN administration to GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats re-established and induced a 63.6% and 62.3% respectively, increase in the HSP70 protein content in the soleus muscle, compared to IMOB group (Figure. 3A; $p < 0.05$). A similar increase of 38.2% and 36% respectively, in the HSP70 protein levels, was observed in the soleus muscle, when the GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats were

compared to the CTRL animals (Figure. 3A). GLN administration also induced a significant increase of 1.6 and 1.5-fold in the HSP70 protein content in the soleus muscle of GLN+ALA and DIP rats, respectively, compared to CTRL animals (Figure 3A; $p<0.05$). Equally, 14-days of hindlimb immobilization evoked a reduction by ~44% in the HSP70 protein content in the gastrocnemius muscle of IMOB animals, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats (Figure 3B, $p<0.05$). Similar to the one observed in soleus muscle, GLN supplements administrated in the present study re-established and elevated in 43.5% and 50% respectively, the HSP70 protein levels in the gastrocnemius muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB group (Figure 3B).

Regard to NF- κ B protein content analysis, 14-days of hindlimb immobilization increased the protein expression of this transcriptional factor, both in phosphorylated and total forms, by ~76.3% and ~54.3%, respectively, in the soleus muscle and by ~30% and ~63.2% respectively, in the gastrocnemius muscle compared to the CTRL, GLN+ALA, and DIP groups (Figures 4A and B, and 4A and B; $p<0.05$). This pro-inflammatory response elicited by immobilization was accompanied by an 87.5% and ~66.1% increase in the protein content levels in the phosphorylated form of the central inhibitory kinase of the NF- κ B factor, the IKK kinase, subunits α and β (IKK α/β), in gastrocnemius muscle of IMOB rats, compared to CTRL and GLN+ALA and DIP animals, respectively (Figure 5D; $p<0.05$). One similar ~74% increase in phosphorylated IKK α/β protein expression form was observed in the soleus muscle of IMOB rats, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP animals (Figure 4D; $p<0.05$). Also, in soleus muscle, 14-days of hindlimb immobilization induced an ~73.4% increase in total IKK α/β protein expression in IMOB group, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups (Figure 4C). On the other hand, both DIP and GLN+ALA supplements were able to attenuate the NF- κ B p65 protein expression both in total (reduction of 76.4% in GLN+ALA-IMOB and, 62.1% in DIP-IMOB rats) and phosphorylated forms (reduction of 61% in both GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals) in the soleus muscle, compared to IMOB group (Figures 4A and B). Similar reduction in the NF- κ B p65 protein expression both in phosphorylated (reduction of 26% and 34.2% in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups respectively) and in total form (reduction of 34.5% and 40% in the GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats respectively) was observed in the gastrocnemius muscle, compared to IMOB animals (Figures 5 A and B; $p<0.05$). This reduction in phosphorylated and total NF- κ B p65 protein content in both soleus and gastrocnemius muscle, in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups, was accompanied by a decrease in phosphorylated IKK α/β protein content, in the order of 87.5% and 84.2% in the soleus muscle and, 57% and 63% in the gastrocnemius muscle, compared to IMOB group (Figures 4D and 5D; $p<0.05$). At the same

time, a 70.1% and 85% reduction in the total IKK α / β protein content was observed in the soleus and gastrocnemius muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats respectively, when compared to IMOB animals (Figures 4C and 5C; $p < 0.05$).

3.7. Muscle myofibrillar protein content analysis

Fourteen days of hindlimb immobilization promoted a significant reduction in myofibrillar protein content, both in the soleus (by ~65.1%) and gastrocnemius muscle (by ~52%), compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups (Tables 3 and 4 $p < 0.05$). On the other hand, although it has not reduced the loss in myofibrillar protein content to basal levels, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups, both GLN+ALA solution and DIP nutritional interventions attenuated the myofibrillar protein content degradation both in the soleus (reduction of 61.3% in the GLN+ALA-IMOB and 54% in the DIP-IMOB groups) and in the gastrocnemius muscle (reduction of 51.4% in the GLN+ALA-IMOB and 48% in the DIP-IMOB groups) compared to IMOB animals (Table 3 and 4; $p < 0.05$).

4. DISCUSSION

4.1. Findings overview

The present study provides new essential insights concerning the body GLN status during a period of limbs immobilization. To our knowledge, this is the first research to evidence this topic in an in vivo model of skeletal muscle atrophy disuse. The present results show that 14-days of hindlimb immobilization, employing the application of a rat new experimental hindlimb immobilization model, reduced the GLN concentrations significantly in both plasma, slow-twitch oxidative-fibers soleus and fast-twitch glycolytic-fibers gastrocnemius muscle, which was attenuated and or prevented by both oral GLN-supplementations with DIP or GLN+ALA solution. Moreover, it was observed that both GLN supplements, attenuated the proteolytic-mediated effects of the NF- κ B signaling pathway activation even when, attenuated the inflammation, oxidative stress and disuse-mediated myofibrillar protein content degradation induced by the hindlimb immobilization period, through a modulation on antioxidant GLN-GSH axis and cytoprotective HSP70 protein expression.

4.2. Fourteen days of hindlimb immobilization reduce soleus and gastrocnemius muscle myofibrillar protein content and affect the plasma and muscle levels of glutamine, what is re-established by GLN+ALA and DIP supplementations

The skeletal muscle constitutes 40% of total body mass, and it is quantitatively the most important site of synthesis, stocking, and release of GLN to the body [9]. Indeed, the skeletal muscle is responsible for more than 60% of total free GLN of the body, a fact that makes this tissue, although not the only one, of fundamental importance for the maintenance of the plasma GLN levels [9, 10, 21, 37]. So, in the present study, it is hypothesized that a reduction on skeletal muscle protein content, induced by a muscle disuse period, can affect the plasma and skeletal muscle GLN levels, fact that, can be re-established and or attenuated by GLN+ALA and DIP supplementations. Indeed, 14-days of hindlimb immobilization induced a significant reduction in the soleus and gastrocnemius muscle myofibrillar protein content, in IMOB rats. At the same time, a significant reduction in the plasma, soleus, and gastrocnemius muscle GLN levels was observed, in the same animals (Tables 2, 3 and 4). On the other hand, both oral supplementations with L-alanyl-L-glutamine (DIP) or free L-glutamine along L-alanine (GLN+ALA solution), in the groups of animals equally submitted to 14-days of hindlimb immobilization, were effective maintaining the plasma and skeletal muscle GLN concentrations as well as, attenuated the loss on myofibrillar protein content (Tables 2, 3 and 4). These findings are the first to show beneficial GLN supplementations-mediated effects on the skeletal muscle protein degradation attenuation, in a muscle disuse situation.

Furthermore, our results are in agreement and are supportive by the findings of other studies where the same oral GLN-supplementations forms, showed to be effective maintaining plasma and muscle tissue GLN stores in animals submitted to full stressors, including resistance [22, 38], intense or exhaustive physical exercises [14] and catabolic situations, such as endotoxemia [13, 39]. Nonetheless, the present study also attended the GLN demand by organs such as kidneys, liver, gut, and rapidly dividing cells, such as immune system cells, during the 14-days of the muscle disuse period. Besides, the findings of the current study, also show that the rat groups not immobilized and supplemented either DIP or GLN+ALA solution (GLN+ALA and DIP groups, respectively) did not show effects on the plasma and skeletal muscle GLN levels. These results reinforced the findings of previous studies [13, 39], attesting, one more time, that a previous GLN supplementation to a catabolic stimulus does not offer cumulative benefits.

Dipeptides containing GLN, such as DIP have been preferentially used because this dipeptide has promoted a stoichiometric increase in the GLN and ALA concentrations in

peripheral tissues, which in turn, can be rapidly available to the plasma [20, 21]. These effects have been attributed to the presence and activity of the PepT-1 protein, next to enterocytes [26]. Located, exclusively, in the luminal membrane, PepT-1 represents the main absorption pathway of the end products of the protein digestion. This pathway allows the transport of dipeptides and tripeptides from the gut mucosa, which has very little or no activity of peptide hydrolases, for the cytosol, where the peptidases exhibit a higher activity (80% to 95% of the total cellular activity), both in humans and animals [26]. However, in the current study, similar to others in vivo studies [14, 15, 22, 38] our results suggest that the GLN+ALA solution supplementation have similar metabolic effects, compared with DIP supplementation. This finding leads to believe that other mechanisms of transport can be involved in both DIP and, mainly, in the GLN+ALA solution intestinal transport. Indeed, Gilbert et al. [40] pointed out that both paracellular movement and cell-penetrating peptides and amino acids transport have been involved in the dipeptides and amino acids intestinal transport. The GLN administration form is another essential factor to consider for the understanding of the mechanism behind these effects present by DIP and GLN+ALA solution, on GLN levels during a catabolic situation, such as a hindlimb immobilization period. Studies, where the same forms of oral supplementation used in the present study were employed, have indicated that the addition of free ALA to GLN, similar to GLN+ALA solution besides may rapidly increase ALA plasma concentration, also acted sparing the body GLN stores [14, 15, 41]. Results of present study meet these studies, since our findings also suggest that the presence of the ALA amino acid, both in DIP and in GLN+ALA solution, contributed to the maintenance of the plasma and, mainly, muscle GLN concentrations, in order to supply the body requirement of this amino acid, during a skeletal muscle disuse period.

4.3. GLN+ALA and DIP supplementation re-established the availability of substrates for GSH synthesis and improved cellular redox status, attenuating lipid peroxidation and protein damage in immobilized rats

GLN has been implicated as an essential precursor for the synthesis of the GSH (the central and highest concentration non-enzymatic cellular antioxidant of the body) [11, 42]. During a situation of oxidative stress, GSH, in an attempt to contribute to the attenuation of the interaction of ROS with the cells, react directly with this oxidative species, by means of a non-enzymatic reaction, passing from its reduced form (GSH) to its oxidized form, also known as glutathione disulfide (GSSG) [43]. That way, the calculation of the ratio among GSSG/GSH is configured with an important predictor index of the intracellular redox state

[11]. So, the intracellular redox state is closely linked to GSH concentration, which, in turn, is influenced by the GLN availability in the body [42]. Periods of skeletal muscle disuse are characterized by a higher synthesis of ROS in this tissue [8]. Although ROS plays a crucial role in muscle adaptations, when synthesized in excess, however, they have are associated with alterations in the intracellular redox state and essential cell functions [8]. Indeed, this situation has been related to an increased susceptibility to oxidative cell injuries, through the peroxidation process of the phospholipids that make up the cell and subcellular membranes, DNA and intracellular proteins damage [43]. In the present study, the lowest availability of GLN in IMOB group has reduced the antioxidant defense capacity mediated by GSH in this group, promoting oxidative stress, inferred by higher GSSG/GSH ratio in both soleus and gastrocnemius muscle, of these animals (Tables 3 and 4). A similar reduction in GSH levels was observed in the erythrocytes, of IMOB animals (Table 2; $p < 0.05$). The erythrocytes are responsible for about 10% of the total GSH synthesis, being this tripeptide the most abundant thiol group (-SH), in these cells [42]. That way, considering that the erythrocytes circulate in all body tissues, it is observed that the general body redox state, in IMOB animals was substantially impaired, at the same time that plasma and skeletal muscle TBARS concentrations, in these same animals, were higher compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats. These findings indicated that there was an increase in lipid peroxides formation and systemic oxidative stress in the IMOB animals. Concomitantly to these findings, a high pro-inflammatory process, mediated by the elevated TNF- α concentration in plasma and the skeletal muscle was also evidenced in IMOB rats (Tables 2, 3, and 4). Previous studies have pointed out that the elevation of both tissue and plasma TNF- α levels, as observed in IMOB group, induce the reversal of liver role in the GLN metabolism [44]. About this condition, the liver, which predominantly acts as a GLN-producer organ, becomes a predominantly consumer tissue of this amino acid. This liver reversal role on GLN metabolism has been attributed to the intense involvement of the liver in the intermediary amino acid metabolism and glucose synthesis to maintain glycemia and supply these substrates to other tissues, such as the brain [44].

In the present study, GLU concentration, both in plasma and in skeletal muscle, remained unchanged among the groups, fact that indicates that GLN/GLU ratio in plasma and skeletal muscle forced the equilibrium of the enzymatic reaction mediated by the enzyme glutaminase (GLS) and GLU consumption by means the glutamate alpha-ketoglutarate enzyme pathway, involving the enzyme glutamate dehydrogenase (GLUD1), diverting GLU to GSH synthesis in skeletal muscle [45]. Moreover, these results can also be attributed to limited intracellular GLU transport since, although they have high affinity for this

amino acid, the GLU transporter (called X-ag), located in the cell membrane, however, it has a very high K_m ($\pm 100 \mu\text{mol/L}$), compared to GLU plasma concentration ($\pm 64 \mu\text{mol/L}$) [18]. In addition to these mechanisms, it seems that the ALA presence in GLN-supplements, as DIP and GLN+ALA solution may alter GLN metabolism [22, 46]. Once ALA is metabolized via alanine aminotransferase to pyruvate, and rapidly consumed in the Krebs Cycle to generate ATP or to synthesized GLU from 2-oxoglutarate [14, 47, 48], it has been proposed that ALA may be the free amino acid GLU-donor for the enzyme glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (GCLC), in order to increase the muscle GSH content [13]. That way, the presence of ALA in both GLN supplements employed in the present study may have stimulated its catabolism in the metabolic activity organs, such as the liver, to form glucose, via gluconeogenesis, or to GLU synthesis in a way to supply the muscle and erythrocyte GSH synthesis. Felig [49] and Gazzola et al. [50] supported this mechanism reporting that the ALA uptake by the liver is an essential precursor for critical amino acid-derived glucose, including GLN. Notwithstanding, this mechanism besides giving to ALA, similar to GLN, a central role for maintenance of intermediary metabolism [22] also may have contributed to the higher GLN levels observed in plasma, and skeletal muscle of immobilized and GLN supplemented rats once, somehow, this one may have contributed to sparing the GLN stores during the 14-days of hindlimb immobilization in the immobilized and GLN-supplemented animals. That way, our results evidence that the higher GLN/GLU ratio, such as observed in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, reinforced the availability of substrates for GSH synthesis, which significantly balanced the erythrocyte and skeletal muscle GSH metabolism, in these groups. Besides, this improvement in the cellular redox status, evidenced by a decreased GSSG/GSH ratio explains, at least in part, the attenuated lipid peroxidation observed by lower TBARS concentration in plasma and skeletal muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals (Tables 2, 3 and 4). According to Fläring et al. [11] GSH, among other functions, protects the cell membrane maintaining the concentration of many proteins and their -SH groups in the reduced form, which are necessary for the maintenance of cell homeostasis. Based on this assumption and considering the increase in GSH concentration promoted by GLN-supplements, both in soleus and gastrocnemius muscle, it is evident that the rate of reconversion of GSSG to GSH, by means of the action of the glutathione reductase (GSR) enzyme, which uses NADPH as a source of reducing power [18] promoted the balance of the redox state, a fact that we infer had been predominant for the lower protein damage evidenced by, the lower carbonyl protein concentration, such as observed in the skeletal muscle tissue of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB animals (Tables 3 and 4).

Although in the present study we have observed almost similar effects of both DIP and GLN+ALA solution on GSH levels in both slow-twitch oxidative-type I soleus and fast-twitch glycolytic-type II gastrocnemius muscle, it is important to emphasize that the skeletal muscle GSH levels may vary depending on the muscle fiber type [51]. Indeed, in a previous study on the male Sprague-Dawley rat soleus muscle, GSH level was raised compared to both deep vastus lateralis and superficial vastus lateralis-glycolytic muscles [52]. According to Ji et al. [52] these findings may be attributed, in part, to the fact that the soleus muscle, besides having a marked oxidative metabolic capacity, also has a remarkably more developed antioxidant defense system when compared with other skeletal muscles. In fact, besides having a higher level of total GSH, activities of GSH-dependent antioxidant enzymes, such as GSH peroxidase, GSSG reductase, and the peroxide-decomposing enzyme catalase, were observed to be markedly higher in the soleus muscle [52]. On the other hand, Austin et al. [53] reported that the glycolytic type fibers have a diminished ability to cope with hydroperoxides generated during oxidative stress, which, in turn, could lead to increased damage to membrane structures by lipid and/or protein peroxidation through the oxidation of sensitive intracellular -SH groups of enzymes by ROS. However, in the current study, GLN-supplements employed shown to have: 1) empowered the soleus muscle GSH-mediate antioxidant defense and; 2) somehow have altered the weak antioxidant profile, enhanced this one, in the glycolytic gastrocnemius muscle of both DIP and GLN+ALA immobilized rats.

4.4. Oral GLN+ALA and DIP supplementation attenuated the immobilization-induced pro-inflammatory response mitigating the TNF- α levels, IKK α/β degradation and NF- κ B activation

It is well established that ROS acts as molecular messengers triggered initial intracellular signal that results in the activation of many catabolic regulatory elements included pro-inflammatory cytokines, most notably TNF- α and, proteolytic cell signaling pathways [1]. This ROS-action has been related as decisively, to trigger and develop of skeletal muscle atrophy and proteolysis [8]. Indeed, although in vivo researches have reported that the skeletal muscle atrophy induction might involve differential activation of multiple cell signaling pathways, the oxidative stress-mediated NF- κ B transcriptional signaling activation alone, however, is sufficient to cause muscle myofiber atrophy and increase the protein content degradation, in this tissue [54, 55]. NF- κ B represents a family of inducible transcription factors, composed of five structurally related homodimers and or heterodimers, including NF- κ B1 (also named p50), NF- κ B2 (also named p52), RelA (also

named p65), RelB and c-Rel [4]. Under non-stressed conditions, the NF- κ B family members are found in their inactive form in the cytosol of many mammalian cell types [4]. However, it is under stressful conditions, including skeletal muscle disuse a variety of stimuli, such as oxidative stress, by the imbalance among the synthesis and removal of ROS and other mediators of muscle atrophy, including TNF- α [7, 8], induce the translocation of this homodimers and/or heterodimers to the cell nucleus and their binding to a specific DNA element, κ B enhancer which, often, mediates and regulates the transcription of a large array of genes involved in different processes including immune, inflammatory and apoptotic responses [4]. Two upstream kinases commonly regulate the nuclear NF- κ B homodimers and heterodimers translocation: the inhibitor of kappa B kinase alpha (IKK α) and inhibitor of kappa B kinase beta (IKK β) [56]. During skeletal muscle disuse atrophy situations, ROS and TNF- α act promoting the phosphorylation and ubiquitination of IKKs, which are, subsequently, degraded by the main proteolytic body system, the 20S/26S ubiquitin-proteasome system. This ROS and TNF- α -mediated action takes to NF- κ B activation and promotes the skeletal muscle atrophy and protein content degradation [3, 4, 7]. Nonetheless, according to Roth et al. [57], the pro-inflammatory response elicited by TNF- α during several stressful and catabolic conditions are also associated with contra-regulators hormones response, which besides stimulating the muscle loss leads to decreased in GLN concentration, both in plasma and from skeletal muscle stores. On the other hand, studies in vitro and in vivo have reported that GLN supplementation is capable of attenuating the excessive synthesis and release of cytokines, including TNF- α and attenuate and/or revert their catabolic effects, a fact that reverberates on the GLN homeostasis maintenance [39, 58]. Notwithstanding, in a previous study, Raizel et al. [22] also reported beneficial effects of ALA supplementation on the reduction of the pro-inflammatory cytokines, including TNF- α . In the current study, 14-days of hindlimb immobilization induced a significant increase in the plasma and skeletal muscle (mainly, in the soleus muscle) TNF- α levels, at the same time that a significant decrease in the plasma and skeletal muscle GLN concentration, was observed in IMOB rats. Interestingly, this higher TNF- α concentration found in the soleus muscle encounters a previous study, which reports that the skeletal muscle tissue-TNF- α expression is more predominant in the type II fibers, such as the gastrocnemius muscle than in predominantly type I fibers muscle, such as the soleus muscle [59]. So, given the different biologic roles of type I and II muscle fibers, it has been postulated that cytokines might be expressed, at skeletal muscle, in a fiber-type specific manner [59]. However, it has also been reported that the cytokine expression detected at the protein level does not reflect at the mRNA level, even though the mRNA level reflects the protein level for the myosin heavy

chain I (MHC I) and myosin heavy chain II (MHC IIa) isoforms. The lack of relation between mRNA and protein levels suggests that skeletal muscle-cytokine expression, including TNF- α , might be regulated in a post-transcriptional manner [59]. These higher TNF- α plasma and skeletal muscle concentrations found were accompanied by a significant increase in phosphorylated IKK α / β protein content levels as well as, in NF- κ B p65 heterodimer protein expression, in its total and phosphorylated forms, in the soleus and gastrocnemius muscle, equally, in IMOB animals (Figures 4 and 5 A, B, C and D, respectively). On the other hand, a significant reduction in both plasma and muscle TNF- α levels was observed in both GLN+ALA solution and DIP supplemented rats, at the same time that a significant increase in the plasma and skeletal muscle GLN concentration was observed, in these same animals (Tables, 2, 3 and 4). These results reverberated on the phosphorylated IKK α / β protein levels even as, on phosphorylated and total NF- κ B p65 protein expression, which were significantly attenuated in the soleus and gastrocnemius muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals (Figures 4 and 5 A, B, C, and D, respectively). These of attenuating effect mediated by GLN supplements on TNF- α levels and in oxidative stress-mediated NF- κ B pathway activation are of great relevance to skeletal muscle protein content degradation attenuate and prevention, since previous studies highlighted that: 1) the downstream target of catabolic signaling mediated by TNF- α , in skeletal muscle, is the proteolytic 20S/26S ubiquitin-proteasome system [7] and; 2) the inhibition and/or attenuation of TNF- α and oxidative stress-mediated NF- κ B pathway activation prevents, at least, 50% of the muscle myofiber atrophy and protein content degradation, during a disuse situation [54, 55, 60].

4.5. Oral GLN administration, either in GLN+ALA solution and/or DIP forms enhanced HSP70 protein expression and prevents the skeletal muscle atrophy-mediated myofibrillar protein content degradation in slow-twitch soleus and fast-twitch gastrocnemius muscle

GLN has been implicated as a pharmacologic-nutrition agent able to modulate cellular stress response through of HSPs, especially the HSP70 family (the dominant HSP) expression [61]. This response represents an essential mechanism of cytoprotection against several forms of injury in full range cells and tissues [62, 63]. Previous studies have suggested that into the cell HSP70, there are significant anti-inflammatory properties, providing stress tolerance, and blocking the activation of the NF- κ B pathway [22, 64, 65]. However, a reduction in GLN availability as observed in plasma and skeletal muscle of IMOB rats, associated to higher local and systemic inflammatory injury, as also observed in these same animals, may lead to a deficit in HSP70 protein levels and impair the recovery process

[14, 15, 22, 66]. Our results regard to limb immobilization effects on muscle HSP70 protein content are aligned with these studies, since the decreased HSP70 protein levels, as observed in IMOB rats promoted inflammatory effects, evidenced by an NF- κ B p65 protein content increase, in both phosphorylated and total forms, in both soleus and gastrocnemius muscle, in this same group of animals, compared to the CTRL, GLN+ALA, and DIP animals (Figures 4 and 5 A and B; $p < 0.05$). This pro-inflammatory response elicited by immobilization was accompanied by an increase in protein content levels of the phosphorylated form of the IKK α/β , in the soleus and gastrocnemius muscle of IMOB rats, compared to CTRL and GLN+ALA and DIP groups (Figures 4 and 5 C and D; $p < 0.05$). On the other hand, in agreement with the proposition that GLN is an essential modulatory substrate on HSP70 expression, the increased protein levels of this HSP found in soleus and gastrocnemius muscle of immobilized-GLN supplemented animals, reduced both phosphorylated and total NF- κ B p65 protein content forms in soleus and gastrocnemius muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, when compared to IMOB animals (Figures 3, 4 and 5 A and B; $p < 0.05$).

Although the focus of the present study has been only on the GLN-mediated cytoprotective effects through HSP70 expression modulation, it is important mention that small neutral amino acids, including ALA, have also shown to exert cytoprotective effects against oxidative, inflammatory, metabolic and chemical insults in a full range of cells and tissues [67]. The exact mechanisms behind these ALA-mediated beneficial effects are unknown. However, it has been purposed that the ALA-mediated antioxidant genes expression and activation of the endogenous iron sequestration mechanisms, such as the expression and enzymatic activity of the antioxidant protein heme oxygenase-1 (HO-1) can be the possible mechanism of these ALA-mediated antioxidant, anti-inflammatory and cytoprotective effects [67-70]. That way, like in both GLN-supplements administrated herein ALA was present, in the same amount, it is possible think that this amino acid, somehow, has also have contributed to the systemic and skeletal muscle antioxidant, anti-inflammatory and cytoprotective effects observed in the DIP-IMOB and GLN+ALA-IMOB animals. However, this study is limited to endorse this hypothesis once we did not have a supplemented ALA alone to the animal group.

In the current study, although the GLN administration to GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats have induced an increase in the HSP70 protein content in both soleus and gastrocnemius muscle compared to IMOB group (Figure. 3A and B; $p < 0.05$), the GLN-mediated increase in the HSP70 protein expression in the soleus muscle was significantly higher compared to gastrocnemius muscle. Indeed, in a previous research Bar-Shai et al. [71] reported a significant increase in both protein levels and mRNA expression of the

HSP70-inducible form (HSP72) especially in slow-twitch soleus muscle fibers of the rat's right hindlimbs immobilized for 7 to 30 days. Additionally, Bar-Shai et al. [71] reported that this increase in HSP72 protein and mRNA levels was markedly higher during the first two weeks of immobilization, a period closely resembles with the immobilization period (14-days) employed in the present study. Locke et al. [72] and O'Neill et al. [73] highlighted that although the HSP70-inducible (HSP72) isoform has generally been considered to be strictly a stress-inducible protein and can be observed in low quantity in unstressed cells, this inducible isoform of the HSP70 family has shown to be constitutively expressed, at higher concentrations, in the "slow" (e.g., high levels of slow MHC I) soleus muscle of the unstressed rats. Although the exact bases for these muscle-specific differences in HSP70 expression are not totally known, however, it has been postulated that the reason(s) for this pattern of expression, mainly of inducible-HSP70 isoform, HSP72, in slow-twitch rat skeletal muscle seems to be related to the fact that the constitutive expression of HSP72 is required in type I fibers either: 1) because in this fiber type it serves a function that is specific but distinct from the general stress-related functions of these HSP or; 2) because this fiber type is continuously subjected to a more stressful environment than other fiber types, since muscles exhibiting high levels of MHC I are more recruited for ambulation and postural maintenance, which offer a constant stress to the muscle loading and, would account for the elevated constitutive expression of HSP70 in these tissues [72-75].

Notwithstanding, in sight of the observation that type I-oxidative fibers contain a higher mitochondrial content than type II-glycolytic fibers, it has been postulated that HSP70 might be involved in the mitochondrial transport, which would justify and/or require a significant constitutive expression, mainly of HSP70-inducible-HSP72 isoform in this muscle type [76]. In addition, muscles composed predominantly of type I-oxidative fibers are known to have higher catalase [77] and ubiquitin [78] levels, contain a greater number of peroxisomes [79], and have a higher intrinsic rate of protein turnover [80] than muscles composed of type II-glycolytic fibers. Thus the constitutive expression of HSP70, mainly its HSP72-inducible isoform may also be required in type I-oxidative fibers to protect or repair the proteins in these fibers from ROS to others damage types and injuries [81]. Additionally, it is importantly mentioned that other mechanisms can be behind and/or should be accountable in the analysis of the different pattern of HSP70 protein expression observed among soleus and gastrocnemius muscle in immobilized and GLN-supplemented rats. Among these the following stand out: 1) the different time courses of the response of specific HSPs between the slow (e.g. soleus) and fast (e.g. gastrocnemius) muscle in adult rats [75]; 2) the initial or basal amounts of HSP70 in the muscle [82]; 3) the differential region-muscle

type-specific response of HSP70 mRNA and protein expression. Regarding this, it has been reported that the specific fiber type composition of a muscle region impacts on the response of specific HSPs to a variety of HSP-inducible factors (e.g. heat shock stress) [75] and; 4) it is well established that muscles adapt to ongoing recruitment with a remodeling process, which results in the transcription and translation of isoforms of myofibrillar proteins metabolically suited for the imposed contractile demands [83]. That way it has been suggested that the mRNA expression and protein levels of HSPs in skeletal muscles depend and/or can be regulated by the electromyographic (EMG) activity pattern and the metabolic capacity, along with mechanical and neural activity levels [84]. However, the effects of GLN on each one these mechanisms, are unknown and need be better investigated yet.

Previous researches have established that morphologic and biochemical alterations accomplish prolonged periods of mechanical unloading or disuse, such as forced bed rest and limb immobilization, impacting on skeletal muscle function and metabolism [6]. In several, these alterations are translated in an exacerbated reduction in the skeletal muscle size mass and myofibrillar protein content [6]. In the present work, the myofibrillar protein content in both soleus and gastrocnemius muscle of both immobilized and non-immobilized rats supplemented or not with GLN+ALA solution or DIP GLN-supplements, were measured. Our findings show that a significant attenuation accompanied the increased HSP70 protein expression observed in soleus and gastrocnemius muscle in supplemented and immobilized animals in myofibrillar protein content degradation in both muscles analyzed, in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals, when compared to IMOB rats (Figures 3A and B; Tables 3 and 4; $p < 0.05$). These findings reinforced the postulated key role of HSP70 as a potentially useful countermeasure agent against disuse-induced skeletal muscle mass and protein content loss. Although the exact cellular mechanisms underlying this HSP70-attenuated effect on muscle protein breakdown remains unclear, it is believed that this effect is, at least in part, linked to molecular chaperone and protein repair functions played by HSP70 [14, 85]. Nonetheless, previous studies have reported that the HSP70-mediated suppression of NF- κ B signaling pathway activation shown to be another potential mechanism that may be behind this HSP70-mediated protective effect against skeletal muscle protein content degradation, during a muscle disuse period [65, 85].

5. CONCLUSION

In conclusion, the present study indicates that oral GLN supplementation either in GLN+ALA solution and or in DIP forms represents an effective nutritional method to maintain GLN stores during a limb immobilization period, which improved skeletal muscle and whole-

body GLN-GSH axis and metabolism. The results also reinforced the modulatory role played by GLN on HSP70 protein expression and skeletal muscle regeneration and recovery process, following an oxidative-mediated injury. Additionally, the results of the current study show that GLN-mediated HSP70 protein expression, also contributed for the attenuation of the oxidative stress-mediated proteolytic NF- κ B signaling pathway activation as well as, contributed for the attenuation of skeletal muscle disuse-mediated myofibrillar protein content degradation in slow-twitch oxidative-fibers soleus and fast-twitch glycolytic-fibers gastrocnemius muscle of rats, submitted to 14-days of hindlimb immobilization. However, further studies, especially in humans, are needed to provide the clinical impact of these findings over the public health systems.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

É.R. Petry designed and performed research, analyzed data, and wrote the manuscript; D.F. Dresch designed and performed research; C. Carvalho, P.C. Medeiros, T.G. Rosa, and C.M de Oliveira performed research; L.A.M. Martins analyzed data and revised the paper; F. C. R. Guma and N.P. Marroni contributed with new reagents and analytic tools; C. M. D. Wannmacher designed research, wrote and revised the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDS RECEIVED

The authors thank Ajinomoto of Brazil for the donation of purified amino acids, L-alanine, and L-glutamine. This work was supported by the research grants from The Commission for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process: 306928/2014-0), The Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), and of Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA, process: 17-0671).

REFERENCES

- [1] R.W. Jackman, S.C. Kandarian, The molecular basis of skeletal muscle atrophy, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287(4) (2004) C834-43.
- [2] Y.P. Li, R.J. Schwartz, I.D. Waddell, B.R. Holloway, M.B. Reid, Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha, *FASEB Journal* 12(10) (1998) 871-80.
- [3] H. Li, S. Malhotra, A. Kumar, Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy, *Journal of Molecular Medicine* 86(10) (2008) 1113-26.
- [4] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.C. Sun, NF-kappaB signaling in inflammation, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (2017).
- [5] P. Zhang, X. Chen, M. Fan, Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy, *Medical Hypotheses* 69(2) (2007) 310-21.
- [6] S.H. Lecker, R.T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S.R. Price, W.E. Mitch, A.L. Goldberg, Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression, *FASEB Journal* 18(1) (2004) 39-51.
- [7] Y.P. Li, Y. Chen, J. John, J. Moylan, B. Jin, D.L. Mann, M.B. Reid, TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle, *FASEB Journal* 19(3) (2005) 362-70.
- [8] S.K. Powers, A.N. Kavazis, J.M. McClung, Oxidative stress and disuse muscle atrophy, *Journal of Applied Physiology* 102(6) (2007) 2389-97.
- [9] P. Newsholme, J. Procopio, M.M. Lima, T.C. Pithon-Curi, R. Curi, Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function, *Cell Biochemistry and Function* 21(1) (2003) 1-9.
- [10] R. Curi, C.J. Lagranha, S.Q. Doi, D.F. Sellitti, J. Procopio, T.C. Pithon-Curi, M. Corless, P. Newsholme, Molecular mechanisms of glutamine action, *Journal of Cellular Physiology* 204(2) (2005) 392-401.
- [11] U.B. Flaring, O.E. Rooyackers, J. Wernerman, F. Hammarqvist, Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle, *Clinical Science* 104(3) (2003) 275-82.
- [12] R.A. Tanhoffer, R.K. Yamazaki, E.A. Nunes, A.I. Pchevozniki, A.M. Pchevozniki, C. Nogata, J. Aikawa, S.J. Bonatto, G. Brito, M.D. Lissa, L.C. Fernandes, Glutamine concentration and immune response of spinal cord-injured rats, *The Journal of Spinal Cord Medicine* 30(2) (2007) 140-6.
- [13] V.F. Cruzat, L.C. Pantaleao, J. Donato, Jr., P.I. de Bittencourt, Jr., J. Tirapegui, Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects

on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25(3) (2014) 345-52.

[14] E.R. Petry, V.F. Cruzat, T.G. Heck, J.S. Leite, P.I. Homem de Bittencourt, Jr., J. Tirapegui, Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways, *Life Sciences* 94(2) (2014) 130-6.

[15] E.R. Petry, V.F. Cruzat, T.G. Heck, P.I. Homem de Bittencourt, Jr., J. Tirapegui, L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats, *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 25(2) (2015) 188-97.

[16] J.M. Lacey, D.W. Wilmore, Is glutamine a conditionally essential amino acid?, *Nutrition Reviews* 48(8) (1990) 297-309.

[17] P. Newsholme, M.M. Lima, J. Procopio, T.C. Pithon-Curi, S.Q. Doi, R.B. Bazotte, R. Curi, Glutamine and glutamate as vital metabolites, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36(2) (2003) 153-63.

[18] E.P. Rutten, M.P. Engelen, A.M. Schols, N.E. Deutz, Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 8(1) (2005) 41-51.

[19] M. Kim, P.E. Wischmeyer, Glutamine, *World Review of Nutrition and Dietetics* 105 (2013) 90-96.

[20] M. Macedo Rogero, J. Tirapegui, R.G. Pedrosa, I. Santana de Oliveira Pires, I. Alves de Castro, Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats, *Nutrition Research* 24(4) (2004) 261-270.

[21] M.M. Rogero, J. Tirapegui, R.G. Pedrosa, I.A. Castro, I.S. Pires, Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise, *Nutrition* 22(5) (2006) 564-71.

[22] R. Raizel, J.S. Leite, T.M. Hypolito, A.Y. Coqueiro, P. Newsholme, V.F. Cruzat, J. Tirapegui, Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of L-glutamine and L-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise, *The British Journal of Nutrition* 116(3) (2016) 470-9.

[23] C.J. Lagranha, S.M. Hirabara, R. Curi, T.C. Pithon-Curi, Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression, *Cell Biochemistry and Function* 25(5) (2007) 563-9.

- [24] V.L. Gabai, M.Y. Sherman, Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock, *Journal of Applied Physiology* 92(4) (2002) 1743-8.
- [25] K.D. Singleton, P.E. Wischmeyer, Glutamine induces heat shock protein expression via O-glycosylation and phosphorylation of HSF-1 and Sp1, *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 32(4) (2008) 371-6.
- [26] S.A. Adibi, Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease, *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 285(5) (2003) G779-88.
- [27] J.T. Silver, H. Kowalchuk, E.G. Noble, hsp70 mRNA temporal localization in rat skeletal myofibers and blood vessels post-exercise, *Cell Stress & Chaperones* 17(1) (2012) 109-20.
- [28] F.W. Booth, W. Lou, M.T. Hamilton, Z. Yan, Cytochrome c mRNA in skeletal muscles of immobilized limbs, *Journal of Applied Physiology* 81(5) (1996) 1941-5.
- [29] I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nature Protocols* 1(6) (2006) 3159-65.
- [30] J.E. Raftos, S. Whillier, P.W. Kuchel, Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte: alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data, *The Journal of Biological Chemistry* 285(31) (2010) 23557-67.
- [31] P. Lund, Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase, , In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., eds), 1985, (1985) pp. 357-363,.
- [32] W.E. Neeley, J. Phillipson, Automated enzymatic method for determining ammonia in plasma, with 14-day reagent stability, *Clinical Chemistry* 34(9) (1988) 1868-9.
- [33] M.H. H.H. Draper, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods in Enzymology* 186 (1990) 421-31.
- [34] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-54.
- [35] C. Chamney, M. Godar, E. Garrigan, K.A. Huey, Effects of glutamine supplementation on muscle function and stress responses in a mouse model of spinal cord injury, *Experimental Physiology* 98(3) (2013) 796-806.
- [36] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods in Enzymology* 233 (1994) 357-63.
- [37] W. Wang, R.H. Choi, G.J. Solares, H.M. Tseng, Z. Ding, K. Kim, J.L. Ivy, L-Alanylglutamine inhibits signaling proteins that activate protein degradation, but does not

- affect proteins that activate protein synthesis after an acute resistance exercise, *Amino Acids* 47(7) (2015) 1389-98.
- [38] A.Y. Coqueiro, R. Raizel, A. Bonvini, M.M. Rogero, J. Tirapegui, Effects of glutamine and alanine supplementation on muscle fatigue parameters of rats submitted to resistance training, *Nutrition* 65 (2019) 131-137.
- [39] V.F. Cruzat, A. Bittencourt, S.P. Scomazzon, J.S. Leite, P.I. de Bittencourt, Jr., J. Tirapegui, Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia, *Nutrition* 30(5) (2014) 602-11.
- [40] E.R. Gilbert, E.A. Wong, K.E. Webb, Jr., Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health, *Journal of Animal Science* 86(9) (2008) 2135-55.
- [41] S. Broer, Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia, *Physiological Reviews* 88(1) (2008) 249-86.
- [42] E. Roth, R. Oehler, N. Manhart, R. Exner, B. Wessner, E. Strasser, A. Spittler, Regulative potential of glutamine--relation to glutathione metabolism, *Nutrition* 18(3) (2002) 217-21.
- [43] W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews* 82(1) (2002) 47-95.
- [44] Y. Inoue, A.J. Pacitti, W.W. Souba, Endotoxin increases hepatic glutamine transport activity, *The Journal of Surgical Research* 54(5) (1993) 393-400.
- [45] T. Welbourne, R. Routh, M. Yudkoff, I. Nissim, The glutamine/glutamate couplet and cellular function, *News in Physiological Sciences* 16 (2001) 157-60.
- [46] J.S. Leite, R. Raizel, T.M. Hypolito, T.D. Rosa, V.F. Cruzat, J. Tirapegui, L-glutamine and L-alanine supplementation increase glutamine-glutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 41(8) (2016) 842-849.
- [47] G.A. Cunningham, N.H. McClenaghan, P.R. Flatt, P. Newsholme, L-Alanine induces changes in metabolic and signal transduction gene expression in a clonal rat pancreatic beta-cell line and protects from pro-inflammatory cytokine-induced apoptosis, *Clinical Science* 109(5) (2005) 447-55.
- [48] D.E. Matthews, R. Harkin, A. Battezzati, D.J. Brillon, Splanchnic bed utilization of enteral alpha-ketoisocaproate in humans, *Metabolism: Clinical and Experimental* 48(12) (1999) 1555-63.
- [49] P. Felig, Amino acid metabolism in man, *Annual Review of Biochemistry* 44 (1975) 933-55.

- [50] V.A. Gazola, R.F. Garcia, R. Curi, T.C. Pithon-Curi, M.S. Mohamad, E.M. Hartmann, H.C. Barrena, R.B. Bazotte, Acute effects of isolated and combined L-alanine and L-glutamine on hepatic gluconeogenesis, ureagenesis and glycaemic recovery in experimental short-term insulin induced hypoglycaemia, *Cell Biochemistry and Function* 25(2) (2007) 211-6.
- [51] C.K. Sen, Glutathione: A key role in skeletal muscle metabolism, in: D.A.Z.R. Author(s): B. Halliwell (auth.), Prof. Dr. L. Packer, Dr. C. K. Sen, Dr. J. O. Holloszy, Dr. M. J. Jackson (eds.) (Ed.), In: *Oxidative Stress in Skeletal Muscle*, 1998, p. 343.
- [52] L.L. Ji, R. Fu, E.W. Mitchell, Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity, *Journal of Applied Physiology* 73(5) (1992) 1854-9.
- [53] L. Austin, H. Arthur, M. de Niese, A. Gurusinghe, M.S. Baker, Micromethods in single muscle fibers. 2. Determination of glutathione reductase and glutathione peroxidase, *Analytical Biochemistry* 174(2) (1988) 575-9.
- [54] D. Cai, J.D. Frantz, N.E. Tawa, Jr., P.A. Melendez, B.C. Oh, H.G. Lidov, P.O. Hasselgren, W.R. Frontera, J. Lee, D.J. Glass, S.E. Shoelson, IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice, *Cell* 119(2) (2004) 285-98.
- [55] D. Van Gammeren, J.S. Damrauer, R.W. Jackman, S.C. Kandarian, The IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy, *FASEB Journal* 23(2) (2009) 362-70.
- [56] S.A. Reed, S.M. Senf, E.W. Cornwell, S.C. Kandarian, A.R. Judge, Inhibition of IkappaB kinase alpha (IKKalpha) or IKKbeta (IKKbeta) plus forkhead box O (Foxo) abolishes skeletal muscle atrophy, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405(3) (2011) 491-6.
- [57] E. Roth, J. Funovics, F. Muhlbacher, M. Schemper, W. Mauritz, P. Sporn, A. Fritsch, Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle, *Clinical Nutrition* 1(1) (1982) 25-41.
- [58] F. da Silva Lima, M.M. Rogero, M.C. Ramos, P. Borelli, R.A. Fock, Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition, *European Journal of Nutrition* 52(4) (2013) 1343-51.
- [59] P. Plomgaard, M. Penkowa, B.K. Pedersen, Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles, *Exercise Immunology Review* 11 (2005) 53-63.

- [60] R.B. Hunter, E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D.A. Essig, S.C. Kandarian, Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy, *FASEB Journal* 16(6) (2002) 529-38.
- [61] P.E. Wischmeyer, Glutamine and heat shock protein expression, *Nutrition* 18(3) (2002) 225-8.
- [62] P.E. Wischmeyer, J. Riehm, K.D. Singleton, H. Ren, M.W. Musch, M. Kahana, E.B. Chang, Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells, *Nutrition* 19(1) (2003) 1-6.
- [63] A.L. Morrison, M. Dinges, K.D. Singleton, K. Odoms, H.R. Wong, P.E. Wischmeyer, Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1, *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 290(6) (2006) C1625-32.
- [64] K.D. Singleton, V.E. Beckey, P.E. Wischmeyer, Glutamine prevents activation of nf-kappab and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis, *Shock* 24(6) (2005) 583-9.
- [65] T. Tanaka, A. Shibazaki, R. Ono, T. Kaisho, HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor kappaB to inhibit inflammatory signaling, *Science Signaling* 7(356) (2014) ra119.
- [66] S.M. Senf, T.M. Howard, B. Ahn, L.F. Ferreira, A.R. Judge, Loss of the inducible Hsp70 delays the inflammatory response to skeletal muscle injury and severely impairs muscle regeneration, *PloS One* 8(4) (2013) e62687.
- [67] N. Grosser, S. Oberle, G. Berndt, K. Erdmann, A. Hemmerle, H. Schroder, Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314(2) (2004) 351-5.
- [68] M.D. Maines, The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37 (1997) 517-54.
- [69] D.M. Suttner, K. Sridhar, C.S. Lee, T. Tomura, T.N. Hansen, P.A. Dennery, Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells, *The American Journal of Physiology* 276(3) (1999) L443-51.
- [70] S. Immenschuh, G. Ramadori, Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target, *Biochemical Pharmacology* 60(8) (2000) 1121-8.
- [71] M. Bar-Shai, E. Carmeli, P. Ljubuncic, A.Z. Reznick, Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation, *Free Radical Biology & Medicine* 44(2) (2008) 202-14.

- [72] M. Locke, E.G. Noble, B.G. Atkinson, Inducible isoform of HSP70 is constitutively expressed in a muscle fiber type specific pattern, *The American Journal of Physiology* 261(5 Pt 1) (1991) C774-9.
- [73] D.E. O'Neill, F.K. Aubrey, D.A. Zeldin, R.N. Michel, E.G. Noble, Slower skeletal muscle phenotypes are critical for constitutive expression of Hsp70 in overloaded rat plantaris muscle, *Journal of Applied Physiology* 100(3) (2006) 981-7.
- [74] T. Ogata, Y. Oishi, R.R. Roy, H. Ohmori, Endogenous expression and developmental changes of HSP72 in rat skeletal muscles, *Journal of Applied Physiology* 95(3) (2003) 1279-86.
- [75] Y. Oishi, K. Taniguchi, H. Matsumoto, A. Ishihara, Y. Ohira, R.R. Roy, Differential responses of HSPs to heat stress in slow and fast regions of rat gastrocnemius muscle, *Muscle & nerve* 28(5) (2003) 587-94.
- [76] H. Takekura, T. Yoshioka, Ultrastructural and metabolic characteristics of single muscle fibres belonging to the same type in various muscles in rats, *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 11(2) (1990) 98-104.
- [77] K.N. Christie, P.J. Stoward, Catalase in skeletal muscle fibers, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 27(4) (1979) 814-9.
- [78] D.A. Riley, J.L. Bain, S. Ellis, A.L. Haas, Quantitation and immunocytochemical localization of ubiquitin conjugates within rat red and white skeletal muscles, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 36(6) (1988) 621-32.
- [79] D.A. Riley, S. Ellis, J.L. Bain, Catalase-positive microperoxisomes in rat soleus and extensor digitorum longus muscle fiber types, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 36(6) (1988) 633-7.
- [80] T. Obinata, K. Maruyama, H. Sugita, K. Kohama, S. Ebashi, Dynamic aspects of structural proteins in vertebrate skeletal muscle, *Muscle & Nerve* 4(6) (1981) 456-88.
- [81] R.P. Beckmann, L.E. Mizzen, W.J. Welch, Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly, *Science* 248(4957) (1990) 850-4.
- [82] A. Ishihara, H. Fujino, F. Nagatomo, I. Takeda, Y. Ohira, Gene expression levels of heat shock proteins in the soleus and plantaris muscles of rats after hindlimb suspension or spaceflight, *The journal of Physiological Sciences* 58(6) (2008) 413-7.
- [83] F. Kawano, A. Ishihara, J.L. Stevens, X.D. Wang, S. Ohshima, M. Horisaka, Y. Maeda, I. Nonaka, Y. Ohira, Tension- and afferent input-associated responses of neuromuscular system of rats to hindlimb unloading and/or tenotomy, *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287(1) (2004) R76-86.

- [84] Y. Ohira, F. Kawano, R.R. Roy, V.R. Edgerton, Metabolic modulation of muscle fiber properties unrelated to mechanical stimuli, *The Japanese Journal of Physiology* 53(6) (2003) 389-400.
- [85] S.M. Senf, S.L. Dodd, J.M. McClung, A.R. Judge, Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy, *FASEB Journal* 22(11) (2008) 3836-45.

TABLE CAPTIONS

Table 1 - Body weight, body weight gain and food intake of rats submitted to 14-days of hindlimb immobilization and supplementation.

	Experimental Groups					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	IMOB	GLN+ALA-IMOB	DIP-IMOB
Biometrics parameters						
Initial body weight (g)	208.7 ± 16.5	209.0 ± 15.4	209.5 ± 30.6	206.8 ± 6.8	206.8 ± 17.5	206.4 ± 11.5
Final body weight (g)	254.6 ± 19.7	264.4 ± 23.5	257.8 ± 39.6	178.7 ± 4.6* †	198.7 ± 10.3* †	197.0 ± 19.7* †
Body weight gain (%)	22.21 ± 7.7	26.52 ± 6.9	23.90 ± 14.7	3.31 ± 15.4* †	4.55 ± 5.3* †	8.32 ± 9.6
Food intake (g/d)	20.69 ± 2.0	20.03 ± 2.4	20.32 ± 2.8	18.72 ± 2.2	19.49 ± 1.6	19.94 ± 1.2

Biometric parameters of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean ± S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

Table 2 - Plasma and erythrocyte parameters.

	Experimental Groups					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	IMOB	GLN+ALA-IMOB	DIP-IMOB
Plasma parameters						
L-Glutamine (mmol/l)	1.08 ± 0.15	1.06 ± 0.10	1.08 ± 0.16	0.68 ± 0.08* †	1.16 ± 0.10 [#]	1.23 ± 0.15 [#]
L-Glutamate (mmol/l)	0.63 ± 0.03	0.66 ± 0.02	0.67 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.63 ± 0.05	0.62 ± 0.02
GLN/GLU ratio	1.70 ± 0.17	1.61 ± 0.17	1.61 ± 0.23	1.09 ± 0.15*	1.86 ± 0.25 [#]	1.98 ± 0.23 [#]
Ammonium	1.09 ± 0.52	1.07 ± 0.53	1.08 ± 0.34	1.44 ± 0.39	1.27 ± 0.24	1.26 ± 0.71
TNF-α (pg/ml)	1.34 ± 0.16	1.32 ± 0.15	1.31 ± 0.21	1.85 ± 0.04* †	1.12 ± 0.08* [#]	1.05 ± 0.04* [#] †
TBARS (nmol MDA/mg protein)	1.04 ± 0.45	1.02 ± 0.40	0.94 ± 0.59	1.93 ± 0.62* †	0.67 ± 0.33 [#]	0.57 ± 0.28 [#]
Erythrocyte parameters						
GSH (μmol/ml)	60.82 ± 8.98	60.18 ± 11.06	59.89 ± 7.57	48.67 ± 4.82* †	65.85 ± 3.28 [#]	67.26 ± 4.18 [#]
GSSG (μmol/ml)	14.41 ± 2.95	14.49 ± 3.33	14.00 ± 5.16	25.64 ± 2.91* †	13.07 ± 1.93 [#]	12.89 ± 2.70 [#]
GSSG/GSH ratio	0.24 ± 0.05	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.08	0.53 ± 0.07* †	0.20 ± 0.02 [#]	0.19 ± 0.04 [#]

Plasma and erythrocyte parameters of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP)

animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. * $p < 0,05$ compared to CTRL group; # $p < 0,05$ compared to IMOB group; † $p < 0,05$ compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

Table 3 - Soleus muscle parameters.

Solues variables	Experimental Groups					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	IMOB	GLN+ALA-IMOB	DIP-IMOB
L-Glutamine ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	5.94 \pm 0.58	6.00 \pm 1.24	5.99 \pm 0.52	2.86 \pm 0.14* †	6.76 \pm 0.18 [#]	6.84 \pm 0.47 [#]
L-Glutamate ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	1.98 \pm 1.13	2.02 \pm 0.60	2.00 \pm 0.44	2.04 \pm 0.35	2.04 \pm 0.35	2.07 \pm 0.34
GLN/GLU ratio	2.98 \pm 0.85	3.19 \pm 1.01	3.13 \pm 0.82	1.52 \pm 0.58* †	3.43 \pm 0.79 [#]	3.38 \pm 0.68 [#]
L-Glutamine (nmol/mg protein)	24.84 \pm 0.95	24.26 \pm 1.23	24.87 \pm 5.53	14.08 \pm 0.76* †	43.79 \pm 4.81* [#] †	41.63 \pm 4.45* [#] †
L-Glutamate (nmol/mg protein)	5.75 \pm 1.59	6.78 \pm 0.14	6.59 \pm 2.36	6.91 \pm 1.42	6.96 \pm 1.19	6.90 \pm 1.39
GLN/GLU ratio	3.62 \pm 0.14	3.58 \pm 0.18	3.75 \pm 0.68	1.91 \pm 0.28* †	6.32 \pm 0.47* [#] †	6.73 \pm 1.58* [#] †
GSH ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	6.65 \pm 0.86	6.74 \pm 0.46	6.81 \pm 0.52	5.11 \pm 0.36* †	6.83 \pm 0.52 [#]	6.82 \pm 0.67 [#]
GSSG ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	1.73 \pm 0.24	1.75 \pm 0.49	1.75 \pm 0.17	2.46 \pm 0.17* †	1.88 \pm 0.23 [#]	1.82 \pm 0.30 [#]
GSSG/GSH ratio	0.26 \pm 0.04	0.26 \pm 0.08	0.26 \pm 0.02	0.48 \pm 0.01* †	0.28 \pm 0.03 [#]	0.27 \pm 0.03 [#]

GSH (nmol/mg protein)	32.15 ± 6.73	29.23 ± 5.05	32.80 ± 6.05	20.62 ± 7.20*	30.52 ± 4.79 [#]	31.67 ± 6.53 [#]
GSSG (nmol/mg protein)	6.64 ± 2.23	8.53 ± 2.54	8.94 ± 1.87	9.55 ± 3.66	6.75 ± 2.84	7.81 ± 4.00
GSSG/GSH ratio	0.21 ± 0.09	0.30 ± 0.11	0.28 ± 0.07	0.46 ± 0.07* †	0.23 ± 0.10 [#]	0.26 ± 0.13 [#]
TBARS (nmol MDA/g fresh tissue)	1.61 ± 0.36	1.57 ± 0.43	1.59 ± 0.60	5.78 ± 1.33* †	3.95 ± 0.73 [#] †	3.83 ± 2.24 [#] †
Carbonyl protein content (nmol/mg protein)	0.19 ± 0.09	0.19 ± 0.15	0.16 ± 0.07	0.34 ± 0.07* †	0.15 ± 0.07 [#]	0.14 ± 0.07 [#]
Myofibrillar protein content (mg protein/mg fresh tissue)	0.38 ± 0.04	0.34 ± 0.06	0.33 ± 0.05	0.12 ± 0.08* †	0.31 ± 0.10 [#]	0.26 ± 0.10 [#]
TNF-α (pg/mg protein)	0.38 ± 0.08	0.37 ± 0.13	0.38 ± 0.05	0.86 ± 0.10* †	0.44 ± 0.06 [#]	0.33 ± 0.10 [#]

Soleus muscle parameters of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean ± S.E.M.

* p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

Table 4 - Gastrocnemius muscle parameters.

	Experimental Groups					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	IMOB	GLN+ALA-IMOB	DIP-IMOB
Gastrocnemius variables						
L-Glutamine ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	3.93 \pm 0.98	3.82 \pm 0.51	4.21 \pm 0.52	2.41 \pm 0.21* †	5.46 \pm 0.36* † #	4.60 \pm 0.49#
L-Glutamate ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	1.18 \pm 0.17	1.03 \pm 0.08	1.11 \pm 0.05	1.11 \pm 0.01	1.12 \pm 0.07	1.14 \pm 0.06
GLN/GLU ratio	3.41 \pm 1.14	3.70 \pm 0.28	3.79 \pm 0.24	2.17 \pm 0.17* †	4.90 \pm 0.54* † #	4.04 \pm 0.52#
L-Glutamine (nmol/mg protein)	25.38 \pm 1.09	25.06 \pm 9.00	25.62 \pm 5.38	6.93 \pm 0.63* †	24.78 \pm 3.22#	24.01 \pm 2.56#
L-Glutamate (nmol/mg protein)	4.40 \pm 0.59	4.66 \pm 1.46	4.51 \pm 0.21	4.70 \pm 0.27	4.78 \pm 1.53	4.78 \pm 0.50
GLN/GLU ratio	5.83 \pm 0.59	5.88 \pm 2.46	5.73 \pm 1.41	1.48 \pm 0.17* †	5.59 \pm 1.73#	5.06 \pm 0.64
GSH ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	6.79 \pm 1.74	6.40 \pm 1.45	6.52 \pm 0.80	5.16 \pm 0.46*	7.01 \pm 0.80#	6.93 \pm 1.09#
GSSG ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue)	1.83 \pm 0.67	1.78 \pm 0.55	1.79 \pm 0.24	6.41 \pm 0.86* †	1.22 \pm 0.36#	1.15 \pm 0.31#
GSSG/GSH ratio	0.28 \pm 0.12	0.28 \pm 0.06	0.26 \pm 0.06	0.41 \pm 0.08* †	0.18 \pm 0.05#	0.17 \pm 0.03* # †

GSH (nmol/mg protein)	27.61 ± 2.63	28.55 ± 9.35	27.26 ± 6.32	9.46 ± 3.52* †	35.96 ± 2.31* #	35.97 ± 4.40* #
GSSG (nmol/mg protein)	2.53 ± 0.39	3.33 ± 2.75	3.24 ± 2.49	4.72 ± 1.76	2.53 ± 0.88	2.87 ± 1.30
GSSG/GSH ratio	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.06	0.11 ± 0.06	0.53 ± 0.03* †	0.07 ± 0.10#	0.08 ± 0.03#
TBARS (nmol MDA/g fresh tissue)	1.30 ± 0.30	1.29 ± 0.19	1.31 ± 0.13	1.78 ± 0.26* †	1.34 ± 0.21#	1.29 ± 0.16#
Carbonyl protein content (nmol/mg protein)	53.04 ± 26.09	53.83 ± 15.50	50.44 ± 11.17	96.04 ± 19.14* †	69.27 ± 6.95#	70.35 ± 9.87#
Myofibrillar protein content (mg protein/mg fresh tissue)	2.89 ± 0.53	2.96 ± 1.03	2.87 ± 1.40	1.40 ± 0.30* †	2.88 ± 0.50#	2.68 ± 0.40#
TNF-α (pg/mg protein)	0.49 ± 0.04	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.04	0.54 ± 0.02* †	0.47 ± 0.02#	0.43 ± 0.04* # †

Gastrocnemius muscle parameters of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean ± S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

FIGURE CAPTIONS

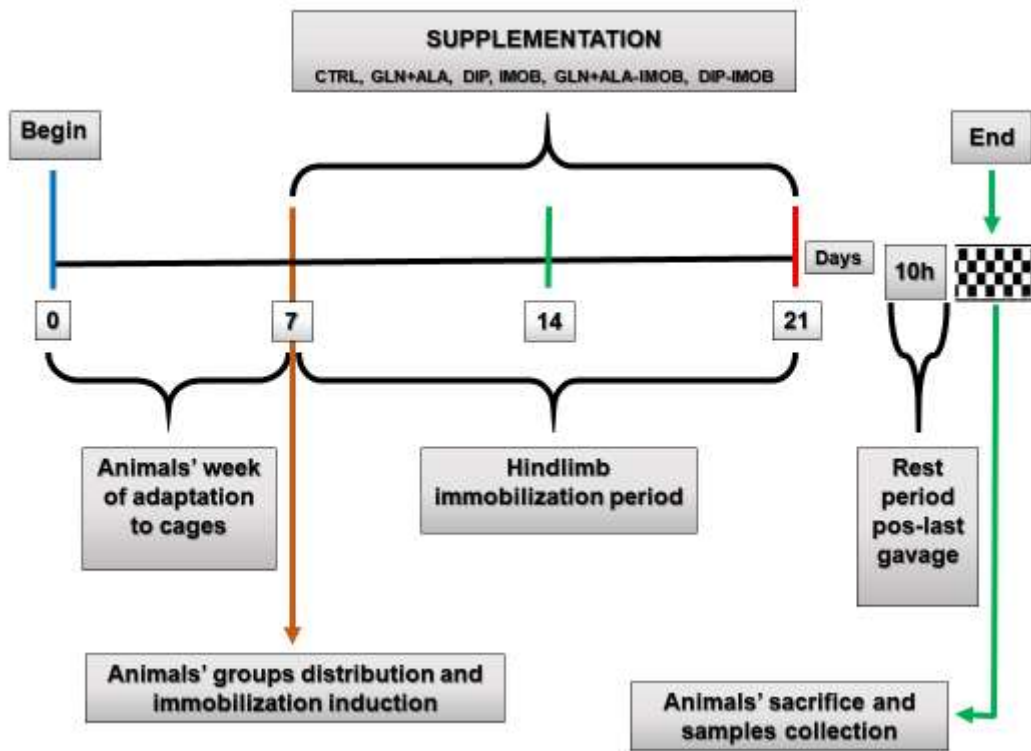


Figure 1 – Schedule and experimental design of the Immobilization protocol.

Immobilization protocol details

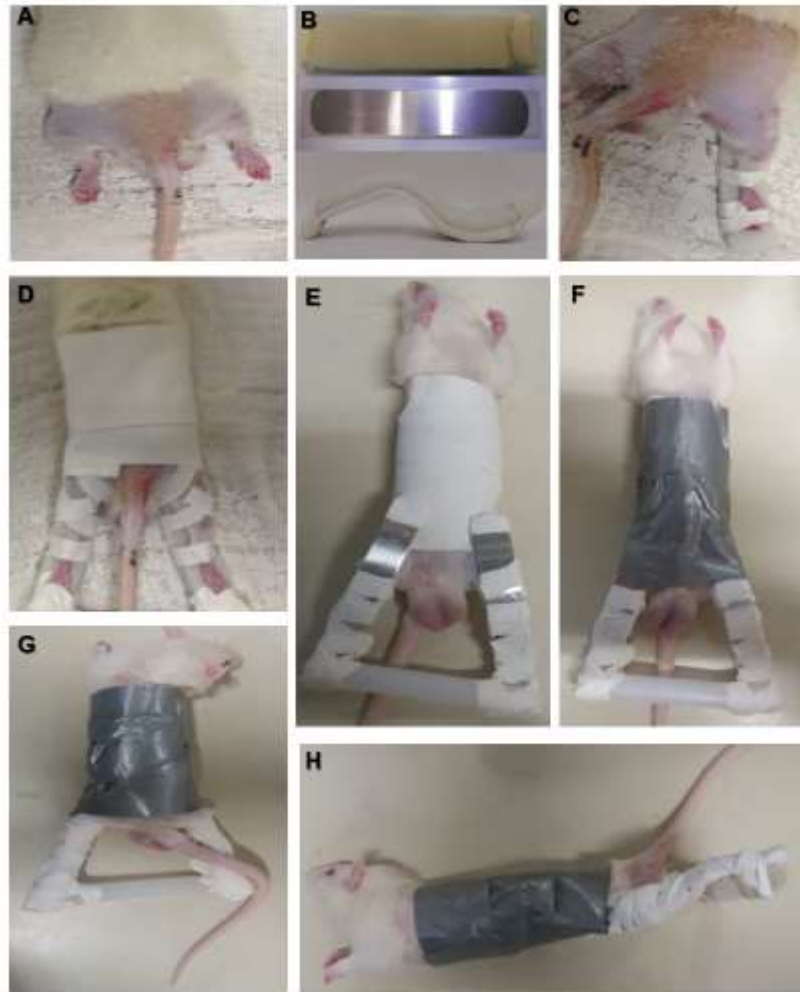


Figure 2 - Immobilization protocol details: (A) depilation of the legs and middle dorsum-caudal portion of the animals through the use of a haircut machine; (B) metal splints (aluminum) used for making the immobilization apparatus. They were coated with foam on the side that was kept in contact with the immobilized body segment. The metal splints were molded according to the anatomy and angulation in which the hip (~160°), knee (~180°) and ankle joints (~115 - 120°) should be fixed so as to leave both hind legs fully extended to the hip and knee joints and the ankle joint in plantar flexion; (C) in order to avoid venous occlusion, the splints were fixed to each leg using strips of patch adhesive tape, which were affixed in "X" format; (D) in order to avoid lacerations and skin abrasions, the tips of the metal splints were coated with hypoallergenic adhesive. The same procedure was adopted in relation to the animals dorsum; (E) in this procedure, care was taken to avoid obstruction of animals urination and defecation; (F) to limit abduction movement of the hips from the animals, an abductor wedge, which consisted of a small plastic cylinder, was attached to the immobilizing apparatus; (G and H) in order to promote the full fixation of the splints and, to prevent the animals from chewing the immobilization apparatus, the abdomen and

dorsum of these ones were wrapped with the layer of adhesive tape, type silver-tape (Scotchcast Plus, 3M).

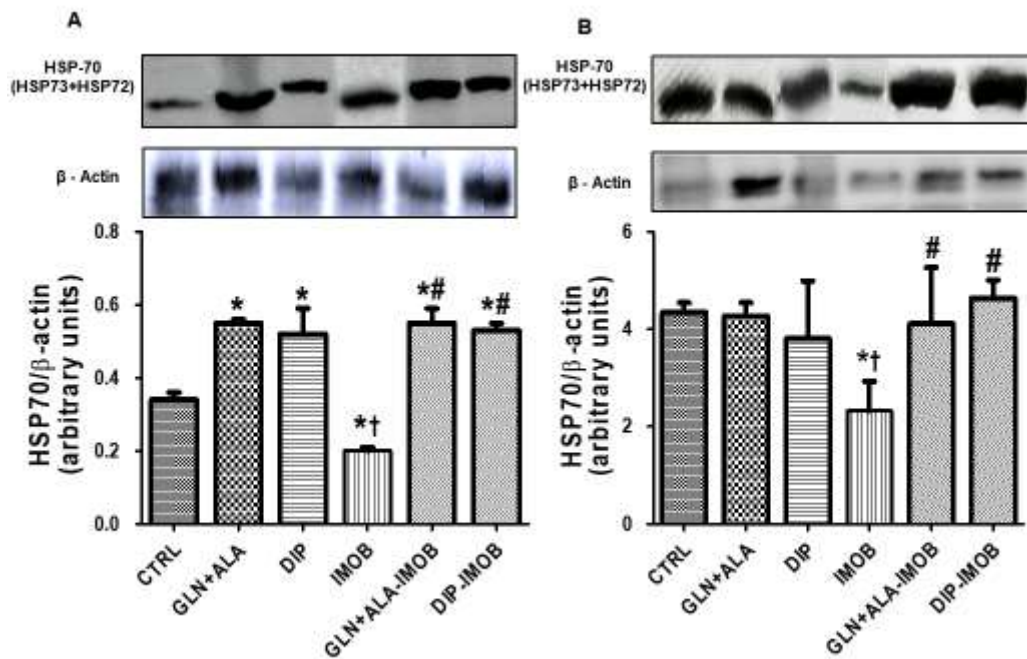


Figure 3 – Representative Western blot showing the analysis of HSP70 protein expression in soleus (A) and gastrocnemius muscle (B) of Wistar rats ($n = 8$ per group) subjected to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. of duplicate experiments. * $p < 0,05$ compared to CTRL group; # $p < 0,05$ compared to IMOB group; † $p < 0,05$ compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

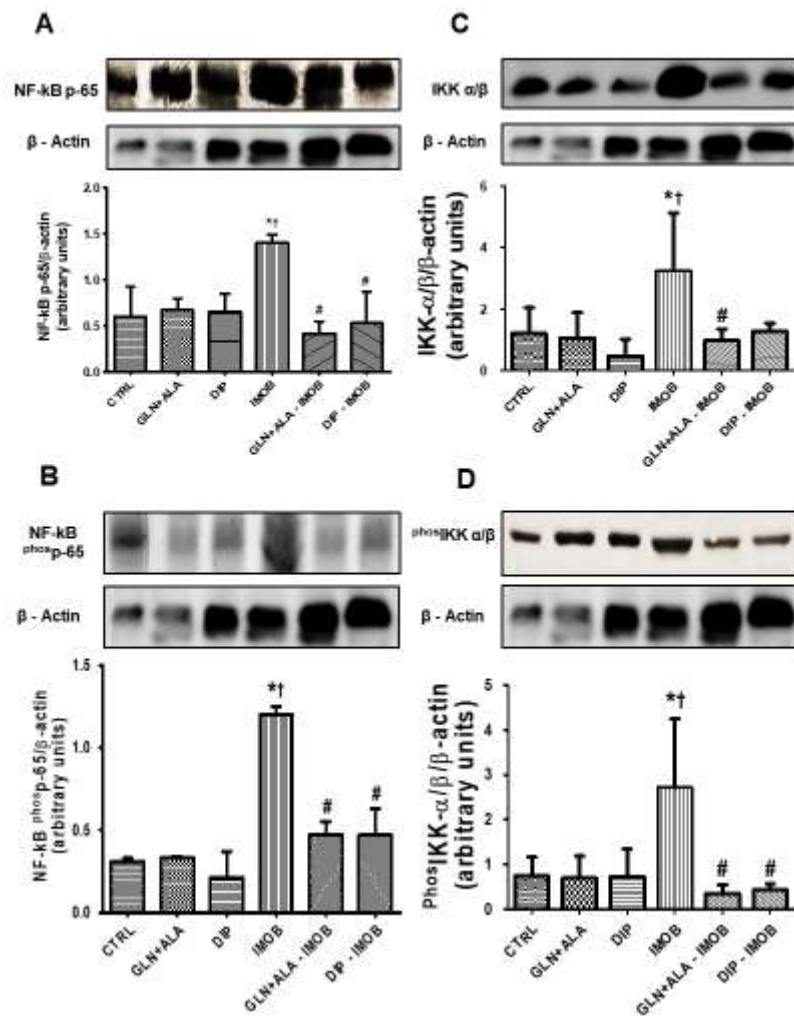


Figure 4 - Representative Western blot showing the analysis of total NF-kB p65 (A), phosphorylated NF-kB p65 (B), total IKK α/β (C) and phosphorylated IKK α/β (D) protein expression in soleus muscle of Wistar rats ($n = 8$ per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. of duplicate experiments. * $p < 0,05$ compared to CTRL group; # $p < 0,05$ compared to IMOB group; † $p < 0,05$ compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

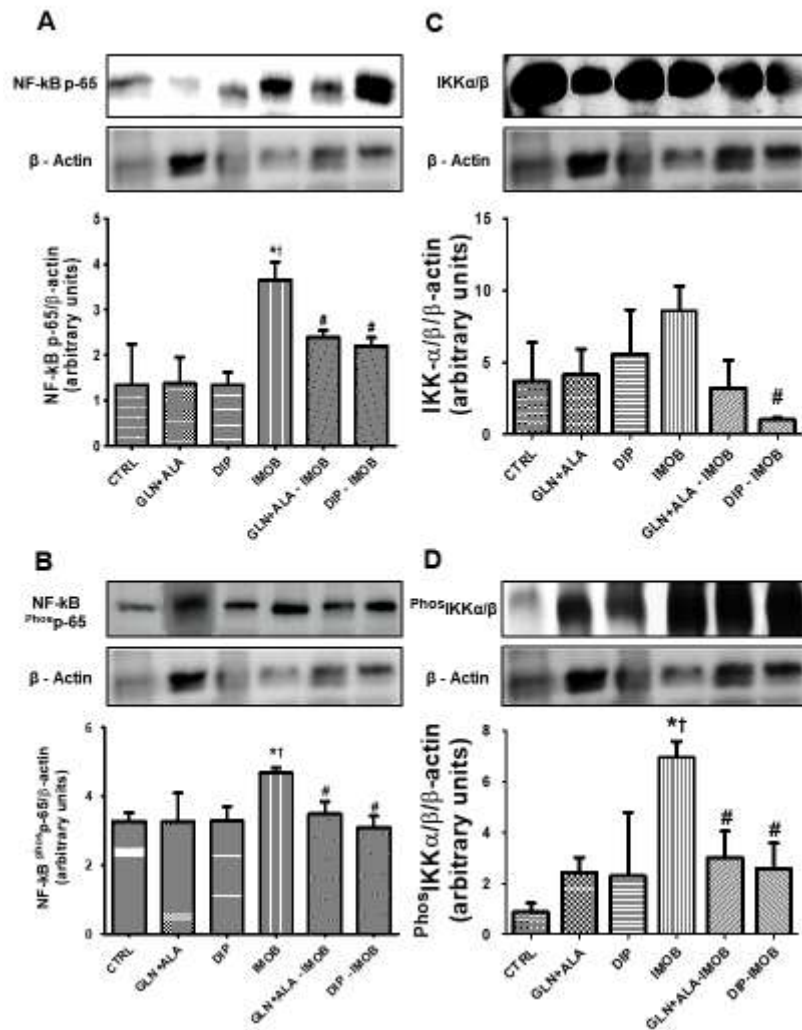


Figure 5 - Representative Western blot showing the analysis of total NF-kB p65 (A), phosphorylated NF-kB p65 (B), total IKKα/β (C) and phosphorylated IKKα/β (D) protein expression in gastrocnemius muscle of Wistar rats ($n = 8$ per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. of duplicate experiments. * $p < 0,05$ compared to CTRL group; # $p < 0,05$ compared to IMOB group; † $p < 0,05$ compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

5.2. Rascunho do manuscrito do Artigo 2 intitulado: Oral L-glutamine supplementation prevents rat's skeletal muscle mass wasting induced by immobilized-disuse muscle atrophy, a ser submetido ao periódico Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.

TITLE PAGE

Oral L-glutamine supplementation prevents rat's skeletal muscle mass wasting induced by immobilized-disuse muscle atrophy

Running Title: Oral L-glutamine supplementation prevents skeletal muscle loss in immobilized rats

AUTHORS

Éder Ricardo Petry^{1,2*}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99509-6903. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: eder.petry@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0003-3786-3187

Diego de Freitas Dresch², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99202-6303. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: diego.fisio@gmail.com

Clarice Carvalho², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99326-8988. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: claricecarvalho.martins@gmail.com

Patricia Calçada Medeiros², postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 98533-0700. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: pacame.patricia@hotmail.com

Tatiana Gomes Rosa³, postal address: 123, Baronesa do Gravataí Street, Mario Quintana Faculty, Cidade Baixa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90160-070. Phone number: +55 51 99194-0248. Fax number: +55 51 3308-5534, email address: tatianagr3@hotmail.com

Cleverson Morais de Oliveira^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do

Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99662-0715, email address: cleverson.oliveira@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0003-0861-6136

Leo Anderson Meira Martins^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99662-0715, email address: leo.meira@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0003-0878-0489

Fátima Costa Rodrigues Guma^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 99984-5841, email address: fatima.guma@ufrgs.br

Norma Possas Marroni^{4,5}, postal address: 2350, Ramiro Barcelos Street, Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-903. Phone number: +55 51 99964-3011, email address: nmarroni@terra.com.br, Orcid ID: 0000-0001-7856-7953

Clóvis Milton Duval Wannmacher^{1,2}, postal address: 2600, Ramiro Barcelos Street, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Santa Cecília, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip-Code: 90035-003. Phone number: +55 51 3308-5575, email address: clovisdw@ufrgs.br, Orcid ID: 0000-0002-7826-8416

*Correspondent author

¹ Post-Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Famaqui – Mario Quintana Faculty, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁵ Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Experimental Research Center, Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA), UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Background Skeletal muscle disuse induces myofibrillar atrophy and muscle mass wasting mediated by pro-apoptotic caspase 3 activity and proteolytic p38 MAPK and Foxo3a signaling pathways activation. L-glutamine (GLN) supplementation has shown mediated antiapoptotic effects via cytoprotective 70-kDa heat shock protein (HSP70) expression modulation. However, its effects on skeletal muscle mass loss protection, during a muscle disuse period are little known yet. This study investigated the effects of oral supplementation with L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA solution), both in their free forms and L-alanyl-L-glutamine (DIP), on pro-apoptotic caspase 3 activity, proteolytic p38 MAPK and Foxo3a pathways activation even as, on cytoprotective HSP70 protein expression and muscle cross sectional area in the slow-twitch soleus and fast-twitch gastrocnemius skeletal muscle of rats submitted to 14-days of bilateral hindlimb immobilization-induced disuse muscle atrophy.

Methods Forty-eight Wistar rats were randomly distributed into 6 groups: hindlimb immobilized (IMOB group) and hindlimb immobilized orally supplemented with either L-glutamine (1 g.kg⁻¹) plus L-alanine (0.61 g.kg⁻¹) (GLN+ALA-IMOB group) or 1.49 g.kg⁻¹ of DIP (DIP-IMOB group). Baselines parameters were obtained from no-immobilized (CTRL) and no-immobilized supplemented GLN+ALA and DIP baselines groups. All animals, including CTRL and IMOB rats (water), were supplemented via intragastric gavage for 14 days, concomitantly to immobilization period. Plasma and muscle GLN concentrations, plasma cortisol and muscle caspase 3 levels, muscle HSP70, p38 MAPK and FOXO3a protein expression and muscle cross sectional area (MCSA) were measured. ANOVA, with Tukey (HSD) posthoc, was used and $p < 0.05$ was considered significant.

Results Relative to CTRL, GLN+ALA, and DIP baselines groups, IMOB rats presented MCSA significantly reduced, what reverberate in reduced plasma and muscle GLN concentration, which was restored in both GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals ($p < 0.05$). Compared to IMOB rats, GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals present increased muscle HSP70 protein expression both in slow twitch soleus and fast twitch gastrocnemius muscle ($p < 0.05$), which attenuated muscle caspase-3 levels and, p38 MAPK and Foxo3a protein expression.

Conclusion: the findings herein shown attest that oral GLN+ALA or DIP supplementation mediated anti-apoptotic, anti-proteolytic and cytoprotective effects, preventing rat's skeletal muscle mass wasting induced by immobilization-muscle disuse atrophy.

Key Words: Glutamine supplementation; muscle atrophy; caspase 3; p38 MAPK; FOXO3a; HSP70.

INTRODUCTION

Skeletal muscle atrophy is a debilitating catabolic response that commonly accompanies systemic metabolic stressors situations such as sepsis, aids, cancer, diabetes and malnutrition, or prolonged periods of inactivity or disuse, such as limb immobilization, long bed rest, denervation and surgical trauma (Jackman & Kandarian, 2004). An increased rate of muscle mass wasting, fact that is closely related to a decreased muscle myofiber size, strength production capacity and resistance to fatigue as well as, a reduced quality of life they present themselves as the main consequences of skeletal muscle atrophy (Jackman & Kandarian, 2004). Multiple neuroendocrine, inflammatory, immune and redox responses as well as, cell signaling pathways are activated through distinct upstream mechanisms, during muscle atrophy (Jackman & Kandarian, 2004; Lecker et al., 2004). Among this one the activation of the mitogen-activated protein kinase family (MAPKs family pathway) and forkhead box O family (FOXO) signalling pathways, triggered by an imbalance among the synthesis and removal process of oxygen and nitrogen reactive species (ROS/RNS), situation known with oxidative stress, along with increased synthesis and release of pro-inflammatory cytokines, include necrosis tumoral factor- α (TNF- α), has been shown contribute decisively to the overall muscle mass wasting observed in situations like the above mentioned (Li et al., 2005; Powers et al., 2007; Li et al., 2008). Nonetheless, the oxidative-induced activation of this cell signaling pathways has been correlated with the phosphorylation and subsequent activation of a protease proteins family called caspase (cysteine-dependent aspartate protease) which are crucial inductors of apoptosis or cell death programmed as well as, hiperactivation of the main protein degradation complex of the body, the 20S/26S ubiquitin-proteasome system (Talbert et al., 2013).

In concentrations among 0.5 to 0.9 mmol/l (20% of total free amino acids pool) in plasma and 20 mmol/Kg wet weight tissue (60% of total free amino acids pool) in skeletal muscle, L-glutamine (GLN) is the most abundant free amino acid of the body (Newsholme et al., 2003). Indeed, GLN is actively synthesized, according to body needs, by different organs such as kidneys, lungs, liver and skeletal muscle which, quantitatively, sets up in the main tissue of synthesis, stock and endogenous release of GLN to the body (Newsholme et al., 2003). That way, skeletal muscle plays a vital role in the body GLN homeostasis maintenance (Wang et al., 2015). In the cell, GLN participates and plays a key role in many fundamental biochemical processes to the maintenance of cellular homeostasis, including: inter-organ nitrogen transport, intermediate amino acid metabolism, cell proliferation (especially cells of immune system), regulation of the acid-base balance and as a precursor of nucleic acids synthesis (Newsholme et al., 2003). The protection of cells and tissues against oxidative stress-mediated apoptosis is another critical intracellular process in that GLN is implicated, since this amino acid, through a crucial modulatory action has shown modulate the cellular stress responses (Curi et

al., 2005) conferring cytoprotective effects to cells and tissues. In this context, experimental evidences (Petry et al., 2014; Petry et al., 2015; Raizel et al., 2016) has highlight the critical modulator role of GLN on heat shock proteins (HSPs) expression. HSPs, especially the 70-kDa family (73-kDa-HSP73 constitutively isoform + 72-kDa-HSP72 inducible isoform) are known as "stress response proteins" whose expression is highly induced by different types of agents and catabolic stimuli, such as oxidative, thermal and metabolic stresses as well as, infection and intense exercise (Gabai & Sherman, 2002). Within the cell, the HSPs act as a molecular chaperones, contributing to the cellular homeostasis maintenance, providing cytoprotection and/or "stress tolerance" to cells and tissues, against continued injury, fact that could cause cell death by apoptosis or impair recovery process (Gabai & Sherman, 2002). The underlying mechanism behind this GLN-modulation on HSP expression isn't entirely know yet. However, previous studies shown that in part, this modulation is associated with GLN-induced O-glycosylation and phosphorylation of main heat shock transcriptional factor, HSF-1, fact that induces the nuclear translocation of this transcriptional factor and its binding, into the cell nucleus, to heat shock transcriptional factors elements (HSEs), resulting on trigger the HSP-ribosomal transcriptional machinery expression (Singleton & Wischmeyer, 2008).

Under normal or good health conditions, GLN is considered as a non-essential amino acid (Lacey & Wilmore, 1990). However, under stressful situations such as several illness, including cancer, aids and sepsis or physiological catabolic conditions such as traumas, spinal cord injury, burns and intense, prolonged or exhaustive physical exercises (Flaring et al., 2003; Cruzat et al., 2014b; Petry et al., 2014; Petry et al., 2015), among others, GLN has been termed as a conditionally essential amino acid (Lacey & Wilmore, 1990). Indeed, under all this stress and catabolic situations, as result of an imbalance among the body GLN requirement and, its de novo synthesis ability, plasma, and skeletal muscle GLN concentrations can be reduced by more than 50% (Lacey & Wilmore, 1990). This fact, given away the critical role of GLN in diverse cell functions, has been directly related to trigger of disaggregating actions to cellular homeostasis (Rutten et al., 2005; Kim & Wischmeyer, 2013). Previous studies have suggested that when the body GLN requirement exceeds its de novo synthesis, GLN supplementation provides an exogenous source of this amino acid, improving GLN "status" (Rogero et al., 2004; Rogero et al., 2006) attenuating inflammation (Raizel et al., 2016) and, protecting a wide range of cell and tissues against injuries and insults (Lagranha et al., 2007; Petry et al., 2014; Petry et al., 2015). However, some studies have described that GLN has an extensive intestinal metabolism, serving as preferred respiratory fuel and precursor for intestinal protein synthesis. This fact causes the gut epithelium to retain more than 50% of dietary GLN that is consumed, resulting in a reduced availability of GLN for plasma and other tissues (Newsholme et al., 2003). That way, the efficacy of GLN supplementation, especially when administrated by orally or

enterally pathway, in its free form, is still target of controversy and questionings (Rogero, 2004; Rogero et al. (2006). On the other hand, several researches have shown that the supplementation with dipeptides containing GLN, such as L-alanyl-L-glutamine (DIP), have been shown a more effective and stable non-invasive nutritional alternative to increase the availability of GLN to the body, both in metabolic stress and in rest situations (Rogero et al., 2006; Petry et al., 2014; Petry et al., 2015). The higher efficiency of supplementation rendered by DIP is a result of its most hydrolytically stable molecular structure and mitigated use by enterocytes through glycopeptide transport protein-1 (Pept-1); (Adibi, 2003). In recent study, we observed that oral GLN supplementation in DIP form or as a solution containing this amino acid along with L-alanine (GLN+ALA solution), both in the free forms, in a dipeptide-like dosage (1g/kg of body weight) was efficient in re-established GLN availability. This fact improved the intracellular redox status, via GLN-GSH axis as well as, induced an increase in HSP70 protein expression, which reverbered positively on skeletal muscle protein content degradation attenuation of rats submitted to 14-days of hindlimb immobilization (Petry et al., 2019). Although GLN supplementation shows these experimental outcomes, its direct effects on skeletal muscle mass loss protection, during a muscle disuse period are little known yet. That way, guided by our previous studies, in the present study we hypothesized that oral GLN supplementation, either in DIP form or GLN+ALA solution form could prevent rat's skeletal muscle mass wasting attenuating the immobilization-induced activation of pro-apoptotic caspase 3 and proteolytic cell signaling pathways, such as p38 MAPK and FOXO3a, via a modulation on cytoprotective HSP70 expression. To test this hypothesis, we supplemented male Wistar rats with DIP and GLN+ALA solution and, concomitantly, exposed these animals to 14-days of bilateral hindlimb immobilization using the experimental model previously proposed by Petry et al. (2019).

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

All procedures and experiments were conducted with the approval of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA - protocol n° 29389), and were performed according to the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation. Forty-eight male adult Wistar rats (55-60 d-old, 199 ± 37g body wt) obtained from the Central Animal House (Creal) of UFRGS, were housed in individual cages and maintained under a 12:12 h light-dark cycle, room temperature of 22 ± 2°C and relative humidity of 60%. Food (standard laboratory rat chow - SUPRA) and water were provided ad libitum throughout the experimental period. The animal's body weight and food intake were monitored daily during the

whole experimental period. After 1 week of acclimation to cage (one rat per cage), the animals were weighed and randomly distributed into six experimental groups (n = 8/group): IMOB group - immobilized rats which received equivalent amounts of water, by 14 days, via intragastric gavage; GLN+ALA-IMOB group - immobilized rats, which were subjected to 14 days of oral supplementation, via intragastric gavage, with a solution containing L-glutamine (1 g/Kg-1 of body weight per day) and L-alanine (0.61 g/Kg-1 of body weight per day) both in their free forms; DIP-IMOB group – immobilized rats, which were submitted to 14 days of oral supplementation, via intragastric gavage, with the dipeptide L-alanyl-L-glutamine (1.49 g/Kg-1 of body weight per day). Baseline parameters were obtained from control animals (CTRL group) – non-immobilized rats, which received equivalent amounts of water, by 14 days, via intragastric gavage; GLN+ALA group – non-immobilized rats, which were submitted to 14 days of oral supplementation, via intragastric gavage, with a solution containing L-glutamine (1 g/Kg-1 of body weight per day) and L-alanine (0.61 g/Kg-1 of body weight per day) both in their free forms; and, DIP group – non-immobilized rats, which were submitted to 14 days of oral supplementation, via intragastric gavage, with the dipeptide L-alanyl-L-glutamine (1.49 g/Kg-1 of body weight per day). The amount of DIP was calculated so that the total amount of GLN administered to the animals was the same in its isolated form, i.e., 1g of GLN/kg body weight/day. The choice for this supplement protocol was based in our previous studies (Petry et al., 2014; Petry et al., 2015; PETRY et al., 2019) when this same dosage was used, finding effects on plasma and tissue GLN concentration. In this sense and consequently, GLN+ALA, GLN+ALA-IMOB, DIP, and DIP-IMOB groups received isocaloric and isonitrogenous treatments, respectively. Daily supplementations, including CTRL and IMOB groups, were administered through intragastric gavage for a total period of 14 days concomitantly to immobilization period, which also had 14 days of duration. The supplements were carefully provided to the animals using gastric gavage cleaned and sterilized at every supplementation time. The first gavage started 6h after the induction of immobilization, then once a day in the afternoon, with the last being given, in the afternoon of the 14th day of the immobilization period. This time-schedule following the previous recommendations of was choiced followed in order to eliminate results that reflected an acute single dose effect (Rogerero et al., 2004).

Free GLN and ALA were supplied by Ajinomoto Interamerican Industry and Commerce Ltd. (São Paulo, Brazil), whereas L-alanyl-L-glutamine DIP [Dipeptiven®; Fresenius Kabi S.A manufactured the solution, consisting of 20mg of L-alanyl-L-glutamine (which equals 8.2g of L-alanine and 13.46g of L-glutamine) dissolved in 100mL of H₂O.

The euthanasia (sacrifice) of the animals was performed 10 hours after the last gavage session, by means of decapitation in a guillotine, as previously described by Petry et al. (2014) and Petry et

al. (2015). The choice for this period was based in the study of Silver et al. (2012), which described this to be the maximum time of HSP70 mRNA expression stability, the main molecular target of the present study.

Immobilization protocol

In the current study, the animals were submitted to 14-days of bilateral hindlimb immobilization through the use of the immobilization experimental model previously proposed by Petry et al. (2019).

Biochemical parameters assessment

Immediately after euthanasia, blood was collected in heparinized tubes (500U/L) and centrifuged at 1000 x g for 5 minutes. After this procedure, plasma aliquots were collected and stored at -80°C for further determinations of the GLN and cortisol levels. On the day of measurements, plasma was TCA-deproteinized and immediately processed for GLN concentration, which were determined spectrophotometrically to 340nm (Lund, 1985) by using a commercial kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adapted for microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA). Plasma cortisol levels were measured spectrophotometrically to 450nm, using a commercial kit (SE – 120082 - Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, MO, USA) following the manufacturer's instructions.

Muscle preparations

Immediately after the animals' sacrifice, soleus and gastrocnemius muscle were surgically excised and immediately frozen by freeze-clamped, in liquid nitrogen for the determination of the GLN concentration and caspase-3 activity. Muscle samples destined to be electrophoresed and immunoblotted were immediately freeze-clamped and frozen in liquid nitrogen in the presence of protease and phosphatase inhibitors. Muscle GLN concentration were TCA extracted and spectrophotometrically assayed to 340nm, using a commercial kit (Sigma-Aldrich Diagnostics kit, Saint Louis, MO, USA), adapted for microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV/VIS, Sunnyvale, CA, USA; (Lund, 1985). Mean values are reported as micromoles of GLN per gram of fresh tissue ($\mu\text{mol/g}$ fresh tissue) and as nanomoles of GLN per milligram of protein (nmol/mg protein).

Western blot analysis

Protein immunoccontent abundance was determined in skeletal muscle samples via Western Blot analysis following the methodology previously described by Petry et al. (2019). Appropriated primary antibodies: HSP70 (1:1000, #4872 Cell Signaling Technology), p38 MAPK α/β (clone A-12, 1:1000, SC-7972 Santa Cruz Biotechnology), phosphorylated-p38 MAPK (Thr 180/182, 1:1000, #9211 Cell Signaling Technology), FOXO3a (clone H-114, 1:1000, SC-11351 Santa Cruz Biotechnology) and phosphorylated-FOXO3a (clone p-FKHRL1, Thr 32 Ser 253, 1:1000, SC-12357 Santa Cruz Biotechnology) as well as, peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit IgG (1:10.000, SC-2357 Santa Cruz Biotechnology) and peroxidase-conjugated anti-mouse IgGk (1:10.000, SC-516102 Santa Cruz Biotechnology) secondary antibodies, were used to interest proteins detectation. A mouse monoclonal anti- β -actin antibody (clone AC-15, 1:5000, A-1978 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to verify correct protein loading. The blots were visualized in an Image Quant 400 (GE Healthcare, Amersham, UK) image system, with a solution prepared with chemo-luminescence ECL-Western blotting reagent, following manufacturer's instructions (Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

Muscle Caspase-3 activity measurement

Caspase-3 activity level was analyzed as an index of muscle atrophy-induced apoptosis, in soleus and gastrocnemius muscle. That way, following the caspase assay protocol previously described by Kaushal et al. (2014), 10 to 20mg of frozen soleus and gastrocnemius tissue samples were mechanically homogenized 1:10 (wt/vol) in a ice-cold lysis buffer (50mM HEPES, pH 7.5, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 0.1% Igepal NP-40, 2mM DTT, and 1mM EDTA), with 1:100 phosphatase and protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich). The resulting homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C, and the supernatants were removed and the pellets discarded. Bradford's protein assay method (Bradford, 1976), using BSA for the standard curve, was used by protein concentrations determination. Afterward, equal amounts (50 μ g) of tissues protein supernatants were added to a black 96-well microplate, containing 100 μ l of caspase assay buffer (100mM HEPES, pH 7.2, 0.1% CHAPS, 10% sucrose, 2mM DTT and 1mM Na-EDTA), and 50 μ M of the synthetic caspase-3 fluorogenic peptide DEVD-AMC substrate (N-7505 Cayman). Following, the reaction mixture was incubated in the dark, for 1h at 37°C. The average amount of fluorescence liberated by fluorescent AMC-group was measured kinetically on a microplate reader (Molecular Devices Microplate Reader 340-750nm UV / VIS, California, USA, readings 5 times to 0, 30, 60, 90 and 120 seconds) using excitation and emission wavelengths of 380 and 460nm, respectively. Based on the standard curve made from

fluorescence reading with free AMC standards (50 μ M to 100nM/ml-1), caspase-3 activity levels mean values were reported as nmol of AMC liberated/mg of protein.

Histological analysis

To evaluate the impact of 14-days of hindlimb immobilization and GLN supplements administration on muscle trophism, soleus and gastrocnemius muscle myofiber cross-sectional area (MCSA) of 4-5 animals/group were determined, following the method described by Macedo et al. (2016). Briefly, soleus and gastrocnemius muscle obtained immediately after the euthanasia was placed in 15ml Falcon type tubes and embedded in 4% paraformaldehyde for 24h at 4°C. For full muscle dehydration, the samples were incubated in a 30% sucrose solution for 24h at 4°C. Afterward, muscle samples were fixed in paraffin for the production of muscle sample-blocks which, were then cut in sections of 5 μ m of thickness, perpendicular to the major axle of the fibers, using a microtome (Lupetec, MRP2015). The muscle sections were collected, fixed onto glass slides and subjected to hematoxylin and eosin (H&E) staining by standard procedures. Following, the sections were photographed using a light microscope equipped with a camera (Nikon DXM 1200, Japan) at 20x magnification and ten randomly photomicrographs were captured of each slide. The digitized images were analyzed manually and randomly using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA), in a blinded manner. The mean MCSA was determined by measuring the circumference of 50 adjacent fibers from the center of each cross-section, totaling 250 fibers per muscle tissue and the values were expressed in square micrometer (μ m²).

Protein determination

The protein concentration of muscle and plasma preparations were measured by the method described by Bradford (Bradford, 1976) using BSA for the standard curve.

Statistical analysis

One-way ANOVA was used to performed comparisons among the groups, for each dependent variable and, when this test detected significance, Tukey's (HSD) honestly significant difference test was performed as a post hoc. Differences with p values <0.05 were considered statistically significant. All statistical calculation was performed using SPSS software v. 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), and all data are expressed as means + standard error of the mean (S.E.M).

RESULTS

Body weight, body weight gain, muscle weight, muscle weight to body weight ratio, degree of muscle atrophy and food intake measurement

The initial body weight did not differ among the groups (weighing 207 ± 87 g). The final body weight, determined in the 14th day of immobilization period was significantly lower in IMOB group (178.7 ± 4.6 g) compared to non-immobilized groups ($p < 0.05$), while GLN supplements attenuated this scenario in GLN+ALA-IMOB (198.7 ± 10.3 g) and DIP-IMOB (197.0 ± 19.7 g) groups, compared to IMOB group ($p < 0.05$). As depicted in table 1, 14-days of hindlimb immobilization have reduced body weight gain even as, induces significantly reduction on muscle weight, muscle weight/body weight ratio and in the degree of muscle atrophy and/or % of muscle weight change in the soleus and gastrocnemius muscle of IMOB animals compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats ($p < 0.05$). On the other hand, GLN+ALA solution administration to immobilized rats attenuated this scenario significantly, compared to IMOB animals ($p < 0.05$). Both 14 days of hindlimb immobilization and GLN supplements have not affected daily food intake (Table 1).

Plasma and muscle glutamine concentration

As shown in table 2, plasma GLN concentration was significantly lower in IMOB group compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups ($p < 0.05$). In contrast, the nutritional interventions with GLN+ALA and DIP have reduced the immobilization effect and, re-established the plasma glutamine levels in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals. Fourteen days of hindlimb immobilization evoked significant decrease in GLN content in soleus (a predominantly slow twitch, oxidative-fiber-type muscle) and gastrocnemius (a fast-twitch-fiber-type, mostly glycolytic muscle) of IMOB animals as calculated in terms of μmol per gram of fresh tissue as well as, when expressed as nmol per mg of protein, compared to CTRL group ($p < 0.05$). Moreover, as observed for plasma, in both muscle types analyzed, GLN concentration was significantly restored (both in $\mu\text{mol/g}$ fresh tissue and nmol/mg protein) in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups (Table 2; $p < 0.05$). Nonetheless, the GLN+ALA and DIP supplementations elicited an even higher amount of GLN in soleus and gastrocnemius muscle of immobilized animals, compared to IMOB group (Table 2; $p < 0.05$).

Immobilization and glutamine administration effects on plasma cortisol and skeletal muscle caspase 3 activity levels

As depicted in figure 1A, plasma cortisol concentration was significantly elevated in IMOB animals (~32.3%) compared to baseline animals. On the other hand, plasma cortisol concentration was reduced (by 42% and 46%, respectively) in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB animals (Figure 1A; $p < 0.05$).

In the present study caspase 3 activation levels was analysis as a pro-apoptotic index. Fourteen days of hindlimb immobilization induced a significant increase in caspase-3 activity levels, measured by hydrolysis of the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC per mg of protein, in soleus muscle of IMOB rats compared to CTRL (67%), GLN+ALA (68%) and DIP (67%) animals (Figure 1B; $p < 0.05$). GLN supplements administration attenuated significantly soleus-caspase-3 activation (by 65.1% in GLN+ALA-IMOB and 60% in DIP-IMOB groups, respectively) compared to IMOB group (Figure 1B). Similar results were observed in gastrocnemius muscle, where IMOB rats present caspase-3 activity levels 23.1% and 36% rise compared to CTRL and GLN+ALA and DIP animals, respectively (Figure 1C). When compared to IMOB animals, GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats present caspase-3 activity levels, in gastrocnemius muscle, 46% and 54% lower, respectively (Figure 1C; $p < 0.05$). Also in gastrocnemius muscle, caspase-3 activity levels in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups were significant lowers, when compared to the CTRL group (Table 4; $p < 0,05$). These findings suggest a beneficial effect of GLN supplements administrated in the present study on muscle apoptosis induction attenuation, both in the fast twitch gastrocnemius and slow twitch soleus muscle.

Western Blot analysis of skeletal muscle HSP70, p38 MAPK and FOXO3a protein expression

Fourteen days of hindlimb immobilization reduced significantly the HSP70 protein content in the soleus muscle of IMOB animals, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats (Figure 2A, $p < 0.05$). On the other hand, GLN administration to GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats re-established and induced a significant increase in the HSP70 protein content in the soleus muscle, compared to IMOB group (Figure. 2A; $p < 0.05$). A similar significant increase in the HSP70 protein levels, was observed in the soleus muscle, when the GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats were compared to the CTRL animals (Figure. 2A). GLN administration also induced a significant increase in the HSP70 protein content in the soleus muscle of GLN+ALA and DIP rats, respectively, compared to CTRL animals (Figure 2A; $p < 0.05$). Equally, 14-days of hindlimb immobilization evoked a significant reduction in the HSP70 protein content in the gastrocnemius muscle of IMOB animals, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP rats (Figure 2B, $p < 0.05$). Similar to the one observed in soleus muscle, GLN supplements administrated in the present study re-established and elevated

significantly, the HSP70 protein levels in the gastrocnemius muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB group (Figure 2B).

In the present study we investigated the anti-apoptotic effects of GLN+ALA solution and DIP supplements on apoptotic mechanism represented by p38 MAPK activation in rats submitted or non to 14-days of hindlimb immobilization. Fourteen days of hindlimb immobilization increased p38 MAPK protein content in phosphorylated form in soleus and gastrocnemius muscle of IMOB rats by 76.2% and 67% respectively, compared to CTRL animals and, by ~78% and ~68% respectively, when compared to GLN+ALA and DIP rats (Figure 3B and 3D; $p < 0.05$). However, both GLN+ALA solution and DIP supplementations reduced by 76.2% and 79% respectively, in soleus muscle and, by 82% and 75.3% respectively, in gastrocnemius muscle, phosphorylated p38 MAPK protein expression form in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB animals (Figure 3B and 3D; $p < 0.05$). Total p38 MAPK protein content was also analyzed in soleus and gastrocnemius muscle of immobilized and non-immobilized rats, supplemented or non with GLN supplements administered in this study. There was an 77.2% and 75.5% increase in p38 MAPK protein content in total form in soleus and gastrocnemius muscle respectively, in IMOB group compared to CTRL group (Figure 3A and 3C; $p < 0.05$). One similar increase (by ~81.1% in soleus muscle and, ~79.1% in gastrocnemius muscle) was observed in total p38 MAPK protein content form in IMOB rats, compared to GLN+ALA and DIP animals (Figure 3A and 3C). Moreover, as observed in phosphorylated p38 MAPK protein expression form analysis, both nutritional interventions administered in the currently study attenuated total p38 MAPK protein content levels in soleus (by 3.5 and 5.2-fold, respectively) and, in gastrocnemius muscle (by 3.6 and 5-fold, respectively) of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, compared to IMOB animals (Figure 3A and 3C; $p < 0.05$).

Regards to FOXO3a protein expression analysis, according to the figures 4A, B, C and D, 14-days of hindlimb immobilization induced an ~83.5% and ~62.2% increase in total FOXO3a protein expression, in soleus and gastrocnemius muscle, respectively, of IMOB rats, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP animals. At same time, 14-days of hindlimb immobilization induced significant decrease in phosphorylated FOXO3a expression, both soleus and gastrocnemius muscle of IMOB rats, compared to baseline animals. On the other hand, both GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB groups present attenuated FOXO3a protein expression, in total form in soleus (reduction of 85% in GLN+ALA-IMOB and, 82.2% in DIP-IMOB groups, respectively) and gastrocnemius muscle (reduction of 71.2% in GLN+ALA-IMOB group and 79.4% in DIP-IMOB group). Both GLN supplements administered in present study, also induced a higher expression of FOXO3a in phosphorylated form in both muscle analysed, compared to IMOB animals (Figures 4C and 4D; $p < 0.05$).

Histological analysis of the muscle cross-sectional area (MCSA)

Fourteen-days of hindlimb immobilization reduced MCSA by 42% and 53.2% in gastrocnemius and soleus muscles, respectively, compared to the CTRL group (Figures 5A and 5B; $p < 0.05$). This reduction was even more significant when the IMOB rats were compared to GLN+ALA (reduction of 54% in gastrocnemius and 58.3% in soleus muscle) and DIP animals (reduction of 59.1% in gastrocnemius and 55.1% in soleus muscle; $p < 0.05$). Although it hasn't reduced the disuse atrophy to basal levels, compared to CTRL, GLN+ALA and DIP groups (Figures 5A and 5B), both nutritional interventions administrated to immobilized rats, have shown to be efficient in attenuated skeletal muscle disuse atrophy in both soleus and gastrocnemius muscle, since MCSA in GLN+ALA-IMOB group was 31% higher in both muscle analysed, while in DIP-IMOB animals, the MCSA was 25% and 24% greater in soleus and gastrocnemius muscle, respectively, compared to IMOB rats (Figures 5A and 5B; $p < 0.05$).

DISCUSSION

The results of present study show that 14-days of hindlimb immobilization reduced GLN concentrations significantly in both plasma, soleus and gastrocnemius muscle which was attenuated and/or reversed by both oral supplementations with DIP or GLN+ALA solution. Moreover, we have observed that both GLN supplements administrated in the present study, attenuated the activation of proteolytic and pro-apoptotic cell signaling pathways (p38 MAPK and FOXO3A, respectively) induced by immobilization-induced muscle disuse atrophy, through a decisive modulation on cytoprotective HSP70 protein expression.

Skeletal muscle atrophy induced by deleterious situations, including limbs immobilization is characterized by the reduction in myofiber cross-sectional area, protein content, tension on muscle and strength production, leading to increased muscle fatigability (Jackman & Kandarian, 2004; Li et al., 2008). Moreover, skeletal muscle atrophy has been closely related to the etiology of pathologies, which are considerably disabling, a fact that has shown a real challenge to the rehabilitation of humans or animals affected by sensory or motor problems as well as, organ disorders. In addition, individuals submitted to situations that lead to skeletal muscle atrophy may be affected by series of secondary pathophysiologies, among them, a higher incidence of infections, fact that, in addition to delaying their recovery, contributes to the elevation of morbidity and, even for a higher degree of mortality (Powers et al., 2007). Nonetheless, being closely associated with muscle mass wasting both in humans and animals, the muscle atrophy has implicated in triggering of neuroendocrine, inflammatory,

immune and intracellular signalling responses, which ultimately culminates in the exacerbation of body nitrogen pool depletion, due to a series of metabolic alterations resulting from the establishment of a hypercatabolism scenario (Jackman & Kandarian, 2004).

Making up 40% of total body mass, the skeletal muscle is quantitatively the major site of synthesis, stocking, and release of the body's most abundant amino acid, glutamine (GLN; (Newsholme et al., 2003). Indeed, the skeletal muscle is responsible for more than 60% of total free GLN of the body, fact that makes this tissue, although not the only one, of fundamental importance for the maintenance of the plasma glutamine levels (Newsholme et al., 2003; Curi et al., 2005; Rogero et al., 2006; Wang et al., 2015). Under metabolic stress, such as cancer, sepsis and intense, prolonged or exhaustive physical exercises, among others, however, muscle GLN metabolism and blood concentrations are dramatically compromised, since this situation stimulates cells to consume high amounts of this amino acid, leading to an imbalance among the body GLN requirement and, its de novo synthesis ability (Cruzat et al., 2014a; Petry et al., 2014).

In our study 14-days of hindlimb immobilization induced muscle atrophy, evidenced by a significant reduction on MCSA in immobilized rats (Figure 5A and 5B). At the same time, 14-days of hindlimb immobilization reduced significantly the GLN availability in plasma and in soleus and gastrocnemius muscle, in IMOB group (Table 2), while both oral supplementations with L-alanyl-L-glutamine or free L-glutamine along L-alanine (GLN+ALA solution), in the groups of animals equally submitted to 14-days of limb immobilization, were effective in maintaining the plasma and skeletal muscle GLN concentrations as well as, attenuated the loss on MCSA (Figure 5A and 5B; Table 2). These results are in agreement with those of other studies where the same oral GLN-supplementations forms, maintained GLN stores in muscle tissue in animals submitted to full stressors, including resistance (Raizel et al., 2016), intense or exhaustive physical exercises (Petry et al., 2014) and catabolic situations, such as endotoxemia (Cruzat et al., 2014a; Cruzat et al., 2014b). Moreover, our results also suggest that the supplementations administrated in the present study also attended the GLN demand by organs such as kidneys, liver, gut and rapidly dividing cells, such as cells of immune system, during muscle disuse period provoked from the application bilateral hindlimb immobilization model. In addition, we show that the rat groups not immobilized and supplemented either DIP or GLN+ALA solution (GLN+ALA and DIP groups, respectively) did not show effects on the plasma GLN levels, suggesting that previous GLN supplementation to a catabolic stimulus does not offer cumulative benefits, which corroborates with other studies, where the same supplements were evaluated in catabolic situations, such as sepsis (Cruzat et al., 2014a; Cruzat et al., 2014b).

GLN is widely accepted as an important amino acid for cell metabolism, since it is involved in the maintenance and promotion of essential wide range functions to maintenance of cellular homeostases, such as the donation of carbon skeletons to gluconeogenesis, regulating the acid-base balance, maintaining cell volume, transporting of ammonia among tissues, proliferating and developing of cells, especially the immune system (Newsholme et al., 2003; Curi et al., 2005). Moreover, GLN has been implicated as a pharmacologic-nutrition agent able to modulated cellular stress response through of HSPs, especially the HSP70 family (the dominant HSP) expression. This response represents an essential mechanism of cytoprotection against several forms of injury in full range cells and tissues. However, a reduction in GLN availability as observed in plasma and skeletal muscle of IMOB rats, may lead to a deficit in HSP70 protein levels and impaired the recovery process.

The eukaryotic cells response to stressful external stimuli are regulated in part by activation of MAPK proteins family pathway (Lagranha et al., 2007). In this context, the activation of p38 MAPK, a preferentially stress-activated MAPK, in situations such as oxidative stress by an imbalance among ROS synthesis and degradation, elevated synthesis and release of proinflammatory cytokines, especially TNF- α and increased activity of classical apoptotic mediators, including caspase-3 activation, has implicated in the induction of many forms of apoptosis, in several mammalians cell types and tissues (Powers et al., 2007). Studies in vivo and in vitro have shown that p38 MAPK activation plays a vital role in initiation of inflammatory responses as well as, resulted in a plethora of changes in cell transcription factors, protein synthesis, cell surface receptor expression, and cytoskeletal structure, ultimately affecting cell survival or leading to programmed cell death (apoptosis, Li et al., 2005; Cuenda & Rousseau, 2007; Kim et al., 2009). Li et al. (2005) observed that the exposition of cultured skeletal muscle myotubes to TNF- α and/or ROS, included hydrogen peroxide (H₂O₂), induced p38 MAPK activation, fact that upregulated MuRF-1 and MAFbx expression, inducing the atrophy of this myotubes. Moreover, to this effects at the cellular level, p38 MAPK also assists in the coordinating responses to stresses at the tissues and organs level via modulation in the synthesis of cytokines, catecholamines, nitric oxide and arachidonate products (Cuenda & Rousseau, 2007). Kim et al. (2009) stands out that 14-days of cast immobilization induced the rat gastrocnemius muscle atrophy resulted in decrease of muscle weight and cross-sectional area, fact that if given in parallel to a significant elevation in MuRF1 and phosphorylated p38 MAPK expression. According to Kim et al. (2009), these results suggest that the expression of MuRF1 in skeletal muscle of cast-immobilized atrophy rats is upregulated by p38 MAPK activation. It has been suggested that cell signaling pathways can interact with each other through biochemical cross talk (Jackman & Kandarian, 2004; Lecker et al., 2004). In this situation, p38 MAPK it seems to act both in the generation of, and subsequent intracellular translation responses to the signal (Lecker et al.,

2004). However, the exact amount of interaction mechanisms among p38 MAPK and others cell signaling pathways, are not totally elucidated (Jackman & Kandarian, 2004). Our findings regards p38 MAPK protein expression are in line with this in vivo and in vitro studies, since immobilized stimuli increase both phosphorylated and total protein expression levels of this protein in both glycolytic gastrocnemius and oxidative soleus muscle of IMOB animals. That way, our results reinforcing the link among immobilized-mediated skeletal muscle atrophy and p38 MAPK pathway activation. On the other hand, previous data have reported that p38 MAPK pathway suppression may be a useful target for anti-proteolytic therapies (Li et al., 2005). In a recent study, Girven et al.(2016) observed that GLN administration could represent an important and effective therapeutic strategy for attenuated p38 MAPK pathway activation and ameliorate muscle loss in conditions that are driven by continuous increases in proinflammatory cytokines, such as TNF- α . In this study, the supplementation of C2C12 myoblasts and existing myotubes with 20mM of GLN, in the presence of TNF- α (20ng/ml-1) resulted in a reduction of p38 MAPK activity back to control levels, with a corresponding rescue of myoblast differentiation and a reversal myotubes atrophy. Furthermore, when administered to mature myotubes GLN supplementation resulted in upregulation of genes associated with growth and survival (Girven et al., 2016). Our results corroborate with Girven et al. (2016) findings since in current paper we have observed that both GLN+ALA solution and DIP GLN-supplements reduced soleus and gastrocnemius muscle p38 MAPK protein phosphorylated and total forms content in immobilized rats, compared to IMOB animals (Figures 3A to D; $p < 0.05$).

It has been argued that the ubiquitin-proteasome system plays a dominant role during inactivity-induced muscle atrophy since this one is responsible for degradation of most sarcomeric proteins (Talbert et al., 2013). Nonetheless, it has also been suggested that the ubiquitin-proteasome system may not be the rate-limiting step in muscle atrophy, since this proteolytic system has proven to be unable to breakdown intact actin and myosin myofilaments because of the tightly packed arrangement of these proteins in a complex known as actomyosin complex, within sarcomeres of striated muscle (Du et al., 2004). Therefore, the release of actin and myosin myofilaments from the actomyosin-sarcomeric complex, as monomeric proteins, prior of its degradation by the ubiquitin-proteasome system, has been shown be a prerequisite and the real rate-limiting step by the skeletal muscle protein content degradation mediated by ubiquitin-proteasome system, during muscle disuse periods (Talbert et al., 2013). Studies in vitro and in vivo have been standing out the critical role played by caspase-3 (a cysteine-dependent, aspartate-directed protease; involved in apoptosis induction) activation in the promotion of the actomyosin complex degradation (Du et al., 2004; McClung et al., 2007). In this process, acting as an upstream element, caspase-3 has proven to be able to induced the release of muscle fiber myofilaments, especially actin and myosin, for its subsequently

degradation through the ubiquitin-proteasome system, fact that has been tightly related to the skeletal muscle cell apoptosis induction, since caspase-3 activates show to be able of activated endonuclease G, which triggers DNA fragmentation and, posterior formation of apoptotic bodies (Du et al., 2004; McClung et al., 2007). It is worth noting that in skeletal muscle, apoptosis is called myonuclear apoptosis since in this tissue this cellular process has distinctive characteristics compared to apoptosis of other tissues because muscle fibers are multinucleated cells (Du et al., 2004). That way, the induction of caspase 3 activation has been implicated in the regulation of muscle protein breakdown, in many muscle-wasting conditions, including a limb immobilization situation. So, in the present study we have investigated the effects of 14-days hindlimb immobilization, concomitantly to GLN+ALA solution and DIP supplementation administration on muscle catabolism induced by caspase-3 activation in soleus and gastrocnemius muscle of immobilized and non-immobilized rats.

Although the control of caspase-3 activity is complex and involves several interconnected pathways, it is feasible that inactivity-associated ROS production in skeletal muscle contributes to the activation of this protease during disuse periods, such as a hindlimb immobilization period (Powers et al., 2007). Indeed, increased cellular levels of ROS have been reported to activate caspase-3 in a wide variety of cell types, including skeletal muscle (Du et al., 2004). Regarding this, it has been postulated that oxidative stress contributes to caspase-3 activation through two essential pathways: 1) mitochondrial pathway - via cytochrome c release; fact that activates the apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1) which in turn, activity caspase-9, and/or; 2) by sarcoplasmic reticulum stress pathway - by means of caspase-12 activation; with sarcoplasmic calcium efflux release and calpain proteolytic system activation (Du et al., 2004). Regard of this last pathway, Talbert et al. (2013) suggests there a cross-talk among the calpain and caspase-3 proteolytic systems, fact that, according to these authors, can play a vital role in the regulation of skeletal muscle myofilaments release and degradation, during periods of muscle disuse. Indeed, Du et al. (2004) revealed that both calpain and caspase-3 are capable of producing actomyosin complex disassociation. Therefore, the activation of one or both of these proteases is considered a requirement for proteolytic degradation of myofilaments during conditions that result in muscle atrophy (Du et al., 2004; Talbert et al., 2013).

Moreover, it has been suggested the involvement of ROS-induced activation of p38 MAPK and TNF- α in caspase-3 activation (Li et al., 2005; Lagranha et al., 2007). Indeed, in the present study, 14-days of hindlimb immobilization augmented the protein expression of p38 MAPK in its phosphorylated form in both fast-twitch gastrocnemius and slow twitch soleus muscles muscle even as, increase caspase-3 activation in same muscle, of IMOB animals. In this way, although in the current study we were not measuring the myonuclear apoptosis, our results lead us believe that the immobilization-induced p38 MAPK and caspase-3 activation mechanism might have contributed to

the induction of myonuclear apoptosis in the soleus and gastrocnemius muscle of IMOB rats, in this study. On the other hand, our results attest that at the same time in that oral GLN supplementation both in GLN+ALA solution and/or in DIP form were able to attenuate p38 MAPK phosphorylated protein content levels in skeletal muscle, this GLN-supplement also has proven able to attenuate caspase-3 activation, equally in fast twitch and slow twitch gastrocnemius and soleus muscle, respectively. These results are in line with findings of others in vivo and in vitro studies which show that GLN administration either in free form or along with ALA, or in dipeptide form, had a protective effect attenuating the apoptosis induced by caspase-3 activation alone and/or along with activation of other proteolytic pathways, such as p38 MAPK, among others, in several stressful or catabolic situations, including a single session of hard exercise (Lagranha et al., 2007), exhibition of cultured neonatal enterocytes to ROS or LPS-endotoxin (Haynes et al., 2009) and after hemorrhagic shock (Yang et al., 2007). Additionally, this evidence has reinforced the hypothesis postulated that the inhibition of caspase-3 activity could be a therapeutic target in the attempt of retarding the ubiquitin-proteasome proteolytic system activation and loss of myonuclei due to myonuclear apoptosis mediated by inactivity-induced muscle atrophy, during muscle disuse situations.

Previous studies on skeletal muscle atrophy have highlighted that the cytoplasmic translocation and activation of FOXO3a (a member of the FOXO transcription factors family) demonstrates to be sufficient to induce skeletal muscle atrophy in a wide range of conditions, including limb immobilization (Lecker et al., 2004; Sandri et al., 2004). On the other hand, HSP70 overexpression shows inhibited FOXO3a transcriptional activities and prevented soleus muscle atrophy in rats, submitted to a skeletal muscle atrophy disuse model (Senf et al., 2008). That way, in the present study we have tested the hypothesis of an increase in HSP70 protein expression mediated by GLN+ALA solution and DIP supplementations, such as here evidenced, can inhibit FOXO3a activation, preventing muscle atrophy in soleus and gastrocnemius muscle of rats, submitted to 14-days of hindlimb immobilization.

During situations of physiological stress including times of skeletal muscle disuse, cells are exposed to numerous disintegrating occurrences, such as ROS and RNS interaction (Droge, 2002), a fact that culminates in changes in cellular homeostasis (Gabai & Sherman, 2002). In order to protect themselves from a possible injury and damage, under these situations, cells trigger a series of intracellular events, commonly known as "stress response" (Gabai & Sherman, 2002). In general, this response is characterized by the induction of transcription and subsequent expression of a variety of genes, among which is included the heat shock proteins, HSPs (Gabai & Sherman, 2002). In the cells, HSPs are found grouped in subfamilies (Morimoto, 1993). Among all subfamilies of HSPs, the members of the HSP70 subfamily, respectively, HSP72 and HSP73 are the most inducible and abundant

HSP subfamily in the eukaryotic cells (Morimoto, 1993). Previous studies have postulated that HSP70 plays a key role in regulating of skeletal muscle plasticity (Miyabara et al., 2006; Senf et al., 2010; Miyabara et al., 2012; Petry et al., 2014) as well as, in the protection against myonuclei apoptosis (Takayama et al., 2003). Indeed, studies *in vivo* have reported that HSP70 overexpression mediated by transfection of mice with a specific HSP70 plasmid and/or in transgenic mice overexpressing HSP70 protected skeletal muscle of this animals, against disuse muscle atrophy (Miyabara et al., 2006; Senf et al., 2008). This HSP70-effect, at least in part, has been credited to action of this HSP on protein folding, since HSP70 induced by various stimuli such as exercise, muscle injury and regeneration, among others, have proved able to interact with other proteins in an ATP-dependent manner (Kalinowska et al., 2005), fact that has proven to reverberate on ubiquitin-proteasome protein degradation system activation and on cellular proteins translocation (Takayama et al., 2003).

Additionally, our data has indicated that GLN-mediated HSP70 protein expression elicited the reduction of proapoptotic stimuli mediated by caspase-3 and p38 MAPK signaling pathway activation in soleus and gastrocnemius muscle of GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals. This GLN-mediated HSP70 protein expression effects have been attributed, in part, to the fact that HSP70 show suppress skeletal muscle atrophy mediated by caspase-dependent apoptosis, inhibited caspase-3-DNA fragmentation induction, via cytochrome c release and apoptosome formation, by means cytochrome c and APAF-1 factor interaction suppression; and/or by caspase-independent apoptosis induction, by means inhibition of interaction among apoptogenic factors such as apoptosis-inducing factor (AIF) and endonuclease G (Kalinowska et al., 2005). Additionally, in the present study, the increased HSP70 protein expression in soleus and gastrocnemius muscle in supplemented and immobilized animals also it was accompanied by significant attenuation in MCSA decrease, in both muscle analyzed, in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals, compared to IMOB rats. This finding has reinforced the postulated key role of HSP70 as a potentially useful countermeasure agent against disuse-induced skeletal muscle mass and fiber size loss. Although the exact cellular mechanisms underlying this HSP70-attenuated effect on muscle atrophy remains unclear, it is believed that this effect is, at least in part, linked to molecular chaperone and protein repair functions played by HSP70 (Senf et al., 2008; Petry et al., 2014). Besides, previous studies have reported that the HSP70-mediated suppression of FOXO3a signaling pathway activation show to be another potential mechanism that may be behind this HSP70-induced protective effect against skeletal muscle atrophy (Senf et al., 2008; Senf et al., 2010). Indeed, FOXO3a when in dephosphorylated form, into the cytoplasm of the cell, acts as a potent and direct transcriptional factor regulator, capable of orchestrating the upregulation of the 20S/26S ubiquitin-proteasome system, through upregulation of two proteolytic muscle-specific E3 ligases, atrogin-1/muscle atrophy F-box32 (also known as

MAFbx), and muscle-specific RING finger 1 (also known as MuRF1 or Trim63) in a wide range skeletal muscle atrophy conditions (Sandri et al., 2004; Senf et al., 2010). In the present study, 14-days of skeletal muscle disuse by means employed of hindlimb immobilization model to rats, at the same time that induced a decrease in HSP70 protein content, also induced a significant increase in dephosphorylated (total form) FOXO3a protein expression in soleus and gastrocnemius muscle, of IMOB rats. On the other hand, at the same time in that GLN administration, either in GLN+ALA solution and/or DIP forms re-established and induced a significant increase in HSP70 protein content in both slow-twitch soleus and fast twitch gastrocnemius muscle, in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB rats, FOXO3a signaling pathway response in this muscle, equally in GLN+ALA-IMOB and DIP-IMOB animals, showed significantly attenuated (Figures 4A to D). Our FOXO3a and HSP70 protein expression results, besides of reinforced the findings of Senf et al. (2008) and Senf et al. (2010) show, for the first time, a key role played by GLN-mediated HSP70 signaling pathway as an anti-proteolytic agent, blocked and/or attenuated the activation of ubiquitin-proteasome system upstream proteins targets, such as FOXO3a.

CONCLUSION

In conclusion, the present study indicates that oral GLN supplementation either in GLN+ALA solution and/or in DIP form represents an effective nutritional method to maintain GLN stores during a limb immobilization period. Additionally, we confirm the modulatory role played by GLN on HSP70 protein expression, a fact that contributes for attenuated proteolytic and pro-apoptotic signaling pathways activation as well as, contributes for attenuation of skeletal muscle disuse atrophy in slow-twitch soleus and fast twitch gastrocnemius muscle of rats, submitted to 14-days of hindlimb immobilization. Besides, the results of the current research reinforcing the key role played by GLN-mediated HSP70 protein expression on skeletal muscle regeneration and recovery process, during and following injury and, for first time, we show that this mechanism, at least in part, also demonstrates impacts on muscle mass and fiber size maintenance, under baseline conditions and during a disuse muscle atrophy situation, such as a hindlimb immobilization period. However, further studies, especially in humans, are needed to provide the clinical impact of these findings over the public health systems.

REFERENCES

- Adibi SA. (2003). Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 285, G779-788.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Broer S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological reviews* 88, 249-286.
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ & Shoelson SE. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119, 285-298.
- Cruzat VF, Bittencourt A, Scomazzon SP, Leite JS, de Bittencourt PI, Jr. & Tirapegui J. (2014a). Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. *Nutrition* 30, 602-611.
- Cruzat VF, Pantaleao LC, Donato J, Jr., de Bittencourt PI, Jr. & Tirapegui J. (2014b). Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. *The Journal of nutritional biochemistry* 25, 345-352.
- Cuenda A & Rousseau S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1358-1375.
- Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M & Newsholme P. (2005). Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of cellular physiology* 204, 392-401.
- Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR & Mitch WE. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of clinical investigation* 113, 115-123.
- Gabai VL & Sherman MY. (2002). Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *Journal of applied physiology* 92, 1743-1748.
- Girven M, Dugdale HF, Owens DJ, Hughes DC, Stewart CE & Sharples AP. (2016). l-glutamine Improves Skeletal Muscle Cell Differentiation and Prevents Myotube Atrophy After Cytokine (TNF-

alpha) Stress Via Reduced p38 MAPK Signal Transduction. *Journal of cellular physiology* 231, 2720-2732.

Haynes TE, Li P, Li X, Shimotori K, Sato H, Flynn NE, Wang J, Knabe DA & Wu G. (2009). L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant- or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes. *Amino acids* 37, 131-142.

Jackman RW & Kandarian SC. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology Cell physiology* 287, C834-843.

Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, Garrard WT & Widlak P. (2005). Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 10, 821-830.

Kaushal V, Herzog C, Haun RS & Kaushal GP. (2014). Caspase protocols in mice. *Methods in molecular biology* 1133, 141-154.

Kim J, Won KJ, Lee HM, Hwang BY, Bae YM, Choi WS, Song H, Lim KW, Lee CK & Kim B. (2009). p38 MAPK Participates in Muscle-Specific RING Finger 1-Mediated Atrophy in Cast-Immobilized Rat Gastrocnemius Muscle. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 13, 491-496.

Kim M & Wischmeyer PE. (2013). Glutamine. *World review of nutrition and dietetics* 105, 90-96.

Lacey JM & Wilmore DW. (1990). Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutrition reviews* 48, 297-309.

Lagranha CJ, Hirabara SM, Curi R & Pithon-Curi TC. (2007). Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell biochemistry and function* 25, 563-569.

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE & Goldberg AL. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB Journal* 18, 39-51.

Lund P. (1985). Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, HU, eds) 357-363.

- Macedo AC, Ywazaki JL, Macedo RM, Noronha L & Gomes AR. (2016). Morphologic study of different treatments for gastrocnemius muscle contusion in rats. *Revista brasileira de ortopedia* 51, 697-706.
- McClung JM, Kavazis AN, DeRuisseau KC, Falk DJ, Deering MA, Lee Y, Sugiura T & Powers SK. (2007). Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175, 150-159.
- Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS & Mestril R. (2006). Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *American journal of physiology Cell physiology* 290, C1128-1138.
- Miyabara EH, Nascimento TL, Rodrigues DC, Moriscot AS, Davila WF, AitMou Y, deTombe PP & Mestril R. (2012). Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 463, 733-741.
- Morimoto RI. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259, 1409-1410.
- Newsholme P, Lima MM, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB & Curi R. (2003). Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian journal of medical and biological research* 36, 153-163.
- Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Homem de Bittencourt PI, Jr. & Tirapegui J. (2015). L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism* 25, 188-197.
- Petry ER, Cruzat VF, Heck TG, Leite JS, Homem de Bittencourt PI, Jr. & Tirapegui J. (2014). Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life sciences* 94, 130-136.
- Powers SK, Kavazis AN & McClung JM. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of applied physiology* 102, 2389-2397.
- Raizel R, Leite JS, Hypolito TM, Coqueiro AY, Newsholme P, Cruzat VF & Tirapegui J. (2016). Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of l-glutamine and l-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance

- Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG, Castro IA & Pires IS. (2006). Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. *Nutrition* 22, 564-571.
- Rogero MMT, J.O.; Pedrosa, R.G.; Pires, I.S.O.; Castro, I.A. . (2004). Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. *Nutrition Research* 24, 261-270.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399-412.
- Senf SM, Dodd SL & Judge AR. (2010). FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *American journal of physiology Cell physiology* 298, C38-45.
- Senf SM, Dodd SL, McClung JM & Judge AR. (2008). Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 3836-3845.
- Silver JT, Kowalchuk H & Noble EG. (2012). hsp70 mRNA temporal localization in rat skeletal myofibers and blood vessels post-exercise. *Cell stress & chaperones* 17, 109-120.
- Singleton KD & Wischmeyer PE. (2008). Glutamine induces heat shock protein expression via O-glycosylation and phosphorylation of HSF-1 and Sp1. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 32, 371-376.
- Takayama S, Reed JC & Homma S. (2003). Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22, 9041-9047.
- Talbert EE, Smuder AJ, Min K, Kwon OS & Powers SK. (2013). Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy. *Journal of applied physiology* 114, 1482-1489.
- Van Gammeren D, Damrauer JS, Jackman RW & Kandarian SC. (2009). The IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 362-370.
- Wang W, Choi RH, Solares GJ, Tseng HM, Ding Z, Kim K & Ivy JL. (2015). L-Alanylglutamine inhibits signaling proteins that activate protein degradation, but does not affect proteins that activate protein synthesis after an acute resistance exercise. *Amino acids* 47, 1389-1398.

Yang R, Martin-Hawver L, Woodall C, Thomas A, Qureshi N, Morrison D & Van Way C, 3rd. (2007). Administration of glutamine after hemorrhagic shock restores cellular energy, reduces cell apoptosis and damage, and increases survival. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 31, 94-100.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

É.R. Petry designed and performed research, analyzed data and wrote the manuscript; D.F. Dresch designed and performed research; C. Carvalho, P.C. Medeiros, T.G. Rosa and C.M de Oliveira performed research; L.A.M. Martins analyzed data and revised the paper; F. C. R. Guma and N.P. Marroni contributed with new reagents and analytic tools; C. M. D. Wannmacher designed research, wrote and revised the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDS RECEIVED

The authors thank Ajinomoto of Brazil for the donation of purified amino acids L-alanine and L-glutamine. For their technical support and valuable help in histology analysis, the authors also would like to thank miss Flávia Giusti and Dr. Emily F. S. Pilar, from the Experimental Pathology Unit, Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA). This work was supported by the research grants from, The Commission for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process: 306928/2014-0), The Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), and of Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG), Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA, process: 17-0671).

GLOSSARY ABBREVIATIONS:

HSP70 - 70-kDa heat shock protein

HSP73 - 73-kDa-constitutively isoform of HSP70

HSP72 - 72-kDa-inducible isoform of HSP70

HSF-1 - Heat shock transcriptional factor 1

HSEs - heat shock transcriptional factors elements

GLN - amino acid L-Glutamine

ALA - amino acid L-Alanine

DIP - dipeptide L-alanyl-L-Glutamine

GLN+ALA solution – a solution containing the free forms of the amino acids L-Glutamine plus L-Alanine

MCSA - myofibrillar cross-sectional area

FOXO3A - forkhead member of the class O3a

MAPKs - mitogen-activated protein kinase Family

TABLE CAPTIONS

Table 1 - Body weight, body weight gain, muscle weight, muscle weight to body weight ratio, degree of muscle atrophy and food intake of rats submitted to 14-days of hindlimb immobilization and L-alanyl-L-glutamine and L-glutamine plus L-alanine solution supplementation.

	CTRL	GLN+ALA	DIP	IMOB	GLN+ALA-IMOB	DIP-IMOB
Initial body weight (g)	218.0 ± 14.9	219.7 ± 19.1	219.7 ± 31.4	216.0 ± 15.4	218.5 ± 15.1	217.3 ± 15.5
Final body weight (g)	232.7 ± 19.2	234.5 ± 22.2	236.5 ± 35.6	119.4 ± 3.6* †	195.5 ± 7.0* # †	199.8 ± 7.8* # †
Body weight gain (%)	11.87 ± 4.6	11.51 ± 2.4	10.90 ± 5.5	3.45 ± 2.7* †	9.32 ± 2.3#	9.52 ± 4.7#
Soleus muscle weight, right leg (mg)	140.5 ± 28.4	142.0 ± 21.8	131.5 ± 29.8	85.1 ± 13.7* †	128.2 ± 32.7#	117.6 ± 29.1#
Right leg soleus muscle weight to body weight ratio (mg/g)	0.60 ± 0.10	0.61 ± 0.13	0.58 ± 0.16	0.35 ± 0.08* †	0.62 ± 0.23#	0.52 ± 0.16

Right leg soleus muscle degree of atrophy (% of muscle weight change)	15.0 ± 6.5	14.6 ± 2.6	15.1 ± 4.0	33.2 ± 13.0* †	21.9 ± 7.9	20.8 ± 16.3
Soleus muscle weight, left leg (mg)	149.0 ± 26.7	144.0 ± 36.5	131.7 ± 49.0	85.0 ± 15.0*	132.7 ± 20.4 [#]	122.0 ± 29.9
Left leg soleus muscle weight to body weight ratio (mg/g)	0.64 ± 0.11	0.61 ± 0.17	0.55 ± 0.21	0.35 ± 0.88* †	0.62 ± 0.21 [#]	0.54 ± 0.16
Left leg soleus muscle degree of atrophy (% of muscle weight change)	16.2 ± 8.7	14.5 ± 3.1	15.7 ± 1.6	34.1 ± 15.4* †	17.9 ± 8.5 [#]	22.3 ± 13.8
Gastrocnemius muscle weight, right leg (mg)	1536 ± 344.6	1521 ± 429.6	1481 ± 232.9	571 ± 87.6* †	1033 ± 99.1* [#] †	980 ± 96.8* [#] †
Right leg gastrocnemius muscle weight to body weight ratio (mg/g)	6.40 ± 1.38	6.45 ± 1.78	6.34 ± 1.09	2.61 ± 0.47* †	4.87 ± 1.04 [#]	4.46 ± 0.80* [#] †

Right leg Gastrocnemius muscle degree of atrophy (% of muscle weight change)	14.2 ± 14.7	19.1 ± 19.1	12.9 ± 7.4	62.8 ± 5.7* †	32.7 ± 6.4 * # †	36.2 ± 6.3* # †
Gastrocnemius muscle weight, left leg (mg)	1500 ± 378.7	1447 ± 333.1	1490 ± 248.5	590 ± 102.1* †	1030 ± 106.5* # †	1008 ± 105.1* # †
Left leg gastrocnemius muscle weight to body weight ratio (mg/g)	6.14 ± 1.44	6.06 ± 0.88	6.41 ± 1.40	2.59 ± 0.68* †	4.84 ± 1.03#	4.59 ± 0.83#
Left leg Gastrocnemius muscle degree of atrophy (% of muscle weight change)	17.6 ± 6.0	18.2 ± 11.4	14.5 ± 5.9	62.3 ± 8.6* †	31.3 ± 7.1 * # †	32.7 ± 7.0* # †
Food intake (g/d)	20.66 ± 2.3	20.63 ± 1.4	20.37 ± 2.9	18.02 ± 1.2	19.92 ± 2.4	19.74 ± 1.0

Biometric and morphologic parameters of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean ± S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

Table 2 – Plasma and muscle L-glutamine concentrations.

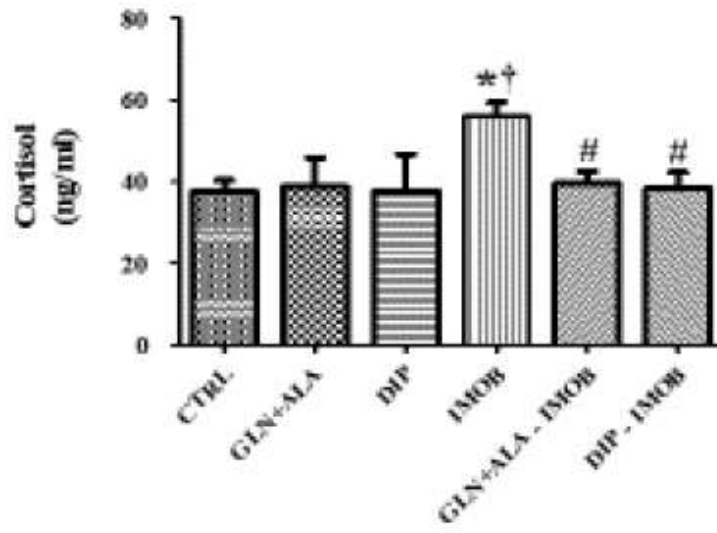
	Experimental Groups					
	CTRL	GLN+ALA	DIP	IMOB	GLN+ALA-IMOB	DIP-IMOB
Plasma L-Glutamine (mmol/l)	1.33 ± 0.24	1.27 ± 0.33	1.29 ± 0.13	0.71 ± 0.09* †	1.42 ± 0.18#	1.41 ± 0.13#
Soleus L-Glutamine (µmol/g fresh tissue)	6.10 ± 0.67	6.05 ± 1.14	6.02 ± 0.49	2.94 ± 0.10* †	6.75 ± 0.18#	7.09 ± 0.08* # †
Soleus L-Glutamine (nmol/mg protein)	24.59 ± 1.08	25.22 ± 2.23	26.72 ± 3.98	15.09 ± 1.37* †	38.06 ± 7.49* # †	36.12 ± 6.33* # †
Gastrocnemius L-Glutamine (µmol/g fresh tissue)	4.54 ± 1.15	4.53 ± 0.87	4.56 ± 0.27	2.67 ± 0.23* †	5.49 ± 0.53#	5.26 ± 1.46#
Gastrocnemius L-Glutamine (nmol/mg protein)	24.79 ± 1.82	24.91 ± 5.93	24.59 ± 5.66	8.21 ± 2.40* †	21.85 ± 3.25#	19.33 ± 3.82#

Plasma and skeletal muscle L-glutamine concentrations of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free forms and non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean ± S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

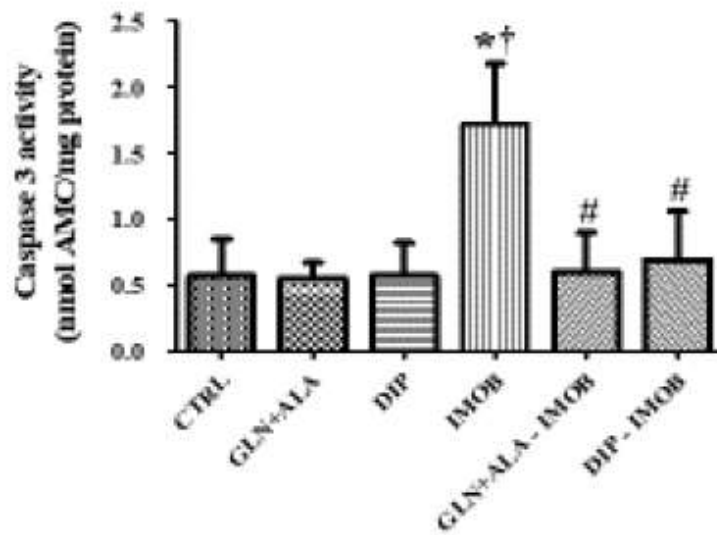
FIGURE CAPTIONS

Figure 1 Plasma cortisol (A); soleus (B) and gastrocnemius (C) muscle caspase 3 activity levels of Wistar rats (n = 8 per group) subjected to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with the dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

A



B



C

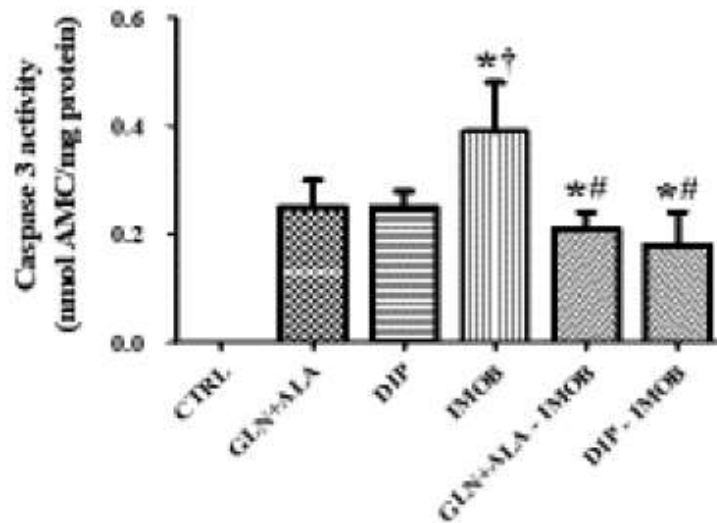


Figure 2 - Representative Western blot showing the analysis of soleus (A) and gastrocnemius (B) muscle HSP70 protein expression of Wistar rats (n = 8 per group) subjected to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. * $p < 0,05$ compared to CTRL group; # $p < 0,05$ compared to IMOB group; † $p < 0,05$ compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

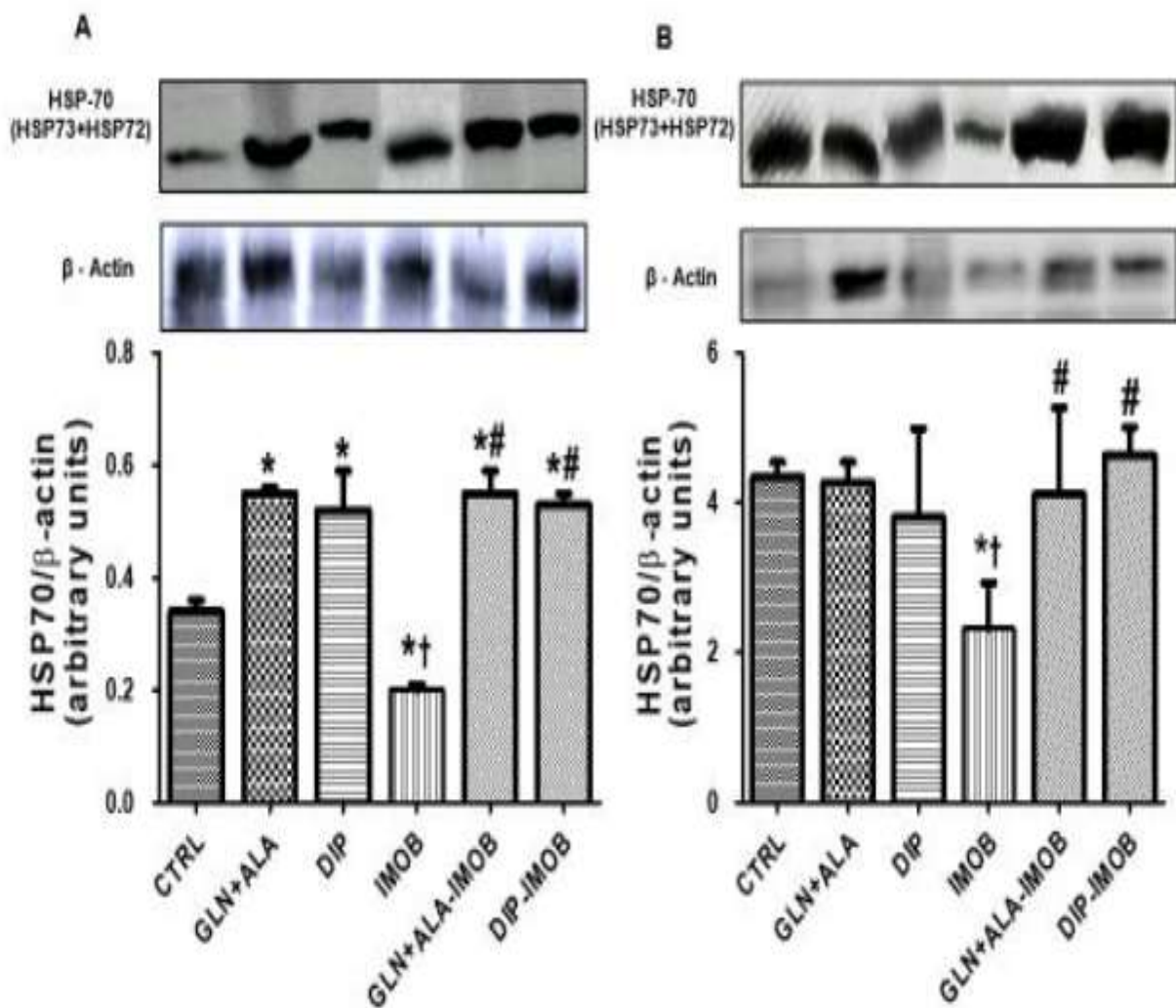


Figure 3 - Representative Western blot showing the analysis of total p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK protein expression in soleus (A and B) and gastrocnemius (C and D) muscle of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

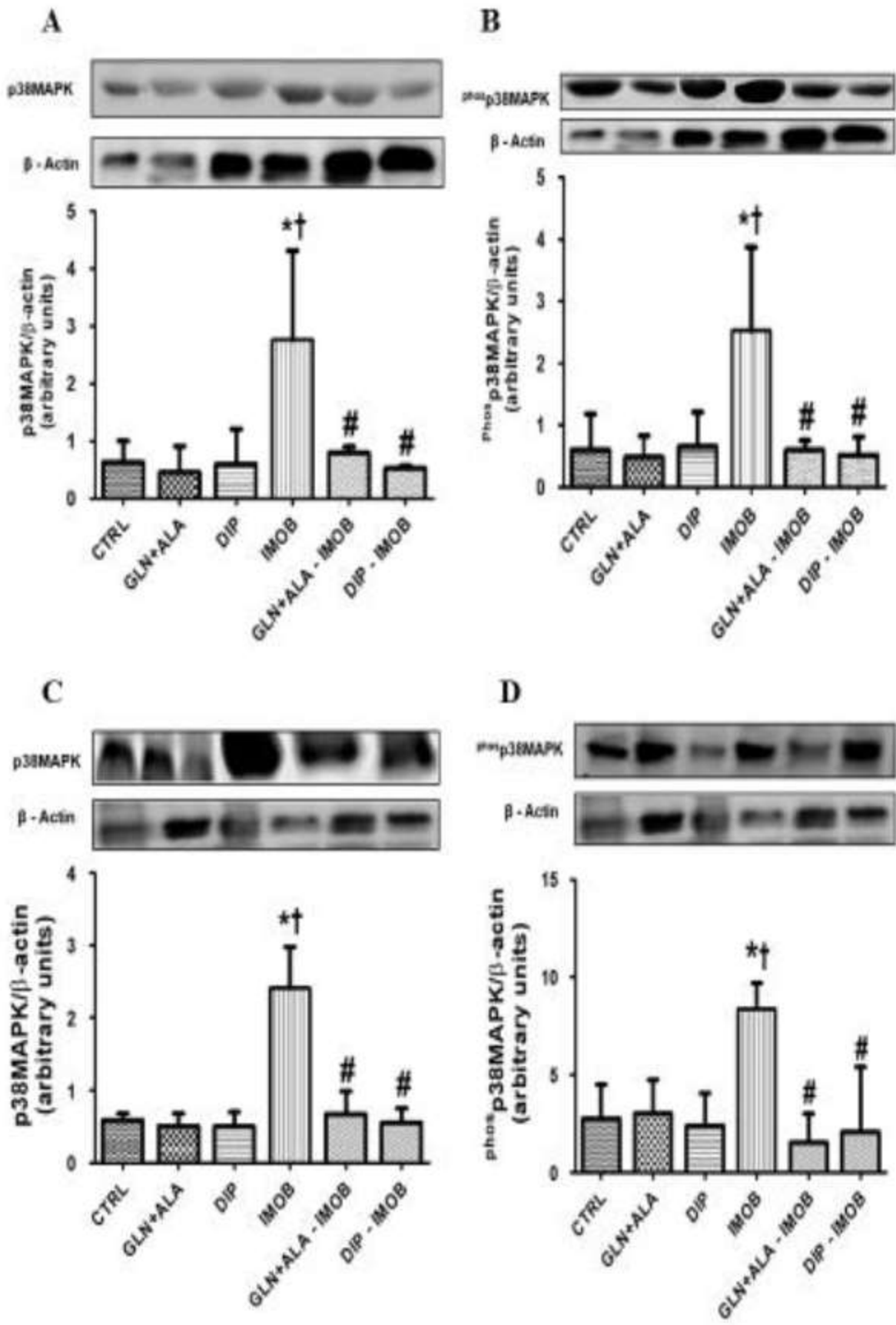


Figure 4 - Representative Western blot showing the analysis of total FOXO3a and phosphorylated FOXO3a protein expression in soleus (A and B) and gastrocnemius (C and D) muscle of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).

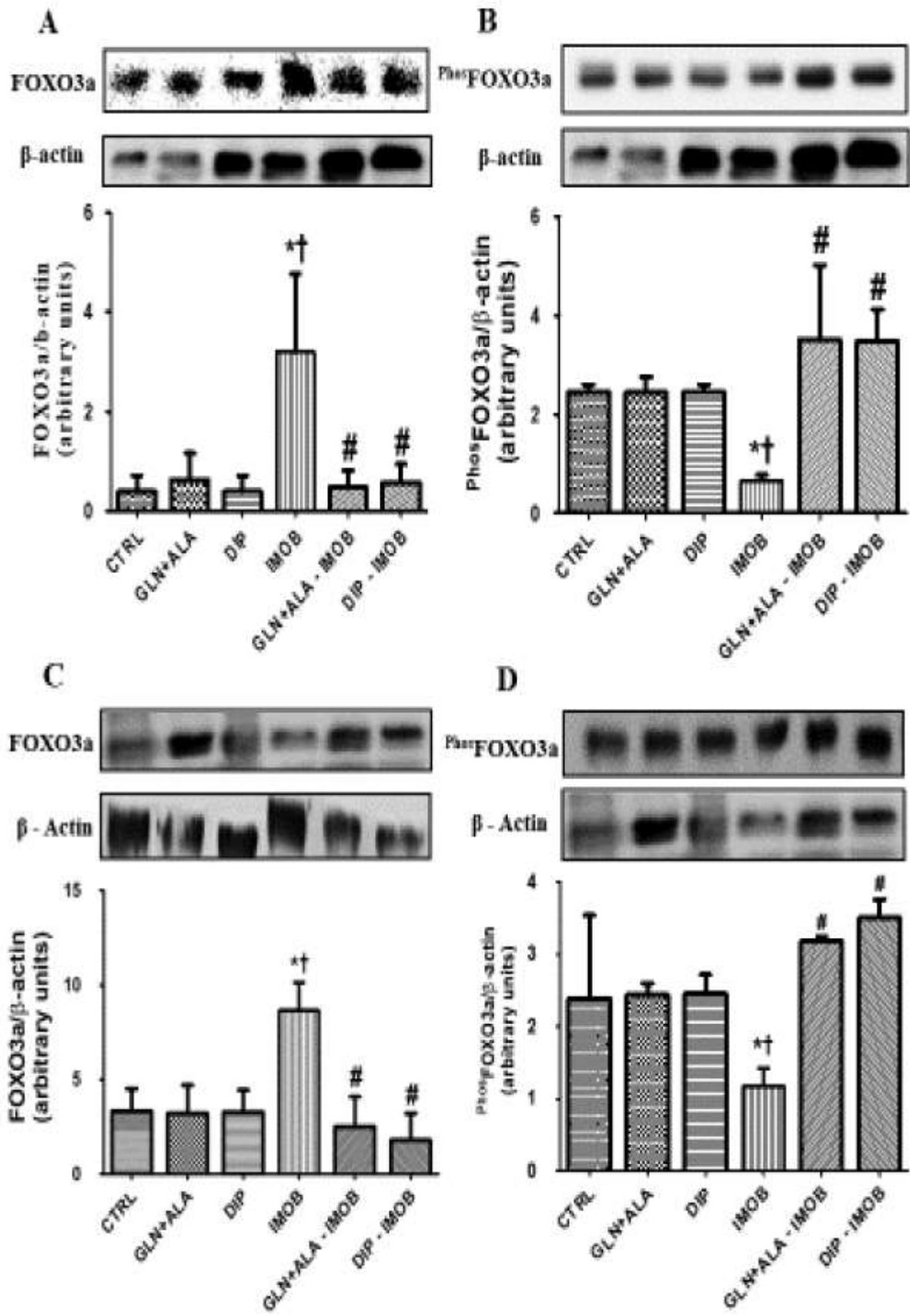
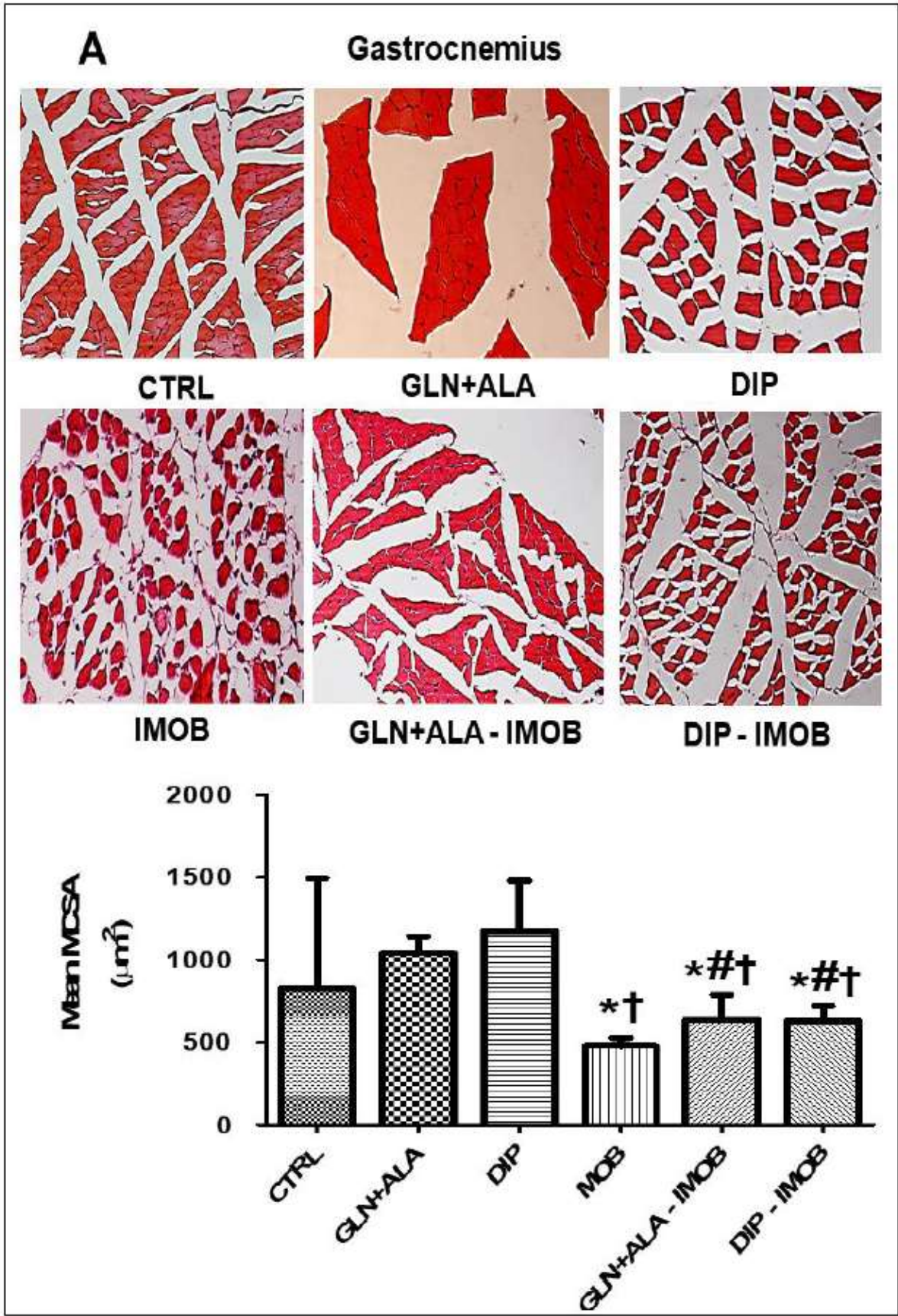
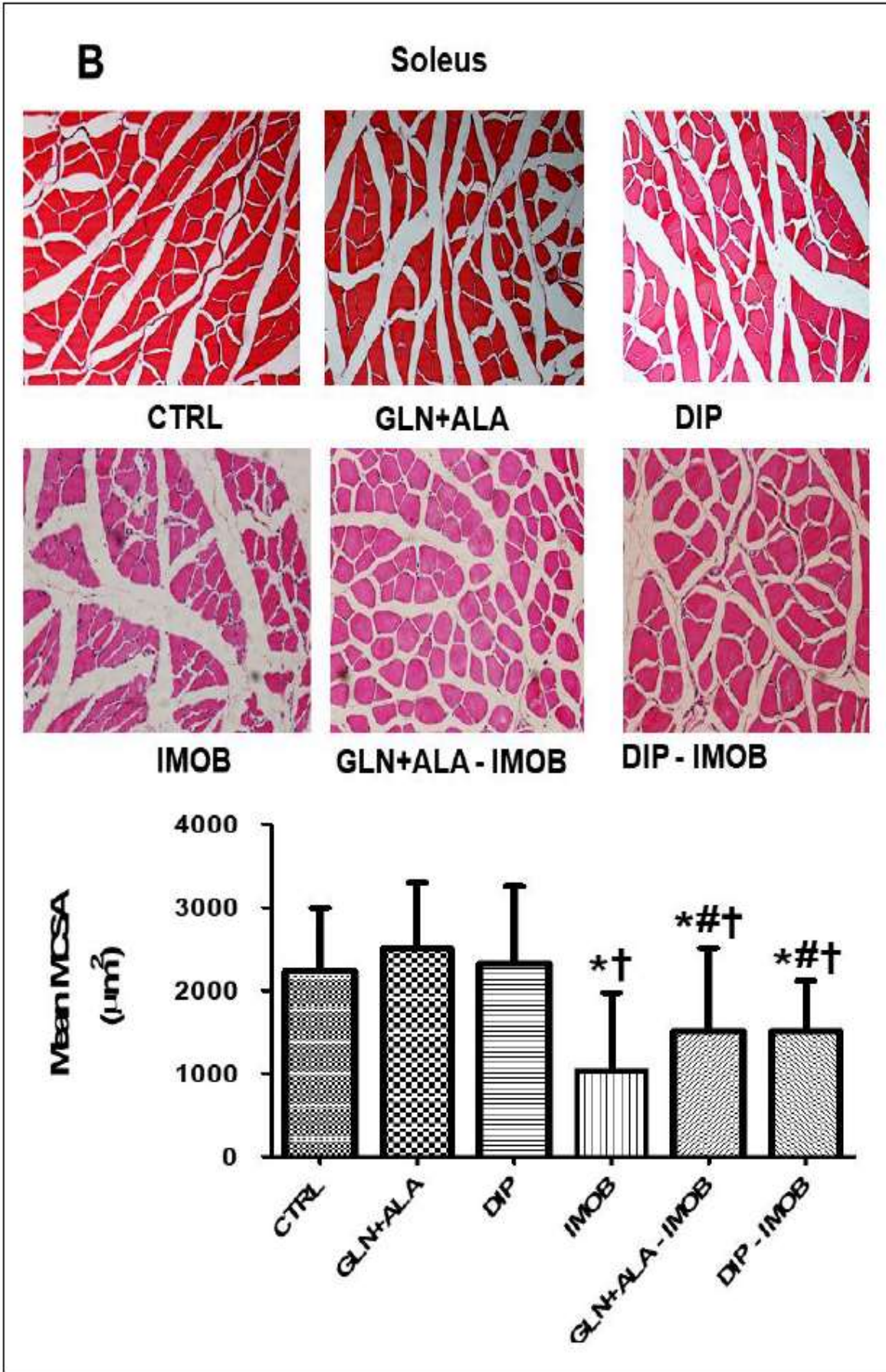


Figure 5 - Myofibrillar cross-sectional area (MCSA) in gastrocnemius (A) and soleus (B) muscle of Wistar rats (n = 8 per group) submitted to bilateral hindlimb immobilization (IMOB), orally supplemented (for 14 days concomitantly to immobilization period) with dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP-IMOB) or a solution containing the amino acids L-glutamine plus L-alanine (GLN+ALA-IMOB), both in their free form and, non-immobilized (CTRL, GLN+ALA and DIP) animals. CTRL (control group) and IMOB groups received equal volumes of water via gastric gavage in the same period. Data are reported as mean \pm S.E.M. * p<0,05 compared to CTRL group; # p<0,05 compared to IMOB group; † p<0,05 compared to GLN+ALA and DIP groups (Tukey HSD).





6. DISCUSSÃO

O presente estudo fornece novas e importantes informações a respeito do *status* corporal do aminoácido L-glutamina, durante um período de imobilização de membros. De nosso conhecimento, esta é a primeira pesquisa a evidenciar esse tópico em um modelo *in vivo* de atrofia muscular por desuso. Nossos resultados demonstram que 14 dias de imobilização dos membros posteriores reduziram significativamente as concentrações de glutamina no plasma e nos músculos sóleo e gastrocnêmio, o que foi atenuado e/ou revertido por ambas as suplementações orais com a solução GLN+ALA e/ou DIP. Além disso, observamos que ambos os suplementos de GLN administrados no presente estudo, através de uma decisiva modulação sobre o eixo antioxidante GLN-GSH e a expressão da proteína citoprotetora HSP70, atenuaram a inflamação e o estresse oxidativo muscular e sistêmico, bem como a ativação de vias de sinalização celular, com potencial proteolítico e pró-apoptótico (NF- κ B, p38 MAPK e FOXO3a, respectivamente), desencadeado pela atrofia muscular por desuso, induzida pela aplicação de um novo modelo experimental de imobilização dos membros posteriores, em roedores.

A atrofia da musculatura esquelética, induzida por situações deletérias, incluindo imobilização de membros, é caracterizada pela redução na área de secção transversal miofibrilar, do conteúdo protéico, da tensão e da produção de força, bem como por aumentada fatigabilidade do tecido muscular esquelético (JACKMAN & KANDARIAN, 2004; LI et al., 2008). Além disso, a atrofia da musculatura esquelética tem se relacionado, intimamente, à etiologia de patologias consideravelmente incapacitantes, fato que tem se mostrado um verdadeiro desafio à reabilitação de seres humanos ou animais, afetados por tal injúria, devido a problemas sensitivos, motores e alterações viscerais, dela decorrentes. Adicionalmente, indivíduos submetidos a situações que levem à atrofia da musculatura esquelética, podem ser acometidos por uma série de fisiopatologias secundárias, entre elas

uma maior incidência de infecções, fato que, além de retardar sua recuperação, contribui para a elevação da morbidade e, até mesmo, para um maior grau de mortalidade, entre esta população (ADAMS et al., 2003; FITTS et al., 2001; HESPEL et al., 2001). Não obstante, além de ser intimamente associada à degradação do conteúdo proteico muscular, a atrofia da musculatura esquelética, por desuso, tem sido implicada no disparo de respostas neuroendócrinas, inflamatórias, imunes e de sinalização intracelular, que, em última instância, culminam na exacerbação da depleção do *pool* de nitrogênio corporal, em decorrência de uma série de alterações metabólicas, advindas da instalação de um quadro de hipercatabolismo (PLANK & HILL, 2000; JACKMAN & KANDARIAN, 2004). Para se ter uma melhor noção da gravidade deste estado hipercatabólico, se a este, ainda for associado um quadro infeccioso, a perda de nitrogênio corporal, pode chegar entre 20 a 40g, ao dia (PLANK & HILL, 2000). Deste modo, um estado de hipercatabolismo induzido por situações que culminem na atrofia da musculatura esquelética, incluindo desenervação, subnutrição, câncer, HIV/aids e imobilização de membros, pode levar, rapidamente, um organismo outrora saudável, a um estado de caquexia, o qual pode propiciar o desencadeamento de infecções mais severas, como choque séptico, ou, ainda, distúrbios respiratórios e dificultar o processo de cicatrização e recuperação do indivíduo.

Perfazendo cerca de 40% da massa corporal total, o músculo esquelético é quantitativamente o principal sítio de síntese, estoque e liberação endógena de glutamina (GLN), para o organismo (NEWSHOLME et al., 2003). De fato, o músculo esquelético é responsável por mais de 60% do total da GLN livre do organismo, fato que torna esse tecido, embora não seja o único, de fundamental importância para a manutenção da glutaminemia (NEWSHOLME et al., 2003; CURI et al., 2005; ROGERO et al., 2006; WANG et al., 2015). Neste contexto, a predominância do tipo de fibra muscular representa fator com considerável influência sobre a concentração muscular de aminoácidos livres, incluindo a concentração de GLN (GRAHAM & MACLEAN, 1998). De acordo com Graham & Maclean

(1998), músculos que apresentam composição mista de fibras, ou seja, com maior predomínio de fibras do tipo IIa, como é o caso do músculo gastrocnêmio, apresentam menor concentração de GLN e outros aminoácidos livres, como o glutamato (GLU), em relação a músculos onde há o predomínio de fibras do tipo I, mais oxidativas, tal como o músculo sóleo. Dentre os fatores que corroboram para esta menor concentração de destes aminoácidos no músculo gastrocnêmio, entre outros, estudos têm indicado que prepondera o fato deste músculo, apresentar menor atividade de enzimas tais como a glutamina sintetase (GS) e a glutamato desidrogenase (GDH), ou ainda, uma menor disponibilidade de ATP, para a síntese de aminoácidos (GRAHAM & MACLEAN, 1998; CURI, 2000).

Sob condições fisiológicas normais, a GLN é sintetizada de acordo com as necessidades do organismo (NEWSHOLME et al., 2003b). No entanto, sob condições de elevado estresse metabólico, incluindo câncer, sepse e exercícios físicos intensos, prolongados ou exaustivos, entre outros, no entanto, o metabolismo muscular e a concentração plasmática deste aminoácido, são drasticamente comprometidos, uma vez que tais situações estimulam as células a consumir grandes quantidades de GLN, levando a um desequilíbrio entre o requerimento corporal deste aminoácido e a sua capacidade de síntese *de novo* (CRUZAT et al., 2014a; PETRY et al., 2014). Em nosso estudo, a aplicação de um novo protocolo experimental de imobilização dos membros posteriores a roedores, por 14 dias, induziu a atrofia da musculatura esquelética destes membros, evidenciada pela significativa redução da área de secção transversa muscular (ASTM) e do conteúdo proteico miofibrilar, dos músculos sóleo e gastrocnêmio, em animais do grupo IMOB (Figura 5A e B artigo 2; Tabelas 2 e 3, artigo 1). Ao mesmo tempo, o estresse causado pela imobilização e, conseqüente, atrofia muscular, evidenciada também, por significativa redução no peso muscular, razão peso muscular/peso corporal e % de alteração do peso muscular (grau de atrofia muscular), prevalecendo, de forma mais acentuada, no músculo gastrocnêmio, de animais IMOB, induziu significativa redução na disponibilidade de GLN

no plasma e nos músculos sóleo e gastrocnêmio, neste mesmo grupo de animais (Tabela 1, artigo 2, Tabelas e 2 e 3, artigo 1), fato que foi atenuado e reestabelecido pela administração de ambas as suplementações orais com L-alanil-L-glutamina (DIP) e/ou L-glutamina conjugada com L-alanina (solução GLN+ALA), em suas respectivas formas livre, nos grupos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB (Tabela 1, artigo 2, Tabelas e 2 e 3, artigo 1). Tal situação reverberou, positivamente, na atenuação da redução da ASTM, do conteúdo proteico miofibrilar, assim como sobre os demais parâmetros morfológicos, acima descritos e analisados, no presente estudo, igualmente, em animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB. Esses resultados estão de acordo com os de outros estudos em que as mesmas formas de suplementação oral com GLN, mostraram-se eficazes em manter os estoques musculares deste aminoácido em animais submetidos a situações de elevado estresse fisiológico, incluindo exercícios físicos intensos e prolongados (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015), de resistência (RAIZEL et al., 2016) e situações catabólicas, como endotoxemia (CRUZAT et al., 2014a,b). Adicionalmente, nossos resultados sugerem que as suplementações administradas na presente pesquisa, também atenderam à demanda de GLN para órgãos como rins, fígado, intestino e células de rápida divisão, como células do sistema imune, durante o período de desuso muscular, provocado pela aplicação do protocolo experimental de imobilização de membros, apresentado neste estudo. Não obstante, nossos resultados atestam que os grupos de animais não imobilizados e suplementados tanto com DIP ou com a solução GLN+ALA (grupos DIP e GLN+ALA, respectivamente) não demonstraram quaisquer efeitos sobre a glutaminemia, sugerindo que a suplementação prévia de GLN, a um estímulo catabólico não oferece benefícios cumulativos, fato que, corrobora, com outros estudos, onde as mesmas suplementações foram avaliadas, porém em situações catabólicas, tais como sepse (CRUZAT et al., 2014 a,b).

Embora alguns estudos considerem a administração de 1g/Kg de peso corporal de GLN, tanto na forma livre, quanto na de dipeptídeo elevada (D'SOUZA et al., 2004; GARLICK, 2004), e desta forma possivelmente tóxica ao organismo, cabe enfatizar, que no presente estudo, não foi constatado qualquer indício de toxicidade, decorrentes das intervenções nutricionais, tais como hiperamonemia, uma vez que a concentração de amônio plasmático, permaneceu inalterada, em todos os 6 grupos experimentais que integraram o estudo.

Apesar das alterações morfométricas observadas em decorrência da aplicação do protocolo experimental de imobilização de membros, cabe ressaltar, no entanto, que não constatamos quaisquer alterações, estatisticamente significativas, decorrentes das intervenções nutricionais, tanto em relação ao peso corporal, quanto em relação à ingesta alimentar (consumo de ração), entre os grupos de animais. Estes resultados se assemelham aos de prévia pesquisa, onde não se verificou alterações nesses mesmos parâmetros, em animais igualmente submetidos a um período de imobilização de membros (SHIBAGUCHI et al., 2016).

De acordo com Newsholme et al. (2003a) e Newsholme et al. (2003b), a GLN, assim como a glicose, configura-se em um nutriente indispensável para as células, uma vez que está envolvida na manutenção e promoção de uma ampla gama de funções essenciais a manutenção de homeostasia celular, como a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, regulação do balanço ácido básico, manutenção do volume celular, transporte de amônia entre os tecidos, proliferação e desenvolvimento de células, em especial de células do sistema imune e na síntese de GLU (CURI, 2000; VALENCIA, MARIN & HARDY, 2002; CORLESS et al., 2006, PETRY et al., 2013). Estudos têm demonstrado também, que a GLN é essencial para a síntese do tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina (GSH), o qual corresponde ao principal e em maior concentração, antioxidante celular não

enzimático, do organismo (MEISTER & ANDERSON, 1983). Logo, uma menor disponibilidade de GLN ao organismo, principalmente no meio intracelular tem sido associado a uma reduzida síntese de GSH, uma vez que, tal situação compromete o fornecimento de GLU, para a síntese deste antioxidante (FLÄRING et al., 2003). Composta por resíduos de cisteína, ácido glutâmico e glicina (MEISTER & ANDERSON, 1983), a GSH é encontrada em elevadas concentrações nas células. Na tentativa de contribuir para o equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, ou seja, com o intuito de atenuar uma situação de estresse oxidativo, a GSH pode reagir diretamente com as ERO e ERN, mediante reações não enzimáticas, onde esta, a fim de reduzir a interação destas espécies radicalares, com as células, passa de sua forma reduzida (GSH) para sua forma oxidada, também denominada dissulfeto de GSH (GSSG; DRÖGE, 2002). Não obstante, no intuito de atenuar a ação deletéria de ERO e ERN, a GSH, também pode agir como doadora de elétrons na redução de peróxidos, catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) (SEN, 1995; JI, 1999).

Durante um período de atrofia da musculatura esquelética, por desuso, em decorrência de situações as quais se incluem a imobilização de membros, observa-se uma elevada síntese de ERO, no músculo esquelético (POWERS et al., 2007). As ERO, apesar de desempenharem papel fundamental nas adaptações musculares (GOMEZ-CABRERA et al., 2010; MASON & WADLEY, 2014), quando sintetizadas em excesso, no entanto, tem sido associadas a alterações no estado redox celular e de importantes funções celulares (POWERS et al., 2007; MASON & WADLEY, 2014), fato que, por sua vez, tem sido relacionado a maior suscetibilidade a lesões celulares do tipo oxidativas, através do processo de peroxidação dos fosfolipídios que compõem as membranas celulares e subcelulares, danos ao DNA e a proteínas intracelulares (JENKINS, 1988; BEJMA; JI, 1999; JI, 1999; HALLIWELL & GUTERIDGE, 1991; DRÖGE, 2002; DALLE-DONNE et al., 2006). O estado redox celular é medido pela razão entre $[GSSG]/[GSH]$. Neste tocante, quando

se observa um desvio nesta razão em direção à redução da concentração de GSH, em detrimento do aumento da concentração de GSSG, observamos um cenário de estresse oxidativo (PETRY et al., 2010; DRÖGE, 2002; LI et al., 1998). Logo, o estado redox das células está intimamente ligado à concentração de GSH (ROTH et al., 2002), que por sua vez é influenciada pela disponibilidade de GLN às células. Deste modo, uma redução na disponibilidade de GLN muscular pode comprometer a síntese *de novo* de GSH, uma vez que a GLN é o precursor imediato de GLU, mesmo que a cisteína e a glicina se encontrem em níveis, relativamente constantes na célula (RUTTEN et al., 2005). No presente estudo, a menor disponibilidade de GLN no grupo IMOB reduziu a capacidade de defesa antioxidante mediada pela GSH nesse grupo, promovendo estresse oxidativo, inferido pela elevada razão [GSSG]/[GSH], tanto no músculo sóleo, quanto no gastrocnêmio, bem como nos eritrócitos de esses animais (Tabelas 2, 3 e 4, artigo 1). Esses achados ganham ainda mais relevância se nos reportarmos ao fato de que cerca de 10% do total da GSH corporal é sintetizada nos eritrócitos, onde esse tripeptídeo corresponde ao mais abundante grupo thiol nestas células (ROTH et al., 2002; SILVEIRA et al., 2007). Deste modo, considerando-se que os eritrócitos circulam em todos os tecidos corporais, observa-se que o estado redox geral do organismo, nos animais IMOB, foi substancialmente prejudicado, ao mesmo tempo em que as concentrações de TBARS no plasma e músculo esquelético, bem como de proteínas carbonilas, no músculo, foram consideravelmente superiores à dos grupos basais do estudo, indicando que houve aumento na formação de peróxidos lipídicos e danos a proteínas celulares e subcelulares e, conseqüentemente, estresse oxidativo sistêmico, neste grupo de animais. Concomitantemente a esses achados, elevado processo pró-inflamatório, mediado por elevada concentração de TNF- α no plasma e no músculo esquelético, também foi evidenciada em ratos IMOB (Tabelas 2, 3 e 4, artigo 1). Nesse contexto, Inoue et al. (1993) destacam que a elevação da concentração plasmática e tecidual de TNF- α , bem como de hormônios contra-reguladores, incluindo o cortisol, que

apresentou elevada concentração no plasma dos animais imobilizados e não suplementados (grupo IMOB), tem se correlacionado a indução da reversão do papel do fígado, no metabolismo da GLN. De acordo com este mecanismo, o fígado, que atua predominantemente, como órgão sintetizador de GLN, torna-se um tecido predominantemente consumidor deste aminoácido. Ainda segundo Inoue et al. (1993), esta reversão do papel do fígado no metabolismo da GLN é atribuído ao intenso envolvimento deste órgão no metabolismo intermediário de aminoácidos e na síntese de glicose, para manter a glicemia e fornecer esses substratos a outros tecidos, entre os quais, o cérebro.

Em nosso estudo, a concentração de GLU, tanto plasmática quanto tecidual permaneceu inalterada, entre os grupos de animais, fato que nos faz crer que a razão GLN/GLU no plasma e tecido muscular esquelético, obrigou o equilíbrio da reação enzimática, mediada pela enzima glutaminase (GLS) e o consumo de GLU, por meio da via da enzima glutamato alfa-cetoglutarato, envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GLUD1), desviando o mesmo, para a síntese de GSH, nos tecidos metabolicamente ativos, dentre os quais, se inclui o músculo esquelético (WELBOURNE et al., 2001). Fato semelhante, já foi verificado em prévias pesquisas (CRUZAT et al., 2014 a,b; PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015), mesmo em condições de elevado catabolismo muscular, onde as células necessitam de elevada disponibilidade de GLN, para a síntese de outros compostos, tais como a GSH. De acordo com Rutten et al. (2005) parte destes resultados, podem ser creditados, ainda, ao fato do transportador de GLU (denominado X-ag), localizado na membrana celular, apesar de possuir alta afinidade por este aminoácido, contudo, possuir um Km muito elevado ($\pm 100 \mu\text{mol/l}$) em comparação a concentração plasmática de glutamato ($\pm 64 \mu\text{mol/l}$), o que limita o transporte deste aminoácido, para o interior das células. Dessa forma, nossos resultados evidenciam que a maior proporção de GLN/GLU observada nos animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB reforçou a disponibilidade de substratos para a síntese de GSH, o que equilibrou significativamente o metabolismo

deste antioxidante nos eritrócitos e no tecido muscular esquelético, nesses grupos. Não obstante, essa melhora no *status* redox celular, evidenciada pela reduzida razão [GSSG]/[GSH], explica, ao menos em parte, a atenuada peroxidação lipídica observada, fato evidenciado pela menor concentração de TBARS no plasma e músculo esquelético, em animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB (Tabelas 2, 3 e 4, artigo 1).

De acordo com Fläring et al. (2003) a GSH, entre outras funções, protege a membrana celular, mantendo a concentração de muitas proteínas e seus grupos sulfidril (-SH) na forma reduzida, necessários para a manutenção da homeostase celular. Com base nessa premissa e considerando o aumento na concentração de GSH promovido pelos suplementos de GLN, tanto no músculo sóleo quanto no gastrocnêmio, se evidencia que a taxa de reconversão de GSSG em GSH, por meio da ação da enzima glutationa redutase (GSR), que utiliza NADPH como fonte de poder redutor (RUTTEN et al., 2005) promoveu o equilíbrio do estado redox, fato que inferimos ter sido preponderante para o menor dano a proteínas, evidenciado por uma menor concentração de proteínas carbonilas, observada músculo esquelético nos grupos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, em comparação ao grupo IMOB (Tabelas 3 e 4, artigo 1). Embora o presente estudo não tenha se focado na elucidação dos mecanismos pelos quais GLN e ALA (seja em suas formas livre ou como dipeptídeo) aumentam o conteúdo de GSH nos eritrócitos e no tecido muscular esquelético, de animais submetidos à atrofia muscular por desuso, por meio do processo de imobilização de membros, é cientificamente verificado que em situações de extremo catabolismo, tais como estados hipoproteinêmicos, a atividade da GLS é aumentada, de forma a metabolizar o GLU (AGARWAL et al., 1981; RUTTEN et al., 2005) fato que, parece ter ocorrido nos animais submetidos à imobilização de membros. Whillier et al. (2011) demonstraram que a GLN plasmática, em conjunto com a ALA derivada do alfa-cetoglutarato, são os principais substratos para o fornecimento de GLU para a síntese de GSH nos eritrócitos. Não obstante, de acordo com Felig (1975), como a GLU é impermeável à membrana celular,

eritrócitos tendem a equilibrar as concentrações de GLN e ALA no plasma e tecidos. Além disso, em situações catabólicas, semelhantes ao processo de imobilização de membros, a fim de manter o estado redox celular, a GLN mitocondrial pode ser desviada para o citosol, a fim de fornecer substrato para a síntese de GSH, fato que, igualmente depende da ação da enzima GLS, e que, evidencia, uma vez mais, a importância deste aminoácido para a manutenção do estado redox celular (CRUZAT et al., 2014b). Além deste mecanismo, tem sido proposto, também, que a ALA presente em ambos os suplementos, na mesma quantidade, utilizado no presente estudo, possa ser o franco aminoácido, doador de GLU para a enzima glutamato cisteína ligase, subunidade catalítica (GCLC), de forma a aumentar o conteúdo de GSH muscular (CRUZAT et al., 2014b). Estudos onde as mesmas formas de suplementações, por via oral, empregadas no presente estudo, foram utilizadas (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015) indicam que a adição de ALA livre a GLN, semelhante à solução GLN+ALA, pode elevar, rapidamente, a concentração plasmática de ALA, uma vez que o transporte desse aminoácido através das células epiteliais intestinais ocorre de forma preferencial pelos transportadores A, ASC, PAT e Y + L (BRÖER, 2008; PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015). Ao avaliar o transporte de ALA em células do epitélio intestinal, Sigrist-Nelson et al. (1975) verificaram que a absorção deste aminoácido, pode ser reduzida quando em conjunto a alguns aminoácidos neutros; contudo, entre estes aminoácidos, não estava incluída a GLN. A forma oral de administração de GLN é um fator importante a ser considerado no aumento da disponibilidade desse aminoácido para o organismo; entretanto, a presença do aminoácido ALA contribui, de alguma forma, para o efeito do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015). Harris et al. (2012) investigaram o efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre, como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) ou L-glutamina associada a outra fonte proteica, tal como a proteína do glúten, sobre a glutaminemia, em humanos. Os resultados deste estudo demonstraram que tanto o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina quanto a GLN livre associado à

proteína do glúten, foram eficazes em elevar os níveis plasmáticos de GLN, não havendo diferença entre estes grupos. Contudo, ambas as formas de suplementação promoveram uma resposta significativamente superior, quando comparadas apenas a GLN administrada de forma isolada. Desta forma, a preferência pelo uso de dipeptídeos de GLN, como o L-alanil-L-glutamina, demonstra estar atrelada, ao fato deste dipeptídeo poder promover um aumento estequiométrico dos aminoácidos GLN e ALA no plasma (KLASSEN et al., 2000). Não obstante, os enterócitos apresentam mecanismos eficientes de captação de dipeptídeos, o que inclui, principalmente, a proteína PepT-1 (ADIBI, 2003). Dependente de íons hidrogênio (H^+), o PepT-1 possui ampla especificidade por substratos e transporta ativamente dipeptídeos e tripeptídeos pelo intestino de humanos e animais (FEI et al., 1994; ADIBI, 2003). A presença da PepT-1 representa a principal via de absorção dos produtos finais da digestão proteica, permitindo que dipeptídeos sejam transportados da mucosa intestinal, que apresenta muito pouca ou nenhuma atividade de hidrolases peptídicas (5% a 12% da atividade total) para o citosol, onde as peptidases apresentam uma elevada atividade (80% a 95% da atividade celular total; YANG, DANTZIG & PIDGEON, 1999; ADIBI, 2003). Adicionalmente, em nosso estudo, a alteração metabólica promovida pelos suplementos de GLN+ALA e DIP também pode ter atenuado o consumo de glicose através do desvio da via da pentose-6-fosfato, permitindo que a glicose seja utilizada na glicólise para a síntese de ATP, em vez de produzir NADPH para reduzir o excesso de GSSG, formado em decorrência do desequilíbrio pró-oxidativo, desencadeado pela atrofia muscular por desuso, advinda do período de imobilização de membros, empregado no presente trabalho. Deste modo, as alterações metabólicas promovidas pelas suplementações, empregadas neste estudo, permitiram que a disponibilidade de GLN, no sistema circulatório, fosse mantida, de forma que esta estivesse disponível, para ser consumida por outras células, como por exemplo, células do sistema imune.

Está bem estabelecido que as ERO atuam como um dos principais contribuintes para o desenvolvimento da atrofia e proteólise do músculo esquelético (POWERS et al., 2007). Essa situação está ligada ao fato de que essas espécies radicalares podem ativar diversos elementos catabólicos reguladores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF- α e, vias de sinalização celular com potencial proteolítico (JACKMAN & KANDARIAN, 2004). Nesse contexto, apesar do desencadeamento do processo de atrofia muscular poder envolver a ativação diferencial, de múltiplas vias de sinalização celular, contudo, a atividade transcricional e de sinalização do NF- κ B é agora reconhecida por induzir o aumento, bem como desencadear e/ou contribuir para a indução de diversos modelos de atrofia muscular por desuso (SENF et al., 2008). Cai et al. (2004) e Van Gammeren et al. (2009) relatam que a ativação isolada da via de sinalização do NF- κ B, *in vivo*, é suficiente para induzir e/ou causar atrofia do músculo esquelético. O NF- κ B representa uma família de fatores de transcrição induzíveis, compostos por cinco homo e/ou heterodímeros, estruturalmente relacionados entre si, incluindo: NF- κ B1 (também denominado p50), NF- κ B2 (também denominado p52), RelA (também denominado p65), RelB e c-Rel (LIU et al., 2017). Sob condições de não estresse, os membros da família NF- κ B são encontrados em sua forma inativa, no citosol, de diversos tipos de células, em mamíferos (Liu et al., 2017). No entanto, sob condições estressantes, incluindo períodos de desuso da musculatura esquelética e subsequente atrofia deste tecido, uma variedade de estímulos, como estresse oxidativo, advindo do desequilíbrio entre a síntese e remoção de ERO, bem como a elevada síntese e liberação de outros mediadores da atrofia muscular, incluindo TNF- α (LI et al., 2005; POWERS et al., 2007), induzem a translocação desses homo e/ou heterodímeros para o núcleo celular, e sua ligação a um elemento específico no DNA, denominado potenciador κ B, fato que media e/ou regula a transcrição de uma variedade de genes envolvidos, entre outras funções, com resposta imune, inflamatória e apoptose celular (LIU et al., 2017). A translocação nuclear dos homo e/ou heterodímeros

da família de fatores de transcrição NF- κ B é regulada por duas quinases *upstream*: o inibidor kappa B quinase alfa (IKK α) e o inibidor kappa B quinase beta (IKK β ; REED et al., 2011). Sob situações que levem a atrofia da musculatura esquelética, por desuso, ERO e TNF- α atuam promovendo a fosforilação e a ubiquitinação dos IKKs, os quais, uma vez nesta conformação molecular são, subseqüentemente, degradados pelo principal sistema de degradação proteica do organismo, o sistema 20S/26S ubiquitina-proteassoma, promovendo a ativação do NF- κ B (LI et al., 2008; LIU et al., 2017). Os resultados do presente estudo estão alinhados com essas evidências, uma vez que a aplicação de 14 dias de imobilização dos membros posteriores elevou significativamente os níveis de TNF- α no plasma e no músculo esquelético, fato que foi acompanhado por um significativo aumento no conteúdo da proteína IKK α/β fosforilada bem como, por um significativo aumento na expressão proteica do heterodímero NF- κ B p65, em suas isoformas total e fosforilada, no músculo sóleo e gastrocnêmio, de animais IMOB (Figuras 4 e 5 A, B, C e D, artigo 1). Por outro lado, tanto a suplementação com a solução GLN+ALA quanto com DIP reduziram significativamente a resposta inflamatória mediada pelo TNF- α no plasma e no músculo esquelético, fato que repercutiu na redução dos níveis de expressão proteica de IKK α/β fosforilada, no músculo sóleo e gastrocnêmio de animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, (Figuras 4D e 5D, artigo 1), de NF- κ B p65 fosforilado e total, igualmente, no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB (Figuras 4 e 5 A, B, C e D, artigo 1). Esses resultados são significativos e estão alinhados com os de outros estudos, os quais destacam que a inibição do NF- κ B, previne e/ou reduz em cerca de 50% a atrofia muscular, induzida durante períodos de desuso do tecido muscular esquelético (HUNTER et al., 2002; CAI et al., 2004; VAN GAMMAREN et al., 2009). Não obstante, de acordo com Roth et al. (1982), a resposta pró-inflamatória promovida pelo TNF- α , durante diversas condições catabólicas, também está associada à resposta de hormônios contra-reguladores, como o cortisol, os quais, além de estimular a perda muscular, levam à

redução da concentração de GLN, tanto no plasma quanto no músculo esquelético. Estudos *in vitro* e *in vivo*, relatam que a suplementação com GLN é capaz de atenuar a excessiva síntese e liberação de citocinas, incluindo TNF- α e seus efeitos catabólicos mediados, incluindo a resposta catabólica do cortisol (da SILVA LIMA et al., 2013; CRUZAT et al., 2014a), fato que também foi observado no presente estudo, nos grupos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB. Adicionalmente, a atenuação dos efeitos catabólicos promovidos pela exarcebação da síntese e liberação de TNF- α e ativação da via de sinalização do NF- κ B, mediada por ambas as formas de suplementação com GLN, administradas na presente pesquisa, ganha ainda mais importância, se nos reportarmos ao fato de que o alvo *downstream* da sinalização catabólica mediada pelo eixo TNF- α -IKK α / β -NF- κ B, no músculo esquelético, é a hiperativação do sistema 20S/26S ubiquitina-proteassoma (LI et al. 2005).

Estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que a ativação da via de sinalização intracelular das MAPKs (uma cascata de serina/treonina quinases que mediam a tradução de sinais intracelulares), especialmente a ativação da via do fator transcricional p38 MAPK, corresponde a outra importante via de sinalização celular, implicada no catabolismo e indução da atrofia da musculatura esquelética, mediado por estresse oxidativo, em diversos modelos experimentais de desuso, incluindo imobilização e membros (LI et al., 2005; CUENDA & ROUSSEAU, 2007; KIM et al., 2009). De acordo com Cuenda & Rousseau (2007), a ativação da p38 MAPK desempenha papel vital na iniciação da resposta inflamatória, bem como resulta em alterações na atividade transcricional de uma infinidade de fatores de transcrição celular, na síntese de proteica, expressão de receptores de superfície celular e na estrutura do citoesqueleto, fato que, em última instância, impacta sobre a sobrevivência da célula por desencadear a morte celular programada (apoptose). Li et al. (2005) observaram que a exposição de miotubos musculares em cultura, a TNF- α e/ou ERO, pela incubação destes, com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), induziu a ativação da p38 MAPK, fato que regulou, de forma positiva a expressão de MuRF-1, induzindo a

atrofia desses miotubos. Neste mesmo estudo, a ativação de p38 MAPK mostrou-se fortemente associada a expressão de atrogin-1, bem como ao aumento da atividade do sistema 20S/26S ubiquitina-proteassoma (LI et al., 2005). Além destes efeitos em nível celular, a ativação da p38 MAPK também tem demonstrado auxiliar na coordenação de respostas ao estresse, em nível de órgãos e tecidos, modulando a síntese de citocinas, catecolaminas e óxido nítrico (CUENDA & ROUSSEAU, 2007). Kim et al. (2009) destacam que a imobilização de um dos membros posteriores, de ratos, por 14 dias, induziu a atrofia do músculo gastrocnêmio do membro imobilizado, destes animais. Tal situação resultou na redução do peso e da área de secção transversa muscular, bem como em significativa elevação da expressão de p38 MAPK, em sua isoforma fosforilada e MuRF1. Segundo Kim et al. (2009), esses resultados sugerem que a expressão de MuRF1, no músculo esquelético durante períodos de desuso da musculatura esquelética, é regulada pela ativação da p38 MAPK.

Divresos artigos encontrados na literatura, têm sugerido que vias de sinalização celular podem interagir entre si, por meio de um mecanismo denominado de “conversa bioquímica cruzada”, do inglês “*biochemical cross talk*” (JACKMAN & KANDARIAN, 2004; LECKER et al., 2004). Nesse contexto, tem sido sugerido que a ativação da via da p38 MAPK está intimamente relacionada à ativação da via do NF- κ B, em resposta a estímulos, como a estimulação por citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α , em diferentes tecidos e tipos celulares (LECKER et al., 2004). Bechara et al. (2014) destacam que a hiperativação da NADPH oxidase induziu a atrofia do músculo plantar em ratos infartados, fato que promoveu o aumento da síntese de ERO, bem como a fosforilação da p38 MAPK, com subsequente ativação do NF- κ B e hiperativação do sistema ubiquitina-proteassoma. A exata quantidade de mecanismos de interação entre o p38 MAPK e o NF- κ B, bem como entre esta proteína quinase e outras vias de sinalização celular, no entanto, não é totalmente conhecida (JACKMAN & KANDARIAN, 2004). Contudo, em situações como a

descrita por Bechara et al. (2014), o p38 MAPK tem demonstrado agir tanto na tradução de sinais intracelulares, ou seja, como um fator de transcrição clássico, levando a subsequente ativação do NF- κ B e de diversas outras vias de sinalização celular, quanto na geração de respostas intracelulares subsequentes (LECKER et al., 2004). Nossos resultados quanto a expressão da proteína p38 MAPK estão alinhados a esses prévios estudos *in vivo* e *in vitro*, uma vez que a aplicação do novo protocolo de imobilização de membros, apresentado na presente pesquisa, estimulou o aumento dos níveis de TNF- α , tanto no músculo sóleo (um músculo predominantemente dotado de fibras oxidativas, tipo I), quanto no músculo gastrocnêmio (músculo com perfil de dotação de fibras glicolíticas mistas, tipo IIa e IIb), ao mesmo tempo em que induziu aumentos na expressão proteica de p38 MAPK (isoformas fosforilada e total) e NF- κ B, subunidade p65 (principalmente na forma fosforilada), no grupo IMOB. Desta forma, nossos resultados reforçam a ligação entre estresse oxidativo e atrofia da musculatura esquelética, induzida por imobilização de membros, mediada pela ativação da via de sinalização da p38 MAPK, bem como evidenciam ser esta via de sinalização um alvo a ser focado, em relação a aplicação de terapias anti-inflamatórias e anti-proteolíticas.

Em recente estudo, Girven et al. (2016) observaram que a administração de GLN representou importante e eficaz estratégia terapêutica, atenuando a ativação da via da p38 MAPK, bem como reduzindo a perda muscular em condições onde aumentos contínuos de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , foram observadas. Neste estudo, a suplementação de mioblastos C2C12 com 20mM de GLN, na presença de TNF- α (20ng/ml¹) resultou, não somente na redução da atividade da p38 MAPK, como também, no retorno dos níveis de expressão desta proteína a níveis basais, reverberando tanto na reversão do processo de atrofia, quanto no resgate do processo de diferenciação destes mioblastos em miotubos. Não obstante, quando administrada a miotubos maduros, a suplementação com GLN resultou na regulação positiva de genes associados ao crescimento e à sobrevivência, destas células (GIRVEN et al., 2016). Nossos resultados corroboram com os de Girven et

al. (2016) uma vez que, no presente estudo, observamos que a suplementação com GLN, tanto na forma de solução GLN+ALA quanto de DIP atenuaram a expressão proteica de p38 MAPK, formas fosforilada e total, no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos imobilizados, em comparação a animais IMOB (Figura 3A a D; $p < 0,05$; artigo 2). Não obstante, nossos resultados reforçam o importante papel anti-inflamatório atribuído a GLN, uma vez que tais resultados foram observados de forma paralela à redução nos níveis de TNF- α no plasma e músculo esquelético, bem como na expressão proteica de NF- κ B, subunidade p65, total e fosforilada, nos músculos sóleo e gastrocnêmio, igualmente em animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB.

Tem sido discutido na literatura, que o sistema ubiquitina-proteassoma desempenha papel preponderante durante a atrofia muscular induzida pela inatividade da musculatura esquelética, degradando proteínas sarcômericas (TALBERT et al., 2013). No entanto, tem sido sugerido que o sistema ubiquitina-proteassoma possa não ser o passo limitador da taxa de atrofia muscular, uma vez que esse sistema proteolítico, provou ser incapaz de quebrar os miofilamentos intactos da actina e miosina devido ao arranjo bem compactado dessas proteínas, em um complexo conhecido como complexo actomiosina, dentro dos sarcômeros do músculo estriado (DU et al., 2004). Desta forma, a liberação prévia dos miofilamentos de actina e miosina do complexo actomiosina-sarcômero, como proteínas monoméricas, antes de sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma, tem demonstrado ser o real passo limitador da taxa, e um pré-requisito para a degradação do conteúdo proteico muscular, mediado pelo sistema ubiquitina-proteassoma, durante períodos de desuso da musculatura esquelética (TALBERT et al., 2013). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm destacado o papel crítico desempenhado pela ativação da caspase-3 (uma protease aspartato-específica dependente de cisteína) na promoção da degradação do complexo actomiosina (DU et al., 2004; McCLUNG et al. 2007). Embora o controle da atividade da caspase-3 seja complexo e envolva várias vias interconectadas, tem sido

sugerido que a síntese exacerbada de ERO, associada à inatividade e/ou desuso da musculatura esquelética, contribua de forma decisiva para a ativação dessa protease durante um período de imobilização de membros (POWERS et al. 2007). Em estudo prévio, Du et al. (2004) relataram que níveis celulares elevados de ERO ativaram caspase-3, em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo o músculo esquelético. Desta forma, tem sido postulado que o estresse oxidativo contribui para a ativação da caspase-3 por duas vias, de forma essencial: 1) via mitocondrial - via liberação de citocromo c; fato que ativa o fator de ativação 1 da protease apoptótica (APAF-1) que, por sua vez, ativa a caspase-9 e/ou; 2) pela via de estresse do retículo sarcoplasmático - por meio da ativação da caspase-12; com acúmulo e posterior liberação, exacerbada, de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e ativação do sistema proteolítico das calpaínas (DU et al., 2004). Em relação a esta última via, Talbert et al. (2013) sugerem haver uma interligação (*cross talk*) entre os sistemas proteolíticos das calpaínas e o mediado pela caspase-3, fato que, segundo esses autores, pode desempenhar vital papel na regulação da liberação e degradação dos miofilamentos do músculo esquelético, durante períodos de desuso muscular. Du et al. (2004) observaram que a ativação conjunta da via das calpaínas e da caspase-3 foram capazes de induzir a desassociação do complexo actomiosina-sarcomérico. Desta forma, a ativação de uma ou de ambas as proteases acima descritas é considerada um requisito indispensável para a degradação dos miofilamentos musculares durante condições de desuso muscular (DU et al., 2004; TALBERT et al., 2013). Além do mecanismo a pouco descrito, estudos prévios têm evidenciado que a ativação induzida por ERO, da via de sinalização celular da p38 MAPK, conjugada a elevada síntese e liberação de TNF- α , correlaciona-se a ativação da caspase-3 (LI et al., 2005; LAGRANHA et al., 2007). Corroborando com estes prévios estudos, na presente pesquisa, evidenciamos que 14 dias de imobilização dos membros posteriores reduziu o *status* redox celular, menssurado pela razão [GSSG]/[GSH], indicando um significativo estresse oxidativo nos músculos sóleo e gastrocnêmio, bem

como nos eritrócitos, fato que foi acompanhado por significativo aumento na expressão proteica de p38 MAPK, sobretudo de sua isoforma fosforilada, em ambos os músculos analisados, assim como dos níveis plasmático e muscular de TNF- α , fato que ocorrerá de forma paralela ao aumento na atividade de caspase-3, nos mesmo músculos, em animais do grupo IMOB. Desta forma, embora no presente estudo não tenhamos avaliado, de forma direta, a apoptose mionuclear, nossos resultados nos permitem inferir que o mecanismo de ativação p38 MAPK-caspase-3 induzido e/ou mediado por TNF- α e ERO, pode ter contribuído para a indução de apoptose mionuclear no músculo sóleo e gastrocnêmio de ratos IMOB, durante os 14 dias de aplicação do protocolo experimental de imobilização de membros, utilizado neste trabalho. Por outro lado, nossos resultados atestam que, ao mesmo tempo em que a suplementação oral de GLN, tanto na forma de solução GLN+ALA quanto de DIP, foi eficaz em atenuar a elevação dos níveis plasmático e muscular de TNF- α , bem como a expressão proteica, da isoforma fosforilada, de p38 MAPK nos músculos sóleo e gastrocnêmio, em ratos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, estes mesmo suplementos de GLN também demonstraram ser eficazes, atenuando a ativação da caspase-3, igualmente nos músculos sóleo e gastrocnêmio, deste mesmo grupo de animais. Esses resultados vão de encontro aos de outros estudos *in vivo* e *in vitro*, nos quais a administração de GLN tanto na forma livre ou conjugada com ALA ou na forma de dipeptídeo, apresentou efeito protetor atenuando a apoptose, seja ela, induzida de forma isolada, pela ativação de caspase-3 e/ou em conjunto com a ativação de outras vias proteolíticas e pró-apoptóticas, como a do p38 MAPK, mediada por TNF- α , entre outras, em diversas condições estressantes ou catabólicas, incluindo uma única sessão de exercício físico intenso (LAGRANHA et al., 2007), exposição de enterócitos neonatais a ERO, endotoxina por LPS (HAYNES et al., 2009) e após choque hemorrágico (YANG et al., 2007). Adicionalmente, essas evidências reforçaram a hipótese postulada de que a inibição da atividade da caspase-3 poderia ser um alvo terapêutico na tentativa de se

retardar a ativação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma e a perda de mionúcleos, devido à apoptose mionuclear, mediada por atrofia muscular, decorrente de situações de desuso muscular.

Durante situações de estresse fisiológico tais como câncer, sepse, traumas cirúrgicos, HIV/aids, exercícios físicos intensos e prolongados e em períodos de desuso da musculatura esquelética, fato que leva a atrofia deste tecido, as células são expostas a inúmeras ocorrências desagregadoras, como, por exemplo, a interação com ERO e ERN, fato que culmina em alterações na homeostase celular (JI, 1999; DRÖGE, 2002; GABAI & SHERMAN, 2002; ATALAY et al., 2004). No intuito de se proteger de uma possível lesão e/ou danos, sob tais situações, as células desencadeiam uma série de eventos intracelulares, comumente conhecidos como "resposta celular de estresse" (FINKEL & HOLBROOK, 2000; GABAI & SHERMAN, 2002). De maneira geral, esta resposta é caracterizada pela indução da transcrição e subsequente expressão de uma variedade de genes, entre os quais estão incluídas as proteínas de choque térmico, HSPs (GABAI & SHERMAN, 2002; ATALAY et al., 2004; WISCHMEYER, 2006). Nas células, as HSPs são encontrados agrupadas em subfamílias (MORIMOTO, 1993). Dentre todas as subfamílias de HSPs, os membros da subfamília da HSP70, respectivamente, sua isoforma induzível de 72 kDa, HSP72 e constitutiva de 73 kDa, HSP73, configuram-se na subfamília de HSPs mais induzível e abundante nas células eucariotas (MORIMOTO, 1993; LOCKE, 2002). Prévios estudos têm indicado que a HSP70 desempenha um papel fundamental na regulação da plasticidade do músculo esquelético (MIYABARA et al., 2006; SENF et al., 2010; MIYABARA et al., 2012; PETRY et al., 2014), bem como, na proteção deste tecido, contra a apoptose de mionúcleos (TAKAYAMA et al., 2003). De fato, *in vivo*, a superexpressão de HSP70, mediada pela transfecção de camundongos com um plasmídeo HSP70 específico e/ou em camundongos transgênicos, que superexpressam esta HSP, protegeu o músculo esquelético desses animais, contra atrofia muscular por desuso

(MIYABARA et al., 2006; SENF et al. 2008). Esses efeitos anti-atróficos HSP70-mediados tem sido, pelo menos em parte, creditados à ação desta HSP no processo de dobramento e enovelamento (*foldings* e *misfoldings*, em inglês) de novas, assim como durante o reparo de proteínas, previamente lesadas ou danificadas. Tal preposição se deve ao fato da HSP70, tendo sua expressão induzida por diversos tipos de estímulos, como, por exemplo, o processo de regeneração de lesões musculares, entre outros, interagir com outras proteínas, de maneira ATP-dependente (KALINOWSKA et al., 2005), fato que demonstrou reverberar, negativamente, sobre a hiperativação do sistema de degradação proteica ubiquitina-proteassoma, durante períodos de intenso catabolismo muscular (TAKAYAMA et al., 2003).

Apesar de pesquisas prévias (BARBE et al., 1988; CURRIE et al., 1993; MOSELEY, 1997; SAMELMAN, 2000) apontarem que o estresse por choque térmico, corresponde ao fator indutor clássico (canônico) da expressão de HSPs, diversos outros estudos (SANDRES & KON, 1991; WISCHMEYER, 2002; WISCHMEYER, 2006; SINGLETON & WISCHMEYER, 2007; PETRY et al., 2014; PETRY et al., 2015), entretanto, têm indicado que agentes farmacológicos-nutricionais, principalmente a GLN, associada ou não, a algum estressor fisiológico, corresponde, atualmente, ao principal regulador farmacológico-nutricional, capaz de modular a expressão destas proteínas de choque térmico, tanto em nível de mRNA, quanto proteico. Neste contexto, Wischmeyer (2002), Wischmeyer et al. (2003) e Morrison et al. (2006) destacam que a GLN tem demonstrado exercer especial modulação sobre a expressão dos membros da família da HSP70. Tal modulação tem se configurado em essencial mecanismo de citoproteção contra diversas formas de lesão e injúrias, em um amplo espectro de células e tecidos, uma vez que, no ambiente intracelular, a HSP70 desempenha, entre outras funções, importante atividade anti-inflamatória e de tolerância ao estresse celular, promovendo a atenuação da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , bem como o bloqueio da ativação de vias de

sinalização celular, entre as quais, a do NF- κ B e da p38 MAPK (SINGLETON, BECKEY & WISCHMEYER, 2005; TANAKA et al., 2014; RAIZEL et al., 2016). Com base nestes pressupostos, prévios estudos (PETRY et al. 2014; PETRY et al., 2015; RAIZEL et al., 2016) tem sugerido que uma redução na disponibilidade de GLN, tal como observada no presente estudo, no plasma e músculo esquelético de ratos IMOB, associada a uma maior resposta inflamatória local e sistêmica, como igualmente observada, neste mesmo grupo de animais, pode levar a um déficit nos níveis de HSP70, tornando as células mais vulneráveis a diversos tipos de lesões e injúrias. De fato, nossos resultados, em relação aos efeitos da imobilização de membros sobre o conteúdo proteico de HSP70, no músculo esquelético, vão de encontro a estes prévios estudos, uma vez que, em nosso estudo, níveis reduzidos de expressão proteica de HSP70, tal como observado em ratos IMOB, contribuíram para a promoção de efeitos pró-inflamatórios nestes animais, fato evidenciado pela aumentada expressão proteica de NF- κ B, subunidade p65, tanto na sua isoforma fosforilada, quanto total, no músculo sóleo e gastrocnêmio, de animais IMOB, em comparação com animais CTRL, GLN+ALA e DIP (Figura 4A e B; $p < 0,05$, artigo 1). Não obstante, em nosso estudo, a resposta pró-inflamatória evocada pela imobilização de membros foi acompanhada por um aumento nos níveis de expressão proteica da proteína IKK α/β , tanto na sua isoforma fosforilada, quanto total, nos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos IMOB, em comparação aos grupos CTRL, GLN+ALA e DIP (Figura 4C e D; $p < 0,05$, artigo 1). Por outro lado, em consonância com a proposição de que a GLN é um substrato modulador essencial, para a expressão de HSP70, a aumentada expressão proteica desta HSP, tal como observado nos músculo sóleo e gastrocnêmio de animais imobilizados e suplementados com GLN+ALA e DIP, contribuiu, de forma decisiva, para a atenuação da expressão proteica de NF- κ B, subunidade p65, isoformas fosforilada e total, igualmente, nos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, quando comparados a animais IMOB (Figura 4A e B, artigo 1). Adicionalmente, nossos resultados

indicam, que este superior conteúdo de HSP70, mediado pelas suplementações com GLN, contribuiu para a redução de estímulos pró-apoptóticos e proteolíticos, mediados pela ativação da atividade de caspase-3 e da via de sinalização da p38-MAPK, nos músculos sóleo e gastrocnêmio, igualmente, de animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB (Figuras 1B e C, 3A a D, artigo 2). Tais resultados podem ser, ao menos em parte, atribuídos ao fato da HSP70 ter demonstrado poder suprimir a atrofia muscular esquelética, pelo seguintes mecanismos: 1) via inibição da apoptose dependente de caspases, inibindo a indução da fragmentação do DNA de caspase-3, e subsequente liberação de citocromo c e formação de apoptossomas; 2) por significativa supressão da interação do fator APAF-1 com a citocromo-c e; 3) via inibição da apoptose independente da caspases, inibindo a interação entre fatores apoptogênicos, como o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease G (KALINOWSKA et al., 2005).

Embora o foco do presente estudo tenha recaído apenas sobre os efeitos citoprotetores mediados pela GLN, via modulação da expressão de HSP70, se faz importante salientar que pequenos aminoácidos neutros, incluindo ALA, também tem demonstrado exercer efeitos citoprotetores contra insultos oxidativos, inflamatórios, metabólicos e químicos, em uma ampla gama de células e tecidos (GROSSER et al., 2004). Embora o exato mecanismo por detrás destes efeitos benéficos, mediados pela ALA, ainda se encontrem pouco esclarecidos, tem sido proposto, no entanto, que a ativação de mecanismos endógenos de sequestro de ferro, representados pela expressão e ativação da atividade enzimática da proteína antioxidante heme oxigenase-1 (HO-1), bem como a indução da expressão de genes antioxidantes, mediados por este aminoácido, podem ser o possível mecanismo por detrás destes efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e citoprotetores mediados pela ALA (MAINES, 1997; SUTTNER et al., 1999; IMMENSCHUH & RAMADORI, 2000; GROSSER et al., 2004;). Dessa forma, dado o fato de que nos dois suplementos de GLN, administrados no presente estudo, a ALA estava presente, na mesma

quantidade, é possível inferir que esse aminoácido, de alguma forma, tenha contribuído, também, para os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e citoprotetores sistêmicos e em nível do tecido muscular esquelético, observados em animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB.

A manutenção da massa muscular é fator essencial para uma melhor e mais longa qualidade de vida. De fato, sob períodos prolongados de desuso da musculatura esquelética, incluindo períodos de repouso forçado no leito e imobilização de membros, entre outros, a célula muscular apresenta expressão de mRNAs e proteica, bem como sua homeostasia, em níveis alterados (LLOVERA et al., 1997; LECKER et al., 2004; HEINEMEIER et al., 2009). Tal situação se traduz, em última análise, em alterações morfológicas na estrutura do tecido muscular esquelético, advindas de uma exacerbada redução da massa e/ou tamanho das fibras musculares, bem como por um desequilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo muscular, resultando em balanço nitrogenado negativo e, em última instância, na redução do conteúdo proteico muscular (LECKER et al., 2004; DU, HU & MITCH, 2005; TISDALE, 2005), fato que têm demonstrado exercer considerável impacto sobre a funcionalidade e o metabolismo do tecido muscular esquelético. No presente estudo, o conteúdo proteico miofibrilar, o peso muscular, a razão peso muscular/peso corporal e o % de alteração do peso muscular, também denominado grau de atrofia muscular, assim como a área de secção transversa muscular (ASTM), dos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos imobilizados e não imobilizados, suplementados ou não com a solução GLN+ALA ou DIP, foram analisados. Nossos resultados, demonstram que 14 dias de imobilização de membros, induziram significativa redução da ASTM, do peso muscular, da razão peso muscular/peso corporal e do conteúdo proteico miofibrilar em ratos IMOB, quando comparados a animais CTRL, GLN+ALA e DIP, fato que reverberou positivamente, sobre o % de alteração do peso e/ou grau de atrofia muscular, no mesmo grupo de animais. Por outro lado, ao mesmo tempo em que uma elevada

expressão proteica de HSP70 foi observada nos músculos sóleo e gastrocnêmio, de animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, uma significativa atenuação da redução tanto da ASTM, quanto do conteúdo proteico miofibrilar, bem como do % de alteração do peso e/ou grau de atrofia muscular, assim como do peso muscular e da razão peso muscular/peso corporal foi constatada, em ambos os músculos analisados, igualmente em ratos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, quando comparados a animais IMOB (Figuras 2A e 2B, 5A e 5B, Tabela 1, artigo 2; Tabelas 3 e 4, artigo 1; $p < 0,05$). Tais resultados, reforçam e vão de encontro, a preposição de que a HSP70, atue como um potencial agente anti-atrófico e anti-proteolítico, em terapias que visem se contrapor e/ou atenuar a perda da massa e do tamanho das fibras musculares, bem como do conteúdo proteico miofibrilar, induzida por períodos de desuso da musculatura esquelética (SENF et al, 2008; SENF et al, 2010). Embora os exatos mecanismos celulares, por detrás deste efeito, mediado pela HSP70, sobre a atenuação da perda e/ou redução da ASTM e do conteúdo proteico miofibrilar, entre outros parâmetros morfológicos, ainda permaneçam pouco esclarecidos, prévios estudos (SENF et al, 2008; SENF et al, 2010), entretanto, têm sugerido que tal efeito esteja, ao menos em parte, relacionado à ação da HSP70 como chaperona molecular, auxiliando no processo de reparação de proteínas lesadas e/ou danificadas, durante situações de elevado catabolismo muscular. Não obstante, estudos anteriores têm demonstrado que a supressão, mediada por HSP70, da ativação da via de sinalização do FOXO3a e NF- κ B, demonstrou ser outro potencial mecanismo, por detrás destes benéficos efeitos, mediados pela HSP70, contrapondo-se a redução da ASTM e a degradação do conteúdo proteico muscular, durante períodos de desuso da musculatura esquelética (SENF et al., 2008; TANAKA et al., 2014).

De acordo com Sandri et al. (2004) e Senf et al. (2010), o fator transcricional FOXO3a, quando em sua isoforma não-fosforilada ou total, e localizado no interior do núcleo celular, configura-se em um potente e direto fator regulador da transcrição de

diversos genes, capazes, entre outras funções, de orquestrar a regulação positiva do sistema proteolítico 20S/26S ubiquitina-proteassoma. Segundo Sandri et al. (2004) tal situação advém de uma igual regulação positiva, FOXO3a-mediada, sobre a expressão e atividade de duas E3 ligases músculo específicas, sendo elas, respectivamente: o fator de atrofia muscular F-box 32 (também conhecido como atrogin-1 e/ou MAFbx) e o fator *RING finger* 1 ou MuRF1 (também conhecido como Trim63), em uma ampla variedade de condições onde, a atrofia da musculatura esquelética é desencadeada por desuso. No presente estudo, a aplicação de um novo modelo experimental de desuso da musculatura esquelética, por imobilização dos membros posteriores, a ratos, por 14 dias, ao mesmo tempo em que induziu significativa redução no conteúdo muscular de HSP70, em animais IMOB, induziu significativo aumento da expressão proteica da isoforma não-fosforilada ou total, de FOXO3a, no músculo sóleo e gastrocnêmio, igualmente em animais IMOB. Por outro lado, ao mesmo tempo em que a administração de GLN, tanto na forma de solução GLN+ALA e/ou DIP, restabeleceu, bem como induziu um aumento significativo no conteúdo de HSP70, nos músculos sóleo e gastrocnêmio de animais GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB, o conteúdo proteico da isoforma total de FOXO3a, em ambos os músculos analisados, igualmente em ratos GLN+ALA-IMOB e DIP-IMOB (Figuras 2A e 2B, 4A, B, C e D, artigo 2; $p < 0,05$), mostrou-se significativamente reduzido. Estes resultados, além de reforçarem os prévios achados de Senf et al. (2008) e Senf et al. (2010) demonstrando, uma vez mais, o decisivo papel, desempenhado pela HSP70, sobre o processo de ativação da via de sinalização celular do FOXO3a, durante períodos de desuso da musculatura esquelética, demonstram também, pela primeira vez uma decisiva ação da GLN, via modulação da expressão de HSP70, como agente anti-proteolítico, bloqueado e/ou atenuado a ativação de proteínas alvos, *upstream*, do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma, como é o caso da FOXO3a.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo, nos permitem concluir que a suplementação oral com GLN, tanto na forma de solução GLN+ALA, quanto na de DIP representa um método nutricional eficaz de fornecimento e manutenção dos estoques corporais de GLN, durante um período de imobilização de membros. Observou-se que tanto a administração da solução GLN+ALA, quanto de DIP, foram eficazes em promover efeitos similares sobre a concentração de GLN, durante um período de 14 dias de imobilização de membros, em roedores. A maior disponibilidade deste aminoácido, atenuou a redução dos estoques musculares e eritrocitários de GSH, fato que reverberou, positivamente, sobre seu estado redox celular, atenuando o estresse oxidativo muscular e sistêmico, bem como a liberação de fatores indicativos de inflamação, peroxidação lipídica e danos a proteínas musculares, induzidos pela situação de imobilização de membros. Inferimos, que tal resultado, tenha se correlacionado ao fato de uma maior oferta de GLN livre, nos músculos sóleo e gastrocnêmio, ter induzido aumento do fluxo deste aminoácido para a enzima γ -glutamil-cisteína sintetase, a qual utiliza GLN, para a síntese de GSH.

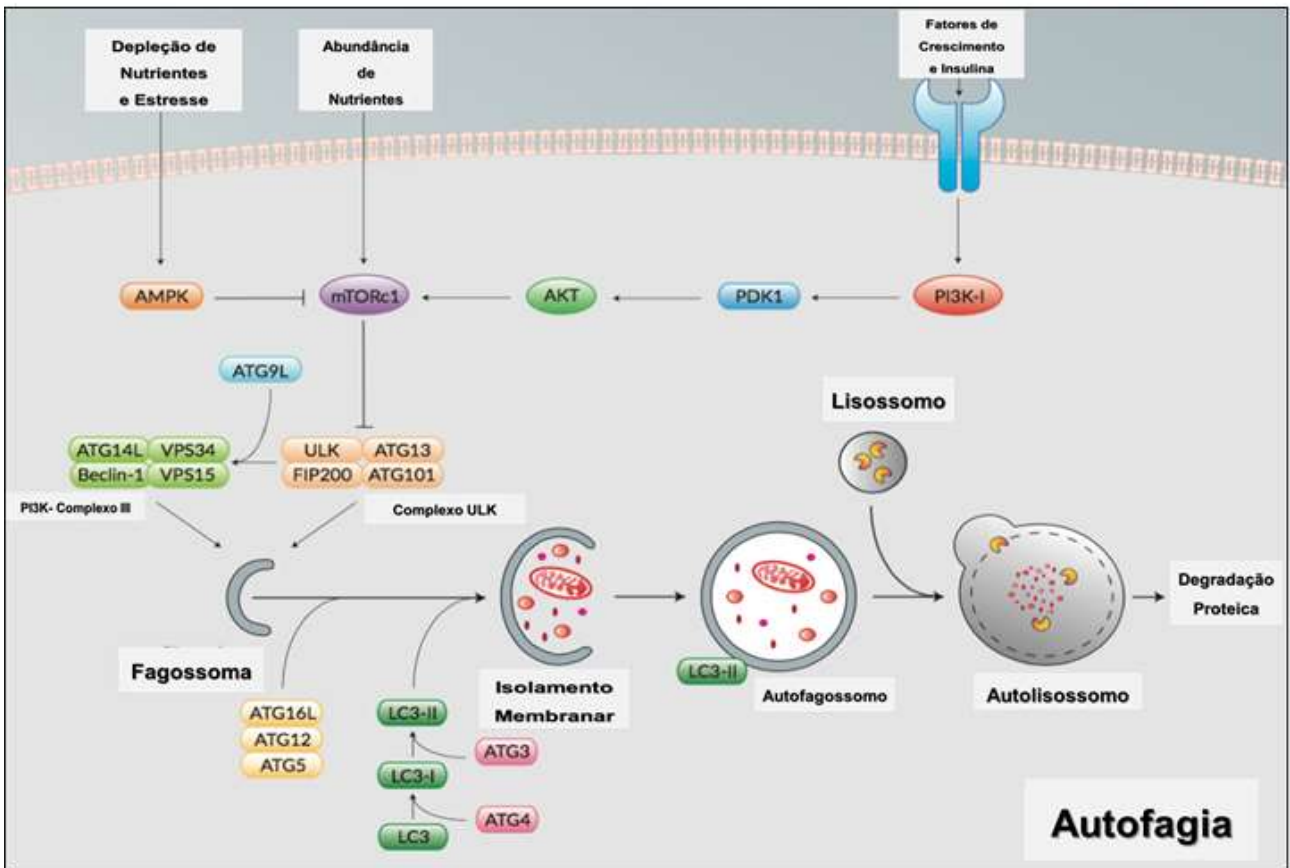
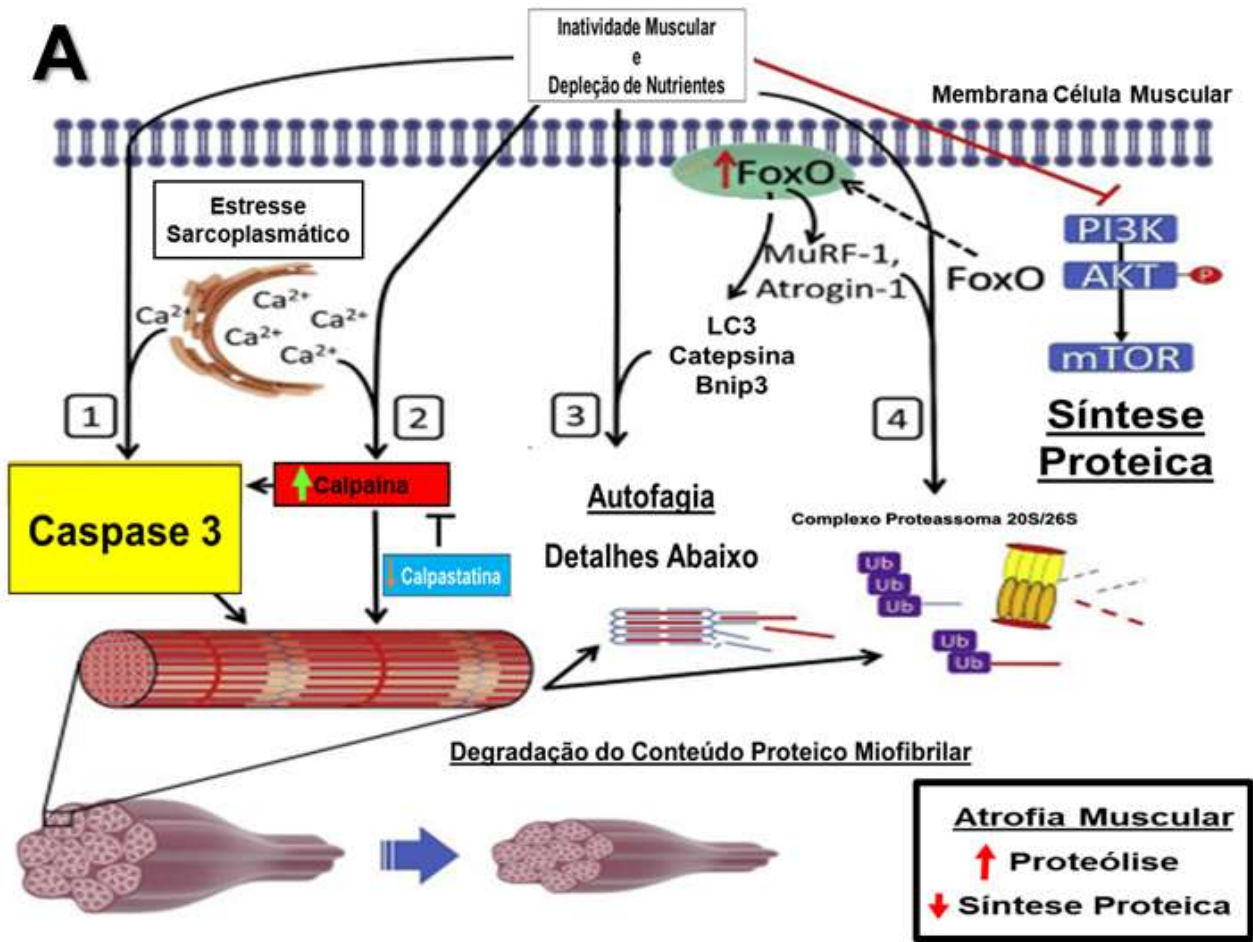
Não obstante, os resultados do presente estudo reforçam e confirmam o papel modulador desempenhado pela GLN sobre a expressão da proteína citoprotetora HSP70. Em nosso estudo, a maior expressão de HSP70 GLN-mediada, não só repercutiu em atenuada ativação de vias de sinalização celular, com caráter proteolítico e pró-apoptótico, como também, pela primeira vez, demonstrou exercer considerável impacto sobre a massa e o tamanho da fibra muscular, tanto no músculo sóleo, um músculo dotado, predominantemente por fibras oxidativas, de contração lenta, quanto no músculo gastrocnêmio, músculo com perfil de dotação de fibras mais glicolíticas, de contração rápida, durante um período de desuso da musculatura esquelética, advindo da submissão de ratos, a 14 dias de imobilização dos membros posteriores.

Desta forma, os resultados do presente estudo suportam a suplementação oral com a solução GLN+ALA e/ou DIP como alternativa nutricional terapêutica e eficaz em atenuar os efeitos deletérios da atrofia muscular por desuso, sobre a funcionalidade orgânica. No entanto, mais estudos, especialmente em seres humanos, são necessários para fornecer uma melhor visão do impacto clínico desses achados, uma vez que o presente estudo reforça a hipótese de que, em sendo possível, ambas as suplementações por via oral, podem ser empregadas clinicamente, já que as mesmas são mais fisiológicas que fórmulas parenterais. Ademais, cabe ressaltar, que o custo da suplementação com a mistura de L-glutamina e L-alanina, na forma livre é muito menos dispendiosa, se comparada a sua quantidade, equivalente, como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, fato que, inferimos, possa ter impacto financeiro, positivo, sobre os sistemas de saúde pública, em todo o mundo.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com Tisdale (2005), a redução do conteúdo proteico muscular pode ocorrer tanto pelo aumento na taxa de degradação quanto pela redução da taxa de síntese proteica muscular. Logo, considerando-se tal pressuposto, e os resultados da presente pesquisa, abre-se oportunidades para novos estudos, com o objetivo de investigar, entre outras situações:

- 1) o efeito da suplementação com L-glutamina, tanto na forma de DIP quanto na de solução GLN+ALA, durante um período de 14 dias de imobilização bilateral, dos membros posteriores sobre o balanço entre proteólise e síntese proteica, no tecido muscular esquelético, mediante a análise da expressão de importantes genes relacionados à regulação da síntese proteica, neste tecido, com destaque para aqueles relacionados à ativação da via de sinalização intracelular AKT/PI3K/mTOR, a citar: os fatores transcricionais eIF-4E, 4E-BP1, as proteínas AKT e p70S6K, além da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), entre outros genes (figura 7A);
- 2) os efeitos das mesmas suplementações nutricionais com L-glutamina, igualmente durante um período de desuso da musculatura esquelética, sobre a função mitocondrial, através da análise da via de sinalização celular do co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1- α), assim como sobre a atividade da via das calpainas e calpastatinas, miostatina e da via de sinalização celular indutora de autofagia (figura 7B).



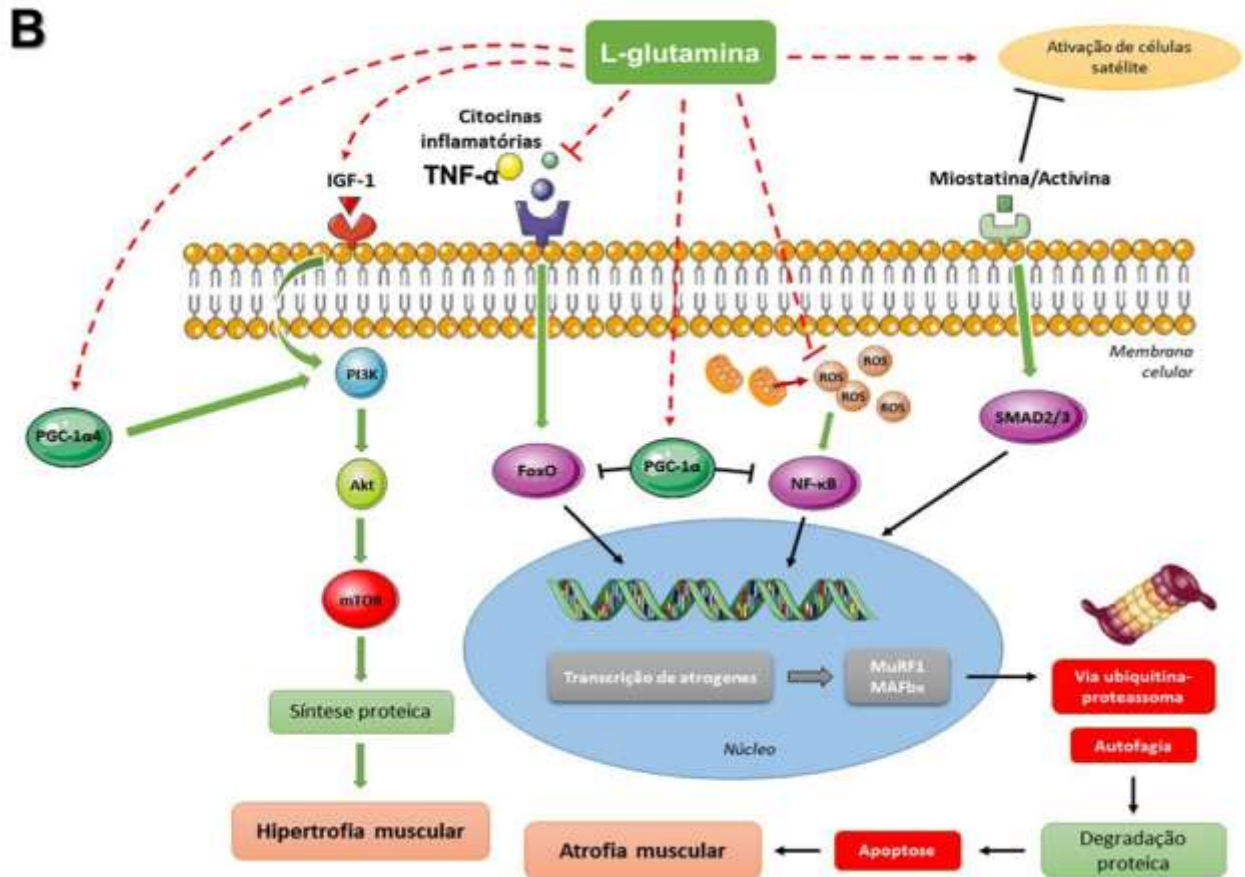


Figura 7 – Perspectivas Futuras - esquema ilustrativo de estudos a partir dos resultados da presente pesquisa, partes A e B.

(Adaptado de Hyatt et al., 2019).

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, G.R.; CAIOZZO, V.J.; BALDWIN, K.M. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J. Appl. Physiol.* 95:2185–2201, 2003.

ADIBI, S.M. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 285, p. G779-G788, 2003.

ADIBI, S.M.; SCHENKER, S.; MORSE, E. Mechanism of clearance and transfer of dipeptides by perfused human placenta. *American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism*, v. 271, p. E535-E540, 1996.

AGARWAL, K.N.; BHATIA, B.D.; BATTI, R.K.; SINGLA, P.N.; SHANKAR, R. Erythrocytic enzymes and amino acids related to glutamic acid metabolism in childhood hypoproteinemic states. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.34, p.924-927, 1981.

ANTONIO, J.; STREET, C. Glutamine: a potentially useful supplement for athletes. *Canadian Journal Applied Physiology*, v. 24, p. 1-14, 1999.

AOKI, M.S.; LIMA, W.P.; MIYABARAA, E.H.; GOUVEIAB, C.H.A.; MORISCOT, A.S. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: role of creatine supplementation. *Clinical Nutrition*, v. 23, p. 1176–1183, 2004.

ATALAY, M.; OKSALA, N.K.J.; LAAKSONEN, D. E.; KHANNA, S.; NAKAO, C.; LAPPALAINEN, J.; ROY, S.; HÄNNINEN, O.; SEN, C. K. Exercise training modulate heat shock protein response in diabetes. *Journal Applied Physiology*, v. 97, p. 605-611, 2004.

BABIJ, P.; MATTHEWS, S.M.; RENNIE, M.J. Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in men. *European Journal of Applied Physiology*, v. 50, p. 405-411, 1983.

BAJOTTO, G.; SATO, Y.; KITAURA, Y.; SHIMOMURA, Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. *Eur. J. Appl. Physiol.*, v. 111, p.1815–1828, 2011.

BARBE, M.F.; TYTELL, M.; Gower, D.J.; WELCH, W.J. Hyperthermia protects agst light damage in the rat retina. *Science*, v. 241, n. 4874, p. 1817-1820, 1988.

BECHARA, L.R.G.; MOREIRA, J.B.N.; JANNIG, P.R.; VOLTARELLI, V.A.; DOURADO, P.M.; VASCONCELOS, A.R.; SCAVONE, C.; RAMIRES, P.R.; BRUM, P.C. NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. *International Journal of Cardiology*, v. 175, n. 3, p. 499-507, 2014.

BEJMA, J.; JI, L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v. 87, p. 465-470, 1999.

BEST, T.M.; FIEBIG, R.; CORR, D.T.; BRICKSON, S.; JI, L.L. Free radical activity, antioxidant enzyme, and glutathione changes with muscle stretch injury in rabbits. *Journal of Applied Physiology*, v. 87, p. 74-82, 1999.

BEUTLER, E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annual Review of Nutrition*, v. 9, p. 287-302, 1989.

BIGGS, III, W.H.; CAVENEE, W.K.; ARDEN, K.C. Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mammalian Genome*, v. 12, n. 6, p. 416–425, 2001.

BIRKENKAMP, K.U.; COFFER, P.J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans.*, v. 31, p. 292-297, 2003.

BODINE, S.C.; BAEHR, L.M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 307, p. E469–E484, 2014.

BOOTH, FW. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 52:1113–1118, 1982.

BOOTH, FW.; LAOU, W.; HAMILTON, MT.; YAN, Z. Cytochrome c mRNA in skeletal muscles of immobilized limbs. *J. Appl. Physiol.* V. 81, n. 5, p. 1941-1945, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRÖER S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal Epithelia. *Physiology Review*, v. 88, p. 249-286, 2008.

CAI, D.; FRANTZ, J.D.; TAWA, N.E, JR.; MELENDEZ, P.A.; OH, B.C.; LIDOV, H.G.; HASSELGREN, P.O.; FRONTERA, W.R.; LEE, J.; GLASS. D.J.; SHOELSON, S.E. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, v. 119, p. 285-298, 2004.

CASPARY, W.F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 55, p. 299S-308S, 1992.

CASTELL, L.; POORTMANS, J.R.; LECLECQ, R.; BRASSEUR, M.; DUCHATEAU, J.; NEWSHOLME, E.A. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effect of glutamine supplementation. *European Journal of Applied Physiology*, v. 75, p. 47-53, 1997.

CHAMNEY, C.; GODAR, M.; GARRIGAN, E.; HUEY, K.A. Effects of glutamine supplementation on muscle function and stress responses in a mouse model of spinal cord injury, *Exp. Physiol.*, v. 98, n. 3, p. 796–806, 2013.

CHEN, Y.W.; GREGORY, C.M.; SCARBOROUGH, M.T.; SHI, R.; WALTER, G.A.; VANDENBORNE, K. Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiol. Genomics*. 115: 1-38, 2007.

CHOW, A.; ZHANG, R. Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. *Journal Nutrition*, v. 128, p. 1296-1301, 1998.

CORLLES, M.; KIELY, A.; MCCLENAGHAN, N.H.; FLATT, P.R.; NEWSHOLME, P. Glutamine regulates expression of key transcricion factor, signal transduction, metabolic gene, and protein expression in clonal pancreatic β -cell line. *Journal of Endocrinology*, v. 190, p. 719-727, 2006.

CRUZAT,V.F; KRAUSE, M; NEWSHOLME P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*.v.11,p.61 2014.

CRUZAT ,VF; BITTENCOURT, A; SCOMAZZON, 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*.v.30, p.602-11, 2014a.

CRUZAT, V.F; PANTALEAO, L.C; DONATO, J. JR.; DE BITTENCOURT, P.I. 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. v.25, p.345-52,2014b.

CRUZAT, V.F.; PETRY, É.R.; TIRAPEGUI, J.O. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 15, p. 392-397, 2009.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 13, p. 336-342, 2007.

CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1773, p. 1358-1375, 2007.

CURRIE, W.; TANGUAY, R.M.; KINGMA JR, J.G. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation*, v. 87, p. 963-971, 1993.

CURI, R. Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. 261p.

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.O.; SELLITTI, D.F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; CORLESS, M; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology*, v. 204, p. 392-401, 2005.

CUSCHIERI, J.; MAIER, R.V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit. Care Med*. 33:417–419, 2005.

da SILVA LIMA, F.; ROGERO, M.M.; RAMOS, M.C.; BORELLI, P.; FOCK, R.A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition, *European Journal of Nutrition*, v. 52, n.4, p 1343-1351, 2013.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, v. 52, p. 601-623, 2006.

DÉCHELOTTE, P.; DARMAUN, D.; RONGIER, M.; HECKETSWEILER, B.; RIGAL, O.; DESJEUX, J. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *American Journal of Physiology*, v. 260, p.G677-G682, 1991.

DI PASQUALE, M.G. Amino acids and proteins for the athlete – the anabolic edge. DOHM, G.L.; BEECHER, G.R.; WARREN, Q.; WILLIAMS, R.T. Influence of exercise on free amino acid concentration in rat tissues. *Journal of Applied Physiology*, v. 50, p. 41-44, 1981.

DOHM, G.L.; KASPEREK, G.J.; TAPSCOTT, E.B.; BARAKAT, H.A. Protein metabolism during endurance exercise. *Federation Proceedings*, v. 44, p. 348-352, 1985.

DRÄPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*.v.186 p.421-31, 1991.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review*, v. 82, p. 47-95, 2002.

D'SOUZA, R.; TUCK, J.P. Glutamine supplements in the critically ill. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.97, p.425-427, 2004.

DU, J.; HU, Z.; MITCH, W. E. Molecular mechanisms activating muscle protein degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions. *European Journal of Clinical Investigation*, v.35, p.157-163, 2005.

DU, J.; WANG, X.; MIERELES, C.; BAILEY, J.L.; DEBIGARE, R.; ZHENG, B.; PRICE, S.R.; MITCH, W.E. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 113, p. 115-123, 2004.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue cultures. *Science*, v. 122, p. 501-504, 1955.

ELEY, H.L.; TISDALE, M.J. Skeletal muscle atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *J. Biol. Chem.* 82(10): 7087-7097, 2007.

FEBBRAIO, MA; MESA, JL; CHUNG, J; STEENSBERG, A; KELLER, C; NIELSEN, HB; KRUSTRUP, P; OTT, P; SECHER, NH; PEDERSEN, BK. Glucose ingestion attenuates the exercise-induced increase in circulating heat shock protein 72 and heat shock protein 60 in humans. *Cell Stress and Chaperones*,. 9: 390-396, 2004.

FEI, Y.J.; KANAI, Y.; NUSSBERGER, S. GANAPATHY, V.; LEIBACH, F.H.; ROMERO, M.F.; SINGH, S.K.; BORON, W.F.; HEDIGER, M.A. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*, v.398, p.563-566, 1994.

FELIG, P. Amino acid metabolism in man. *Annual Review of Biochemistry*, v.44, p.933-955, 1975.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress. Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, v. 4, n. 36, p. 327-358, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.*, v. 408, p. 239-247, 2000.

FITTS, R. H.; RILEY, D. R.; WIDRICK, J.J. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity. *Journal Experimental Biology.*, v. 204, p.3201-3208, 2001.

FLÄRING, U. B.; ROOYACKERS, O. E.; WERNERMAN J.; HAMMARQVIST, F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. *Clinical Science*, v. 104, p. 275-282, 2003.

FOLETTA, V.C.; WHITE, L.J.; LARSEN, A.E.; LÉGER, B.; RUSSELL, A.P. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, v. 461, p. 325–335, 2011.

FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de Absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. Controle e implicações na dietoterapia humana. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.

FRIEDMAN, J.R.; KAESTNER, K.H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 19–20, p. 2317–2328, 2006.

FRIMEL, T.N.; KAPADIA, F.; GAIDOSH, G.S.; LI, Y.; WALTER, G. A.; VANDENBORNE, K. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle Nerve.*, 32: 672-674, 2005.

FURUKAWA-HIBI, Y.; KOBAYASHI, Y.; CHEN, C.; MOTOYAMA, N. FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 7, n. 5-6, p. 752-60, 2005.

GABAI, V.L.; SHERMAN, M.Y. Molecular Biology of Thermoregulation. Invited Review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J. Appl. Physiol.*, v. 92, p. 1743-1748, 2002.

GANAPATHY, V.; BRADSCH, M.; LEIBACH, F.H. Intestinal transport of amino acid and peptides. In: JOHNSON, L.R.; ALPERS, D.H., eds. *The physiology of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1994. P. 1773-1793.

GARLICK, P.J. The nature of human hazards associated with excessive intake of amino acids. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 1633S-1639S, 2004.

GIRVEN, M.; DUGDALE, H.F.; OWENS, D.J.; HUGHES, D.C.; STEWART, C.E.; SHARPLES, A.P. L-glutamine improves skeletal muscle cell differentiation and prevents myotube atrophy after cytokine (TNF- α) stress via reduced p38 mapk signal transduction. *Journal of Cellular Physiology*, v. 231, p. 2720-2732, 2016.

GLASS, D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature Cell Biol.*, v. 5, p. 87-90, 2005.

GILBERT, E.R.; WONG, E.A.; WEBB, K.E. Peptide absorption and utilization: implications for animal nutrition and health. *Journal of Animal Science*, v.86, p.2125-2155, 2008.

GOMEZ-CABRERA, M.C; CLOSE, G.L; KAYANI, A; MCARDLE, A; VINA, J; JACKSON, M.J. Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle force generation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v. 298, p.R2-8, 2010.

GRAHAM, T.E.; MACLEAN, D.A. Ammonia and amino acid metabolism in skeletal muscle: human, rodent and canine models. *Medicine Science and Sports Exercise*, v. 30, p. 34-46, 1998.

GRINIUS L, KESSLER C, SCHROEDER J, HANDWERGER S. Forkhead transcription factor FOXO1a is critical for induction of human decidualization. *Journal of Endocrinology*, v. 189, n.1, p.179–187, 2006.

GROSSER, N.; OBERLE, S.; BERNDT, G.; ERDMANN, K.; HEMMERLE, A.; SCHRODER, H. Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 314, n. 2, p. 351-355, 2004.

HALL, G.V.; WAGENMAKERS, A.J.M. Effect of carbohydrate supplementation on plasma glutamine during prolonged exercise and recovery. *International Journal of Sports Medicine*, v. 19, p. 82-86, 1998.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC, CROSS CE. Free radicals, antioxidants, and human diseases: where are we now? *J Lab Clin Med.*, v. 1991; 119: 598-620.

HAMIEL, C.R.; PINTO, S.; HAU, A.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression via increased hexosamine biosynthetic pathway activity. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 297, n. 6, p. C1509–C1519, 2009.

HAMMARQVIST, F.; WERNERMAN, J.; ALI, R.; VON DER DECKEN, A.; VINNARS, E. Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis and improves nitrogen balance. *Annals of Surgery*, v.209, p.455-461, 1989.

HARRIS, R.C.; HOFFMANB, J.R.; ALLSOPP, A.; ROUTLEDGE, N.B.H. L-glutamine absorption is enhanced after ingestion of L-alanylglutamine compared with the free amino acid or wheat protein. *Nutrition Research*, v.32, p.272-277, 2012.

HÄUSSINGER, D.; LANG, F.; GEROK, W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *American Journal of Physiology*, v. 267, p. E343-E355, 1994.

HAYNES, T.E.; LI, P.; LI, X.; SHIMOTORI, K.; SATO, H.; FLYNN, N.E.; WANG, J.; KNABE D.A.; WU, G. L-Glutamine or L-alanyl-L-glutamine prevents oxidant-or endotoxin-induced death of neonatal enterocytes. *Amino Acids*, v. 37, p. 131-142, 2009.

HEINEMEIER, K.M.; OLESEN, J.L.; HADDAD, F.; SCHJERLING, P.; BALDWIN, K.M.; KJAER, M. Effect of unloading followed by reloading on expression of collagen and related growth factors in rat tendon and muscle. *Journal of Applied Physiology*, v.106, p.178-186, 2009.

HERRMANN, J.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ. Res.*, 100: 1276-1291, 2007.

HESPEL, P.; EIJINDE, B. O.; LEEMPUTTE, M. V.; URSØ, B.; GRENHAF, P. L.; LABARQUE, V.; DYMARKOWSKI, S. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J. Physiol.*536:625-633, 2001.

HISCOCK, N.; PETERSEN, B.K Exercise-induced immunodepression – plasma glutamine is not the link. *Journal of Applied Physiology*, v. 93, p. 813-822, 2002.

HOLSON, RR. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. *Neurotoxicol Teratol*, v.14, p.253-257, 1992.

HORTOBÁGYI, T.; DEMPSEY, L.; FRASER, D.; ZHENG, D.; HAMILTON, G.; LAMBERT, J.; DOHN, L. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J. Physiol.* 524:293-304, 2000.

HUANG, H.; TINDALL, D. J. Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science*, v. 120, p. 2479-2487, 2007.

HUNTER, R.B.; STEVENSON, E.; KONCAREVIC, A.; MITCHELL-FELTON, H.; ESSIG D.A.; KANDARIAN, S.C. Activation of an alternative NF- κ B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.*16:529–538, 2002.

HYATT, H.; DEMINICE, R.; YOSHIHARA, T.; POWERS, S.K. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: a review of the causes and effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Doi: <https://doi.org/10.106/j.abb,2018.11.005>, 2018.

IMMENSCHUH, S.; RAMADORI G. Gene regulation of heme oxygenase-1 as a therapeutic target. *Biochemical Pharmacology*, v. 60, n. 8, p. 1121-1128, 2000.

INOUE, Y.; PACITTI, A.; SOUBA, W.W. Endotoxin increases hepatic glutamine transport activity. *Journal of Surgical Research*, v.54, p.393-400, 1993.

JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 287:C834–C843, 2004.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Medicine*, v. 5, p. 156-170, 1988.

Jl, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* 222: 283-292, 1999.

KALINOWSKA, M.; GARNCARZ, W.; PIETROWSKA, M.; GARRARD, W.T.; WIDLAK, P. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, v.10, p. 821-830, 2005.

KARINCH, A.M.; PAN, M.; LIN, C.; STRANGE, R.; SOUBA, W.W. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *Journal of Nutrition*, v.131, p.2535S-2538S, 2001.

KAUSHAL, V.; HERZOG, C.; HAUN, R.S.; KAUSHAL, G.P. Caspase protocols in mice. *Methods in molecular biology*, v. 1133, p. 141-154, 2014.

KAVAZIS, A.N.; DERUISSEAU, K.C.; McCLUNG, J.M.; WHIDDEN, M.A.; FALK, D.J.; SMUDER, A.J.; SUGIURA, T.; POWERS, S.K. Diaphragmatic proteasome function is maintained in the ageing Fisher 344 rat. *Exp. Physiol.* 92(5): 895-901, 2007.

KIM, J.; WON, K.J.; LEE, H.M.; HWANG, B.Y.; BAE, Y.M.; CHOI, W.S.; SONG, H.; LIM, K.W.; LEE, C.K.; KIM, B. p38 MAPK Participates in Muscle-Specific RING Finger 1-Mediated Atrophy in Cast-Immobilized Rat Gastrocnemius Muscle. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, v.13, p. 491-496, 2009.

KLASSEN, P.; MAZARIEGOS, M.; SOLOMNS, N.W.; FÜRST, P. The pharmacokinetic responses of human to 20 g of alanyl-glutamine dipeptide differ with that dosing protocol but not with gastric acidity or in patients with acute dengue fever. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 177-182, 2000.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; AMSTER, H.L.; BOZA, J.; KRISTENSEN, J.H.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine and protein supplementation on exercise induced decreases in salivary IgA. *Journal Applied Physiology*, v. 91, p. 832-838, 2001a.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; KRISTENSEN, J.H.; BOZA, J.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, v. 281, p. C1259-C1265, 2001b.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism – glutaminase and glutamine synthetase. *Journal of Nutrition*, v.131, p. 2467S-2474S, 2001.

LAGRANHA, C.J. HIRABARA, S.M.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell Biochemistry and Function*, v. 25, p. 563-569, 2007.

LANCEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutrition Reviews*, v. 48, p. 297-309, 1990.

LECKER, S.H.; JAGOE, R.T.; GILBERT, A.; GOMES, M.; BARACOS, V.; BAILEY, J.; PRICE, S. R.; MITCH, W.E.; GOLDBERG, A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J.* 18: 39-51, 2004.

LEEUWENBURGH, C.; GURLEY, C.M.; STROTMAN, B.A.; DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory and Integrative Comparative Physiology*, v.288, n.5, p. R1288-R1296, 2005.

LI, H.; MALHOTRA, S.; KUMAR, A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy, *J. Mol. Med.*, v. 86, n. 10, p.1113–1126, 2008.

LI, Y.P.; CHEN, Y.; JOHN, J.; MOYLAN, J.; JIN, B.; MANN, D.L.; REID, M.B. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb J.* 19:362–370, 2005.

LI, Y.P.; REID, M.B. NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R1165 – R 1170, 2000.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v.2, p.725-34, 2002.

LI, Y-P.; SCHWARTZ, J.R.; WADDELL, I.D.; HOLLOWAY, B.R.; REID, M.B. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumor necrosis factor α . *FASEB Journal*, v.12, p.871-880, 1998.

LIBONI, K. C.; LI, N.; SCUMPIA, P. O.; NEU, J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through I κ B/NF- κ B in human fetal and adult intestinal epithelium. *J. Nutr.* 135:245–251, 2005.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C. NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 2, 2017.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; AGELL, N.; LOPEZ-SORIANO, F.J.; ARGILES, J.M. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochemistry and Biophysics Research Communication*, v.230, p.238-241, 1997.

LOCKE, M. Overview of stress response. In: LOCKE, M.; NOBLE, E. G. *Exercise and Stress Response: the role of stress proteins*. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 1-12.

LUND, P. Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H. U. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis*, London: Academic Press, p. 357-363, 1985.

MACEDO, A.C.; YWAZAKI, J.L.; MACEDO, R.M.; NORONHA, L.; GOMES, A.R. Morphologic study of different treatments for gastrocnemius muscle contusion in rats. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 51, p. 697-706, 2016.

MAINES, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 37, p. 517-554, 1997.

MASON, S; WADLEY, G.D. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. v.19, p.97-106, 2014.

McCLUNG, J.M.; KAVAZIS, A.N.; DERUISSEAU, K.C.; FALK, D.J.; DEERING, M.A.; LEE, Y.; SUGIURA, T.; POWERS, S.K. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation-induced atrophy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 175, p.150-159, 2007.

MCMILLAN, E.M.; QUADRILATERO, J. Differential apoptosis-related protein expression, mitochondrial properties, proteolytic enzyme activity, and DNA fragmentation between skeletal muscles. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.300, p. R531-R543, 2011.

MEIJER, A.J. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathway. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 2057S-2062S, 2003.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, v. 52, p. 711-760, 1983.

MINAMI, H.; MORSE, E.L.; ADIBI, S.A. Characteristics and mechanism of glutamine-dipeptide absorption in human intestine. *Gastroenterology*, v. 103, p. 3-11, 1992.

MIYABARA, E.H.; MARTIN, J.L.; GRIFFIN, T.M.; MORISCOT, A.S.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, v. 290, p. C1128-1138, 2006.

MIYABARA, E.H.; NASCIMENTO, T.L.; RODRIGUES, D.C.; MORISCOT, A.S.; DAVILA, W.F.; AITMOU, Y.; DETOMBE, P.P.; MESTRIL, R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy. *Pflugers Archiv. European Journal of Physiology*, v. 463, p. 733-741, 2012

MOCHALOVA, E.P.; BELOVA, S.P. MIRZOEV, T.M. SHENKMAN, B.S.; NEMIROVSKAYA, T.L. Atrogin-1/MAFbx mRNA expression is regulated by histone deacetylase 1 in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *Nature Scientific Reports*, v. 9, p.10263, 2019.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, v. 259, p. 1409-1410, 1993.

MORRISON, A.L.; DINGES, M.; SINGLETON, K.D.; ODIMS, K.; WONG, H.R.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat

shock factor-1. *American Journal Physiology. Cell Physiology*, v. 290, p. C1625-C1632, 2006.

MOYLAN, J. S.; REID, M. B. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle & Nerve*, v. 35, n. 4, p. 411–429, 2007.

NEELEY, W.E.; PHILLIPSON, J. Automated enzymatic method for determining ammonia in plasma, with 14-day reagent stability. *Clinical Chemistry*, v.34, p.1868-1869, 1988.

NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *FASEB Journal*, v. 10, p. 829-837, 1996.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 153-163, 2003a.

NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.P.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, v.21, p. 1-9, 2003b.

NIEMAN, D.C.; PEDERSEN, B.K. Exercise and immune function. *Sports Medicine*, v. 27, p. 73-80, 1999.

PARRY-BILLINGS, M.; LEIGHTON, B.; DIMITRIADIS, G.D.; BOND, J.; NEWSHOLME, E.A. Effects of physiological and pathological levels of glucocorticoids on skeletal muscle glutamine metabolism in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 40: 1145-1148, 1990.

PARRY-BILLINGS, M.; BEVAN, S.J.; OPARA, E.; NEWSHOLME, E.A. Effects of changes in cell volume on the rates of glutamine and alanine release from rat skeletal muscle in vitro. *Biochemical Journal*, v.276, p.559-561, 1991.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22:153–183, 2001.

PETRY, É.R.; Dresch, D.F.; Carvalho, C.; Medeiros, P.C.; Rosa, T.G.; de Oliveira, C.M.; Martins, L.A.M.; Schemitt, E.; Bona, S.; Guma, F.C.R.; Marroni, N.P.; Wannmacher, C.M.D. Oral glutamine supplementation attenuates inflammation and oxidative stress-mediated skeletal muscle protein. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 145, p. 87-102, 2019.

PETRY, É.R. CRUZAT, V.F.; HECK, T.G.; LEITE, J.S.M.; Homem de Bittencourt Jr., P.; TIRAPEGUI, J.O. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: Involvement of heat shock protein pathways. *Life Sciences*, v.94, p. 130-136, 2014.

PETRY, É.R. CRUZAT, V.F.; HECK, T.G.; Homem de Bittencourt Jr., P.; TIRAPEGUI, J.O. L-glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, v. 25, p. 188 -197, 2015.

PETRY, É.R.; ALVARENGA, M. L.; CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Suplementações nutricionais e estresse oxidativo: implicações na atividade física e no esporte. *Revista Brasileira de Ciências do Esporte*, v. 35, n. 4, p. 1071-1092, 2013.

PETRY, É.R.; ALVARENGA, M.L.; CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J. Exercício físico e estresse oxidativo: mecanismos e efeitos. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v.18, n. 4, p. 90-99, 2010.

PINEL, C.; COXAN, V.; MIGNON, M.; TAILLANDIER, D.; CUBIZOLLES, C.; LEBECQUEA, P.; DARMAUN, D.; MEYNIAL-DENIS, D. Alterations in glutamine synthetase activity in rat skeletal muscle are associated with advanced age. *Nutrition*, v. 22, p. 778-785, 2006.

PITHON-CURI, T.C.; TREZENA, A.G.; TAVARES-LIMA, W.; CURI, R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. *Cell. Biochem. Funct.* 20:81–86, 2002.

PLANK, L.D.; HILL, G.L. Similarity of changes in body composition in intensive care patients following severe sepsis or major blunt injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 904, p. 592-602, 2000.

POWERS, S.K.; KAVAZIS, A.N.; DeRUISSEAU, K.C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 288, n. 2, p. R337-344, 2005.

POWERS, S.K.; KAVAZIS, A.N.; McCLUNG, J.M. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 102:2389–2397, 2007.

RAIZEL, R.; LEITE, J. S. M.; HYPÓLITO, T. M.; COQUEIRO, A. Y.; NEWSHOLME, P.; CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of L-glutamine and L-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise. *British Journal of Nutrition.* 116, 470–479, 2016.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, v.1, n.6, p.3159-3165, 2006.

REED, S.A.; SENF, S.M.; CORNWELL, E.W.; KANDARIAN, S.C.; JUDGE, A.R. Inhibition of I κ B kinase alpha (IKK α) or IKKbeta (IKK β) plus forkhead box O (Foxo) abolishes skeletal muscle atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 405, n. 3, p.491-496, 2011.

REINNIE, M.J.; BOWTELL, J.L; BRUCE, M.; KHOGALI, S.E.O. Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. *Journal of Nutrition*, v. 131, p. 2488S-2490S, 2001.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymology*, v. 233, p. 357-363, 1994.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O. Aspectos atuais sobre glutamine, atividade física e sistema imune. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 36, p. 202-212, 2000.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. *Journal of Metabolism and Nutrition*, v. 7, p.106-117, 2003.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O. Effect of L-alanyl-L-glutamine supplementation on the plasma and tissue concentrations of glutamine in rats submitted to exhaustive exercise. *Nutrition*, v. 22, p. 564-571, 2006.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; PEDROSA, R.G.; PIRES, I.S.O. ; CASTRO, I.A. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats. *Nutrition Research*, v. 24, p. 261-270, 2004.

ROHDE, T.; ASP, S.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B. K. Competitive sustained exercise in humans, lymphocyte active killer cell activity, and glutamine-an intervention study. *European Journal Applied Physiology and Occupation Physiology*, v.78, p. 261-270, 1998.

ROPELESKI, M.J.; RIEHM, J.; BAER, K. A.; MUSCH, M. W.; CHANG, E. B. Anti-apoptotic effects of L-glutamine-mediated transcriptional modulation of the heat shock protein 72 during heat shock. *Gastroenterology*, v.129, p.170-184, 2005.

ROTH, E.; OEHLER, R. Hypothesis: Muscular glutamine deficiency in sepsis – a necessary step for a hibernation-like state? *Nutrition*, v.26, p.571-574, 2010.

ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potential of glutamine-regulation to glutathione metabolism. *Nutrition*, v.18, p.217-221, 2002.

ROTH, E.; FUNOVICS, J.; MUHLBACHER, F.; SCHEMPER, M.; MAURITZ, W.; SPORN, P.; FRITSCH, A. Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: glutamine deficiency in skeletal muscle. *Clinical Nutrition*, v. 1, n.1, p. 25-41, 1982.

ROWBOTTOM, D. G.; KEAST, D.; MORTON, A. R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Medicine*, v. 21, p. 80–97, 1996.

RUTTEN, E.P.A.; ENGELEN, M.P.K.J.; SCHOLS, A.M.W.J.; DEUTZ, N.E.P. Skeletal muscle glutamate metabolism in health and disease: state of the art. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 8, p. 41-51, 2005.

SALEM, M. KENNEY, P.B.; REXROAD, C.E.; YAO, J. Microarray gene expression analysis in atrophying rainbow trout muscle: a unique nonmammalian muscle degradation model. *Physiol. Genomics*. 28:33-45, 2006.

SAMELMAN, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Experimental Physiology*, v. 85, p. 97-102, 2000.

SANDRES, M.M.; KON, C. Glutamine is a powerful effector of heat shock protein expression in drosophila Kc cells. *American Journal Physiology. Cell Physiology*, v. 146, p.180- 191, 1991.

SANDRI, M.; SANDRI, C.; GILBERT, A.; SKURK, C.; CALABRIA, E.; PICARD, A.; WALSH, K.; SCHIAFFINO, S.; LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, v. 117, n. 3, p. 399-412, 2004.

SANTOS, R.V.T.; BASSIT, R.A.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.F.B.P. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30Km race. *Life Sciences*, v. 75, p. 1917-1924, 2004.

SANTOS, R.V.T.; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.B.B.P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sciences*, v. 80, p. 573-578, 2007.

SAVARY-AUZÉLOUX, I.; MAGNE, H.; MIGNÉ, C.; OBERLI, M.; BREUILLÉ, D.; FAURE, M.; VIDAL, K.; PERROT, M.; RÉMOND, D.; COMBARET, L.; DARDEVET, D. A dietary supplementation with leucine and antioxidants is capable to accelerate muscle mass recovery after immobilization in adult rats. *PLoS ONE*, v. 8, n.11, p. e81495-e8210, 2013.

SEN, C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal Applied Physiology*, v. 79, p. 675-686, 1995.

SENF, S.M.; DODD, S.L.; JUDGE, A.R. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, v. 298, p. C38-45, 2010.

SENF, S.M.; DODD, S.L.; JUDGE, A.R. Hsp70 overexpression inhibits NF-kappaB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB Journal*, v. 22, p. 3836-3845, 2008.

SHIBAGUCHI, T.; YAMAGUCHI, Y.; MIYAJI, N.; YOSHIHARA, T.; NAITO, H.; GOTO, K.; OHMORI, D.; YOSHIOKA, T.; SUGIURA, T. Astaxanthin intake attenuates muscle atrophy caused by immobilization in rats. *Physiological Reports*, v. 4, n. 15, p. e12885-e 12893, 2016.

SIGRIST-NELSON, K.; MURER, H.; HOPFER, U. Active alanine transport in isolated brush border Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p.5674-5680, 1975.

SILVEIRA, E.M.; RODRIGUES M.F.; KRAUSE, M.S.; VIANNA, D.R.; ALMEIDA B.S.; ROSSATO, J.S.; OLIVEIRA JR, L.P.; CURI, R.; DE BITTENCOURT JR., P.I. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell Biochemistry and Function*, v. 25, p. 63-73, 2007.

SILVER, J.T.; KOWALCHUK, H.; NOBLE, E.G. hsp70 mRNA temporal localization in rat skeletal myofibers and blood vessels post-exercise. *Cell Stress & Chaperones*, v. 17, p. 109-20, 2012.

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF-kB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and

prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock*, v. 24, n.6, p. 583-589, 2005.

SINGLETON, K.D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *American Journal Physiology Regul. Integral. Comportament. Physiology*, v. 292, p.1839-1845, 2007.

STITT, T.N.; DRUJAN, D.; CLARKE, B.A.; PANARO, F.; TIMOFEYVA, Y.; KLINE, W.O.; GONZALEZ, M.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell.*, v. 14, n. 3, p. 395–403, 2004.

SUTTNER, D.M.; SRIDHAR, K.; LEE, C.S.; TOMURA, T.; HANSEN, T.N.; DENNERY, P.A. Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells, *The American Journal of Physiology*, v. 276, n. 3, p. L443-L451, 1999.

TALBERT, E.E.; SMUDER, A.J.; MIN, K.; KWON, O.S.; POWERS, S.K. Calpain and caspase-3 play required roles in immobilization-induced limb muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology* 114, 1482-1489, 2013.

TAKAYAMA, S.; REED, J.C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, v. 22, p. 9041-9047, 2003.

TANAKA, T.; SHIBAZAKI, A.; ONO, R.; KAISHO, T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor kappaB to inhibit inflammatory signaling, *Science Signaling*, v.7, n. 356, p.119, 2014.

TEMPLE, C.S.; STEWART, A.K; MEREDITH, D.; LISTER, N.A.; MORGAN, K.M.; COLLIER, I.D.; VAUGHAN-JONES, R.D.; BOYD, C.A.R.; BAILEY, P.D.; BRONK, J.R. peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 20-22, 1998.

TISDALE, M.J. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology*, v.20, p.340-348, 2005.

THOMASON D.B.; BOOTH, F.W. Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.* 68:1–12, 1990.

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Glutathione - nutritional and pharmacological viewpoints: Part VI. *Nutrition*, v. 18, p. 291-292, 2002a.

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Glutathione: nutritional and pharmacological viewpoints: Part V. *Nutrition*, v. 17, p. 978, 2001b.

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Glutathione: nutritional and pharmacological viewpoints: Part II. *Nutrition*, v. 17, p. 485-486, 2001a.

VAN DER HEIDE, L.P.; HOEKMAN, M.F.; SMIDT, M.P. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* v.1, n. 380, p. 297–309, 2004.

- VAN DE POLL, M.C.G.; SOETERS, P.B.; DEUTZ, N.E.P.; FEARON, K.C.H.; DEJONG, C.H.C. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid Exchange. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, p. 185-197, 2004.
- VAN GAMMEREN, D.; DAMRAUER, J.S.; JACKMAN, R.W.; KANDARIAN, S.C. The I κ B kinases IKK α and IKK β are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy. *FASEB Journal*, v. 23, p.362-370, 2009.
- VENOJÄRVI, M.; KVIST, M.; JOZSA, L.; KALIMO, H.; HÄNNINEN, O.; ATALAY, M. Skeletal muscle HSP expression on response to immobilization and remobilization. *International Journal of Sports Medicine*, v.28, p. 281-286, 2007.
- WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. Glutamine exercise and immune function: links and possible mechanism. *Sports Medicine*, v. 26, p. 177-191, 1998.
- WANG, W.; CHOI, R.H.; SOLARES, G.J.; TSENG, H.M.; DING, Z.; KIM, K.; IVY, J.L. L-Alanyl-glutamine inhibits signaling proteins that activate protein degradation, but does not affect proteins that activate protein synthesis after an acute resistance exercise. *Amino Acids*, v. 47, p.1389-1398, 2015.
- WELBOURNE, T.; ROUTH, R.; YUDKOFF, M.; NISSIM, I. The glutamine/glutamate couplet and cellular function. *News in Physiological Science*, v.16, p.157-160, 2001.
- WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Modulation of endogenous glutathione availability. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2:487–492, 1999.
- WHILLIER, S.; GARCIA, B.; CHAPMAN, B.E.; KUCHEL, P.W.; RAFTOS, J.E. Glutamine and α -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. *FEBS Journal*, v.278, p.3152-3163, 2011.
- WHITEHOUSE, A.S.; TISDALE, M.J. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B. *British J. Cancer*. 89: 1116-1122, 2003.
- WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 53, p. 201-237, 1982.
- WISCHMEYER, P.E. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition*, v.18, p.225-228, 2002.
- WISCHMEYER, P. E. Glutamine: the first clinically relevant pharmacological regulator of heat shock protein expression? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 9, p. 201-206, 2006.
- WISCHMEYER, P.E.; MUSCH, M.W.; MADONNA, M.B.; THISTED, R.; CHANG, E.B. Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *American Journal Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 272, p. G879-G884, 1997.
- WRAY, C.J.; MAMMEN, J.M.V.; HASSELGREN, P. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. *Nutrition*, v. 18, p. 971-977, 2002.

YANG, C.Y.; DANTZIG, A.H.; PIDGEON, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharmaceutical Research*, v.16, p.1331-1343, 1999.



YANG, R.; MARTIN-HAWVER, L.; WOODALL, C.; THOMAS, A.; QURESHI, N.; MORRISON, D.; VAN, W.C. Administration of glutamine after hemorrhagic shock restores cellular energy, reduces cell apoptosis and damage, and increases survival. *JPEN - Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 31, p. 94-100, 2007.

YUE, G.H.; BILODEAU, M.; HARDY, P.A.; ENOKA, R.M. Task dependent effect of limb immobilization on the fatigability of the elbow flexor muscles in humans. *Exp. Physiol.* 82: 567- 592, 1997.

ZAMANIAN-DARYOUSH, M.; MOGENSEN, T.H.; DIDONATO, J.A.; WILLIAMS, B.R.G. NF- κ B activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF- κ B-inducing kinase and I κ B kinase. *Molecular and Cellular Biology*, v.20, p.1278-1290, 2000.

10. ANEXOS

ANEXO I - Carta de aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Ética em Uso de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEUA/UFRGS.

	<p>UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL</p>	<p>PRO-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais</p>	
---	---	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29389

Título: Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre vias de degradação proteica mediadas por NF-kB, MAPK, complexo ubiquitina-proteassoma e mecanismos citoprotetores representados pela expressão de

Vigência: 01/08/2015 à 31/07/2019

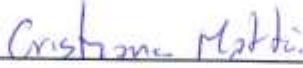
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CLOVIS MILTON DUVAL WANNMACHER - coordenador desde 01/08/2015
Éder Ricardo Petry - Aluno de Doutorado desde 01/08/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/08/2015 - Sala Multiuso da Biblioteca Central - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 664 ratos Wistar machos adultos, com idade entre 55 e 60 dias, cedidos pelo biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Creal), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 27 de Agosto de 2015



CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética