

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, livres ou como dipeptídeo, sobre a lesão, inflamação e citoproteção em modelos de estresse *in vivo* e *in vitro*

Raquel Raizel

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2017

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, livres ou como dipeptídeo, sobre a lesão, inflamação e citoproteção em modelos de estresse *in vivo* e *in vitro*

Raquel Raizel

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.  
Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP”.

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

R161e Raizel, Raquel  
Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, livres ou como dipeptídeo, sobre a lesão, inflamação e citoproteção em modelos de estresse in vivo e in vitro / Raquel Raizel. - São Paulo, 2017.  
104 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.  
Orientador: Orlando Tirapegui Toledo, Julio

1. Glutamina. 2. Alanina. 3. L-alanil-L-glutamina. 4. Exercício resistido. 5. Resistência à insulina. I. T. II. Orlando Tirapegui Toledo, Julio, orientador.

Raquel Raizel

Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, livres ou como dipeptídeo, sobre a lesão, inflamação e citoproteção em modelos de estresse *in vivo* e *in vitro*

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Prof. Dr.  
Orientador/Presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

---

4º examinador

São Paulo, 10 de outubro de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, **Dirceu Raizel** e **Marlene Raizel** (*in memoriam*), que mesmo quando não souberam como oferecer ajuda, ajudaram sendo bons exemplos de caráter, humildade e perseverança.

À minha **família** que confia e me apoia em todas as decisões.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo**, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho, pela confiança, pelos conselhos e pelo incentivo a seguir adiante, superando as dificuldades em busca dos meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela dádiva de desfrutar deste momento privilegiado.

Aos meus **amigos** que, por muitas vezes, compreenderam minha necessidade de estar ausente em comemorações e outras datas importantes.

Às queridas **Audrey Yule Coqueiro**, que desde sua iniciação científica não mediu esforços para contribuir com este trabalho, e **Andrea Bonvini**, que envolve a todos com sua alegria e modo irreverente de ver a vida. Ambas dividiram comigo os últimos momentos de angústia, ansiedade e alegria no doutorado. Além de amigas dedicadas, revelaram-se a melhor equipe de trabalho que se pode ter.

Ao **Thiago Sousa** que, mais do que noivo, é um amigo parceiro, sempre disposto a ajudar. Agradeço pela paciência, compreensão e incentivo para que eu continue em busca dos meus objetivos.

Aos **amigos e colegas** do laboratório que dividiram muitos momentos de ansiedade, cansaço e realizações, compartilharam momentos felizes e outros nem tanto. Em especial à **Jaqueline Leite, Thaís Hypólito, João Motarelli e Bárbara Dias** pelas risadas que aliviaram o árduo trabalho no biotério. Estendo o agradecimento às queridas **Luciana Nishimura e Kelcylene Gomes** pela agradável convivência.

À minha amiga **Ivanir Santana de Oliveira Pires**, pelo carinho, dedicação e auxílio, sempre que precisei.

À professora **Christianne de Faria Coelho Ravagnani**, orientadora do mestrado, por ter me apresentado ao professor Julio Tirapegui e me incentivado a lutar pelos meus objetivos.

Ao professor Dr. **Philip Newsholme** pela confiança, acolhimento e oportunidade do desenvolvimento do doutorado sanduíche no seu laboratório de pesquisa em Perth, Austrália.

Aos meus amigos **Felipe Krupelis, Catherine Emm, Rezz, Mehdi e Masoud** que, durante o período sanduíche, tornaram minha estadia mais alegre e prazerosa.

Aos **amigos e colegas** do laboratório de Ciências Biomédicas na Austrália, pelo acolhimento e convívio agradável. Em especial, à minha querida amiga **Younan Chen**, pelo suporte emocional, e ao **Rodrigo Carlessi**, pelos valiosos ensinamentos e auxílio nas análises do doutorado sanduíche.

À minha querida amiga **Yuphin** pelo apoio afetivo e por não medir esforços para que eu me sentisse em casa, mesmo estando tão longe.

Aos colegas **Thiago Rosa, Vinicius e Rodrigo** pelo auxílio nas técnicas e estruturação do projeto.

Aos colegas **Humberto Rubim e Mauro Ribeiro Junior**, pelo auxílio em cálculos complexos de parâmetros dosados.

Aos **professores** do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos pelos ensinamentos prestados.

Aos **funcionários do biotério** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelo auxílio durante o período experimental.

Aos **funcionários da Secretaria** do Bloco 14 e da Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, pelo profissionalismo e presteza no atendimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**);  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelas  
bolsas de estudo e apoio financeiro ao projeto.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

(Martin Luther King)

## RESUMO

RAIZEL, R. **Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, livres ou como dipeptídeo, sobre a lesão, inflamação e citoproteção em modelos de estresse *in vivo* e *in vitro*.** 2017. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Subprojeto 1: Determinação do efeito anti-inflamatório e citoprotetor da suplementação com L-glutamina e L-alanina, ou com L-alanil-L-glutamina (DIP) em ratos submetidos a treinamento resistido.

Exercícios intensos reduzem a disponibilidade de glutamina, comprometendo a função imune e a recuperação de atletas. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo (DIP), sobre parâmetros de lesão, inflamação e citoproteção em ratos *Wistar* adultos submetidos a treinamento resistido (TR). Neste estudo, o TR reduziu a concentração de glutamina no plasma e no músculo EDL. No entanto, este efeito foi atenuado pelos suplementos contendo L-glutamina, os quais aumentaram os conteúdos da proteína de resposta ao estresse (HSP70) em células do sistema imune (PBMC) e no EDL, concomitantemente à redução da ativação do NF- $\kappa$ B e a da concentração de citocinas no EDL. O efeito protetor das suplementações também foi evidenciado pela atenuação de marcadores de lesão (CK e LDH) e inflamação (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), bem como pelo aumento nas concentrações de marcadores anti-inflamatórios (IL-6, IL-10 e MCP-1) no plasma. Nossos resultados sugerem que a suplementação oral crônica com L-glutamina (administrada com L-alanina livre ou como DIP) promoveu efeitos citoprotetores mediados pela HSP70 em resposta à lesão e inflamação induzidas pelo TR.

Subprojeto 2: Efeitos da L-alanil-L-glutamina sobre as vias de sinalização da insulina e da mTOR/S6K, e citoproteção em células musculoesqueléticas C2C12.

O dipeptídeo L-alanil-L-glutamina é conhecido por modular o metabolismo e a viabilidade celular. Contudo, os efeitos sobre os componentes clássicos das vias de sinalização da insulina e da mTOR/S6K, bem como o efeito citoprotetor em células musculares, são pouco esclarecidos. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do DIP sobre as vias de sinalização da insulina e da mTOR/S6K em miotubos C2C12, em condições normais ou resistentes à insulina. A exposição crônica à insulina (24h) promoveu resistência à insulina, reduzindo os conteúdos totais do receptor beta (IR- $\beta$ ) e do substrato do receptor de insulina (IRS-1), e diminuindo a fosforilação de IRS-1, AKT e P44/42 MAPK. Adicionalmente, houve redução na expressão do transportador de glicose (GLUT4) e HSP70, redução da viabilidade celular e menor fosforilação de p70S6k e S6, proteínas relacionadas à síntese proteica. Em contraste, a suplementação com DIP aumentou os conteúdos totais de IR- $\beta$  e IRS-1 e a fosforilação de IRS-1 e AKT. A glicólise anaeróbia e a capacidade glicolítica, além da fosforilação de p70S6k e S6, foram aumentadas pelo DIP em condições normais e na resistência à insulina. Nestas condições experimentais, nossos resultados sugerem que a suplementação com DIP melhorou as vias de sinalizações da insulina e da mTOR/S6K, aumentou a captação e metabolização da glicose, independente da estimulação com insulina e, finalmente, promoveu citoproteção resgatando parcialmente as células de um estado resistente à insulina, por meio do aumento de HSP70 e ativação das etapas finais da via mTOR/S6K.

**Palavras chave:** Glutamina, Alanina, L-alanil-L-glutamina, Treinamento resistido, Insulina

## ABSTRACT

RAIZEL, R. **Effects of supplementation with L-glutamine and L-alanine, in their free form or as dipeptide, on muscle damage, inflammation and cytoprotection of in vivo and in vitro stress models.** 2017. 105f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Subproject 1: Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of supplementation with L-glutamine and L-alanine, or with L-alanyl-L-glutamine in rats submitted to resistance training.

Intense exercise reduces glutamine availability, compromising immune function and recovery of athletes. The objective of the study was to evaluate the effects of chronic oral supplementation with L-glutamine and L-alanine, in their free form or as dipeptide (DIP), on muscle damage, inflammation and cytoprotection in adult Wistar rats submitted to resistance training (RT). In this study, RT reduced glutamine concentration in plasma and EDL muscle. However, this effect was attenuated by supplements containing L-glutamine, which increased the contents of the stress response protein (HSP70) in immune system cells (PBMC) and EDL, concomitantly with the reduction of NF- $\kappa$ B activation and the concentration of cytokines in EDL. The protective effect of supplementation was also evidenced by attenuation of lesion markers (CK and LDH) and inflammation (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), as well as by the increase in anti-inflammatory plasma markers (IL-6, IL-10 and MCP-1). Our results suggest that chronic oral supplementation with L-glutamine (administered along with free L-alanine or as DIP) promoted HSP70-mediated cytoprotective effects in response to RT-induced injury and inflammation.

Subproject 2: Effects of L-alanyl-L-glutamine on the components of insulin and mTOR/ S6K signaling pathways and cytoprotection in C2C12 musculoskeletal cells.

The dipeptide L-alanyl-L-glutamine is known to modulate metabolism and cell viability. However, the effects on the classical components of insulin and mTOR/ S6K signaling pathways, as well as the cytoprotective effect on muscle cells, are poorly understood. The aim of this study was to investigate the effect of DIP on insulin and mTOR/ S6K signaling pathways in C2C12 myotubes, under normal or insulin resistant conditions. Chronic insulin exposure (24h) promoted insulin resistance, reducing the total contents of the insulin receptor (IR- $\beta$ ) and the insulin receptor substrate (IRS-1), and decreasing the phosphorylation of IRS-1, AKT and P44/ 42 MAPK. In addition, there was a reduction in the expression of glucose transporter (GLUT4) and HSP70, reduction of cell viability and defective phosphorylation of p70S6k and S6, which are related to protein synthesis. On the other hand, DIP supplementation increased the total contents of IR- $\beta$  and IRS-1 and the phosphorylation of IRS-1 and AKT. Anaerobic glycolysis and glycolytic capacity, in addition to phosphorylation of p70S6k and S6, were increased by DIP under normal conditions and in insulin resistance. In our experimental conditions, our results suggest that DIP supplementation improved the signaling pathways of insulin and mTOR/ S6K, increased glucose uptake and metabolism, independent of insulin stimulation, and finally promoted cytoprotection by partially rescuing the cells of an insulin resistant state, by increasing HSP70 and activating the final stages of the mTOR/ S6K pathway.

**Keywords:** Glutamine, Alanine, L-alanyl-L-glutamine, Resistance training, Insulin

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Efeito citoprotetor da glutamina no músculo esquelético.....	<b>23</b>
<b>Figura 2</b> Escada usada no treinamento resistido.....	<b>27</b>
<b>Figura 3</b> Desenho experimental e protocolo de treinamento.....	<b>27</b>
<b>Figura 4</b> Teste de carga máxima e lactato sanguíneo.....	<b>37</b>
<b>Figura 5</b> Conteúdos de HSP70 em músculo EDL e células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de ratos submetidos a treinamento resistido.....	<b>41</b>
<b>Figura 6</b> Atividade de ligação ao DNA do NF-kB p65 detectada em extrato nuclear do músculo EDL de ratos submetidos a treinamento resistido.....	<b>42</b>
<b>Figura 7</b> Células musculoesqueléticas da linhagem C2C12 nas formas de mioblastos e diferenciadas em miotubos.....	<b>60</b>
<b>Figura 8</b> Esquema de tratamento crônico com insulina e diferentes concentrações do dipeptídeo (Ala-Gln) de células musculoesqueléticas da linhagem C2C12.....	
<b>Figura 9</b> Esquema de injeções do teste de estresse glicolítico Seahorse XFe.....	<b>63</b>
<b>Figura 10</b> A exposição crônica à insulina afeta os primeiros passos da cascata de sinalização de insulina, enquanto o tratamento com L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) potencializa sua regulação inicial em células musculares esqueléticas C2C12.....	<b>65</b>
<b>Figura 11</b> A suplementação de L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) melhora a via de sinalização da mTOR e potencializa sua regulação final em miotubos C2C12 resistentes à insulina, independente da estimulação com insulina.....	<b>66</b>
<b>Figura 12</b> L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) aumenta a capacidade de glicólise anaeróbia de células musculares C2C12, saudáveis e resistentes à insulina.....	<b>68</b>
<b>Figura 13</b> A viabilidade celular diminui em células musculares C2C12 resistentes à insulina não tratadas com L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln).....	<b>70</b>
<b>Figura 14</b> L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) recupera a funcionalidade das células aumentando as concentrações de P44/ 42 MAPK e HSP70 em células musculares C2C12 resistentes à insulina.....	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Peso corporal inicial, ganho de peso, consumo diário de ração e ingestão hídrica de ratos submetidos a treinamento resistido.....	<b>36</b>
<b>Tabela 2</b> Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo sobre marcadores de lesão muscular e inflamação no plasma, e concentrações de glutamina e glutamato no plasma e músculo EDL de ratos submetidos a treinamento resistido.....	<b>39</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**44/42 MAPk** - p44/ p42 Proteína quinase ativada por mitógeno

**6-PG** - 6-fosfogluconato

**AKT** - Proteína quinase B

**ALA** – Alanina

**ALA-GLN** – L-alanil-L-glutamina

**AMPK** - Quinase ativada por AMP

**ATP** - Adenosina trifosfato

**BSA** – Albumina do soro bovino

**CK** – Creatina quinase

**CTRL** – Controle

**DAPI** - 4',6-diamidino-2-phenylindole

**DIP** – Dipeptídeo

**DM2** – Diabetes mellitus tipo 2

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's medium

**DP** – Desvio padrão

**ECAR** - Taxa de acidificação extracelular

**ECL** - Enhanced chemiluminescence

**EDL** – Extensor longo dos dedos

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético

**G-6-PDH** - Glicose-6-fosfato desidrogenase

**GA** – Glutaminase

**GAAC** - Via geral de controle de aminoácidos

**GDH** – Glutamato desidrogenase

**GLN+ALA** – Glutamina + Alanina

**GLUT-1** - Transportador de glicose do tipo 1

**GLUT-4** transportador de glicose do tipo

**GSK3 $\beta$**  - Glicogênio sintase quinase-3 beta

**HCl** - Ácido clorídrico

**HIF1 $\alpha$**  - Fator 1-alfa induzível pela hipóxia

**HK** - Hexoquinase

**HSF-1** – Fator de choque térmico-1

**HSP** – Proteína de choque térmico

**HSP70** – Proteína de choque térmico da família de 70 kDa

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta

**IL-6** – Interleucina 6

**IRS-1** - Substrato 1 do receptor de insulina

**IR- $\beta$**  - Subunidade beta do receptor de insulina

**LDH** – Lactato desidrogenase

**MCP-1** – Proteína quimiotática de monócitos-1

**mTOR** - Proteína alvo de rapamicina em mamíferos

**MTT** - Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** - Carbonato de sódio

**Na<sub>2</sub>H(PO)<sub>4</sub>** - Fosfato dissódico

**NaCl** - Cloreto de sódio

**NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADP** - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NF- $\kappa$ B** – Fator nuclear kappa B

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** - Amônio

**p70S6k** - Proteína quinase ribossomal de 70 kDa

**PBMC** - Células mononucleares do sangue periférico

**PBS** - Tampão fosfato-salino

**PepT1** - Transportador intestinal 1

**PI3K** - Fosfatidilinositol-3 quinase

**PKC** - Proteína quinase C

**PMSF** - Phenylmethane sulfonyl fluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride

**RIPA** - Teste de radioimunoprecipitação

**S6K** - proteína ribossomal S6 quinase

**SDS** - Sodium Dodecyl Sulfate

**SED** – Sedentário

**SFB** - Soro fetal bovino

**SIRT1** - Sirtuin 1

**TCA** - Ácido tricloroacético

**TCM** – Teste de carga máxima

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TR** - Treinamento resistido

## SUMÁRIO

<b>1 SUBPROJETO 1.....</b>	<b>18</b>
<b>2 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>3 HIPÓTESE.....</b>	<b>20</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>5 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Exercício Físico e Inflamação.....</b>	<b>20</b>
<b>5.2 Exercício Físico e Proteínas de Choque Térmico.....</b>	<b>22</b>
<b>5.3 Glutamina e Exercício Físico.....</b>	<b>23</b>
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1 Animais.....</b>	<b>25</b>
<b>6.2 Grupos Experimentais.....</b>	<b>26</b>
<b>6.3 Suplementação.....</b>	<b>26</b>
<b>6.4 Protocolo de treinamento resistido e teste de carga máxima (TCM).....</b>	<b>26</b>
<b>6.5 Eutanásia dos animais e coleta de amostras.....</b>	<b>27</b>
<b>6.6 Parâmetros analisados durante o experimento.....</b>	<b>28</b>
<b>6.7 Parâmetros analisados após eutanásia.....</b>	<b>28</b>
<b>6.7.1 Plasma .....</b>	<b>28</b>
<b>6.7.2 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....</b>	<b>28</b>
<b>6.7.3 Músculo esquelético.....</b>	<b>28</b>
<b>6.8 Determinações plasmáticas e teciduais.....</b>	<b>29</b>
<b>6.8.1 Lactato sanguíneo.....</b>	<b>29</b>
<b>6.8.2 Separação de PBMC.....</b>	<b>29</b>
<b>6.8.3 Creatina Quinase.....</b>	<b>29</b>
<b>6.8.4 Lactato Desidrogenase.....</b>	<b>30</b>
<b>6.8.5 Concentrações de glutamina e glutamato.....</b>	<b>30</b>
<b>6.8.6 Concentrações plasmáticas de TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-10, IL-1<math>\beta</math> e MCP-1.....</b>	<b>31</b>
<b>6.8.7 Análises de western blotting.....</b>	<b>31</b>
<b>6.8.7.1 Extração de proteína.....</b>	<b>31</b>
<b>6.8.7.2 Preparo do gel de poliacrilamida.....</b>	<b>32</b>
<b>6.8.7.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE .....</b>	<b>32</b>

6.8.7.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose.....	33
6.8.7.5 Incubação com anticorpos.....	33
6.8.7.6 Revelação com sistema Quimioluminescente.....	33
<b>6.8.8 Atividade de ligação nuclear do NF-kB.....</b>	<b>34</b>
<b>6.9 Análise estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>8 DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>10 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>11 SUBPROJETO 2.....</b>	<b>57</b>
<b>12 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>13 OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
<b>13.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>58</b>
<b>13.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>58</b>
<b>14 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>14.1 Anticorpos e reagentes .....</b>	<b>59</b>
<b>14.2 Cultura de células.....</b>	<b>59</b>
<b>14.3 Análise de western blotting .....</b>	<b>61</b>
<b>14.4 Determinação da viabilidade celular.....</b>	<b>61</b>
<b>14.5 Imunofluorescência.....</b>	<b>61</b>
<b>14.6 Teste de estresse glicolítico em tempo real.....</b>	<b>62</b>
<b>14.7 Análise estatística.....</b>	<b>63</b>
<b>15 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>15.1 Via de sinalização da insulina em miotubos C2C12.....</b>	<b>63</b>
<b>15.2 Via de sinalização da mTOR/ S6K.....</b>	<b>64</b>
<b>15.3 Teste de estresse glicolítico.....</b>	<b>67</b>
<b>15.4 Teste de viabilidade celular.....</b>	<b>70</b>
<b>15.5 Sensores de insulina e de aminoácidos.....</b>	<b>71</b>
<b>16 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>17 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>18 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>19 ANEXOS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 1 Artigo publicado.....</b>	<b>82</b>

<b>ANEXO 2</b> Artigo sob revisão em periódico internacional.....	<b>83</b>
<b>ANEXO 3</b> Artigo aceito para publicação em periódico nacional.....	<b>84</b>
<b>ANEXO 4</b> Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	<b>85</b>
<b>ANEXO 5</b> Ficha do aluno.....	<b>86</b>
<b>ANEXO 6</b> Currículo Lattes.....	<b>88</b>

## 1 SUBPROJETO 1

Determinação do efeito anti-inflamatório e citoprotetor da suplementação com L-glutamina e L-alanina, ou com L-alanil-L-glutamina (DIP) em ratos submetidos a treinamento resistido.

## 2 INTRODUÇÃO

No esporte, a elevada carga de treinamento necessária para alcançar o máximo desempenho, muitas vezes expõe os atletas aos limites da capacidade física (Koch, 2010; Brooks & Carter, 2013). O aumento do volume ou intensidade do treinamento, aliado à períodos de recuperação insuficientes torna a rotina do atleta exaustiva, o que gera elevado estresse metabólico (Kruk, 2011; Finsterer, 2012). Após uma sessão de exercício intenso, a ruptura miofibrilar e o extravasamento de proteínas intracelulares para o meio extracelular acionam a resposta inflamatória aguda e local para recuperação tissular (Brooks & Carter, 2013; Baltusnikas *et al.*, 2015). Lesões musculares contínuas desencadeiam uma resposta inflamatória crônica, que pode agravar as lesões subjacentes, implicando em redução do desempenho e comprometimento da saúde desses indivíduos (Koch, 2010; Finsterer, 2012).

Nestas condições, sistemas protetores são ativados na tentativa de restaurar a homeostase. Uma destas respostas é mediada pelas proteínas de choque térmico (HSP), as quais têm papel importante na resistência a processos de morte celular, por meio do remodelamento de proteínas desnaturadas (Milne & Noble, 2008). As HSPs estão envolvidas na resposta primária a uma lesão muscular e na modulação da resposta inflamatória (Shi *et al.*, 2006; Senf *et al.*, 2013) relacionada à inibição da via de sinalização I $\kappa$ B quinase (IKK)/fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B), integrador central de respostas ao estresse mecânico, oxidativo e inflamatório (Milne & Noble, 2008; Cruzat *et al.*, 2009; Koch, 2010). No exercício, as HSP (sobretudo HSP70) facilitam a biogênese mitocondrial e regulam vias apoptóticas (Milne & Noble, 2008), entretanto, a expressão destas proteínas parece ser dependente de concentrações adequadas de glutamina (Singleton & Wischmeyer, 2008).

A glutamina, o aminoácido livre mais abundante do organismo, é considerada condicionalmente essencial em situações de estresse e desempenha um papel central no transporte de nitrogênio entre órgãos (Curi *et al.*, 1997), no metabolismo intermediário

(Newsholme *et al.*, 2003), nas vias redox celular (Brosnan, 2001), e na síntese de glicose (Stumvoll *et al.*, 1999) e glutatona (Cruzat & Tirapegui, 2009), bem como em outros processos metabólicos essenciais (Newsholme, 2001; Singleton *et al.*, 2005). No esporte, a glutamina é popular entre atletas, sendo considerada importante para a função imune e recuperação de lesões musculares e catabolismo (Cruzat *et al.*, 2010). Este aminoácido é, de fato, um substrato crítico para o funcionamento e proliferação de células do sistema imune (Curi *et al.*, 1997; Newsholme, 2001), e é sintetizado, principalmente, no músculo esquelético, o que indica uma relação estreita entre a atividade musculoesquelética e a função imune. No entanto, a eficiência da suplementação com L-glutamina por via oral tem sido questionada (Curi *et al.*, 1997; Shewchuk *et al.*, 1997, Rogero *et al.*, 2006; Lagranha *et al.*, 2007; Gleeson, 2008; Cruzat & Tirapegui, 2009).

Embora a suplementação com glutamina apresente benefícios no exercício, a efetividade da administração por via oral tem sido questionada, devido ao fato de, aproximadamente 50% da glutamina, ser metabolizada por células da mucosa intestinal e pelo fígado antes que a circulação periférica e o músculo esquelético sejam alcançados. Tendo em vista a alta taxa de metabolização da glutamina livre por enterócitos (Stoll B & Burrin, 2006; Zhou *et al.*, 2012), o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP) tem sido utilizado em estudos clínicos (Rooyackers *et al.*, 1995; Klassen *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002) e relacionados ao esporte (Furst, 2001; Rogero *et al.*, 2006; Petry *et al.*, 2014; Cruzat *et al.*, 2014) como um meio alternativo de administração oral de glutamina.

Estudos realizados em nosso laboratório, com modelos animais submetidos ao exercício aeróbio intenso e exaustivo, ou ainda, em situações de elevado catabolismo, tais como sepse, evidenciaram que as suplementações com ambas as formas de glutamina, ofertadas como DIP ou L- glutamina e L-alanina nas formas livres, apresentaram resultados semelhantes na restauração das concentrações de glutamina e atenuação dos processos lesivo e inflamatório no músculo esquelético dos animais submetidos a modelos de estresse (exercício ou sepse) (Rogero *et al.*, 2004; 2006; Cruzat *et al.*, 2009; 2010; 2014; Petry *et al.*, 2014). Desta forma, estima-se que a L-alanina desempenhe um papel importante no metabolismo da glutamina. Contudo, os efeitos da alanina sobre a disponibilidade de glutamina em situações catabólicas, bem como os efeitos de ambos os aminoácidos sobre a lesão, inflamação e citoproteção celular em modelo animal submetido a treinamento resistido (TR) não são conhecidos.

### **3 HIPÓTESE**

O treinamento resistido intenso pode reduzir a disponibilidade do aminoácido mais abundante do organismo, a glutamina, fato que pode alterar a função de células do sistema imune e aumentar a lesão e a inflamação muscular, prejudicando a recuperação de atletas. Nesse contexto, a hipótese do presente projeto é de que a suplementação com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo, poderia restaurar os estoques de glutamina e aumentar a citoproteção por meio da resposta de HSPs, atenuando a lesão e inflamação muscular, bem como a imunossupressão em ratos submetidos a TR.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da suplementação crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou como dipeptídeo sobre os parâmetros de lesão muscular, de inflamação e citoproteção em ratos submetidos a TR.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o efeito das intervenções nutricionais sobre:

- 4.2.1 Concentrações de glutamina no plasma e músculo;
- 4.2.2 Concentrações de marcadores bioquímicos de lesão tecidual;
- 4.2.3 Concentrações plasmáticas e musculares de indicadores de inflamação;
- 4.2.4 Capacidade citoprotetora celular e tecidual;
- 4.2.5 Expressão de proteínas integrantes de vias envolvidas na inflamação.

### **5 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **5.1 Exercício Físico e Inflamação**

As contrações mecânicas realizadas durante o treinamento resistido induzem microtraumas nas fibras musculares, ocasionando ruptura da matriz extracelular, lâmina basal e sarcômeros, além de alteração da homeostase do cálcio, fato que promove alteração na estrutura e permeabilidade da membrana celular (Cooper *et al.*, 2007; Silva & Macedo, 2011). Após uma sessão de exercício intenso, a ruptura miofibrilar e o extravasamento de proteínas intracelulares, como a creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH), para o meio extracelular, acionam a resposta inflamatória local para recuperação tissular (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Paulsen *et al.*, 2007; Finsterer, 2012; Brooks & Carter, 2013).

A resposta inflamatória local envolve a síntese e liberação de moléculas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que agem como fatores quimiotáticos no sítio da inflamação, promovendo o recrutamento inicial de neutrófilos e monócitos e, posteriormente, de linfócitos para a reparação do tecido (Silva & Macedo, 2011; Finsterer, 2012; Gata *et al.*, 2014). A inflamação local é acompanhada por uma resposta sistêmica de fase aguda (Paulsen *et al.*, 2007), que varia de acordo com o tipo, intensidade e duração do exercício (Peake *et al.*, 2015). Este processo é vital para a recuperação do tecido muscular lesionado, contudo, pode induzir uma lesão secundária por meio da degradação de outras proteínas que estão intactas. Neste sentido, o treinamento intenso com contínua privação de descanso suficiente gera aumento na liberação de indicadores de inflamação e, conseqüentemente, pode promover um quadro patológico em atletas (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Silva & Macedo, 2011; Peak *et al.*, 2015).

A cascata inflamatória é dependente de moléculas que ativam vias de sinalização, tais como a via do fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) (Cooper *et al.*, 2007; Finsterer, 2012). Em uma única sessão aguda de exercício a atividade do NF- $\kappa$ B no músculo esquelético de ratos é aumentada. Adicionalmente, ocorre um aumento da expressão gênica de interleucinas, como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, de TNF- $\alpha$  e MCP-1 no músculo esquelético (Peake *et al.*, 2015). Observa-se, também, o aumento da concentração de agentes anti-inflamatórios, como a IL-10 e MCP-1, 24 horas após o exercício excêntrico, como mecanismo de controle da inflamação (Vella *et al.*, 2012).

A síntese e a liberação de citocinas pelo músculo esquelético envolve vários fatores intracelulares, como o MCP-1, fator de choque térmico 1 (HSF-1) e NF $\kappa$ B (Peake *et al.*, 2015). A via de sinalização NF- $\kappa$ B atua como integrador central de respostas ao estresse mecânico, oxidativo e inflamatório (Pahl, 1999; Finsterer, 2012). Contudo, a contínua ativação desta via de sinalização, bem como a síntese em excesso de componentes inflamatórios, pode estimular o recrutamento excessivo de células, promovendo lesão

adicional ao tecido (Urso, 2013). Sendo assim, mecanismos de proteção contra lesões inflamatórias crônicas induzidas pelo exercício são ativados para garantir a sobrevivência celular (Powers *et al.*, 2000).

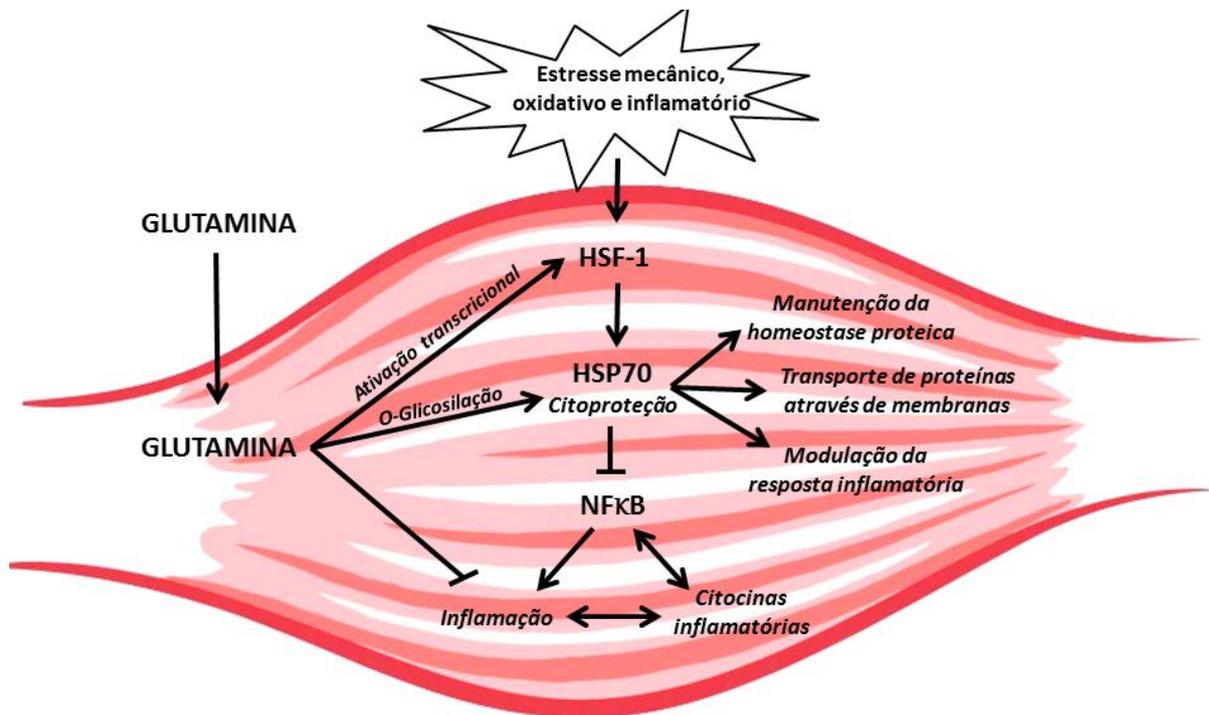
## 5.2 Exercício Físico e Proteínas de Choque Térmico

Para neutralizar eventos e agentes nocivos, o organismo dispõe de respostas adaptativas para a máxima sobrevivência celular (Nadal *et al.*, 2011). As HSPs são sintetizadas em resposta a diversos tipos de estresse fisiológico e ambiental (Mikani *et al.*, 2004), e especializadas na proteção contra lesão e morte celular, além de regulação da homeostase proteica por meio do remodelamento de proteínas desnaturadas (Milne & Noble, 2008; Senf *et al.*, 2013; Schoenfeld, 2013). As HSPs da família de 70 kDa (HSP72 + HSP73), são proteínas conhecidas como "proteínas de resposta ao estresse", pois sua expressão é altamente induzida por diferentes tipos de agentes e estímulos catabólicos, tais como hipóxia, acidose, aumento da temperatura muscular e isquemia-reperfusão, subprodutos do treinamento resistido associado a níveis elevados de estresse metabólico (Paulsen *et al.*, 2007; Senf *et al.*, 2013).

Condições de estresse que promovam a instabilidade e a desnaturação de proteínas liberam o HSF1 (Paulsen *et al.*, 2007; Nadal *et al.*, 2011), cuja atividade está associada à expressão de HSP70 no miocárdio, músculo esquelético, e em leucócitos humanos (Benjamin & Christians, 2002). Desta forma, o aumento da expressão de HSPs na superfície de leucócitos após treinamento intenso agudo sinaliza estresse excessivo (Whitham *et al.*, 2004), porém, não se conhece, até então, os efeitos do treinamento resistido sobre a expressão de HSP70 em células imunocompetentes. No exercício de *endurance*, as HSPs facilitam a biogênese mitocondrial, além de regular as vias de sinalização associadas a apoptose (Mikami *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2009). A HSP70, também está envolvida na regulação da resposta primária a uma lesão muscular, devido ao seu papel na regeneração e recuperação de miofibras (Senf *et al.*, 2013) e à inibição da via do NFκB, modulando a resposta inflamatória (Shi *et al.*, 2006; Milne & Noble, 2008).

A indução da expressão da família HSP de 70 kDa tem sido investigada devido ao seu papel modulador da resposta imune inflamatória e citoproteção sob condições de estresse (Urso, 2013). Neste sentido, observa-se o efeito citoprotetor da glutamina como potencial elemento terapêutico (Figura 1). A glutamina estimula a expressão de HSP70, proteína relacionada ao estresse que age como um regulador chave da inflamação (Kim *et al.*, 2013;

Petry *et al.*, 2014), atuando como um importante modulador da resposta ao estresse mediada por HSPs, por meio da O-glicosilação, translocação nuclear e ativação transcricional do HSF-1 (Wischmeyer, 2002; Singleton KD & Wischmeyer, 2008).



**Figura 1** Efeito citoprotetor da glutamina no músculo esquelético.

O aumento dos estoques de glutamina no músculo esquelético contribui para a manutenção da homeostase proteica e regeneração tecidual, por meio da expressão de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) e bloqueio da ativação da via de sinalização do NFκB. Conseqüentemente, a resposta inflamatória é atenuada aumentando a citoproteção celular.

### 5.3 Glutamina e Exercício Físico

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e músculo esquelético, sintetizada a partir do glutamato e da amônia durante reação catalisada pela enzima glutamina sintetase (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Newsholme *et al.*, 2003). Este aminoácido é utilizado em altas taxas por leucócitos, e fornece energia para a biosíntese celular de nucleotídeos. É essencial para função e proliferação de células de rápida divisão como enterócitos, bem como para a atividade fagocítica de macrófagos e síntese de glutathione, o antioxidante mais potente do organismo (Newsholme *et al.*, 2003). Quantitativamente, o

principal tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina é o tecido muscular esquelético, e este possui um papel essencial na regulação da glutaminemia em situações de elevada demanda por outros órgãos e tecidos (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Iwashita *et al.*, 2005). Sendo assim, a atividade do músculo esquelético pode influenciar diretamente o sistema imune (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Tendo em vista a alta taxa de metabolização da glutamina livre por enterócitos (Stoll B & Burrin, 2006; Zhou *et al.*, 2012), a oferta deste aminoácido às células do sistema imune também é comprometida (Rogero *et al.*, 2006). Entretanto, uma alternativa para transpor a barreira intestinal tem sido a utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como o L-alanil-L-glutamina (DIP), utilizado em estudos clínicos (Rooyackers *et al.*, 1995; Klassen *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002) e relacionados ao esporte (Furst, 2001; Rogero *et al.*, 2006; Petry *et al.*, 2014; Cruzat *et al.*, 2014) como um meio alternativo de administração oral de glutamina. Em 2004, Rogero e colaboradores investigaram os efeitos da suplementação oral aguda e crônica com o DIP sobre as concentrações plasmáticas e teciduais de glutamina e verificaram que a suplementação aguda aumentou a concentração plasmática de glutamina e, a suplementação crônica aumentou as concentrações muscular e hepática em ratos saudáveis (Rogero *et al.*, 2004).

Em 2006, investigou-se o efeito da suplementação com glutamina livre e DIP sobre as concentrações plasmáticas e teciduais de glutamina em ratos treinados, imediatamente e três horas após uma única sessão de exercício até a exaustão. Os autores demonstraram que a suplementação crônica com DIP promoveu maior concentração de glutamina nos músculos gastrocnêmio e sóleo imediatamente após o teste de exaustão, comparada à suplementação crônica com glutamina livre (Rogero *et al.*, 2006). No exercício de longa duração, a suplementação oral com DIP ou com L-glutamina associada a L-alanina, ambas na forma livre, promoveram resultados semelhantes no aumento da concentração de glutamina, bem como nos estoques muscular e hepático de glutamina, o que influenciou o estado redox celular (Cruzat *et al.*, 2010).

A eficácia do DIP tem sido relacionada ao transportador intestinal 1 (PepT1), que facilita uma ampla absorção de dipeptídeos e tripeptídeos (Buyse, 2001). O DIP também permite um fornecimento de mais moléculas de glutamina na osmolalidade fisiológica necessária para soluções orais (Petry *et al.*, 2014; McCormack *et al.*, 2015). Em estudo que avaliou a reidratação com o DIP em bebida esportiva, durante uma hora de corrida com intensidade submáxima, os autores observaram uma diminuição no tempo de reação dos atletas aos estímulos visuais (Pruna *et al.*, 2016). Em outro estudo, a ingestão de DIP durante

uma corrida de intensidade moderada resultou em uma significativa melhora do desempenho durante um teste subsequente de exaustão. Os resultados foram atribuídos a uma melhora na absorção intestinal de fluidos e eletrólitos e, possivelmente, no músculo esquelético ocasionando maior desempenho neuromuscular, além do possível efeito gliconeogênico da alanina poupando glicogênio muscular e retardando a fadiga (McCormack *et al.*, 2015; Pruna *et al.*, 2016).

Estudos realizados em nosso laboratório com modelos animais submetidos ao exercício aeróbio intenso e exaustivo, ou ainda, em situações de elevado catabolismo, tais como sepse, evidenciam que a suplementação crônica com DIP ou com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre são intervenções nutricionais eficientes para o fornecimento de glutamina ao organismo, fato que pode atenuar o processo lesivo e inflamatório (Rogerio *et al.*, 2004; 2006; Cruzat *et al.*, 2009; 2010; 2014; Petry *et al.*, 2014). Embora a captação de glutamina pelo enterócito seja prioritária, os resultados permitem sugerir que a presença de outros aminoácidos, tais como a alanina, possa alterar o metabolismo da glutamina (Petry *et al.*, 2014). Contudo, o efeito da L-alanina sobre a disponibilidade de glutamina em situações catabólicas, bem como os efeitos de ambos os aminoácidos sobre a lesão, a inflamação e a citoproteção celular em modelo animal submetido a TR não são conhecidos.

## **6 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1 Animais**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (Protocolo CEUA/FCF/428). O estudo foi realizado com 40 ratos adultos (60 dias), da linhagem Wistar albinos, pesando aproximadamente  $228 \pm 2,03$  gramas. Os animais foram obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e mantidos sob um ciclo de luz invertido de 12 h (luzes acesas às 16:00 horas, luzes apagadas 04:00 horas), a uma temperatura ambiente de  $22 \pm 2^\circ$  C e umidade relativa de  $55 \pm 10\%$  durante oito semanas. Os animais tiveram acesso livre à água e ração padrão (NUVILAB CR1; Nuvital Nutrients), composta por 22% de proteína. A ingestão de ração e o peso corporal foram registrados três vezes por

semana, a ingestão de líquidos foi avaliada diariamente e o peso final foi determinado antes da eutanásia.

## 6.2 Grupos experimentais

Todos os animais foram adaptados ao ambiente laboratorial durante uma semana antes do início do protocolo experimental. Após o período de adaptação, os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=8/ grupo): não treinados (SED) e treinados (CTRL), com água *ad libitum*; treinados, suplementados com L-alanina (ALA); treinados, suplementados com L-alanina e L-glutamina livres (GLN+ALA); treinados, suplementados com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (DIP).

## 6.3 Suplementação

A suplementação foi administrada *ad libitum* na água de beber dos animais, a uma concentração de 4% (4 g dissolvidos em um volume final de 100 ml), nos últimos 21 dias do experimento, caracterizando um período crônico de suplementação na fase mais intensa do treinamento (Rogerio *et al.*, 2004; Cruzat *et al.*, 2010). A ingestão de suplemento foi medida diariamente. A administração na água potável foi selecionada após dificuldades técnicas na administração diária de gavagem e na tentativa de reduzir o estresse da manipulação, além de aumentar a frequência de ingestão de aminoácidos ao longo do dia (Prada *et al.*, 2007). A proporção de aminoácidos diluídos na água de beber dos animais foi calculada com base na concentração da solução comercial do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (Dipeptiven®, 20 g de L-alanil-L-glutamina dissolvida em 100 ml de água). A L-glutamina livre e a L-alanina livre foram fabricadas pela empresa Labsynth (Synth), enquanto o Dipeptiven® foi fabricado pela empresa Fresenius Kabi S.A.

## 6.4 Protocolo de treinamento resistido e teste de carga máxima (TCM)

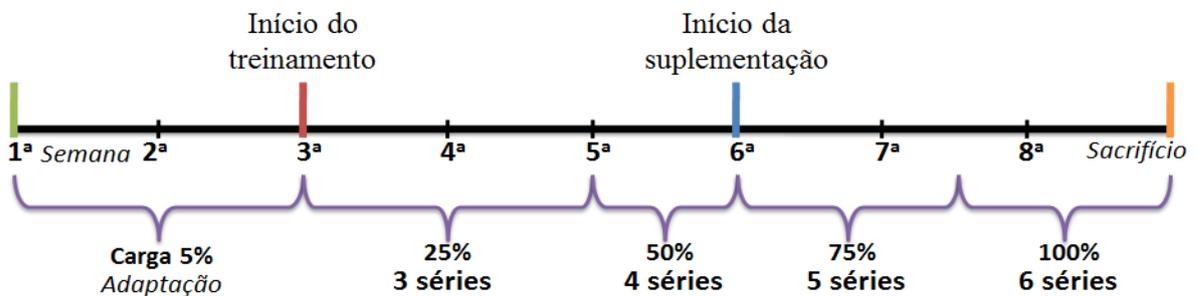
O protocolo de treinamento foi adaptado de Scheffer *et al.*, (2012), originalmente publicado por Hornberger & Farrar (2004), e consistiu em escalar uma escada vertical (1,1m x 0,18m, degrau de 2-cm, inclinada à 80°) com aparato de carga acoplado à base da cauda (Figura 2). O protocolo iniciou-se pela adaptação, com oito escaladas consecutivas (uma série) e carga correspondente a 5% do peso corporal. Em seguida, a carga do treinamento foi

aumentada progressivamente para 25, 50, 75 e 100% do peso corporal, envolvendo três a seis séries de oito repetições (Figura 3), com intervalo de dois minutos entre as séries. Cada sessão de treinamento foi realizada com intervalo de 48 horas, por seis semanas.



**Figura 2** Escada usada no treinamento resistido.

Foram realizados três testes de carga máxima (TCM) para determinar o desempenho durante o protocolo de treinamento: após o período de adaptação (teste 1), antes da suplementação (teste 2) e após a suplementação (teste 3). Resumidamente, o protocolo de teste consistiu em uma escalada com uma carga inicial de 75% do peso corporal, e uma carga adicional de 30 g em cada escalada, com dois minutos de descanso entre cada subida. Este procedimento foi repetido sucessivamente até a exaustão, sendo a maior carga carregada considerada como resultado final do TCM.



**Figura 3** Desenho experimental e protocolo de treinamento.

### 6.5 Eutanásia dos animais e coleta de amostras

A eutanásia foi realizada por decaptação, uma hora após a última sessão de treinamento. Após a coleta de sangue em tubos heparinizados, amostras de soro, plasma e leucócitos foram armazenadas em freezer (-80°C). O músculo esquelético *Extensor Digitorum Longus* (EDL) foi cirurgicamente excisado, pesado, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para armazenamento em freezer (- 80°C) e posteriores análises.

## **6.6 Parâmetros analisados durante o experimento**

- Peso corporal
- Consumo de ração
- Ingestão hídrica
- Consumo de suplemento
- Concentração sanguínea de lactato
- TCM

## **6.7 Parâmetros analisados após eutanásia**

### **6.7.1 Plasma**

- Concentração de glutamina e glutamato
- Concentração de creatina quinase
- Concentração de lactato desidrogenase
- Concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, MCP-1

### **6.7.2 Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

- Expressão de HSP70 (HSP 72 e 73)

### **6.7.3 Músculo esquelético**

- Concentração de glutamina e glutamato
- Atividade de ligação nuclear do NF- $\kappa$ B
- Expressão proteica: HSP70 (HSP 72 e 73)
- Concentração de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10

## **6.8 Determinações plasmáticas e teciduais**

### **6.8.1 Lactato sanguíneo**

O lactato sanguíneo foi determinado durante o treinamento, na terceira sessão de cada carga de treinamento (25, 50, 75 e 100% do peso corporal). As amostras foram coletadas em repouso e imediatamente após o exercício, da veia da cauda dos animais em tubos heparinizados e analisadas em um lactímetro (Yellow Spring Instruments, Life Science).

### **6.8.2 Separação de PBMC**

A separação de PBMC foi realizada pela técnica de Ficoll-Hypaque 1,084, utilizando como anticoagulante heparina sódica a 5% (Boyum *et al.*, 2002). Após a coleta, o sangue é diluído 1:3 com PBS e centrifugado por 10 minutos a 400 x g em tubos cônicos de 15 mL, contendo 3 mL de solução de Ficoll-Hypaque 1,084. Neste procedimento ocorre a separação em gradiente descontínuo de polissacarose, Ficoll 400, o qual se agrega aos eritrócitos e granulócitos precipitando-os durante a centrifugação na presença de diatrizoato de sódio (Hypaque) que garante a densidade do gradiente.

Nesta concentração (10,24%), o diatrizoato fornece uma solução ligeiramente hipertônica (311 mOsm/kg H<sub>2</sub>O) o que torna possível a posterior coleta e separação de PBMC, enquanto que eritrócitos e granulócitos tendem a precipitar com o Ficoll. Por método de aspiração com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico é feita a coleta de PBMC. Uma vez coletadas, as amostras são transferidas para outro tubo de 15 mL e diluídas com PBS para um volume de cerca de 10 vezes o volume de mononucleares obtido, sendo centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos, à temperatura ambiente para precipitar as células. Ao término da centrifugação o PBS é aspirado retirando as plaquetas ainda restantes na nuvem.

### **6.8.3 Creatina Quinase**

A concentração de creatina quinase (CK) foi determinada através do Kit CK- NAC liquiform (Labtest, Brasil) utilizado no aparelho Labmax 240 (Labtest) conforme a metodologia descrita por Schumann *et al* (2002). A atividade de CK é determinada através das seguintes reações: A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir

adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose -6-fosfato, na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorvância em 340 nm é proporcional à atividade da CK na amostra.

#### **6.8.4 Lactato Desidrogenase**

A concentração de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada, conforme instruções do fabricante através do Kit LDH liquiform (Labtest, Brasil) utilizado no aparelho Labmax 240 (Labtest), de acordo com a reação em que a LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorvância em 340nm devido a oxidação do NADH é proporcional à atividade da LDH na amostra.

#### **6.8.5 Concentrações de glutamina e glutamato**

A determinação de glutamina e glutamato foi realizada através de kit comercial (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA). Amostras de plasma foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para garantir a estabilidade. Para a determinação dos conteúdos de glutamina e/ou glutamato, as amostras foram homogeneizadas com ácido tricloroacético (TCA) a 5% na proporção de 1:1 em homogeneizador (Ultra Turrax). Após a homogeneização em TCA as amostras foram neutralizadas utilizando 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para cada 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante coletado posteriormente a centrifugação a 16.000 x g por 2 min., a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. O volume de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  utilizado é suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5. Para o ensaio foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes em triplicata.

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 ( $\text{NH}_4^+$ ) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato é desidrogenado e convertido a  $\alpha$ -cetoglutarato (2-oxoglutarato) via glutamato desidrogenase (GDH), na presença de  $\text{NAD}^+$ . 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 (Biorad Benchmark Microplate Reader340-750nm UV/VIS, Califórnia, EUA) conforme método descrito por Lund (1985).

### **6.8.6 Concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ e MCP-1**

Para determinação das concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 e MCP-1 foram utilizados Kits com micro placa para citocinas de animais (Tecnologia Millipore Lincoplex - Billerica, MA, USA). Este ensaio envolve um processo que cora internamente micro esferas de poliestireno com dois fluorocromos espectrais distintos. Utilizando uma proporção destes dois fluorocromos são criados conjuntos de esferas. Cada esfera é conjugada a um anticorpo analítico específico. As micro esferas são combinadas em um único poço de reação.

Os ensaios se fundamentam na metodologia “sanduíche” convencional de dois sítios, onde a mistura de micro esferas é incubada com padrões e amostras em formato de placa de 96 poços utilizando anticorpo biotinizado, e incubada com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina. A leitura é realizada no equipamento Luminex 200 (Millipore, EUA) através de sistema duplo de lasers que incide sob as micro esferas, à medida que estas fluem através do fluxocelular. Um feixe de laser detecta a micro esfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de repórter em cada micro esfera. As micro esferas passam através do fluxo celular Luminex, cada micro esfera é identificada e o sinal estreptavidina-ficoeritrina associado a elas é quantificado.

### **6.8.7 Análises de western blotting**

As membranas foram incubadas com o anticorpo primário HSP70 (1:1000 Cell Signaling Technology). A análise do conteúdo celular de  $\beta$ -Actina foi utilizada como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo anti  $\beta$ -actina contendo peroxidase (1:1000 Sigma-Aldrich).

#### **6.8.7.1 Extração de proteína**

Amostras congeladas (300 a 400 mg) do músculo esquelético EDL foram mantidas em microtubos até a extração. Os tecidos foram homogeneizados em 1,2 mL de tampão para lise e extração das proteínas contendo 20 mM Tris HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1 mM EDTA (pH 8,00), 10% glicerol, 20 mM fluoreto de sódio, 30 mM pirofosfato de sódio, 0,2% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio e água ultrapura.

O tampão é sempre mantido no gelo e no momento do uso acrescenta-se 1mM de PMSF, 1 mM ortovanadato de Na, 50  $\mu$ M leupeptina e 5  $\mu$ M aprotinina (Sigma-Aldrich). Para a homogeneização é utilizado homogeneizador elétrico tipo polytron (Ika T10 basic) na velocidade máxima, em 3 ciclos de cerca de 30 segundos cada. A velocidade elevada é utilizada para dissociar e romper o tecido. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador é lavado em álcool 70% e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras são mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

Posteriormente, as amostras são centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e temperatura de -4°C. Após a centrifugação, ocorre separação em três camadas: fatcake (camada superior), proteínas extraídas (camada intermediária) e infranadante (camada inferior). A camada intermediária é coletada delicadamente, com o auxílio de seringa e agulha, e transferida para outro tubo (1,5 mL). Serão feitas alíquotas de 50  $\mu$ L e armazenadas em freezer (-80°C).

#### *6.8.7.2 Preparo do gel de poliacrilamida*

Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônia e 0,1% TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5 e 10%, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônia e 0,077% TEMED.

#### *6.8.7.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE*

As amostras foram combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol. Amostras contendo 30  $\mu$ g de proteína foram previamente aquecidas em banho-maria por cinco minutos com o intuito de desnaturar as proteínas. Logo em seguida, as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida, com ponteiras para gel (diâmetro da ponta 0,57 mm), balizado por marcador padrão de peso molecular Full-Range Rainbow de 12.000 a 225.000 Da (Amersham GE Healthcare- RPN800E). A eletroforese é realizada em cubas para gel (Amersham GE Healthcare), inicialmente a 60 V. Quando as proteínas atravessam o gel de empilhamento, a voltagem é aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida.

#### *6.8.7.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose*

Para a transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose), as membranas foram hidratadas e, então, um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm (Whatman), gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana é realizada em cuba de eletroforese (Biorad), na presença de tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 8,3), sob corrente de 25 V, por 90 min. A cuba de eletroforese é mantida em recipiente com gelo, para preservar a integridade das proteínas no gel. A eficiência da transferência é verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante Ponceau (1% ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% KH<sub>2</sub>(PO)<sub>4</sub>, 1,15% Na<sub>2</sub>H(PO)<sub>4</sub>, 0,5% Tween].

#### *6.8.7.5 Incubação com anticorpos*

Para a sondagem das proteínas de interesse foi utilizado o aparelho Snap ID (Milipore). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com proteínas de albumina bovina a uma concentração de 5%, em tampão PBST, por 20 minutos. Posteriormente foram lavadas por 3 x e incubadas overnight com anticorpo específico para cada proteína de interesse, mantendo as membranas sob leve agitação, à 4°C. A análise do conteúdo celular de  $\beta$ -Actina foi utilizada como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo primário. As membranas foram lavadas 3 vezes, com PBST e incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em PBST, por 20 minutos. Ao final da incubação as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes.

#### *6.8.7.6 Revelação com sistema Quimioluminescente*

A solução de revelação é preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do kit ECL Advance (GE Healthcare), composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio, e a mistura é utilizada para umedecer as membranas. Os blots são visualizados pelo sistema

de bioimagem ImageQuant™ 400 (GE Healthcare) e analisados pelo software QuantityOne (Bio-Rad).

#### **6.8.8 Atividade de ligação nuclear do NF-κB**

A atividade total de ligação ao DNA do fator de transcrição NF-κB p65 foi determinada no extrato nuclear do músculo EDL por ensaio de desvio de mobilidade eletroforética. Frações nucleares foram isoladas utilizando o método recomendado no kit Nuclear Extraction Kit (Abcam), que consiste em homogeneizar amostras de tecido em tampão de pré-extração (5mL/ g tecido) e posteriormente em uma solução de extrato nuclear (10μl/ 2 mg de tecido), mantendo as amostras em gelo para evitar a degradação proteica.

Após testar a diluição, os extratos nucleares das amostras são subsequentemente analisados quanto à atividade de NF-κB, conforme as instruções do fabricante utilizando o kit NF-κB p50/p65 transcription factor assay kit (Abcam). NF-κB p65 foi detectado por adição de um anticorpo primário específico anti NF-κB p65. Um anticorpo secundário foi adicionado para proporcionar uma leitura colorimétrica sensível a 450 nm. As quantidades de NF-κB p65 foram normalizadas por divisão de cada leitura das amostras pela concentração de proteína nuclear, o que permite fazer comparações semi-quantitativas das quantidades relativas de NF-κB p65 nuclear entre os grupos correspondentes.

### **6.9 Análise estatística**

O tamanho amostral foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos para a principal variável dependente do estudo (concentração de glutamina). Foi utilizado um poder estatístico de 80% para um nível de significância de 0,05%. Foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov e teste de normalidade de Levene. As comparações entre os grupos foram realizadas por ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey HSD. As análises em tempos diferentes foram realizadas com medidas repetidas. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado como medida de associação para comparações entre a ingestão de aminoácidos e as concentrações de glutamina no plasma e músculo de animais treinados. O nível de significância estatística foi fixado em  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados usando Prism 5.0 para Windows e expressos como média e desvio padrão.

## 7 RESULTADOS

O ganho de peso corporal e o consumo de ração foram reduzidos (em 30 e 11%, respectivamente) no grupo CTRL em comparação com o grupo SED ( $p < 0,05$ ). No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos treinados antes do período de suplementação. Conforme ilustrado na Tabela 1, o treinamento atenuou o aumento de peso corporal e a ingestão de alimentos no grupo CTRL ( $p < 0,05$  vs SED) ao longo do período de suplementação, e não houve diferença na ingestão de água entre os grupos SED e CTRL. Embora a ingestão de suplementos tenha sido maior no grupo ALA ( $65,14 \pm 2,92$  ml/ dia) comparado aos grupos GLN+ALA e DIP ( $60,15 \pm 1,90$  e  $52,75 \pm 1,90$  ml/ dia, respectivamente), bem como em todos os grupos suplementados em comparação com o CTRL ( $p < 0,05$ ), as administrações de L-glutamina ou L-alanina não afetaram o aumento de peso e a ingestão de alimentos.

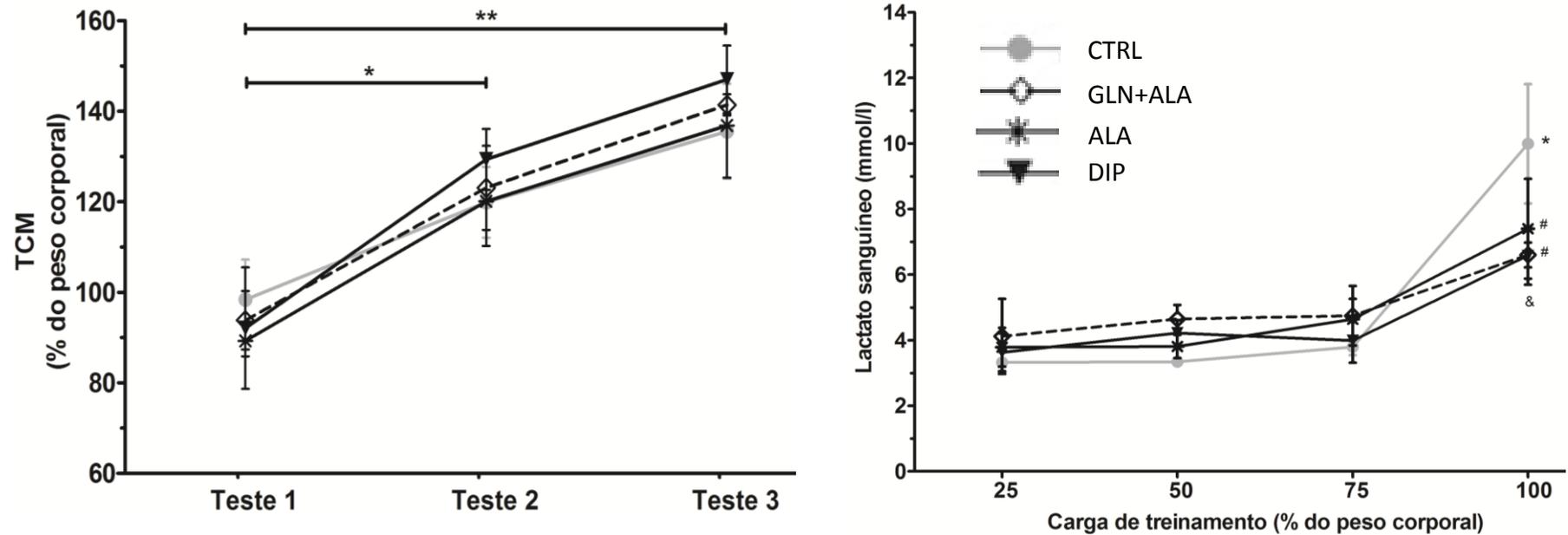
O TCM foi realizado para determinar o desempenho durante o protocolo de treinamento. Conforme ilustrado na figura 4, todos os animais treinados demonstraram um aumento no desempenho ( $p < 0,05$ ) nos testes 2 e 3 (aproximadamente 32 e 50%, respectivamente) quando comparados com o primeiro teste. No entanto, é importante ressaltar que não houve diferença entre o teste 2 e o teste 3, o que sugere uma menor capacidade de carregamento de carga, consistente com a fase de maior intensidade do protocolo de treinamento resistido. Não houve diferença significativa entre animais controles e animais suplementados (Figura 4).

Adicionalmente ao TCM, a intensidade do exercício e a demanda metabólica foram avaliadas pela determinação do lactato sanguíneo de repouso e imediatamente após o treino de cada carga (25, 50, 75 e 100% do peso corporal). Os animais do grupo CTRL exibiram a concentração de lactato sanguíneo duas vezes maior no treinamento com carga de 100% do peso corporal, em relação a todas as cargas anteriores ( $p < 0,05$ ), sugerindo aumento da demanda energética promovido pelo ER. Nos grupos suplementados, a concentração de lactato aumentou aproximadamente 80% na carga de 100%, o que foi estatisticamente significativo quando comparado com a carga de 25% do peso corporal ( $p < 0,05$ ). Além disso, ambos os grupos suplementados com L-glutamina apresentaram menor concentração de lactato na carga de 100%, quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

**Tabela 1** Peso corporal inicial, ganho de peso, consumo diário de ração e ingestão hídrica de ratos submetidos a treinamento resistido e avaliados durante o período de suplementação.

	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Peso corporal inicial (g)	224,80±5,46	232,80±9,52	224,90±7,34	230,60±5,61	230,80±4,76
Ganho de peso (%)	13,11±1,77	7,17±2,17*	6,28±3,22*	7,35±2,80*	8,11±1,72*
Consumo de ração (g/dia)	27,08±0,65	23,00±1,92*	22,15±2,04*	21,69±0,53*	21,66±0,32*
Ingestão hídrica (mL/dia)	39,06±2,12	37,88±2,16	65,14±7,16* <sup>#&amp;</sup>	60,15±4,64* <sup>#</sup>	52,75±4,66* <sup>#</sup>

SED (grupo sedentário hidratado com água); CTRL (controle treinado e hidratado com água); ALA (treinado e suplementado com L-alanina); GLN+ALA (treinado e suplementado com L-alanina e L-glutamina); DIP (treinado e suplementado com L-alanil-L-glutamina). Os suplementos foram diluídos a 4% em água filtrada e ofertada *ad libitum* nos últimos 21 dias do experimento. O protocolo de treinamento resistido de 8 semanas consistiu em escalar uma escada com aumento de carga progressivo. Os dados foram apresentados como média ± DP (n = 8). \*p <0,05 vs. SED; #p <0,05 vs. CTRL; &p <0,05 vs. DIP (ANOVA, Tukey HSD).



**Figura 4** Teste de carga máxima e lactato sanguíneo.

O teste de carga máxima (TCM) foi realizado antes da suplementação (teste 1 e teste 2) e após o período de suplementação (teste 3) ao longo do protocolo de treinamento resistido (n 8). Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  vs teste 1; \*\* $p < 0,01$  vs testes 1 e 2. O lactato sanguíneo foi avaliado na terceira sessão de cada carga de treinamento (25, 50, 75 e 100% do peso corporal). \* $p < 0,05$  vs as cargas de 25, 50 e 75%; # $p < 0,05$  vs carga de 25%; & $p < 0,05$  GLN+ALA e DIP vs CTRL.

Devido ao aumento da demanda fisiológica desencadeada pelo exercício intenso, a concentração de glutamina no plasma e nos tecidos é reduzida de forma acentuada, especialmente nos principais tecidos de estoque e liberação do aminoácido para todo o corpo, como o músculo esquelético. Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que o treinamento reduziu as concentrações de glutamina tanto no plasma quanto no músculo, bem como a razão glutamina/ glutamato no músculo EDL do grupo CTRL, quando comparado aos animais SED ( $p < 0,05$ ). Em contraste, as intervenções nutricionais com ALA, GLN+ALA e DIP atenuaram os efeitos do ER, aumentando a concentração plasmática de glutamina (45, 40 e 57%, respectivamente), quando comparado com o grupo CTRL ( $p < 0,05$ ). Além disso, as concentrações musculares de glutamina foram significativamente restauradas nos grupos GLN+ALA e DIP. Embora a ingestão de aminoácidos tenha sido aumentada em grupos suplementados (33%) em comparação com o CTRL, não foi observada correlação significativa entre a ingestão de aminoácidos e as concentrações de glutamina no plasma dos grupos ALA ( $r = 0,28$ ,  $p = 0,59$ ), GLN+ALA ( $r = 0,42$ ,  $p = 0,40$ ) e DIP ( $r = 0,40$ ,  $p = 0,42$ ), bem como no músculo ( $r = 0,04$ ,  $p = 0,93$ ;  $r = 0,33$ ,  $p = 0,52$ ;  $r = 0,10$ ,  $p = 0,85$ , respectivamente).

A análise das concentrações plasmáticas de CK e LDH foi realizada para avaliação de lesão muscular. Neste estudo, houve um aumento de CK e LDH (56 e 39%, respectivamente) no grupo CTRL treinado em comparação com o grupo SED ( $p < 0,05$ ). No entanto, este efeito foi atenuado pela administração de GLN+ALA e DIP, quando comparado com o grupo CTRL ( $p < 0,05$ ). Além do aumento na concentração de marcadores de lesão, o TR promoveu aumento nas concentrações plasmáticas dos marcadores inflamatórios IL-1 $\beta$  (75%), TNF- $\alpha$  (14%), IL-6 (45%), IL-10 (46%) e MCP-1 (33%) no grupo CTRL comparado ao SED ( $p < 0,05$ ). No entanto, as intervenções nutricionais com ALA, GLN+ALA e DIP reduziram as concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (57 e 21%, respectivamente), quando comparadas com os controles ( $p < 0,05$ ). De forma interessante, os animais suplementados com GLN+ALA e DIP exibiram um aumento na concentração de IL-6 (38%), IL-10 (91%) e MCP-1 (28%), em comparação com o grupo CTRL (Tabela 2;  $p < 0,05$ ).

Conforme observado na Tabela 2, o TR e a suplementação nutricional tiveram impacto nos marcadores de inflamação muscular. No grupo CTRL, o TR induziu um aumento na concentração dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, quando comparados aos animais SED ( $p < 0,05$ ). No entanto, os suplementos ALA, GLN+ALA e DIP atenuaram estes resultados ( $p < 0,05$  vs CTRL), mantendo a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 próxima das concentrações basais observados no músculo EDL do grupo SED.

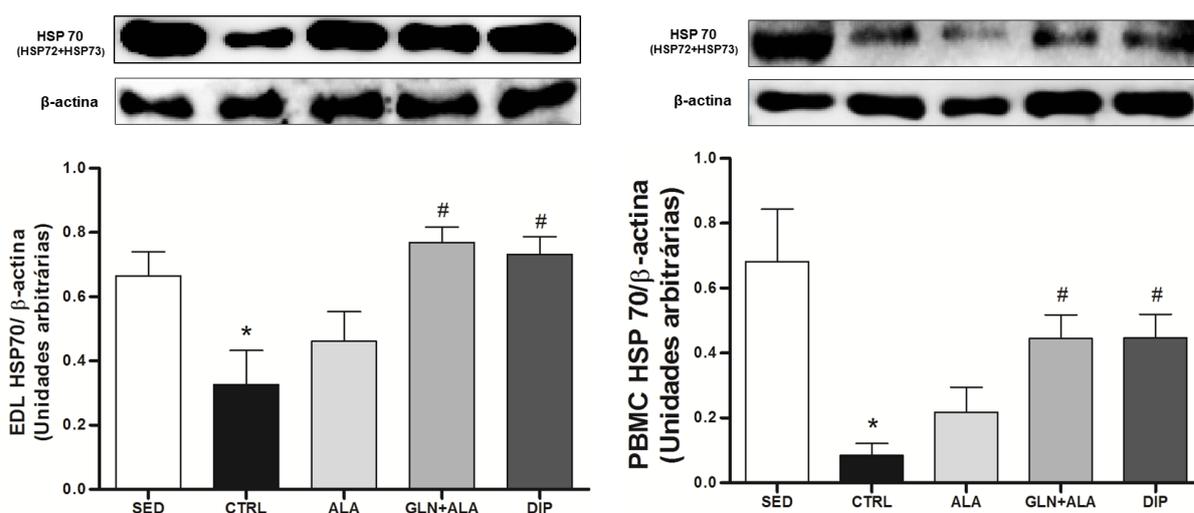
**Tabela 2** Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo sobre marcadores de lesão muscular e inflamação no plasma, e concentrações de glutamina e glutamato no plasma e músculo EDL de ratos submetidos a treinamento resistido.

	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
<b><i>Plasma</i></b>					
CK (U/mL)	12,10±2,23	18,83±2,62*	16,32±5,20 <sup>&amp;</sup>	10,27±4,60 <sup>#</sup>	9,82±3,03 <sup>#</sup>
LDH (U/mL)	5,13±0,77	7,12±1,33*	5,30±1,65	4,55±1,35 <sup>#</sup>	4,77±1,08 <sup>#</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	0,08±0,03	0,14±0,03*	0,07±0,04 <sup>#</sup>	0,06±0,04 <sup>#</sup>	0,05±0,03 <sup>#</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	1,77±0,02	2,05±0,07*	1,68±0,09 <sup>#</sup>	1,69±0,08 <sup>#</sup>	1,52±0,08 <sup>#</sup>
IL-6 (pg/mL)	7,38±2,10	10,72±2,30*	11,18±1,51* <sup>&amp;</sup>	14,92±2,65* <sup>#</sup>	14,70±2,08* <sup>#</sup>
IL-10 (pg/mL)	0,95±0,23	1,39±0,14*	1,53±0,52* <sup>&amp;</sup>	2,67±0,48* <sup>#</sup>	2,64±0,35* <sup>#</sup>
MCP-1 (pg/mL)	309,72±85,86	412,90±64,87*	432,80±37,52*	518,10±69,65* <sup>#</sup>	533,90±88,81* <sup>#</sup>
Glutamina ( $\mu$ mol/l)	1,15±0,03	0,99±0,10*	1,44±0,11 <sup>#</sup>	1,39±0,20 <sup>#</sup>	1,56±0,37* <sup>#</sup>
Glutamato ( $\mu$ mol/l)	0,83±0,25	0,79±0,31	0,76±0,27	0,79±0,30	0,73±0,36
<b><i>Músculo EDL</i></b>					
Glutamina ( $\mu$ mol/ g tecido fresco)	8,59±0,21	6,73±0,75*	8,00±1,43	8,77±0,52 <sup>#</sup>	9,05±1,05 <sup>#</sup>
Glutamato ( $\mu$ mol/ g tecido fresco)	6,18±0,45	6,26±0,10	6,28±0,10	6,44±0,25	6,32±0,08
Razão Glutamina/ Glutamato	1,40±0,06	0,99±0,21*	1,27±0,26	1,31±0,15 <sup>#</sup>	1,37±0,24 <sup>#</sup>
Glutamina (nmol/ mg proteína)	20,46±3,27	11,94±4,23*	22,44±11,12	23,06±2,55 <sup>#</sup>	24,51±10,63 <sup>#</sup>
Glutamato (nmol/ mg proteína)	13,98±4,92	18,23±8,08	18,80±7,41	17,94±2,48	14,45±3,66
Razão Glutamina/ Glutamato	1,41±0,04	0,99±0,05*	1,27±0,34	1,31±0,17 <sup>#</sup>	1,33±0,23 <sup>#</sup>

TNF- $\alpha$ (pg/ mg proteína)	0,12 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01*	0,10 $\pm$ 0,02 <sup>#</sup>	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>#</sup>	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>#</sup>
IL-6 (pg/ mg proteína)	6,61 $\pm$ 0,75	8,35 $\pm$ 0,98*	6,11 $\pm$ 1,17 <sup>#</sup>	6,11 $\pm$ 1,07 <sup>#</sup>	5,93 $\pm$ 1,10 <sup>#</sup>
IL-10 (pg/ mg proteína)	0,60 $\pm$ 0,18	1,13 $\pm$ 0,20*	0,62 $\pm$ 0,24 <sup>#</sup>	0,61 $\pm$ 0,19 <sup>#</sup>	0,58 $\pm$ 0,07 <sup>#</sup>

SED (grupo sedentário hidratado com água); CTRL (controle treinado e hidratado com água); ALA (treinado e suplementado com L-alanina); GLN+ALA (treinado e suplementado com L-alanina e L-glutamina); DIP (treinado e suplementado com L-alanil-L-glutamina). Os suplementos foram diluídos a 4% em água filtrada e ofertados *ad libitum* nos últimos 21 dias do experimento. O protocolo de treinamento resistido de 8 semanas consistiu em escalar uma escada com aumento de carga progressivo. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP (n = 8). \*p <0,05 vs SED; <sup>#</sup>p <0,05 vs CTRL; &p <0,05 vs GLN+ALA e DIP (ANOVA, Tukey HSD).

As HSPs, especialmente a família HSP70, fornecem proteção contra várias formas de lesão. Embora o exercício seja um potente estímulo para a resposta mediada por HSPs, lesões inflamatórias locais e sistêmicas levam a um déficit nos conteúdos da proteína HSP70, o que pode prejudicar a homeostase celular e a recuperação tecidual. Neste estudo, o conteúdo muscular de HSP70 foi significativamente reduzido (51%) pelo TR no grupo CTRL, comparado ao SED ( $p < 0,05$ ). Além disso, o TR induziu uma diminuição severa (88%) no conteúdo de HSP70 nas PBMC circulantes ( $p < 0,05$ ), possivelmente porque estas células são incapazes de sintetizar a glutamina e dependem, em grande parte, da disponibilidade plasmática e muscular deste aminoácido, o que foi comprometida pelo TR (Tabela 2). De fato, a disponibilidade de glutamina é crítica para a regulação da resposta mediada por HSPs, e os suplementos GLN+ALA e DIP foram capazes de restaurar a concentração de HSP70 tanto no músculo esquelético EDL quanto nas PBMC (Figura 5), quando comparado aos animais CTRL ( $p < 0,05$ ).

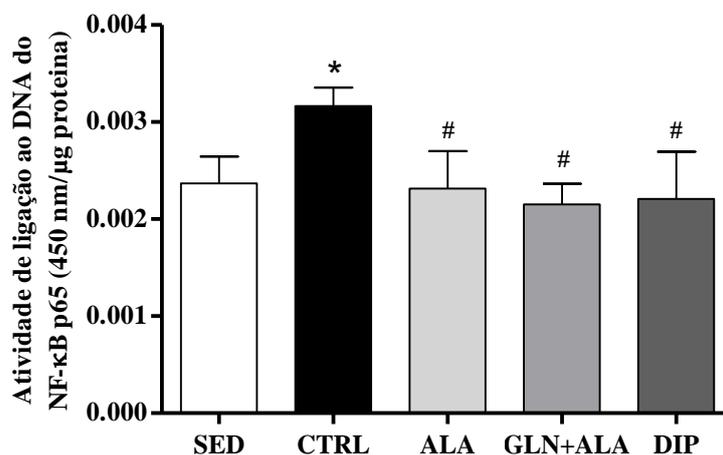


**Figura 5** Conteúdos de HSP70 em músculo EDL e nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de ratos submetidos a treinamento resistido.

SED (grupo sedentário hidratado com água); CTRL (controle treinado e hidratado com água); ALA (treinado e suplementado com L-alanina); GLN+ALA (treinado e suplementado com L-alanina e L-glutamina); DIP (treinado e suplementado com L-alanil-L-glutamina). Os suplementos foram diluídos a 4% em água filtrada e ofertados *ad libitum* nos últimos 21 dias do experimento. O protocolo de treinamento resistido de 8 semanas consistiu em escalar uma escada com aumento de carga progressivo. O músculo EDL foi extraído e congelado em nitrogênio líquido para análise posterior. Amostras frescas de sangue foram coletadas e as PBMC foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade por Ficoll. Os

imunoblots foram obtidos com anticorpo monoclonal HSP70 e as bandas normalizadas com os respectivos controles de  $\beta$ -actina. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP (n = 8). \*p <0,05 vs SED; # p <0,05 vs CTRL.

O fator nuclear-kappa B é um complexo proteico que controla a transcrição de DNA e tem sido identificado como um fator de transcrição chave na mediação da resposta inflamatória após o exercício. Neste sentido, a HSP70 intracelular possui importantes propriedades anti-inflamatórias, proporcionando tolerância ao estresse por meio do bloqueio da ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B (Singleton & Wischmeyer, 2007; Cruzat *et al.*, 2014). A atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição NF- $\kappa$ B p65 foi detectada em extratos nucleares do músculo EDL e os resultados encontrados neste estudo (Figura 6) estão de acordo com estudos *in vitro* e *in vivo* com exercícios aeróbios, uma vez que a diminuição do conteúdo de HSP70 promoveu efeitos inflamatórios aumentando a ativação de NF- $\kappa$ B p65 no músculo esquelético do grupo CTRL (34%), em comparação com o grupo SED (p<0,05). Além disso, a glutamina é um substrato chave que tem um impacto na expressão HSP70. Conseqüentemente, a redução de aproximadamente 30% na ativação do NF- $\kappa$ B p65 no músculo EDL dos grupos que receberam suplementação pode ser decorrente do aumento no conteúdo HSP70, induzido pelo aumento da oferta de glutamina.



**Figura 6** Atividade de ligação ao DNA do NF- $\kappa$ B p65 detectada em extrato nuclear do músculo EDL de ratos submetidos a treinamento resistido.

SED (grupo sedentário hidratado com água); CTRL (controle treinado e hidratado com água); ALA (treinado e suplementado com L-alanina); GLN+ALA (treinado e suplementado com L-alanina e L-glutamina); DIP (treinado e suplementado com L-alanil-L-glutamina). Os suplementos foram diluídos a 4% em água filtrada e ofertados *ad libitum* nos últimos 21 dias

do experimento. O protocolo de treinamento resistido de oito semanas consistiu em escalar uma escada com aumento de carga progressivo. O músculo EDL foi excisado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior preparação de extrato nuclear. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP (n = 8). \*p <0,05 vs SED; #p <0,05 vs CTRL.

## 8 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a suplementação oral crônica com L-glutamina (na forma livre em solução com L-alanina ou como dipeptídeo) promoveu efeitos cipotetores mediados pela HSP70, atenuando marcadores de lesão muscular e de inflamação. A glutamina é conhecida como um aminoácido importante para o metabolismo e função celular, servindo como um substrato metabólico chave no fornecimento de energia e na manutenção do balanço nitrogenado (Stoll *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012). O metabolismo da glutamina e a concentração sanguínea deste aminoácido são drasticamente comprometidos em situações catabólicas, que incluem exercício de alta intensidade e de longa duração, conforme descrito previamente. No entanto, pouco é investigado sobre o metabolismo da glutamina administrada de forma oral em atividades predominantemente anaeróbias, como o treinamento resistido intenso.

O protocolo de treinamento realizado neste estudo promoveu redução das concentrações de glutamina no plasma e no músculo EDL. O tecido muscular é quantitativamente a maior fonte e é essencial para a síntese e liberação de glutamina, influenciando a concentração plasmática deste aminoácido, bem como a sua utilização por outros tecidos e células, tais como PBMC (Curi *et al.*, 1997; Newsholme, 2001; Santos *et al.*, 2007; Cruzat *et al.*, 2014). Embora a glutamina corresponda a, pelo menos, 50% do *pool* de aminoácidos livres no músculo esquelético, em situações catabólicas, a liberação muscular de glutamina excede a síntese, o que pode comprometer a recuperação tecidual devido à alta taxa de degradação proteica induzida por desequilíbrio no balanço nitrogenado após o exercício (Newsholme, 2001; Newsholme *et al.*, 2003; Cruzat *et al.*, 2014). No presente estudo, a administração oral crônica com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como o dipeptídeo, não alterou a ingestão de ração e o ganho de peso corporal entre os animais suplementados, permitindo avaliar o efeito exclusivo das suplementações em ratos treinados. Os efeitos benéficos descritos aqui corroboram os resultados publicados em estudos anteriores

(Rogerio *et al.*, 2006; Cruzat & Tirapegui, 2009; Cruzat *et al.*, 2010; Petry *et al.*, 2014; Cruzat *et al.*, 2014).

Curiosamente, a suplementação com L-alanina aumentou significativamente a concentração e os efeitos da glutamina. O exercício é caracterizado por uma mudança no fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal para o músculo ativo, o que pode levar a mudanças na absorção intestinal de glutamina, como demonstrado em condições catabólicas (Zhou *et al.*, 2012). A presença de alanina em suplementos contendo glutamina demonstrou alterar o metabolismo da glutamina, uma vez que esta é metabolizada a piruvato, via alanina aminotransferase, e rapidamente consumida no Ciclo de Krebs para a geração de ATP e síntese de glutamato a partir do 2-oxoglutarato (Battezzati *et al.*, 1999; Cunningham *et al.*, 2005; Petry *et al.*, 2014). Semelhante à glutamina, a alanina tem um papel central na manutenção do metabolismo intermediário (Curi *et al.*, 1997; Newsholme, 2001; 2003). O aumento na liberação de alanina pelo músculo esquelético durante e após o exercício tem sido considerada necessária como uma forma não tóxica de transporte de nitrogênio no músculo e um substrato para a gluconeogênese hepática, uma vez que o fluxo glicolítico é aumentado proporcionalmente à intensidade de trabalho durante as contrações musculares (Hood & Terjung, 1994). Neste sentido, apesar da elevada demanda energética evidenciada pelo aumento do lactato sanguíneo, a alta concentração de glutamina no plasma de ratos tratados com L-alanina corrobora a hipótese de que a suplementação com alanina pode fornecer substrato adicional para a gliconeogênese hepática e renal, preservando a utilização de glutamina. Os efeitos benéficos da suplementação oral com glutamina, administrada em combinação com outros aminoácidos, sobre a redução das concentrações de citocinas inflamatórias foram previamente demonstrados (Zhou *et al.*, 2012). Neste estudo, a suplementação com L-alanina reduziu a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, a administração de L-alanina livre não recuperou os estoques de glutamina no músculo esquelético de ratos treinados.

A glutamina também tem sido utilizada como potencializador da expressão de HSP70 kDa (HSP70) (Wischmeyer *et al.*, 2001; Petry *et al.*, 2014) via O-glicosilação e fosforilação de HSF-1 (Wischmeyer, 2002; Singleton & Wischmeyer, 2008) em animais sob estresse ou em condições normais (Wischmeyer *et al.*, 2001). A proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) é uma das isoformas mais indutíveis de HSPs, interage com outras proteínas de maneira dependente de ATP e é induzida por vários estímulos, como exercício, lesão e regeneração muscular (Milne & Noble, 2008; Senf, 2013). A HSP70 desempenha um papel importante na regulação da plasticidade do músculo esquelético (Peake *et al.*, 2005; Milne &

Noble, 2008; Petry *et al.*, 2014), apoptose, morte celular, vias de degradação de ubiquitina e translocação de proteína (Takayama *et al.*, 2003). Recentemente foi proposta a hipótese do equilíbrio de chaperonas, em que a ativação de NF- $\kappa$ B pode reduzir o conteúdo intracelular de HSP70, liberando a HSP70 no meio extracelular para agir na redução do estresse oxidativo em células alvo. No entanto, quando elevada por período crônico no meio extracelular, a HSP70 estimula a inflamação, o estresse oxidativo, a redução da expressão de HSF-1 e, eventualmente, a redução de HSP70 intracelular (Krause *et al.*, 2015).

Para investigar a resposta de proteínas de choque térmico induzida pelo TR progressivo, uma forma comum de exercício, o conteúdo de HSP70 foi avaliado no músculo EDL, o qual possui fibras de contração rápida e pode gerar alta potência de trabalho durante o exercício (Barclay *et al.*, 1993). Embora o exercício seja um estímulo para a resposta de HSPs, neste estudo, o conteúdo total de HSP70 no músculo EDL diminuiu acentuadamente no grupo CTRL, o que pode ter sido consequência do comprometimento da oferta de glutamina e ativação do NF- $\kappa$ B. A supressão da resposta de HSPs também foi encontrada nas PBMC, componentes críticos do sistema imunológico envolvidos no processo de reparo do tecido muscular após o exercício, uma vez que essas células são uma fonte primária de liberação de citocinas pró-inflamatórias (Risøy *et al.*, 2003; Wischmeyer *et al.*, 2003; Ihalainen *et al.*, 2014). As PBMC são, em grande parte, dependentes da síntese e liberação de glutamina pelo músculo esquelético no sangue, uma vez que estas células possuem baixa atividade da enzima glutamina sintetase, catalisadora da síntese de glutamina a partir de amônia e glutamato (Gleeson, 2008). A glutamina pode modular diretamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias em PBMC, o que pode estar relacionado à resposta de HSPs (Wischmeyer *et al.*, 2003). Os resultados deste estudo sugerem que os tratamentos com DIP e GLN+ALA promoveram uma resposta citoprotetora, e esta resposta foi mediada pela reposição das concentrações de glutamina, além do aumento do conteúdo de HSP70 no músculo esquelético e PBMC.

A HSP70 tem sido considerada um regulador precoce da resposta inflamatória à lesão muscular devido ao seu papel na regeneração e recuperação de miofibras (Senf *et al.*, 2013). O aumento de HSP70 resulta na inibição da síntese de citocinas inflamatórias em PBMCs humanas (Wischmeyer *et al.*, 2003), bem como na inativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B (Pahl, 1999; Shi *et al.*, 2006; Milne & Noble, 2008). Os resultados evidenciados neste estudo sugerem que as concentrações elevadas de HSP70 atenuaram a síntese de citocinas inflamatórias por inativação do NF- $\kappa$ B. As respostas inflamatórias são mediadas pela ativação de vias de sinalização críticas, como a do NF- $\kappa$ B (Shi *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2007; Chen

*et al.*, 2008; Finsterer, 2012). Em uma única sessão aguda de exercício, a atividade de NF- $\kappa$ B é aumentada no músculo esquelético de ratos (Ji *et al.*, 2004; Vella *et al.*, 2012). A via NF- $\kappa$ B atua como um integrador central das respostas ao estresse mecânico, oxidativo e inflamatório (Pahl, 1999). No entanto, a ativação contínua e a síntese de componentes inflamatórios podem estimular o recrutamento excessivo de células do sistema imune, promovendo uma lesão tecidual adicional (Urso, 2013). Este estudo demonstrou um aumento na atividade nuclear NF- $\kappa$ B p65 no músculo EDL do grupo CTRL. Por outro lado, todos os tratamentos nutricionais atenuaram o efeito do ER. A glutamina pode atenuar a ativação de múltiplas vias de inflamação, como NF- $\kappa$ B, por meio da via ubiquitina-proteassoma, conferindo proteção contra condições inflamatórias exacerbadas (Chen *et al.*, 2008; Lesueur *et al.*, 2012).

A redução da concentração de glutamina está bem estabelecida em situações catabólicas como no exercício de alta intensidade e exercício prolongado, bem como em processos inflamatórios, aumentando a taxa de degradação proteica (Curi *et al.*, 1997; Stumvoll *et al.*, 1999; Rogero *et al.*, 2006; Cruzat & Tirapegui, 2009; Cruzat *et al.*, 2010; Petry *et al.*, 2014). Neste estudo, o TR induziu um aumento na concentração plasmática das enzimas CK e LDH que, apesar de serem conhecidas como marcadores tardios de lesão, foram significativamente alterados uma hora após a última sessão de ER. Um estudo recente (Baltusnikas *et al.*, 2015) demonstrou que contrações excêntricas induzem um aumento significativo no efluxo de CK muscular imediatamente após o exercício. As contrações mecânicas induzidas pelo TR podem induzir microtraumas nas fibras musculares promovendo a degradação da matriz extracelular, lâmina basal e sarcolema, o que leva a mudanças na estrutura e permeabilidade da membrana (Cooper *et al.*, 2007). A CK está localizada quase que exclusivamente no cérebro, músculos esquelético e cardíaco e é liberada na corrente sanguínea após lesão na estrutura de elementos musculares não-contráteis, induzida pelo exercício intenso (Finsterer, 2012). Sessões moderadas de exercício excêntrico podem induzir adaptação muscular fisiológica. No entanto, a realização de exercício intenso por períodos contínuos pode induzir maior liberação de marcadores de lesão muscular e a perda de proteínas musculares (Hirose *et al.*, 2004; Brancaccio *et al.*, 2006; Brancaccio *et al.*, 2008; Brentano & Martins Krueel, 2011). Estes efeitos foram observados no grupo CTRL, o que indica lesão muscular adicional após cada sessão de exercícios.

Apesar dos efeitos nocivos do TR intenso, houve redução nas concentrações de CK e LDH em grupos suplementados com glutamina (GLN+ALA, DIP), sugerindo resistência muscular em relação às lesões subsequentes causadas por uma nova sessão de exercício. Um estudo recente mostrou a inibição da sinalização de proteínas que ativam a degradação

proteica após TR em ratos suplementados com L-alanilglutamina (Wang *et al.*, 2015), e os estudos anteriores publicados pelo nosso grupo indicaram que os suplementos contendo L-glutamina representam uma maneira efetiva de manter concentrações adequadas de glutamina, o que reduz a liberação de substâncias indicativas de lesão muscular e estresse oxidativo em ratos treinados (Cruzat & Tirapegui, 2009; Cruzat *et al.*, 2010; Petry *et al.*, 2014). O aumento da concentração de lactato promove a mobilização de células do sistema imune para a circulação (Risøy *et al.*, 2003). A micro lesão muscular também induz influxo de macrófagos da circulação para promover o reparo e remodelação tecidual através da síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias (Petersen & Pedersen, 2005; Brancaccio *et al.*, 2006; Ihalainen *et al.*, 2014). No entanto, lesões contínuas sem períodos de repouso adequados desencadeiam respostas inflamatórias crônicas que podem exacerbar as lesões subjacentes e resultar em redução do desempenho e comprometimento da saúde do atleta (Peake *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Peake *et al.*, 2015). Os resultados deste estudo demonstram que o TR desencadeou uma resposta inflamatória estimulando a síntese de mediadores pró e anti-inflamatórios.

Uma sessão de TR intenso desencadeia uma resposta inflamatória transitória estimulando a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias (Ihalainen *et al.*, 2014). As citocinas desempenham um papel integrativo e regulador mediando a comunicação intercelular local ou sistêmica (Peake *et al.*, 2005). De acordo com os resultados, o protocolo de treinamento resistido induziu inflamação pelo aumento da concentração das moléculas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . As contrações mecânicas no músculo esquelético realizadas durante o exercício induz o aumento robusto da IL-6, que estimula a síntese de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, além de inibir a síntese de TNF- $\alpha$  (Steensberg *et al.*, 2003; Petersen & Pedersen, 2005; Cruzat *et al.*, 2014; Ihalainen *et al.*, 2014). Fatores além da lesão muscular, como a secreção de cortisol, também aumentam as concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (Steensberg *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2003), o que pode explicar o aumento plasmático da IL-6 neste estudo. Além disso, a magnitude e o perfil da resposta das citocinas ao exercício podem diferir em relação às mudanças nos fatores locais e sistêmicos durante o exercício (Hirose *et al.*, 2004).

A IL-6 desempenha um papel central na resposta das citocinas. Aumentada pela contração muscular, a liberação de IL-6 está relacionada a mudanças na homeostase do cálcio, e depleção de glicogênio (Steensberg *et al.*, 2003; Pedersen & Febbraio, 2008). No entanto, a relação entre a depleção de glicogênio e a síntese de citocinas não é completamente elucidada (Brentano & Martins Krueel, 2011). O glicogênio muscular não foi analisado neste estudo, fato que representa uma limitação, pois poderia auxiliar na compreensão da relação entre depleção

de glicogênio e a síntese de citocinas. O protocolo de TR utilizado no presente trabalho promoveu alta atividade metabólica indicada pelo aumento do lactato e, portanto, maior concentração de IL-6 no músculo. Concentrações elevadas de IL-6 também foram observadas no plasma de ratos treinados e suplementados. Pedersen *et al.* (2003) demonstraram que a IL-6, liberada pela contração muscular durante o exercício, induz a lipólise e age de forma semelhante a um hormônio para mobilizar substrato energético extracelular e/ ou aumentar a distribuição do substrato durante o exercício. Embora os grupos suplementados tenham recebido mais substrato energético, houve menor ganho de peso, sugerindo efeitos lipolíticos da IL-6. No entanto, as menores concentrações de IL-6 foram observadas no músculo EDL de grupos suplementados, permitindo assim o uso de substratos não lipídicos.

Após o exercício excêntrico, a IL-10 e MCP-1 são aumentados, de forma dependente da intensidade (Peake *et al.*, 2005), na tentativa de conter a inflamação (Vella *et al.*, 2012). Sintetizada por uma variedade de tipos celulares, a MCP-1 recruta monócitos nos focos de inflamação ativa, processo que é necessário para o sucesso da regeneração muscular. A regeneração muscular comprometida em camundongos MCP-1<sup>-/-</sup> sugere um papel importante para macrófagos e MCP-1 nos processos de reparação tecidual (Shireman *et al.*, 2007). Conforme observado neste estudo, devido à elevada demanda metabólica e ao estresse induzido pelo treinamento resistido, as concentrações de MCP-1 aumentaram no grupo CTRL. A administração de glutamina em ambas as formas foi eficiente em aumentar as concentrações plasmáticas de MCP-1, gerando maior capacidade de proteção celular. Neste sentido, o aumento da concentração de mediadores anti-inflamatórios pode limitar a síntese de citocinas pró-inflamatórias associadas a lesões contínuas (Cruzat *et al.*, 2014).

## 9 CONCLUSÕES

Avaliados em conjunto, os resultados deste estudo demonstraram que as suplementações orais crônicas com L-glutamina e L-alanina nas suas formas livres ou como um dipeptídeo induzem efeitos citoprotetores, mediados pela resposta de HSP70, atenuando os efeitos nocivos e inflamatórios do treinamento resistido progressivo e intenso. Os suplementos contendo L-glutamina aumentaram a oferta de glutamina no plasma e no músculo esquelético, o que pode ter estimulado o aumento das concentrações de HSP70 no músculo EDL e nas células do sistema imune, além da redução da atividade de ligação ao DNA do NF-κB, suprimindo a inflamação e a lesão muscular induzida pelo TR intenso.

## 10 REFERÊNCIAS

- BALTUSNIKAS, J., VENCKUNAS, T., KILIKEVICIUS, A., FOKIN, A. & RATKEVICIUS, A. (2015) Efflux of creatine kinase from isolated soleus muscle depends on age, sex and type of exercise in mice. *J Sports Sci Med*, 14(2), 379-85.
- BARCLAY, C. J., CONSTABLE, J. K. & GIBBS, C. L. (1993) Energetics of fast- and slow-twitch muscles of the mouse. *J Physiol*, 472, 61-80.
- BATTEZZATI, A., HAISCH, M., BRILLON, D. J. & MATTHEWS, D. E. (1999) Splanchnic utilization of enteral alanine in humans. *Metabolism*, 48(7), 915-21.
- BENJAMIN, J. I.; CHRISTIANS, E. (2002) Exercise, Estrogen, and Ischemic Cardioprotection by Heat Shock Protein 70. *Circ Res.* (8), 833-5.
- BOUSVAROS, A., GUANDALINI, S., BALDASSANO, R. N., BOTELHO, C., EVANS, J., FERRY, G. D., GOLDIN, B., HARTIGAN, L., KUGATHASAN, S., LEVY, J., MURRAY, K. F., OLIVA-HEMKER, M., ROSH, J. R., TOLIA, V., ZHOLUDEV, A., VANDERHOOF, J. A. & HIBBERD, P. L. (2005) A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus GG* versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 11(9), 833-9.
- BØYUM, A., LØVHAUG, D., TRESLAND, L. & NORDLIE, E. M. (1991) Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol*, 34(6), 697-712.
- BRANCACCIO, P., LIMONGELLI, F. M. & MAFFULLI, N. (2006) Monitoring of serum enzymes in sport. *Br J Sports Med*, 40(2), 96-7.
- BRANCACCIO, P., MAFFULLI, N., BUONAURO, R. & LIMONGELLI, F. M. (2008) Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med*, 27(1), 1-18.
- BRENTANO, M. A. & MARTINS KRUEL, L. F. (2011) A review on strength exercise-induced muscle damage: applications, adaptation mechanisms and limitations. *J Sports Med Phys Fitness*, 51(1), 1-10.
- BROOKS, K. A.; CARTER, J. G. (2013) Overtraining, Exercise, and Adrenal Insufficiency. *J Nov Physiother.* v. 16, 125.
- BROSNAN, J. T. (2001) Amino acids, then and now--a reflection on Sir Hans Krebs' contribution to nitrogen metabolism. *IUBMB Life*, 52(6), 265-70.
- BUYSE, M., BERLIOZ, F., GUILMEAU, S., TSOCAS, A., VOISIN, T., PÉRANZI, G., MERLIN, D., LABURTHE, M., LEWIN, M. J., ROZÉ, C. & BADO, A. (2001) PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest*, 108(10), 1483-94.
- CANDOW, D. G., CHILIBECK, P. D., BURKE, D. G., DAVISON, K. S. & SMITH-PALMER, T. (2001) Effect of glutamine supplementation combined with resistance training in young adults. *European Journal of Applied Physiology*, 86(2), 142-9.

- CHEN, G., SHI, J., QI, M., YIN, H. & HANG, C. (2008) Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappa B activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats. *Inflamm Res*, 57(2), 57-64.
- COOPER, D. M., RADOM-AIZIK, S., SCHWINDT, C. & ZALDIVAR, F. (2007) Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *J Appl Physiol* (1985), 103(2), 700-9.
- CRUZAT, V. F. & TIRAPEGUI, J. (2009) Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition*, 25(4), 428-35.
- CRUZAT, V. F., BITTENCOURT, A., SCOMAZZON, S. P., LEITE, J. S., DE BITTENCOURT, P. I., JR. & TIRAPEGUI, J. (2014a) Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. *Nutrition*, 30(5), 602-11.
- CRUZAT, V. F., KRAUSE, M. & NEWSHOLME, P. (2014b) Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *J Int Soc Sports Nutr*, 11(1), 61.
- CRUZAT, V. F., PANTALEAO, L. C., DONATO, J., JR., DE BITTENCOURT, P. I., JR. & TIRAPEGUI, J. (2014c) 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), 345-52.
- CRUZAT, V. F., ROGERO, M. M. & TIRAPEGUI, J. (2010) Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. *Cell Biochem Funct*, 28(1), 24-30.
- CURI, T. C., DE MELO, M. P., DE AZEVEDO, R. B., ZORN, T. M. & CURI, R. (1997) Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 1), C1124-9.
- FINSTERER, J. (2012) Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musculoskelet Disord*, 13, 218.
- FURST, P. (2001) New developments in glutamine delivery. *J Nutr*, 131(9 Suppl), 2562S-8S.
- GLEESON, M. (2008) Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. *J Nutr*, 138(10), 2045S-2049S.
- GOUTIANOS, G., TZIOURA, A., KYPAROS, A., PASCHALIS, V., MARGARITELIS, N. V., VESKOUKIS, A. S., ZAFEIRIDIS, A., DIPLA, K., NIKOLAIDIS, M. G. & VRABAS, I. S. (2015) The rat adequately reflects human responses to exercise in blood biochemical profile: a comparative study. *Physiol Rep*, 3(2).
- HARRIS, R. C., HOFFMAN, J. R., ALLSOPP, A. & ROUTLEDGE, N. B. (2012) L-glutamine absorption is enhanced after ingestion of L-alanylglutamine compared with the free amino acid or wheat protein. *Nutr Res*, 32(4), 272-7.

HIROSE, L., NOSAKA, K., NEWTON, M., LAVEDER, A., KANO, M., PEAKE, J. & SUZUKI, K. (2004) Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev*, 10, 75-90.

HOOD, D. A. & TERJUNG, R. L. (1994) Endurance training alters alanine and glutamine release from muscle during contractions. *FEBS Lett*, 340(3), 287-90.

HORNBERGER, T. A. & FARRAR, R. P. (2004) Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*, 29(1), 16-31.

IHALAINEN, J., WALKER, S., PAULSEN, G., HÄKKINEN, K., KRAEMER, W. J., HÄMÄLÄINEN, M., VUOLTEENAHO, K., MOILANEN, E. & MERO, A. A. (2014) Acute leukocyte, cytokine and adipocytokine responses to maximal and hypertrophic resistance exercise bouts. *Eur J Appl Physiol*, 114(12), 2607-16.

IWASHITA, S.; WILLIAMS, P.; JABBOUR, K.; UEDA, T.; KOBAYASHI, H.; BAIER, S.; FLAKOLL, P. J. (2005) Impact of glutamine supplementation on glucose homeostasis during and after exercise. *J Appl Physiol*, (99), 1858-1865.

JI, L. L., GOMEZ-CABRERA, M. C., STEINHAFEL, N. & VINA, J. (2004) Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J*, 18(13), 1499-506.

KIM, K. S.; SUH, G. J.; KWON, W. Y.; LEE, H. J.; JEONG, K. Y.; JUNG, S. K.; KWAK, Y. H. (2013) The effect of glutamine on cerebral ischaemic injury after cardiac arrest. *In press, Resuscitation*.

KLASSEN, P., MAZARIEGOS, M., SOLOMONS, N. W. & FURST, P. (2000) The pharmacokinetic responses of humans to 20 g of alanyl-glutamine dipeptide differ with the dosing protocol but not with gastric acidity or in patients with acute Dengue fever. *J Nutr*, 130(2), 177-82.

KOCH, A. J. (2010) Immune Response to Resistance Exercise. *A J Lifestyle Medicine*, (4), 244-252.

KORZENIEWSKI, B. & ZOLADZ, J. A. (2015) Possible mechanisms underlying slow component of V'O<sub>2</sub> on-kinetics in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985).

KRAUSE, M., HECK, T. G., BITTENCOURT, A., SCOMAZZON, S. P., NEWSHOLME, P., CURI, R. & HOMEM DE BITTENCOURT, P. I. (2015) The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators Inflamm*, 2015, (24)9205.

KREHER, J. B.; SCHWARTZ, J. B. (2012 ) Overtraining Syndrome: A Practical Guide. *Sports Health*,(4), 128-138.

KRUK, J. (2011) Physical exercise and oxidative stress. *Med Sport*, (15), 30-40.

- LAGRANHA, C. J., HIRABARA, S. M., CURI, R. & PITHON-CURI, T. C. (2007) Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. *Cell Biochem Funct*, 25(5), 563-9.
- LESUEUR, C., BÔLE-FEYSOT, C., BEKRI, S., HUSSON, A., LAVOINNE, A. & BRASSE-LAGNEL, C. (2012) Glutamine induces nuclear degradation of the NF- $\kappa$ B p65 subunit in Caco-2/TC7 cells. *Biochimie*, 94(3), 806-15.
- LIMA, A. A., CARVALHO, G. H., FIGUEIREDO, A. A., GIFONI, A. R., SOARES, A. M., SILVA, E. A. & GUERRANT, R. L. (2002) Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. *Nutrition*, 18(6), 458-62.
- LUND, P. (1970) A radiochemical assay for glutamine synthetase, and activity of the enzyme in rat tissues. *Biochem J*, 118(1), 35-9.
- LUND, P. (1985) Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H. U. (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis*, London: *Academic Press*, 357-363.
- MIKAMI, T.; SUMIDA, S.; ISHIBASHI, Y.; OHTA, S. (2004) Endurance exercise training inhibits activity of plasma GOT and liver caspase-3 of rats exposed to stress by induction of heat shock protein 70. *J Appl Physiol*, (96), 1776-1781.
- MILNE, K. J. & NOBLE, E. G. (2008) Response of the myocardium to exercise: sex-specific regulation of hsp70. *Med Sci Sports Exerc*, 40(4), 655-63.
- MORTON, J. P.; CROFT, L.; BARTLETT, J. D.; MACLAREN, D. P. M.; REILLY, T.; EVANS, L.; MCARDLE, A.; DRUST, B. (2009) Reduced carbohydrate availability does not modulate training-induced heat shock protein adaptations but does upregulate oxidative enzyme activity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, (106), 1513-1521.
- NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. (2011) Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*, (12), 833-45.
- NEWSHOLME, P. (2001) Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr*, 131(9 Suppl), 2515S-22S; discussion 2523S-4S.
- NEWSHOLME, P., PROCOPIO, J., LIMA, M. M., PITHON-CURI, T. C. & CURI, R. (2003) Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*, 21(1), 1-9.
- NIEMAN, D. C., ZWETSLOOT, K. A., MEANEY, M. P., LOMIWES, D. D., HURST, S. M. & HURST, R. D. (2015) Post-Exercise Skeletal Muscle Glycogen Related to Plasma Cytokines and Muscle IL-6 Protein Content, but not Muscle Cytokine mRNA Expression. *Front Nutr*, 2, 27.

NOGIEC, C. D. & KASIF, S. (2013) To supplement or not to supplement: a metabolic network framework for human nutritional supplements. *Plos One*, 8(8), e68751.

PAHL, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853-66.

PAULSEN, G.; VISSING, K.; KALHOVDE, J. M.; UGELSTAD, I.; BAYER, M. L.; KADI, F.; SCHJERLING, P.; HALLÉN, J.; RAASTAD, T. (2007) Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, (2), 44-53.

PEAKE, J. M., DELLA GATTA, P., SUZUKI, K. & NIEMAN, D. C. (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev*, 21, 8-25.

PEAKE, J. M., SUZUKI, K., HORDERN, M., WILSON, G., NOSAKA, K. & COOMBES, J. S. (2005) Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur J Appl Physiol*, 95(5-6), 514-21.

PEDERSEN, B. K. & FEBBRAIO, M. A. (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 88(4), 1379-406.

PEDERSEN, B. K., STEENBERG, A., KELLER, P., KELLER, C., FISCHER, C., HISCOCK, N., VAN HALL, G., PLOMGAARD, P. & FEBBRAIO, M. A. (2003) Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch*, 446(1), 9-16.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. (2000) Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol Rev*, (3), 1055-81.

PETERSEN, A. M. & PEDERSEN, B. K. (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985), 98(4), 1154-62.

PETRY, E. R., CRUZAT, V. F., HECK, T. G., HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., JR. & TIRAPEGUI, J. (2015) L-glutamine Supplementations Enhance Liver Glutamine-Glutathione Axis and Heat Shock Factor-1 Expression in Endurance-Exercise Trained Rats. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 25(2), 188-97.

PETRY, E. R., CRUZAT, V. F., HECK, T. G., LEITE, J. S., HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., JR. & TIRAPEGUI, J. (2014) Alanine-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: Involvement of heat shock protein pathways. *Life sciences*, 94(2), 130-6.

POWERS, S. K.; LOCKE, M.; DEMIREL, H. A. (2000) Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci in Sports & Exercise*, 386-392.

PRADA, P. O., HIRABARA, S. M., DE SOUZA, C. T., SCHENKA, A. A., ZECCHIN, H. G., VASSALLO, J., VELLOSO, L. A., CARNEIRO, E., CARVALHEIRA, J. B., CURI, R. & SAAD, M. J. (2007) L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue

and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia*, 50(9), 1949-59.

RISØY, B. A., RAASTAD, T., HALLÉN, J., LAPPEGÅRD, K. T., BAEVERFJORD, K., KRAVDAL, A., SIEBKE, E. M. & BENESTAD, H. B. (2003) Delayed leukocytosis after hard strength and endurance exercise: aspects of regulatory mechanisms. *BMC Physiol*, 3, 14.

ROGERO, M. M., TIRAPEGUI, J., PEDROSA, R. G., CASTRO, I. A. & PIRES, I. S. (2006) Effect of alanyl-glutamine supplementation on plasma and tissue glutamine concentrations in rats submitted to exhaustive exercise. *Nutrition*, 22(5), 564-71.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J.; 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. *Nutr Res*, (24), 261–270.

ROOYACKERS, O. E., SOETERS, P. B., SARIS, W. H. & WAGENMAKERS, A. J. (1995) Effect of an enterally administered glutamine-rich protein on the catabolic response to a zymosan challenge in rats. *Clin Nutr*, 14(2), 105-15.

SANTOS, R. V., CAPERUTO, E. C. & COSTA ROSA, L. F. (2007) Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci*, 80(6), 573-8.

SCHEFFER, D. L., SILVA, L. A., TROMM, C. B., DA ROSA, G. L., SILVEIRA, P. C., DE SOUZA, C. T., LATINI, A. & PINHO, R. A. (2012) Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab*, 37(6), 1239-46.

SCHOENFELD, B. J. (2013) Potential Mechanisms for a Role of Metabolic Stress in Hypertrophic Adaptations to Resistance Training. *Sports Med*, (43), 179-194.

SENF, S. M. (2013) Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. *Front Physiol*, 4, 330.

SENF, S. M., HOWARD, T. M., AHN, B., FERREIRA, L. F. & JUDGE, A. R. (2013) Loss of the inducible Hsp70 delays the inflammatory response to skeletal muscle injury and severely impairs muscle regeneration. *PLoS One*, 8(4), e62687.

SHEWCHUK, L. D., BARACOS, V. E. & FIELD, C. J. (1997) Dietary L-glutamine does not improve lymphocyte metabolism or function in exercise-trained rats. *Med Sci Sports Exerc*, 29(4), 474-81.

SHI, Y., TU, Z., TANG, D., ZHANG, H., LIU, M., WANG, K., CALDERWOOD, S. K. & XIAO, X. (2006) The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF-kappaB pathway but not the MAPK pathways. *Shock*, 26(3), 277-84.

SHIREMAN, P. K., CONTRERAS-SHANNON, V., OCHOA, O., KARIA, B. P., MICHALEK, J. E. & MCMANUS, L. M. (2007) MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol*, 81(3), 775-85.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. (2011) Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*, (13), 320-328.

SINGLETON, K. D. & WISCHMEYER, P. E. (2007) Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(5), R1839-45.

SINGLETON, K. D. & WISCHMEYER, P. E. (2008) Glutamine induces heat shock protein expression via O-glycosylation and phosphorylation of HSF-1 and Sp1. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 32(4), 371-6.

SINGLETON, K. D., BECKEY, V. E. & WISCHMEYER, P. E. (2005) 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), 583-9.

STEENSBERG, A., FISCHER, C. P., KELLER, C., MØLLER, K. & PEDERSEN, B. K. (2003) IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(2), 433-7.

STOLL, B. & BURRIN, D. G. (2006) Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers. *J Anim Sci*, 84 Suppl, E60-72.

STUMVOLL, M., PERRIELLO, G., MEYER, C. & GERICH, J. (1999) Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney Int*, 55(3), 778-92.

TAKAYAMA, S., REED, J. C. & HOMMA, S. (2003) Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 9041-7.

THAMOTHARAN, M., BAWANI, S. Z., ZHOU, X. & ADIBI, S. A. (1998) Mechanism of dipeptide stimulation of its own transport in a human intestinal cell line. *Proc Assoc Am Physicians*, 110(4), 361-8.

URSO, M. L. (2013) Anti-inflammatory interventions and skeletal muscle injury: benefit or detriment? *J Appl Physiol* (1985), 115(6), 920-8.

VELLA, L., CALDOW, M. K., LARSEN, A. E., TASSONI, D., DELLA GATTA, P. A., GRAN, P., RUSSELL, A. P. & CAMERON-SMITH, D. (2012) Resistance exercise increases NF- $\kappa$ B activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(6), R667-73.

WANG, W., CHOI, R. H., SOLARES, G. J., TSENG, H. M., DING, Z., KIM, K. & IVY, J. L. (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(7), 1389-98.

WHITHAM, M.; HALSON, S. L.; LANCASTER, G. I.; GLEESON, M.; JEUKENDRUP, A. E.; BLANNIN, A. K. (2004) Leukocyte Heat Shock Protein Expression before and after intensified training. *Int J Sports Med*. (25), 522-527.

WISCHMEYER, P. E. (2002) Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition*, 18(3), 225-8.

WISCHMEYER, P. E., KAHANA, M., WOLFSON, R., REN, H., MUSCH, M. M. & CHANG, E. B. (2001) Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol* (1985), 90(6), 2403-10.

WISCHMEYER, P. E., RIEHM, J., SINGLETON, K. D., REN, H., MUSCH, M. W., KAHANA, M. & CHANG, E. B. (2003) Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition*, 19(1), 1-6.

XUE, H.; SLAVOV, D.; WISCHMEYER, P. E. (2012) Glutamine-mediated Dual Regulation of Heat Shock Transcription Factor-1 Activation and Expression. *J Biol Chem*, (287), 40400-40413.

ZHOU, X., WU, X., YIN, Y., ZHANG, C. & HE, L. (2012) Preventive oral supplementation with glutamine and arginine has beneficial effects on the intestinal mucosa and inflammatory cytokines in endotoxemic rats. *Amino Acids*, 43(2), 813-21.

## 11 SUBPROJETO 2

Efeitos da L-alanil-L-glutamina sobre as vias de sinalização da insulina e da mTOR/S6K, e citoproteção em células musculoesqueléticas C2C12.

## 12 INTRODUÇÃO

O músculo esquelético é o local de maior captação de glicose estimulada pela insulina, representando cerca de 80% da captação de glicose corporal em seres humanos (Ferrannini *et al.*, 1988; Jue *et al.*, 1989; Newsholme *et al.*, 2016) sob condições hiperinsulinêmicas euglicêmicas (Thiebaud *et al.*, 1982). Quando o transporte de glicose estimulado pela insulina para o músculo esquelético é impossibilitado há uma incapacidade de manter as concentrações de glicose sanguínea em intervalos normais (Jue *et al.*, 1989). A desregulação na remoção de glicose circulante mediada pelo músculo esquelético tem emergido como o principal fator na patogênese do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (DeFronzo & Tripathy, 2009). Neste sentido, o músculo esquelético desempenha um papel vital na manutenção da homeostase da glicose. Além disso, a resistência à insulina do músculo esquelético é uma característica importante do DM2, e representa um dos focos primários para a pesquisa do diabetes (Eriksson *et al.*, 1989; DeFronzo & Tripathy, 2009).

A insulina estimula uma cascata de sinalização com a ativação da via fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT) para culminar no transporte de glicose (Huang & Czech, 2007) e síntese de glicogênio (Long *et al.*, 2011; Copps & White, 2012). Na presença de um balanço adequado de aminoácidos, a insulina promove a glicogênese muscular e a lipogênese, de forma sinérgica à via de sinalização da proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR)/ proteína ribossomal S6 quinase (S6K), enquanto inibe a lipólise e a degradação de proteína (Cline *et al.*, 1999 Drummond *et al.*, 2008). No DM2, obesidade e envelhecimento, a captação de glicose estimulada por insulina é prejudicada no músculo esquelético, devido a defeitos na sinalização de insulina, translocação e oxidação reduzidas de glicose, bem como redução na síntese de glicogênio (DeFronzo *et al.*, 1985; Kahn & Flier, 2000). Considerando que a resistência à insulina em tecidos periféricos afeta globalmente o metabolismo da glicose, esforços consideráveis estão sendo direcionados para identificar abordagens nutricionais e farmacológicas que atinjam a sensibilidade à insulina e o metabolismo da glicose no músculo esquelético.

O DM2 também está associado à redução da síntese proteica e ao aumento da degradação das proteínas musculares, além de redução da concentração de glutamina (Henry, 1994; Charlton & Nair, 1998; Menge *et al.*, 2010). A glutamina é o aminoácido mais abundante no organismo (Newsholme *et al.*, 2003; Newsholme *et al.*, 2011) e está relacionada a estimulação da síntese e inibição da degradação proteica no músculo esquelético de ratos diabéticos tratados com glicocorticoides (Boza *et al.*, 2001; Lambertucci *et al.*, 2012). Além disso, estudos evidenciaram um aumento da captação muscular de glicose estimulada por insulina, melhora da sinalização de insulina e aumento nas concentrações plasmáticas de insulina em indivíduos obesos e com DM2 tratados com glutamina (Prada *et al.*, 2007; Greenfield *et al.*, 2009).

O dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) tem sido amplamente utilizado como uma fonte estável de administração de glutamina (Hübl *et al.*, 1989; Imamoto *et al.*, 2013). Estudos com Ala-Gln demonstram a prevenção da perda de músculo esquelético em ratos tratados com glicocorticoide (Hickson *et al.*, 1996) e melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em pacientes críticos (Bakalar *et al.*, 2006; Déchelotte *et al.*, 2006). Apesar destes efeitos benéficos, os efeitos do Ala-Gln sobre a modulação do (s) componente (s) das vias de sinalização da insulina e da mTOR/ S6K ou outras vias, além de citoproteção de células musculoesqueléticas não são bem elucidados.

## **13 OBJETIVOS**

### **13.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da L-alanil-L-glutamina sobre as vias de sinalização da insulina e da mTOR/S6K, e citoproteção em células musculoesqueléticas C2C12, sob condições normais ou resistência à insulina.

### **13.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações da L-alanil-L-glutamina sobre:

- 13.2.1 Componentes da via de sinalização da insulina;
- 13.2.2 Componentes da via de sinalização da mTOR/ S6K;
- 13.2.3 Fluxo glicolítico na ausência de estímulo com insulina;

- 13.2.4 Viabilidade celular;
- 13.2.5 Resposta de sensores de insulina e aminoácidos.

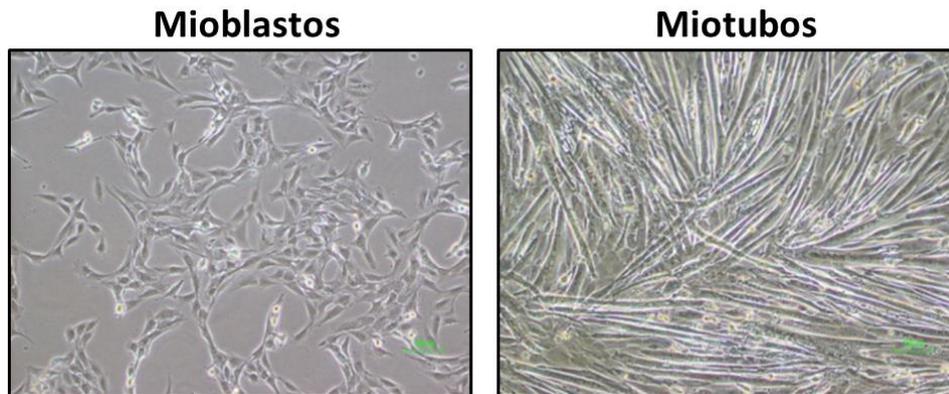
## **14 MATERIAL E MÉTODOS**

### **14.1 Anticorpos e reagentes**

O meio de cultura (DMEM-alta glicose), a solução de insulina de pâncreas bovino, anticorpo contra o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) e os produtos químicos para o teste de estresse glicolítico foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O soro fetal bovino (SFB), penicilina/ estreptomicina e tripsina foram obtidos da empresa Life Technologies (Gaithersburg, MD, EUA). Os anticorpos contra a subunidade beta do receptor de insulina (IR- $\beta$ ), o substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), AKT, fosfo AKT (p-AKT),  $\beta$ -actina, mTOR, fosfo mTOR (p-mTOR), S6, fosfo S6 (p-S6), proteína quinase ribossomal de 70 kDa (p70S6k), fosfo p70S6k (p-p70S6k), glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK3 $\beta$ ), fosfo GSK3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ), p44 / p42 proteína quinase ativada por mitógeno (44/42 MAPk ), fosfo 44/42 MAPk (p-44/42 MAPk), Sirtuin 1 (SIRT1) e proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), foram adquiridos da empresa Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). O Phospho-IRS-1 foi obtido da empresa Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA). Os produtos químicos e os anticorpos foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante, salvo indicação em contrário.

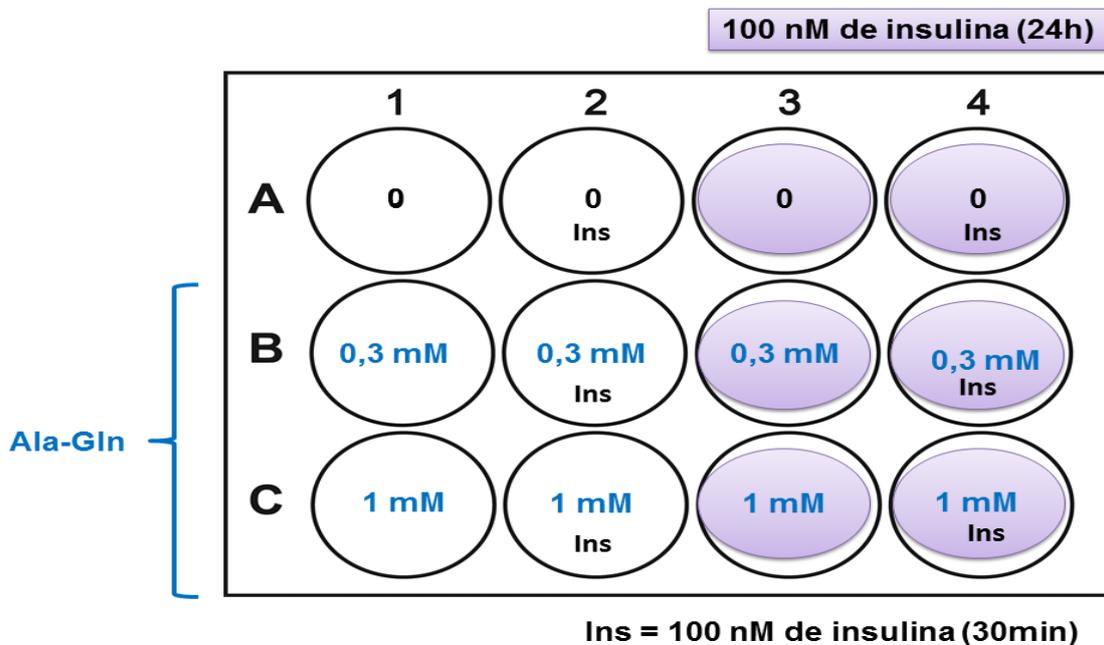
### **14.2 Cultura de células**

Os mioblastos C2C12 foram generosamente fornecidos pela Prof. Deirdre R. Coombe, da Faculdade de Ciências Biomédicas da Universidade Curtin, Perth, WA, Austrália. As células foram utilizadas até a passagem 14 e mantidas em cultura até atingirem 80% de confluência, em uma atmosfera humidificada (95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C), em DMEM (Sigma-Aldrich, # D5796) contendo 2 mM de glutamina, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina. Neste ponto, a diferenciação de mioblastos para miotubos (Figura 7) foi iniciada pela mudança do meio de cultura com adição de apenas 2% de SFB.



**Figura 7** Células musculoesqueléticas da linhagem C2C12 nas formas de mioblastos e diferenciadas em miotubos.

Para induzir resistência à insulina, miotubos totalmente diferenciados foram expostos a 100 nM de insulina e incubados em DMEM (D5671) sem glutamina e sem SFB, durante 24 horas. Os tratamentos consistiram em suplementação com 0, 0,3 ou 1 mM de Ala-Gln (Figura 8). Após 24 horas, as células foram lavadas brevemente com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e estimuladas com 100 nM de insulina, durante 30 minutos. A depleção de soro foi essencial neste estudo, dado os vários fatores de crescimento contidos no SFB que podem afetar a sinalização de insulina.



**Figura 8** Esquema de tratamento crônico com insulina e diferentes concentrações do dipeptídeo (Ala-Gln) de células musculoesqueléticas da linhagem C2C12.

### 14.3 Análise de western blotting

As células foram lavadas em PBS frio e lisadas em tampão de teste de radioimunoprecipitação (RIPA) contendo inibidores de protease e fosfatase (Cell Signaling Technology). A concentração de proteína nos extratos celulares foi quantificada por meio do Espectrômetro Infra-vermelho de Detecção Direta (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Uma quantidade de 15 µg de proteína foi carregada em SDS PAGE, seguida de transferência para membrana de nitrocelulose por iBlot (Life Technologies). As membranas foram bloqueadas e incubadas *overnight*, a 4° C, com anticorpos primários específicos, seguindo as instruções do fabricante. O sistema de vácuo SNAP i.d (Merck Millipore) foi utilizado para bloqueio de membrana e incubação de anticorpos secundários. IgG anti-coelho (Dako) foi utilizado como anticorpo secundário e anti-β-actina para a normalização da concentração de proteínas. As bandas alvo foram visualizadas com ECL Clarity Western no aparelho Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

### 14.4 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada após a indução da resistência à insulina e tratamento com Ala-Gln, pelo ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), em que as células metabolicamente ativas convertem o MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água). Foram adicionados 5 mg/ ml de MTT ao meio de cultura a uma diluição de 1:10 com PBS. Após 4 h de incubação, os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO e a absorbância foi medida a 540 nm, usando um espectrofotômetro (EnSpire Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, MA, EUA). Os valores relativos de células viáveis foram determinados em comparação com os controles não tratados e expressos em porcentagem.

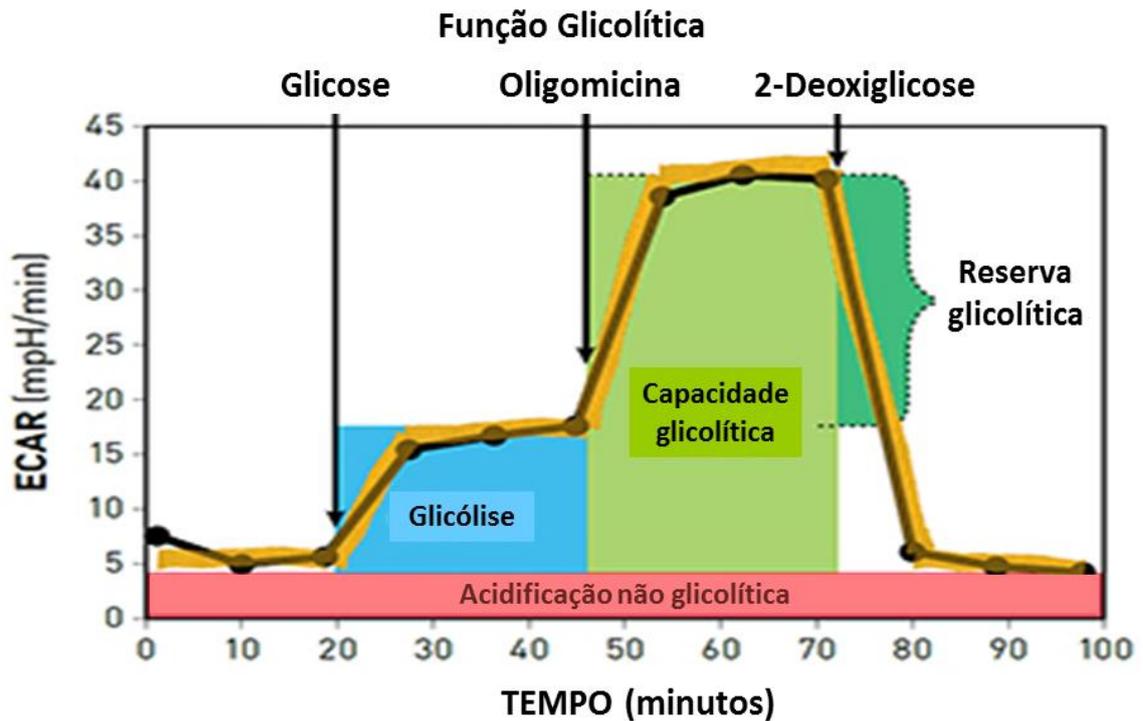
### 14.5 Imunofluorescência

As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/ poço e diferenciadas como detalhado na seção de cultura de células. Após as 24 h dos tratamentos experimentais, as células foram estimuladas com 100 nM de insulina durante 30 minutos e fixadas com 4% de paraformaldeído. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,3% de saponina, bloqueadas com PBS contendo 0,1% de saponina, 0,25% de BSA e

2% de soro de cabra, e incubadas durante a noite com anticorpo anti-GLUT4 (1: 200, Sigma-Aldrich), a 4°C. Após três lavagens com PBS frio, as células foram incubadas com IgG anti-coelho conjugado Alexa Fluor 488 (1: 2000, Cell Signaling Technology) durante 30 min. Os núcleos foram contrastados com DAPI (Cell Signaling Technology). As células foram visualizadas usando microscópio de fluorescência Olympus IX51 (Olympus Life Science Solutions, EUA).

#### **14.6 Teste de estresse glicolítico em tempo real**

As células de mioblastos C2C12 foram semeadas ( $5 \times 10^3$  células/ poço) na placa de cultura com 96 poços do ensaio Seahorse XFe e diferenciadas por 4 dias. O analisador de fluxo extracelular Seahorse Bioscience XFe96 Flux foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Após indução de resistência à insulina e a realização do protocolo de tratamento, as células foram equilibradas com meio de cultura DMEM, sem tampão bicarbonato ou qualquer suplemento, em uma incubadora a 37° C sem CO<sub>2</sub> e as medidas basais foram registradas na ausência de glicose extracelular e piruvato. O teste de estresse glicolítico foi realizado medindo a taxa de acidificação extracelular (ECAR), registrada após injeções sequenciais de glicose (25 mM) e oligomicina (2 µM), conforme ilustrado na figura 9. A glicólise foi determinada subtraindo-se a última medida antes da adição de glicose, da medida máxima antes da injeção de oligomicina. A capacidade glicolítica foi medida subtraindo-se a última medida antes da injeção de glicose, da medida máxima após a injeção de oligomicina. Os tratamentos foram avaliados em pelo menos seis réplicas.



**Figura 9** Esquema de injeções do teste de estresse glicolítico Seahorse XFe. Adaptado de Agilent.

#### 14.7 Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M de pelo menos três experimentos independentes. As comparações entre os tratamentos foram realizadas por ANOVA e Tukey HSD como pós teste (GraphPad Prism, GraphPad Software). As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

## 15 RESULTADOS

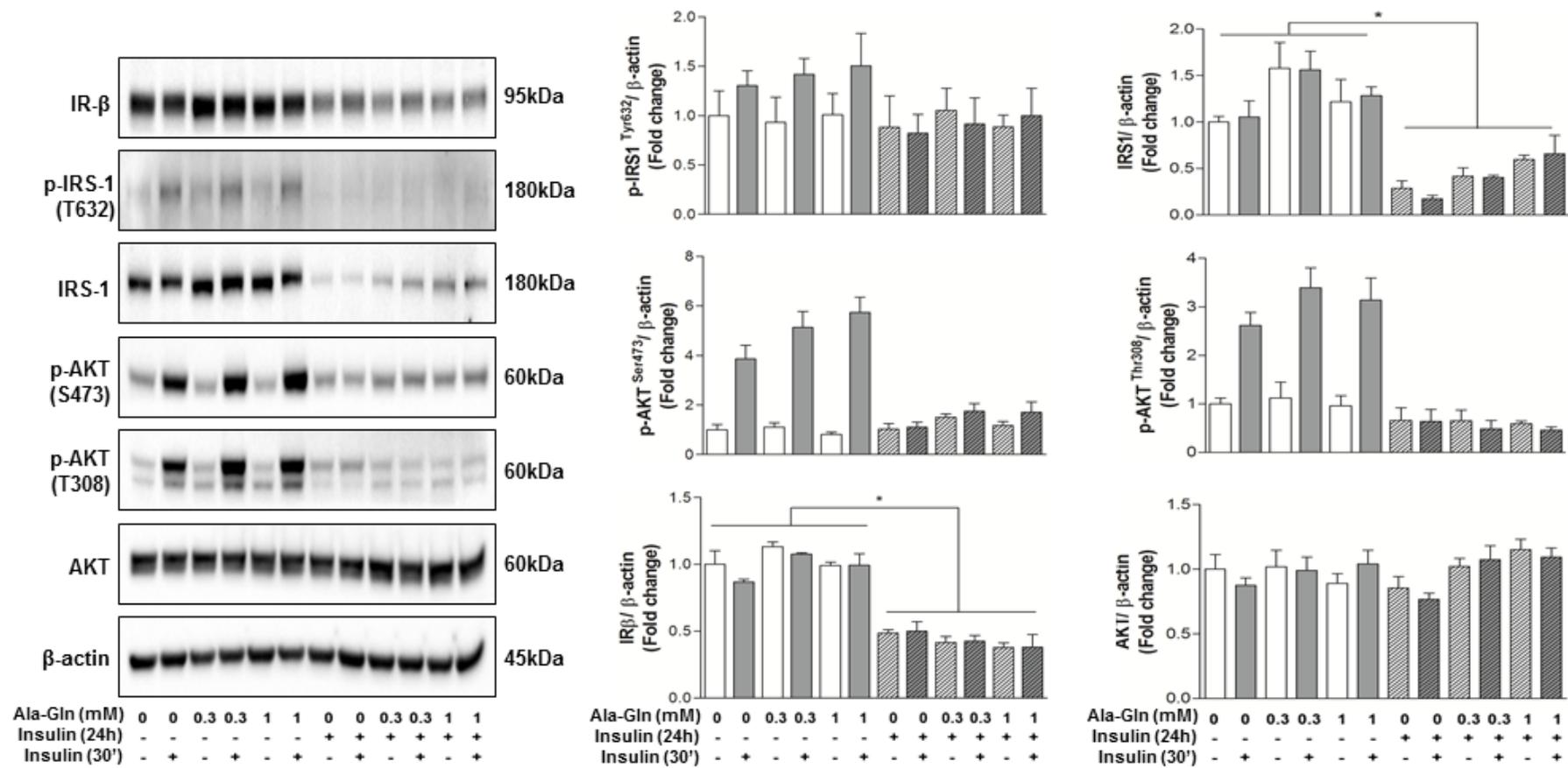
### 15.1 Via de sinalização da insulina em miotubos C2C12

Neste estudo, investigamos o efeito da Ala-Gln na cascata de sinalização de insulina em miotubos C2C12, sob condições normais e após exposição crônica a 100 nM de insulina para induzir resistência à insulina (Figura 10). O estado resistente à insulina foi confirmado pela redução dos conteúdos totais de IR- $\beta$  e IRS-1 após a exposição crônica (24h) à insulina. Além disso, a redução na fosforilação de IRS-1 em tirosina e as fosforilações de AKT em

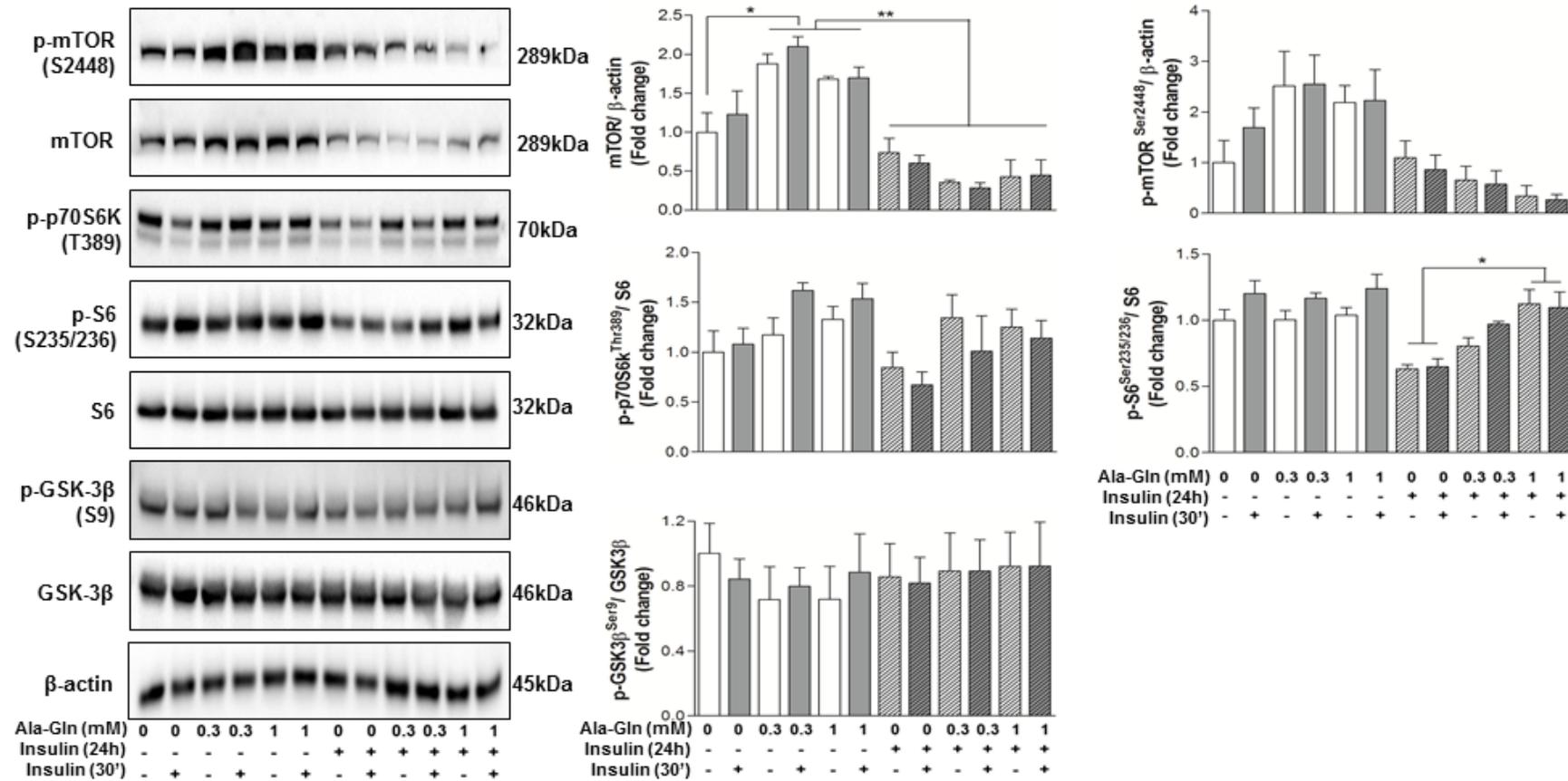
serina/ treonina, importantes na cascata de sinalização de insulina, também foram evidentes. A AKT é ativada pela insulina e desencadeia a cascata de sinalização para culminar no transporte de glicose. Apesar da reduzida ativação de AKT, a suplementação com Ala-Gln aumentou a fosforilação da serina 473 e treonina 308 após o estímulo com insulina em condições normais, indicando um efeito benéfico do dipeptídeo. A suplementação com 0,3 e 1 mM de Ala-Gln aumentou o conteúdo total de IRS-1 em condições normais e este efeito também foi observado na exposição crônica à insulina. Estes resultados pode indicar um retardo na degradação do IRS-1, possivelmente permitindo a contínua sinalização de insulina sob o estado de resistência à insulina.

## 15.2 Via de sinalização da mTOR/ S6K

Para aprofundar a investigação sobre os efeitos de Ala-Gln na síntese de proteínas e glicogênio, foram analisados os reguladores chave como mTOR, p70S6k, S6 e GSK3 $\beta$ , que são fosforilados para o aumento da síntese proteica e de glicogênio em condições de suficiência de fatores de crescimento e nutrientes (Drummond *et al.*, 2008 Katta *et al.*, 2009). Curiosamente, Ala-Gln aumentou a fosforilação basal e estimulada por insulina das proteínas mTOR, p70S6k e S6 em miotubos sob condições normais. Em miotubos resistentes à insulina, a suplementação de Ala-Gln aumentou a fosforilação de p70S6k e S6, independente da estimulação de insulina, sugerindo que o dipeptídeo melhora o estado resistente à insulina. Este achado é promissor quando os tratamentos nutricionais são considerados como uma estratégia para aumentar a síntese proteica no do músculo esquelético resistente à insulina (Figura 11). Em relação à síntese de glicogênio, não houve aumento na GSK3 $\beta$  (Ser 9), conforme observado anteriormente em outros estudos (Katta *et al.*, 2009; Dionyssiou *et al.*, 2014).



**Figura 10** A exposição crônica à insulina afeta as primeiras etapas da cascata de sinalização de insulina, enquanto o tratamento com L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) potencializa sua regulação inicial em células musculares esqueléticas C2C12. Os miotubos foram incubados na ausência de soro fetal bovino e glutamina, com e sem 100 nM de insulina, e suplementados com 0, 0,3 ou 1 mM de Ala-Gln, por 24h. Em seguida, as células foram estimuladas com 100 nM de insulina durante 30 min e lisadas para análise de western blotting, como descrito nos métodos. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  S.E.M de pelo menos três experimentos independentes.\* $p < 0,05$

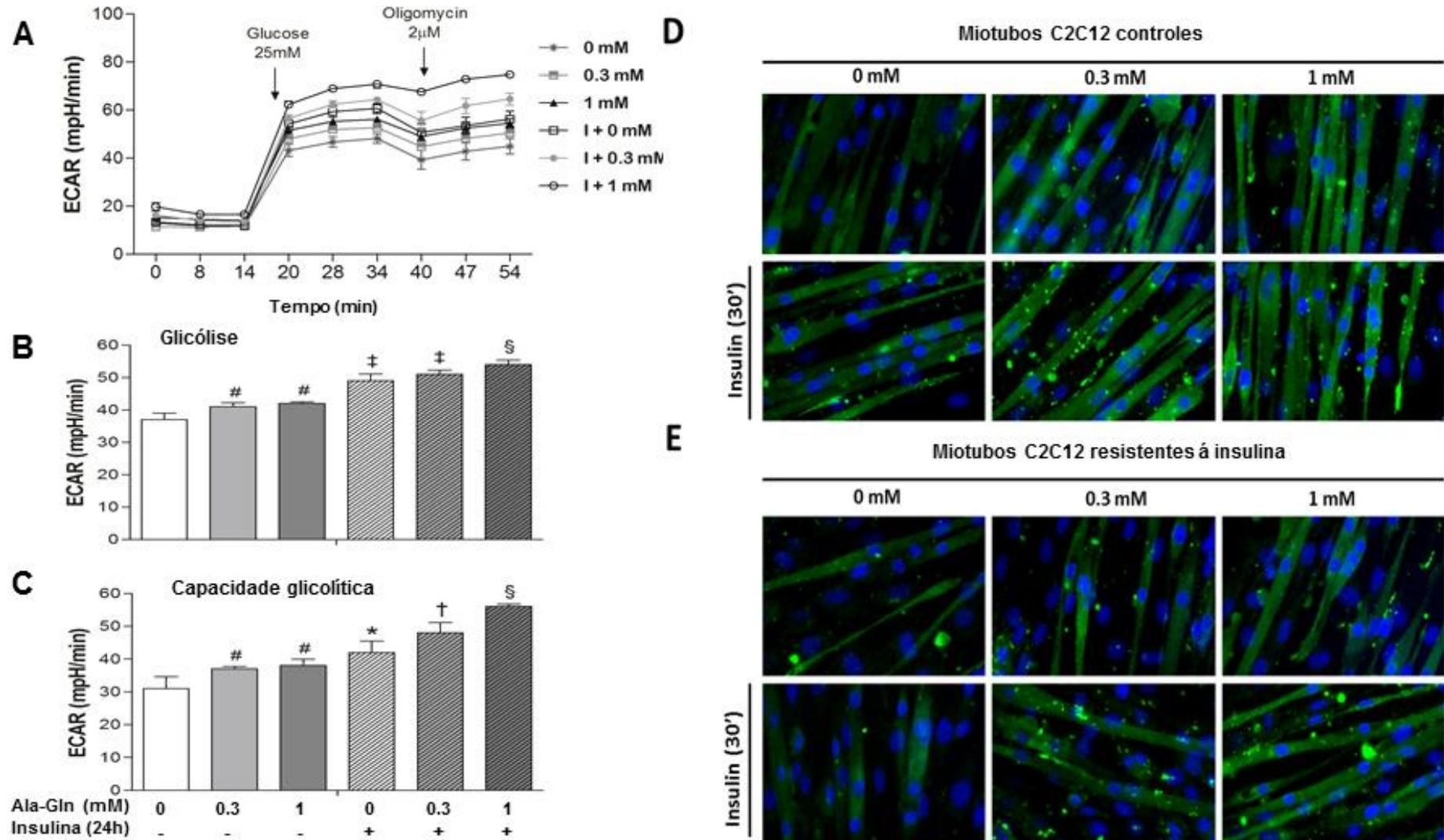


**Figura 11** A suplementação de L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) melhora a via de sinalização da mTOR e potencializa sua regulação final em miotubos C2C12 resistentes à insulina, independente da estimulação com insulina. Os miotubos foram incubados na ausência de soro fetal bovino e glutamina, com e sem 100 nM de insulina, e suplementados com 0, 0,3 ou 1 mM de Ala-Gln, por 24h. Em seguida, as células foram estimuladas com 100 nM de insulina durante 30 min e lisadas para análise de western blotting, como descrito nos métodos. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  S.E.M de pelo menos três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

### 15.3 Teste de estresse glicolítico

Para analisar se o pré-condicionamento com Ala-Gln seria capaz de modular a resposta glicolítica, analisamos a taxa de acidificação extracelular (ECAR), uma medida de glicólise anaeróbia (Figura 12A-C). A glicólise e capacidade glicolítica foram marcadamente aumentadas em miotubos resistentes à insulina em comparação com miotubos em condições normais, e o aumento foi potencializado pelo tratamento com Ala-Gln em ambas as condições, independentemente da estimulação com insulina. Estes dados podem sugerir que Ala-Gln pode melhorar a captação e metabolismo da glicose no músculo esquelético, independente da insulina e, portanto, aumentar a tolerância corporal à glicose promovendo o metabolismo muscular da glicose. Além disso, a flexibilidade no uso de substrato energético muscular foi melhorada em células pré-condicionadas com Ala-Gln, visto pela maior capacidade de utilizar a glicose para a síntese de ATP após a injeção de oligomicina (um inibidor da produção de ATP através da respiração celular).

Alguns estudos demonstraram um efeito hipoglicemiante de alguns aminoácidos estimulando a captação de glicose pelo músculo esquelético independente de insulina, e um dos mecanismos envolvidos na captação de glicose é a ativação de transportadores de glicose (Wiernsperger, 2005; Selvi *et al.*, 2010). Para verificar se o Ala-Gln promoveu o aumento da glicólise independente da insulina através da ativação do transportador de glicose, foi analisada neste estudo a expressão de GLUT4 por imunofluorescência, em miotubos em condições normais e resistência à insulina, (Figuras 12 D e E). A intensidade da imunofluorescência foi reduzida em células resistentes à insulina e não suplementadas com Ala-Gln, indicando a depleção de GLUT4. No entanto, a suplementação com 1 mM de Ala-Gln aumentou a expressão de GLUT4, como visto pelo aumento na intensidade de fluorescência, sugerindo um papel importante do dipeptídeo ao manter a funcionalidade celular dentro da normalidade.

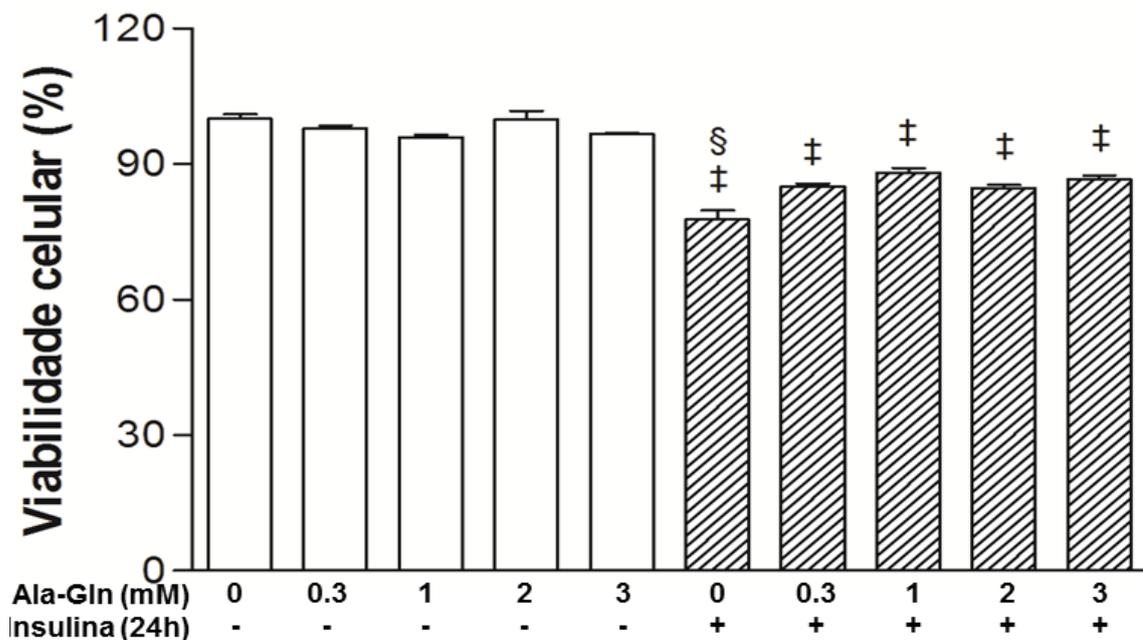


**Figura 12** L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) aumenta a capacidade de glicólise anaeróbia de células musculares C2C12, saudáveis e resistentes à insulina. Os miotubos foram incubados na ausência de soro fetal bovino e glutamina, e expostos a insulina 100 nM (I +), na ausência ou presença

de Ala-Gln (0, 0.3 ou 1mM), durante 24h. A taxa de acidificação extracelular (ECAR), um índice de glicólise anaeróbia, foi medida utilizando um analisador Seahorse XF96. ECAR (A) foi determinado após injeção sequencial de glicose 25 mM e oligomicina 2 uM. A glicólise (B) e a capacidade glicolítica (C) foram calculadas conforme detalhado nos métodos. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  S.E.M de cada tratamento, medidos em pelo menos 6 poços. Para a detecção de GLUT4, os miotubos foram incubados na ausência de soro fetal bovino e glutamina, com (E) e sem insulina (D) 100 nM e suplementados com 0, 0,3 ou 1 mM de Ala-Gln, durante 24h. Em seguida, as células foram estimuladas com 100 nM de insulina durante 30 min e fixadas com 4% de paraformaldeído. As células fixadas foram incubadas com anticorpo anti-GLUT4 (verde). Os núcleos foram contrastados com DAPI (azul). As imagens são representativas de três experimentos independentes. #p<0,05 vs 0 mM; ‡p<0,05 vs 0, 0,3 e 1 mM; §p<0,05 vs todos os tratamentos; \*p<0,05 vs 0 e 0,3 mM; †p<0,05 vs 0, 0,3, 1 e I + 0 m

### 15.4 Teste de viabilidade celular

Para determinar se a suplementação de Ala-Gln poderia proteger as células musculares resistentes à insulina e se as concentrações superiores a 1mM do dipeptídeo promoveriam efeitos adicionais, analisamos a viabilidade celular por meio do ensaio MTT. Neste estudo, a privação de glutamina não suprimiu a viabilidade de células musculares saudáveis, provavelmente porque as células atendiam suas demandas metabólicas usando outros aminoácidos essenciais presentes no meio de cultura. No entanto, no estado de resistência à insulina, a privação de glutamina diminuiu a viabilidade celular em 30%, o que foi significativamente atenuado com a suplementação de Ala-Gln, reforçando seu papel protetor (Figura 13). Não houve diferença entre as concentrações de Ala-Gln, o que sugere que a menor concentração é eficiente para proteger as células da toxicidade induzida pela insulina.



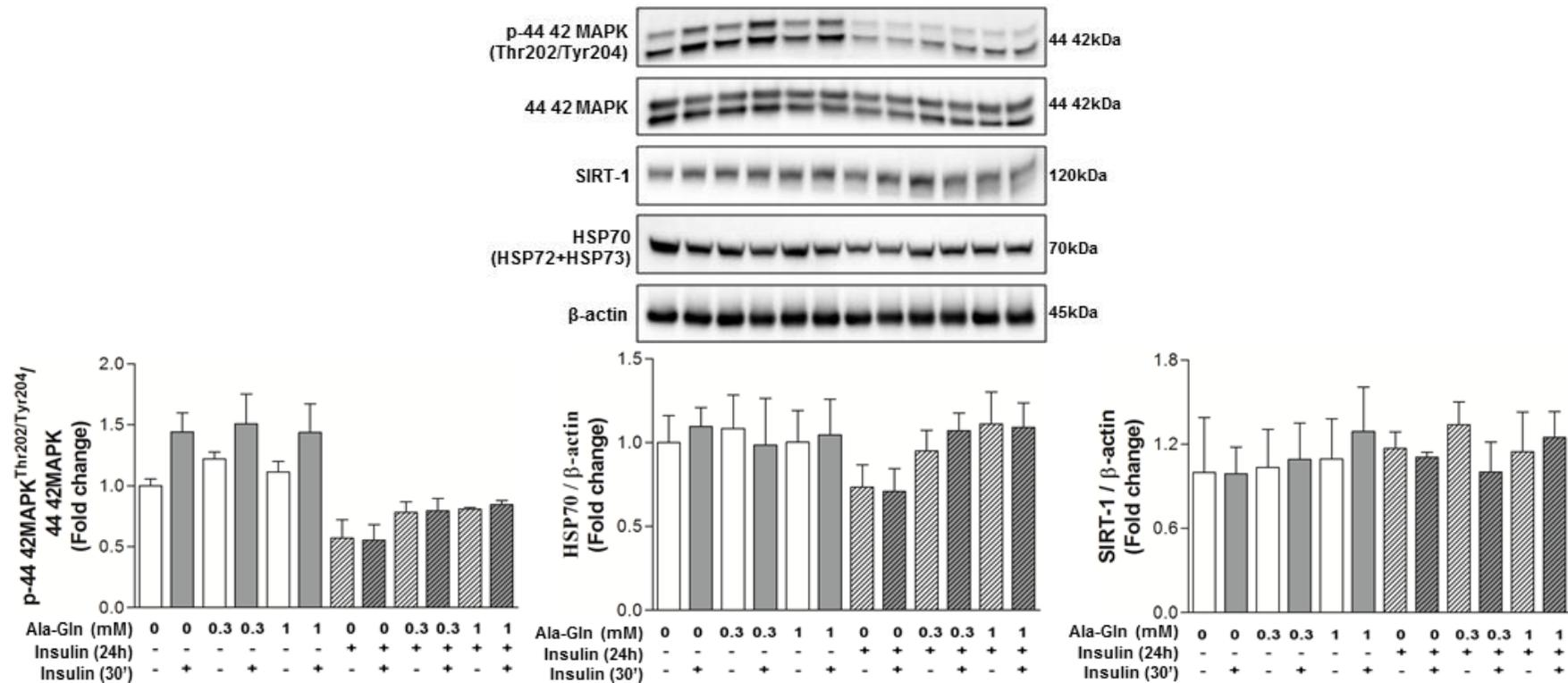
**Figura 13** A viabilidade celular diminuiu em células musculares C2C12 resistentes à insulina não tratadas com L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln). Os miotubos foram incubados na ausência de soro fetal bovino e glutamina, com e sem 100 nM de insulina, e suplementados com diferentes concentrações (0 a 3 mM) de Ala-Gln, durante 24h. Em seguida, as células foram estimuladas com 100 nM de insulina durante 30 min e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT. O número relativo de células viáveis foi medido em comparação com o controle saudável não tratado e expresso em porcentagem. Os dados são apresentados como

médias  $\pm$  S.E.M de pelo menos três experimentos independentes. <sup>‡</sup>p<0,05 versus todos os tratamentos sem insulina 24h; <sup>§</sup>p<0,05 versus todos os tratamentos com insulina 24h.

### 15.5 Sensores de insulina e de aminoácidos

Vários reguladores que estão ligados à melhora da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, como SIRT1 e HSP70, foram identificados. A desregulação de p44 / p42 MAPK, uma cascata de quinase essencial na sinalização do IRS, foi sugerida atuar no transporte reduzido de glicose do músculo esquelético e o desenvolvimento da resistência à insulina (Ruiz-Alcaraz *et al.*, 2013). Aqui, a via MAPK foi fortemente ativada em miotubos estimulados com insulina em condições normais. Apesar da menor ativação no estado resistente à insulina, quando Ala-Gln foi adicionado, houve aumento da MAPK independente da estimulação com insulina. Este achado sugere que Ala-Gln pode ativar a via MAPK independentemente da via de sinalização IR / IRS desencadeada pela insulina (Figura 14).

A expressão reduzida de HSP70, uma proteína relacionada ao estresse, em células resistentes à insulina foi atenuada pela adição de Ala-Gln, o que sugere aumento da citoproteção como demonstrado pelos resultados obtidos com o teste MTT. A SIRT1 é um regulador chave do metabolismo do músculo esquelético (Cao *et al.*, 2016), uma vez que a sua expressão é diminuída no músculo dos pacientes diabéticos tipo 2 (Fröjdö *et al.*, 2011) e a super expressão está relacionada a atenuação da resistência à insulina muscular (Zhang *et al.*, 2015). No entanto, neste estudo, o conteúdo de SIRT1 não foi alterado em miotubos, em nenhuma das condições (Figura 14).



**Figura 14** L-alanil-L-glutamina (Ala-Gln) recupera a funcionalidade das células aumentando as concentrações de P44 / 42 MAPK e HSP70 em células musculares C2C12 resistentes à insulina. Os miotubos foram incubados na ausência de soro fetal bovino e glutamina, com e sem 100 nM de insulina, e suplementados com 0, 0,3 ou 1 mM de Ala-Gln, por 24h. Em seguida, as células foram estimuladas com 100 nM de insulina durante 30 min e lisadas para análise de western blotting, como descrito nos métodos. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  S.E.M de pelo menos três experimentos independentes.

## 16 DISCUSSÃO

As principais conclusões deste estudo implicam na atenuação do estado de resistência à insulina com recuperação parcial da via de sinalização da mTOR/ S6k em células musculoesqueléticas, por meio da suplementação com Ala-Gln. O dipeptídeo L-alanil-L-glutamina potencializou a regulação final da via da mTOR através do aumento na fosforilação de p70S6k e S6, independente da estimulação com insulina. O complexo mTOR tem um papel essencial no controle do crescimento e desenvolvimento de mamíferos (Newsholme *et al.*, 2005; Jewell e Guan, 2013). Este complexo fosforila os reguladores translacionais p70S6k e S6 para aumentar, de forma coordenada, a síntese proteica, o crescimento e a proliferação celular em condições favoráveis como o aumento da disponibilidade de nutrientes e de fatores de crescimento (Ekim *et al.* 2011; Jewell e Guan, 2013).

A disponibilidade de aminoácidos é um regulador bem estabelecido da atividade do mTORC1 e a glutamina tem sido causalmente ligada à ativação de mTORC1 dependente de aminoácidos (Newsholme *et al.* 2005; Durán *et al.* 2012; Csibi *et al.* 2014; Jewell *et al.* 2015; Zhai *et al.* 2015). As evidências sobre a ativação da mTOR após a privação de glutamina são conflitantes (Durán *et al.* 2012; Shanware *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2015). Aqui, a ativação persistente de mTOR em células privadas de glutamina em condições normais pode estar ligada a uma resposta autofágica, recentemente relacionada à ativação de mTOR durante a depleção de nutrientes (Yu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014; Shanware *et al.* , 2014). Além disso, a depleção de glutamina desencadeia a via geral de controle de aminoácidos (GAAC), aumentando assim a captação de aminoácidos e elevando as concentrações de aminoácidos intracelulares, o que reativa a mTOR (Chen *et al.*, 2014). As proteínas p70S6k e S6 foram pouco ativadas em células resistentes à insulina e não tratadas com Ala-Gln. Uma vez que essas células foram privadas de glutamina, este resultado sugere que a síntese proteica foi ineficaz independentemente da presença de insulina e disponibilidade energética. Curiosamente, a adição de Ala-Gln foi suficiente para estimular a fosforilação dos substratos da mTOR e recuperar parcialmente a atividade desta via de sinalização.

Recentemente, o metabolismo da glutamina foi associado à autofagia, na reativação do mTORC1 durante a privação de aminoácidos. Isto ocorreu por meio da conversão de glutamina em glutamato e posterior transaminação em aminoácidos não essenciais, o que foi suficiente para conferir sensibilidade à insulina ao mTORC1 (Tan *et al.*, 2017). Especula-se que a hiperativação do mTORC1 dá origem a um loop de feedback negativo. Nesse cenário, mTORC1 e S6K1 ativos induzem a fosforilação em serina do IRS-1, induzindo a inativação

de AKT, levando a dessensibilização de insulina, que por sua vez se traduz em captação muscular de glicose reduzida. A sinalização de insulina mediada por IRS-1 também é atenuada pela degradação de IRS-1 (Yoon *et al.*, 2016). Neste estudo, nós demonstramos que a suplementação com Ala-Gln aumentou os níveis totais de IRS-1 em condições normais, bem como durante a exposição crônica à insulina. Esses achados podem indicar um atraso na degradação do IRS-1 e uma sustentação na sinalização de insulina, apesar da hiperativação da mTOR e seus conhecidos mecanismos de loop de feedback negativo.

Uma das ações mais importantes da insulina é aumentar a incorporação de nutrientes nas células. Neste estudo, a Ala-Gln estimulou a absorção de glicose independente de insulina nas células do músculo esquelético, conforme observado pelo aumento da glicólise e capacidade glicolítica em ambas as condições. Esses resultados sugerem que o dipeptídeo pode contribuir com um efeito de redução da glicemia e aumentar a tolerância e metabolismo da glicose no corpo inteiro. A capacidade glicolítica foi uma medida da taxa máxima de conversão de glicose em piruvato ou lactato, alcançada de forma aguda pelos miotubos. Uma vez que a síntese glicolítica de ATP é obrigatoriamente ligada ao fluxo de carbono glicolítico, a capacidade glicolítica também é uma medida da capacidade máxima de glicólise em gerar ATP (Mookerjee *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2013). Conforme observado no teste de estresse glicolítico, a capacidade de utilizar a glicose para a síntese de ATP, após a inibição da mesma a partir da respiração celular, foi aumentada, indicando uma melhora na flexibilidade de utilização do combustível muscular em células pré-tratadas com Ala-Gln.

Um dos mecanismos relacionados à absorção de glicose independente de insulina e induzida por aminoácidos envolve a ativação de transportadores de glicose (Wiernsperger, 2005; Selvi *et al.*, 2010). Neste estudo, foi analisada a expressão GLUT4 em miotubos sob condições normais e resistentes à insulina. A baixa intensidade de fluorescência em células resistentes à insulina não suplementadas indicou a depleção de GLUT4, contrariamente à maior intensidade de fluorescência verificada em miotubos tratados com 1mM de Ala-Gln, sugerindo um importante papel do dipeptídeo na recuperação e manutenção da funcionalidade celular. A absorção de glicose também é regulada por uma elevação na razão AMP/ ATP e consequente ativação da quinase ativada por AMP (AMPK) durante o aumento da demanda energética (Yuan *et al.*, 2013), bem como pela ativação do mTORC1, que promove a absorção de glicose e um aumento no fluxo glicolítico, aumentando tanto a transcrição quanto a tradução do fator 1-alfa induzível pela hipóxia (HIF1a) (Düvel *et al.*, 2010). Além disso, demonstrou-se que um aumento na atividade intrínseca de mediadores de glicose independentes de insulina, como GLUT-1 e/ ou cotransportadores de glicose de sódio,

compensa a entrada de glicose na célula em indivíduos com tolerância à glicose ou DM2 (Wiernsperger, 2005; Selvi *et al.*, 2010; Jumpertz *et al.*, 2010).

Uma série de mecanismos pelos quais as proteínas e os aminoácidos da dieta modulam as vias metabólicas da glicose e a sensibilidade à insulina foram propostas. Estudos sugerem que os aminoácidos individualmente têm diferentes efeitos sobre a absorção de glicose independente da insulina e que a via de sinalização de aminoácidos que controla a absorção de glicose é única (Nishitani *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2005; Wiernsperger, 2005; Morifuji *et al.*, 2009; Selvi *et al.*, 2010). Nos miotubos C2C12, os aminoácidos leucina e isoleucina estimulam a absorção de glicose de forma independente da insulina, envolvendo a PI3K e a proteína quinase C (PKC) (Doi *et al.*, 2003; Düvel *et al.*, 2010). De acordo com os estudos mencionados, nossos resultados sugerem que a Ala-Gln assume o papel de um sinal para o metabolismo da glicose, estimulando assim o transporte de glicose independente da insulina em células musculoesqueléticas.

## **17 CONCLUSÕES**

Em resumo, nossos resultados demonstram que Ala-Gln estimulou a via de sinalização da mTOR e potencializou sua regulação independente da estimulação com insulina, denotando um efeito protetor da Ala-Gln em resgatar parcialmente as células de um estado resistente à insulina através da ativação da mTOR/ S6K, da melhoria da via de sinalização de insulina, do aumento da absorção de glicose independente da insulina e, finalmente, pela melhora na viabilidade celular de miotubos resistentes à insulina.

## 18 REFERÊNCIAS

AGILENT. Disponível em: [http://www.agilent.com/cs/pubimages/images/shb\\_glyco-stress-test.png](http://www.agilent.com/cs/pubimages/images/shb_glyco-stress-test.png)

ALTMAN, B. J., STINE, Z. E. & DANG, C. V. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16(10), 619-34.

BAKALAR, B., DUSKA, F., PACHL, J., FRIC, M., OTAHAL, M., PAZOUT, J. & ANDEL, M. (2006) Parenterally administered dipeptide alanyl-glutamine prevents worsening of insulin sensitivity in multiple-trauma patients. *Crit Care Med*, 34(2), 381-6.

BOZA, J. J., TURINI, M., MOËNNOZ, D., MONTIGON, F., VUICHOUD, J., GUEISSAZ, N., GREMAUD, G., POUTEAU, E., PIGUET-WELSCH, C., FINOT, P. A. & BALLÈVRE, O. (2001) Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats. *Nutrition*, 17(1), 35-40.

CAO, Y., JIANG, X., MA, H., WANG, Y., XUE, P. & LIU, Y. (2016) SIRT1 and insulin resistance. *J Diabetes Complications*, 30(1), 178-83.

CHARLTON, M. & NAIR, K. S. (1998) Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr*, 128(2 Suppl), 323S-327S.

CHEN, R., ZOU, Y., MAO, D., SUN, D., GAO, G., SHI, J., LIU, X., ZHU, C., YANG, M., YE, W., HAO, Q., LI, R. & YU, L. (2014) The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *J Cell Biol*, 206(2), 173-82.

CLINE, G. W., PETERSEN, K. F., KRSSAK, M., SHEN, J., HUNDAL, R. S., TRAJANOSKI, Z., INZUCCHI, S., DRESNER, A., ROTHMAN, D. L. & SHULMAN, G. I. (1999) Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 341(4), 240-6.

COPPS, K. D. & WHITE, M. F. (2012) Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565-82.

CSIBI, A., LEE, G., YOON, S. O., TONG, H., ILTER, D., ELIA, I., FENDT, S. M., ROBERTS, T. M. & BLENIS, J. (2014) The mTORC1/S6K1 pathway regulates glutamine metabolism through the eIF4B-dependent control of c-Myc translation. *Curr Biol*, 24(19), 2274-80.

DÉCHELOTTE, P., HASSELMANN, M., CYNOBER, L., ALLAOUCHICHE, B., COËFFIER, M., HECKETSWEILER, B., MERLE, V., MAZEROLLES, M., SAMBA, D., GUILLOU, Y. M., PETIT, J., MANSOOR, O., COLAS, G., COHENDY, R., BARNOUD, D., CZERNICHOV, P. & BLEICHNER, G. (2006) L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med*, 34(3), 598-604.

DEFRONZO, R. A. & TRIPATHY, D. (2009) Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32 Suppl 2, S157-63.

DEFRONZO, R. A., GUNNARSSON, R., BJÖRKMAN, O., OLSSON, M. & WAHREN, J. (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 76(1), 149-55.

DIONYSSIOU, M. G., EHYAI, S., AVRUTIN, E., CONNOR, M. K. & MCDERMOTT, J. C. (2014) Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  represses MYOGENIN function in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cell Death Dis*, 5, e1094.

DOI, M., YAMAOKA, I., FUKUNAGA, T. & NAKAYAMA, M. (2003) Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*, 312(4), 1111-7.

DOI, M., YAMAOKA, I., NAKAYAMA, M., MOCHIZUKI, S., SUGAHARA, K. & YOSHIZAWA, F. (2005) Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity. *J Nutr*, 135(9), 2103-8.

DRUMMOND, M. J., BELL, J. A., FUJITA, S., DREYER, H. C., GLYNN, E. L., VOLPI, E. & RASMUSSEN, B. B. (2008) Amino acids are necessary for the insulin-induced activation of mTOR/S6K1 signaling and protein synthesis in healthy and insulin resistant human skeletal muscle. *Clin Nutr*, 27(3), 447-56.

DURÁN, R. V., OPPLIGER, W., ROBITAILLE, A. M., HEISERICH, L., SKENDAJ, R., GOTTLIEB, E. & HALL, M. N. (2012) Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell*, 47(3), 349-58.

DÜVEL, K., YECIES, J. L., MENON, S., RAMAN, P., LIPOVSKY, A. I., SOUZA, A. L., TRIANTAFELLOW, E., MA, Q., GORSKI, R., CLEAVER, S., VANDER HEIDEN, M. G., MACKEIGAN, J. P., FINAN, P. M., CLISH, C. B., MURPHY, L. O. & MANNING, B. D. (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2), 171-83.

EKIM, B., MAGNUSON, B., ACOSTA-JAQUEZ, H. A., KELLER, J. A., FEENER, E. P. & FINGAR, D. C. (2011) mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 31(14), 2787-801.

ERIKSSON, J., FRANSSILA-KALLUNKI, A., EKSTRAND, A., SALORANTA, C., WIDÉN, E., SCHALIN, C. & GROOP, L. (1989) early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 321(6), 337-43.

FERRANNINI, E., SIMONSON, D. C., KATZ, L. D., REICHARD, G., BEVILACQUA, S., BARRETT, E. J., OLSSON, M. & DEFRONZO, R. A. (1988) The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*, 37(1), 79-85.

FRÖJDÖ, S., DURAND, C., MOLIN, L., CAREY, A. L., EL-OSTA, A., KINGWELL, B. A., FEBBRAIO, M. A., SOLARI, F., VIDAL, H. & PIROLA, L. (2011) Phosphoinositide 3-

kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. *Mol Cell Endocrinol*, 335(2), 166-76.

GREENFIELD, J. R., FAROOQI, I. S., KEOGH, J. M., HENNING, E., HABIB, A. M., BLACKWOOD, A., REIMANN, F., HOLST, J. J. & GRIBBLE, F. M. (2009) Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, and type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr*, 89(1), 106-13.

HENRY, R. R. (1994) Protein content of the diabetic diet. *Diabetes Care*, 17(12), 1502-13.  
Henry, R. R. (1994) Protein content of the diabetic diet. *Diabetes Care*, 17(12), 1502-13.

HICKSON, R. C., WEGRZYN, L. E., OSBORNE, D. F. & KARL, I. E. (1996) Alanyl-glutamine prevents muscle atrophy and glutamine synthetase induction by glucocorticoids. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 2), R1165-72.

HUANG, S. & CZECH, M. P. (2007) The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*, 5(4), 237-52.

HÜBL, W., DRUML, W., LANGER, K. & LOCHS, H. (1989) Influence of molecular structure and plasma hydrolysis on the metabolism of glutamine-containing dipeptides in humans. *Metabolism*, 38(8 Suppl 1), 59-62.

IMAMOTO, Y., TANAKA, H., TAKAHASHI, K., KONNO, Y. & SUZAWA, T. (2013) Advantages of AlaGln as an additive to cell culture medium: use with anti-CD20 chimeric antibody-producing POTELLIGENT™ CHO cell lines. *Cytotechnology*, 65(1), 135-43.

JEWELL, J. L. & GUAN, K. L. (2013) Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem Sci*, 38(5), 233-42.

JEWELL, J. L., KIM, Y. C., RUSSELL, R. C., YU, F. X., PARK, H. W., PLOUFFE, S. W., TAGLIABRACCI, V. S. & GUAN, K. L. (2015) Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*, 347(6218), 194-8.

JUE, T., ROTHMAN, D. L., SHULMAN, G. I., TAVITIAN, B. A., DEFRONZO, R. A. & SHULMAN, R. G. (1989) Direct observation of glycogen synthesis in human muscle with <sup>13</sup>C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(12), 4489-91.

JUMPERTZ, R., THEARLE, M. S., BUNT, J. C. & KRAKOFF, J. (2010) Assessment of non-insulin-mediated glucose uptake: association with body fat and glycemic status. *Metabolism*, 59(10), 1396-401.

KAHN, B. B. & FLIER, J. S. (2000) OBESITY AND INSULIN RESISTANCE. *J CLIN INVEST*, 106(4), 473-81.

KATTA, A., KAKARLA, S., WU, M., PATURI, S., GADDE, M. K., ARVAPALLI, R., KOLLI, M., RICE, K. M. & BLOUGH, E. R. (2009) Altered regulation of contraction-induced Akt/mTOR/p70S6k pathway signaling in skeletal muscle of the obese Zucker rat. *Exp Diabetes Res*, 2009, 384683.

LAMBERTUCCI, A. C., LAMBERTUCCI, R. H., HIRABARA, S. M., CURI, R., MORISCOT, A. S., ALBA-LOUREIRO, T. C., GUIMARÃES-FERREIRA, L., LEVADAPIRES, A. C., VASCONCELOS, D. A., SELLITTI, D. F. & PITHON-CURI, T. C. (2012) Glutamine supplementation stimulates protein-synthetic and inhibits protein-degradative signaling pathways in skeletal muscle of diabetic rats. *PLoS One*, 7(12), e50390.

LONG, Y. C., CHENG, Z., COPPS, K. D. & WHITE, M. F. (2011) Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways. *Mol Cell Biol*, 31(3), 430-41.

MENGE, B. A., SCHRADER, H., RITTER, P. R., ELLRICHMANN, M., UHL, W., SCHMIDT, W. E. & MEIER, J. J. (2010) Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Regul Pept*, 160(1-3), 75-80.

MOOKERJEE, S. A., NICHOLLS, D. G. & BRAND, M. D. (2016) Determining Maximum Glycolytic Capacity Using Extracellular Flux Measurements. *PLoS One*, 11(3), e0152016.

MORIFUJI, M., KOGA, J., KAWANAKA, K. & HIGUCHI, M. (2009) Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 55(1), 81-6.

NEWSHOLME, P., ABDULKADER, F., REBELATO, E., ROMANATTO, T., PINHEIRO, C. H., VITZEL, K. F., SILVA, E. P., BAZOTTE, R. B., PROCOPIO, J., CURI, R., GORJAO, R. & PITHON-CURI, T. C. (2011) Amino acids and diabetes: implications for endocrine, metabolic and immune function. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 315-39.

NEWSHOLME, P., BRENNAN, L., RUBI, B. & MAECHLER, P. (2005) New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 108(3), 185-94.

NEWSHOLME, P., CRUZAT, V. F., KEANE, K. N., CARLESSI, R. & DE BITTENCOURT, P. I., Jr. (2016) Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J*, 473(24), 4527-4550.

NEWSHOLME, P., PROCOPIO, J., LIMA, M. M., PITHON-CURI, T. C. & CURI, R. (2003) Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*, 21(1), 1-9.

NISHITANI, S., MATSUMURA, T., FUJITANI, S., SONAKA, I., MIURA, Y. & YAGASAKI, K. (2002) Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 299(5), 693-6.

PRADA, P. O., HIRABARA, S. M., DE SOUZA, C. T., SCHENKA, A. A., ZECCHIN, H. G., VASSALLO, J., VELLOSO, L. A., CARNEIRO, E., CARVALHEIRA, J. B., CURI, R. & SAAD, M. J. (2007) L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia*, 50(9), 1949-59.

RUIZ-ALCARAZ, A. J., LIPINA, C., PETRIE, J. R., MURPHY, M. J., MORRIS, A. D., SUTHERLAND, C. & CUTHBERTSON, D. J. (2013) Obesity-induced insulin resistance in

human skeletal muscle is characterised by defective activation of p42/p44 MAP kinase. *PLoS One*, 8(2), e56928.

SELVI, R., Angayarkanni, N., Asma, B., Seethalakshmi, T. & Vidhya, S. (2010) Amino acids influence the glucose uptake through GLUT4 in CHO-K1 cells under high glucose conditions. *Mol Cell Biochem*, 344(1-2), 43-53.

SHANWARE, N. P., BRAY, K., ENG, C. H., WANG, F., FOLLETTIE, M., MYERS, J., FANTIN, V. R. & ABRAHAM, R. T. (2014) Glutamine deprivation stimulates mTOR-JNK-dependent chemokine secretion. *Nat Commun*, 5, 4900.

TAN, H. W. S., SIM, A. Y. L. & LONG, Y. C. (2017) Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation. *Nat Commun*, 8(1), 338.

THIEBAUD, D., JACOT, E., DEFRONZO, R. A., MAEDER, E., JEQUIER, E. & FELBER, J. P. (1982) The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. *Diabetes*, 31(11), 957-63.

WIERNSPERGER, N. F. (2005) Is non-insulin dependent glucose uptake a therapeutic alternative? Part 1: physiology, mechanisms and role of non insulin-dependent glucose uptake in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 31(5), 415-26.

YOON, M. S. & CHOI, C. S. (2016) The role of amino acid-induced mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1) signaling in insulin resistance. *Exp Mol Med*, 48(1), e201.

YU, L., MCPHEE, C. K., ZHENG, L., MARDONES, G. A., RONG, Y., PENG, J., MI, N., ZHAO, Y., LIU, Z., WAN, F., HAILEY, D. W., OORSCHOT, V., KLUMPERMAN, J., BAEHRECKE, E. H. & LENARDO, M. J. (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), 942-6.

YUAN, H. X., XIONG, Y. & GUAN, K. L. (2013) Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Mol Cell*, 49(3), 379-87.

ZHAI, Y., SUN, Z., ZHANG, J., KANG, K., CHEN, J. & ZHANG, W. (2015) Activation of the TOR Signalling Pathway by Glutamine Regulates Insect Fecundity. *Sci Rep*, 5, 10694.

ZHANG, H. H., MA, X. J., WU, L. N., ZHAO, Y. Y., ZHANG, P. Y., ZHANG, Y. H., SHAO, M. W., LIU, F., LI, F. & QIN, G. J. (2015) SIRT1 attenuates high glucose-induced insulin resistance via reducing mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 240(5), 557-65.

**19 ANEXOS**

ANEXO 1 Artigo publicado.

Raizel, R.; Leite, J.S.; 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. **Br J Nutr.** Aug;116(3):470-9, 2016. doi:10.1017/S0007114516001999.



*British Journal of Nutrition* (2016), **116**, 470–479  
© The Authors 2016

doi:10.1017/S0007114516001999

## Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of L-glutamine and L-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise

Raquel Raizel<sup>1,2\*</sup>, Jaqueline Santos Moreira Leite<sup>1</sup>, Thaís Menezes Hypólito<sup>1</sup>, Audrey Yule Coqueiro<sup>1</sup>, Philip Newsholme<sup>2</sup>, Vinicius Fernandes Cruzat<sup>2,3\*</sup> and Julio Tirapegui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

<sup>2</sup>School of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences and Curtin Health Innovation Research Institute, Curtin University, WA 6102, Australia

<sup>3</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

(Submitted 21 December 2015 – Final revision received 9 April 2016 – Accepted 18 April 2016 – First published online 24 May 2016)

### Abstract

We evaluated the effects of chronic oral supplementation with L-glutamine and L-alanine in their free form or as the dipeptide L-alanyl-L-glutamine (DIP) on muscle damage, inflammation and cytoprotection, in rats submitted to progressive resistance exercise (RE). Wistar rats (*n* 8/group) were submitted to 8-week RE, which consisted of climbing a ladder with progressive loads. In the final 21 d before euthanasia, supplements were delivered in a 4% solution in drinking water. Glutamine, creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), TNF- $\alpha$ , specific IL (IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels were evaluated in plasma. The concentrations of glutamine, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10, as well as NF- $\kappa$ B activation, were determined in *extensor digitorum longus* (EDL) skeletal muscle. HSP70 level was assayed in EDL and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). RE reduced glutamine concentration in plasma and EDL ( $P < 0.05$  *v.* sedentary group). However, L-glutamine supplements (L-alanine plus L-glutamine (GLN + ALA) and DIP groups) restored glutamine levels in plasma (by 40 and 58%, respectively) and muscle (by 93 and 105%, respectively). GLN + ALA and DIP groups also exhibited increased level of HSP70 in EDL and PBMC, consistent with the reduction of NF- $\kappa$ B p65 activation and cytokines in EDL. Muscle protection was also indicated by attenuation in plasma levels of CK, LDH, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as well as an increase in IL-6, IL-10 and MCP-1. Our study demonstrates that chronic oral L-glutamine treatment (given with L-alanine or as dipeptide) following progressive RE induces cytoprotective effects mediated by HSP70-associated responses to muscle damage and inflammation.

**Key words:** L-Alanyl-L-glutamine: Alanine: Resistance exercise: Inflammation: Heat-shock protein

The most abundant amino acid in the body, glutamine, is considered conditionally essential during stress and plays a key role in the inter-organ N transport<sup>(1)</sup>, intermediary metabolism<sup>(2)</sup>, cellular redox pathways<sup>(1)</sup>, glucose<sup>(3)</sup> and glutathione synthesis<sup>(4)</sup>, as well as in several other essential metabolic processes<sup>(5,6)</sup>. Glutamine is also an important modulator of the heat-shock protein (HSP) response, via O-glycosylation and phosphorylation of heat-shock factor 1 (HSF-1)<sup>(7,8)</sup>. HSP, especially the 70-kDa family (HSP72 + HSP73), are proteins known as 'stress response proteins', as their expression is highly induced by different types of agents and catabolic stimuli, such

as oxidative, thermal and metabolic stresses, infection and intense exercise<sup>(9)</sup>. Within the cell, HSP act as molecular chaperones maintaining cellular homeostasis, protecting against injury and death<sup>(9)</sup> and modulating inflammatory responses through the NF- $\kappa$ B signalling pathway<sup>(10)</sup>. Recently, HSP70 was shown to act as a regulator of the early inflammatory response to muscle injury, because of its role in myofibre regeneration and recovery<sup>(11)</sup>.

In sport and exercise, glutamine supplementation is popular among athletes, as it is considered an important nutrient for immune function and muscle recovery from injury and

**Abbreviations:** ALA, trained supplemented with L-alanine; CK, creatine kinase; CTRL, trained control group; DIP, dipeptide L-alanyl-L-glutamine; EDL, *extensor digitorum longus*; GLN + ALA, L-alanine plus L-glutamine; HSP, heat-shock protein; LDH, lactate dehydrogenase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RE, resistance exercise; SED, sedentary group.

\* Corresponding author: R. Raizel, email raqzel@usp.br; V. F. Cruzat, email vinifc@usp.br

**ANEXO 2** Artigo sob revisão em periódico internacional.

Raquel Raizel<sup>1\*</sup>, Rodrigo Carlessi<sup>2</sup>, Younan Chen<sup>3</sup>, Kevin N. Keane<sup>2</sup>, Vinicius F. Cruzat<sup>2</sup>, Julio Tirapegui<sup>1</sup>, Philip Newsholme<sup>2\*</sup>. L-alanyl-L-glutamine improves insulin and mTOR/S6K signalling in insulin resistant C2C12 myotubes.

## **L-ALANYL-L-GLUTAMINE IMPROVES INSULIN AND MTOR/S6K SIGNALLING IN INSULIN RESISTANT C2C12 MYOTUBES**

**Short Title:** L-alanyl-L-glutamine improves insulin and mTOR/S6K signalling

### **Abstract**

The dipeptide L-alanyl-L-glutamine (Ala-Gln) is known to alter cell metabolism and improve viability. Herein we investigated the effect of the dipeptide on component(s) of the insulin and mTOR/S6K signalling pathway in C2C12 muscle cells, under normal or insulin resistant conditions. Myotubes were incubated in serum and glutamine free medium with and without 100 nM insulin, and supplemented with 0, 0.3 or 1 mM of Ala-Gln, for 24h. Cells were then challenged with 100 nM insulin for 30 min. We determined that chronic exposure to insulin altered the first steps of insulin cascade by reducing the levels of total IR- $\beta$  and IRS-1 and impairing phosphorylation of IRS-1 (tyr632), AKT (thr308 and ser473) and p44/42 MAPK. A reduction in GLUT4 and HSP70 expression was also observed, as well as a decrease in cell viability. The phosphorylation of p70S6k and S6 was also decreased suggesting that protein synthesis was ineffective regardless of the insulin stimulus and adequate energy. In contrast, Ala-Gln increased total levels of IRS-1 and AKT phosphorylation, which may indicate delayed degradation of IRS-1. Interestingly, anaerobic glycolysis and glycolytic capacity was increased by Ala-Gln in both conditions, as well as the stimulation of p70S6k and S6. Taken together, our results demonstrate that Ala-Gln enhanced the mTOR signalling pathway and potentiated its downstream regulation independent of insulin stimulation, denoting a protective effect of L-alanyl-L-glutamine by partially rescuing the cells from an insulin resistant state through activation of the mTOR/S6K signalling pathway.

**keywords:** L-alanyl-L-glutamine, insulin resistance, mTOR, muscle cell

**ANEXO 3** Artigo aceito para publicação em periódico nacional.

Raizel, R.; Coqueiro, A.Y.; Bonvini, A.; Godois, A.M.; Tirapegui, J. Citoproteção e inflamação: efeitos da suplementação com glutamina e alanina sobre a lesão muscular induzida pelo exercício resistido.

## **CITOPROTEÇÃO E INFLAMAÇÃO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA E ALANINA SOBRE A LESÃO MUSCULAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO RESISTIDO**

### **RESUMO**

Exercícios de alta intensidade reduzem a concentração do aminoácido mais abundante do organismo, a glutamina, fato que pode influenciar na recuperação de atletas. Estudos demonstram que a suplementação oral crônica com L-glutamina na forma livre, em conjunto com L-alanina, ou como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) pode atenuar a lesão, inflamação e imunossupressão induzida pelo exercício aeróbico intenso e/ou exaustivo. Contudo, o efeito destas suplementações durante o exercício resistido não é bem esclarecido. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi revisar os efeitos da suplementação com L-glutamina e L-alanina sobre mecanismos de lesão muscular, inflamação e citoproteção induzidos pelo exercício resistido.

**Palavras chave:** glutamina, lesão, inflamação, sistema imune, exercício resistido, atletas.

## **CYTOPROTECTION AND INFLAMMATION: EFFECTS OF GLUTAMINE AND ALANINE SUPPLEMENTATION UPON RESISTANCE EXERCISE-INDUCED MUSCLE DAMAGE**

### **ABSTRACT**

High intensity exercise reduces the levels of the most abundant amino acid in the body, glutamine, which may affect the recovery of athletes. Previous studies have shown that chronic oral supplementation with L-glutamine and L-alanine in its free form or as dipeptide (L-alanyl-L-glutamine) can attenuate the injury, inflammation and immune suppression induced by intense aerobic and exhaustive exercise. However, the effects of these supplements on resistance exercise are unclear. Thus, the aim of study was summarize the effect of L-glutamine and L-alanine upon muscle injury and inflammation in resistance exercise.

**Key words:** glutamine, muscle damage, inflammation, immune system, resistance exercise, athletes.

**ANEXO 4** Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF/ USP.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 5.2014-P428

## **C E R T I F I C A D O**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros inflamatórios e a expressão de proteínas de choque térmico em ratos submetidos a exercício resistido**" (Protocolo CEUA/FCF/428), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Raquel Raizel**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 11 de novembro de 2013.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2014.

**Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**  
Coordenador da CEUA/FCF/USP

## ANEXO 5 – Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Documento sem validade oficial  
FICHA DO ALUNO

9132 - 8786606/1 - Raquel Raizel

Email: raqzel@usp.br  
Data de Nascimento: 23/01/1984  
Cédula de Identidade: RG - 1474754-5 - MT  
Local de Nascimento: Estado de Mato Grosso  
Nacionalidade: Brasileira  
Graduação: Nutricionista - Universidade de Cuiabá - Mato Grosso - Brasil - 2009  
Mestrado: Mestre em Biociências - Área de Concentração em Nutrição (1) - Universidade Federal de Mato Grosso - Mato Grosso - Brasil - 2013

Curso: Doutorado  
Programa: Ciência dos Alimentos  
Área: Nutrição Experimental  
Data de Matrícula: 27/08/2013  
Início da Contagem de Prazo: 27/08/2013  
Data Limite para o Depósito: 28/08/2017  
Orientador: Prof(a). Dr(a). Julio Orlando Tirapegui Toledo - 27/08/2013 até o presente. Email: tiraegu@usp.br  
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 27/08/2013  
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/07/2015  
Data do Depósito do Trabalho:  
Título do Trabalho:  
Data Máxima para Aprovação da Banca:  
Data de Aprovação da Banca:  
Data Máxima para Defesa:  
Data da Defesa:  
Resultado da Defesa:  
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 27/08/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 18/08/2017 15:38:49

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Documento sem validade oficial  
FICHA DO ALUNO

9132 - 8786606/1 - Raquel Raizel

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5899-2/3	Bio-disponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	92	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	0	-	-	N	Pré-matrícula Indeferida
EFB5755-3/1	Efeitos do Exercício Físico no Metabolismo Muscular (Escola de Educação Física e Esporte - Universidade de São Paulo)	01/04/2014	03/06/2014	90	6	94	A	N	Concluída
FBA5729-4/2	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	03/03/2015	06/04/2015	75	0	-	-	N	Turma cancelada

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	0	-	-	N	Pre-matricula Indeferida
FBA5728-3/11	Aprimoramento Didático	14/04/2015	11/05/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5729-4/3	Nutrição e Metabolismo na Atividade Física	01/08/2016	04/09/2016	75	5	87	A	N	Concluída
FBA5753-1/2	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	23
Estágios:			
Total:	0	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

**Observações:**

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 18/08/2017 15:38:49

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 8786606/1 - Raquel Raizel

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
81078	Julio Orlando Tirapegui Toledo	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 18/08/2017 15:38:49

## ANEXO 6 Currículo Lattes

	<p><b>Raquel Raizel</b>          Endereço para acessar este CV: <a href="http://lattes.cnpq.br/3518445781714978">http://lattes.cnpq.br/3518445781714978</a>          Última atualização do currículo em 17/10/2017</p>
<p><b>Resumo informado pelo autor</b></p>	
<p>Possui graduação em Nutrição pela Universidade de Cuiabá. Especialização em Nutrição Esportiva e Clínica pelo Instituto Centro Oeste de Pós Graduação (ICOP). Especialização em Exercício Físico e Nutrição na Saúde, na doença e no esporte, pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Mestrado em Biociências pela Faculdade de Nutrição-UFMT, na linha de pesquisa: Nutrição, Exercício, Rendimento físico e Doenças metabólicas, e Doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos alimentos - Área de Alimentos e Nutrição Experimental, pela Universidade de São Paulo (USP), com período sanduíche na Curtin University of Technology, Western Australia. (Texto informado pelo autor)</p>	
<p><b>Links para Outras Bases:</b>  <a href="#">SciELO - Artigos em texto completo</a> </p>	
<p><b>Dados pessoais</b></p>	
<b>Nome</b>	Raquel Raizel
<b>Filiação</b>	Dircou Raizel e Marlene Raizel
<b>Nascimento</b>	23/01/1984 - Nova Brasília/MT - Brasil
<b>Endereço profissional</b>	Faculdade de Ciências Farmacéuticas - USP, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Avenida Professor Lineu Prestes Butantã - São Paulo 05508000, SP - Brasil Telefone: 11 30913300
<b>Endereço eletrônico</b>	E-mail para contato : <a href="mailto:raizel@usp.br">raizel@usp.br</a> E-mail alternativo <a href="mailto:raizel@hotmail.com">raizel@hotmail.com</a>
<p><b>Formação acadêmica/titulação</b></p>	
<b>2013 - 2017</b>	<p>Doutorado em Ciências dos Alimentos.          Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil          com período sanduíche em Curtin University of Technology (Orientador : Philip Newsholme)          Título: Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina, livres ou como dipeptídeo, sobre a lesão, inflamação e citoproteção em modelos de estresse in vivo e in vitro, Ano de obtenção: 2017.          Orientador: Julio Orlando Trapegi Toledo           Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico          Palavras-chave: L-Alanyl-L-Glutamina, L-alanina, L-glutamina, inflamação, Resistência exercício, Insult resistance          Áreas do conhecimento : Nutrição Esportiva, Nutrição, Aminoácidos</p>
<b>2011 - 2013</b>	<p>Mestrado em Biociências.          Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil          Título: Fatores associados à ingestão inadequada de frutas e verduras de adolescentes: uma abordagem ecológica, Ano de obtenção: 2013          Orientador: Christianne de Faria Coelho Ravagnani           Co-orientador: Marlene Matinez Espinosa          Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior          Palavras-chave: Frutas, Verduras, Adolescentes          Áreas do conhecimento : Epidemiologia, Saúde Coletiva, Análise Nutricional de População          Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana, Saúde humana e serviços sociais</p>
<b>2010 - 2012</b>	<p>Especialização em Exercício Físico e Nutrição (saúde, doença e esp.          Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil          Título: Avaliação do estado nutricional e ingestão alimentar de jogadores de futebol profissional em período de pré competição.          Orientador: Christianne de Faria Coelho Ravagnani          Bolsista do(a): Universidade Federal de Mato Grosso</p>
<b>2009 - 2010</b>	<p>Especialização em Nutrição Esportiva e Clínica.          Instituto Centro Oeste de Pós Graduação, ICOP, Brasil          Título: Avaliação do estado nutricional e ingestão alimentar de pacientes com Insuficiência Renal Crônica em hemodiálise de Cuiabá, MT.          Orientador: Christianne de Faria Coelho Ravagnani          Bolsista do(a): Instituto Centro Oeste de Pós Graduação</p>
<b>2006 - 2008</b>	<p>Graduação em Nutrição.          Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil          Título: Aspectos atuais do consumo de fibra solúvel no controle glicêmico de pacientes adultos com diabetes mellitus não insulino-dependente.          Orientador: Leanda Maria Comas Chaim          Bolsista do(a): Programa Universidade para Todos</p>

## Formação complementar

---

- 2017 - 2017** Módulo preparatório para o exame TOEFL. . (Carga horária: 60h).  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasília, Brasil  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Treinamento em Citometria de Flux: Attune acoustic; BD LSR Fortessa. (Carga horária: 24h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Microscopia: Olympus BX-61; Olympus IX-81 Inverted; Nikon A1+ confocal. (Carga horária: 8h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Análise Bionergetica: Seahorse Extracellular Flux Analyser. (Carga horária: 8h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Staff English Program. (Carga horária: 24h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Treinamento em OGTR (Office of the Gene Technology Regulator). (Carga horária: 4h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Software analítico: Image J image analysis; FlowJo analysis. (Carga horária: 16h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Treinamento em Cultura Celular. (Carga horária: 8h).  
Curtin University of Technology, CUT, Perth, Austrália  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Do sequenciamento de próxima geração à PCR digital. (Carga horária: 2h).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Maggip Training. (Carga horária: 18h).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2012** Flak English Course. . (Carga horária: 320h).  
Flak University, FISK, Nashville, Estados Unidos
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Introdução à Bioestatística I em SPSS. (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Programas de Promoção de Saúde do Trabalhador. (Carga horária: 10h).  
Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, CBAFS, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Aumento da Produtividade e Redução de Custo Cozinha. (Carga horária: 12h).  
Serviço de apoio às Micro e Pequenas Empresas Mato Grosso, SEBRAE, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Dietética. (Carga horária: 20h).  
Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Atendimento Nutricional em Consultório & Home care. (Carga horária: 8h).  
DNN Serviços Nutricionais, DNN, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Almoço Cultural. (Carga horária: 25h).  
Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Práticas do Nutricionista no Banco de Leite. (Carga horária: 15h).  
Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Estruturação e Implantação do SNC do HGU. (Carga horária: 40h).  
Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil
- 2005 - 2005** Avaliação da Alimentação Escolar de Cuiabá-MT. . (Carga horária: 24h).  
Consultoria e Pesquisa em Alimentação, NUTRIDADOS, Brasil

## Atuação profissional

---

### 1. Hospital Fêmina, Cotabé-MT - FEMINA

#### Vínculo Institucional

**2008 - 2008** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio em UAN , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### 2. Hospital Geral Universitário - HGU

#### Vínculo Institucional

**2008 - 2008** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio em Clínicas Médicas e Saúde Mat. Infant , Carga horária: 40, Regime: Integral

### 3. Creche Santa Inês - CRECHE

#### Vínculo Institucional

**2008 - 2008** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio em Saúde Infantil , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### 4. Escola de Educação Infantil - EEI

#### Vínculo Institucional

**2008 - 2008** Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio em Alimentação Escolar , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### 5. Instituto Centro Oeste de Pós Graduação - ICOP

#### Vínculo Institucional

**2009 - 2010** Vínculo: Boleia , Enquadramento funcional: Pós Graduação Lato Sensu , Carga horária: 10, Regime: Parcial

### 6. Curtin University of Technology - CUT

#### Vínculo Institucional

**2015 - 2016** Vínculo: Boleia , Enquadramento funcional: Doutorado Sanduíche , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

### 7. Universidade de São Paulo - USP

#### Vínculo Institucional

**2013 - Atual** Vínculo: Boleia , Enquadramento funcional: Aluna de doutorado FBA - FCFRUSP , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

### 8. Prefeitura Municipal de Planalto da Serra-Secretaria de Educação - PREFEITURA

#### Vínculo Institucional

**2010 - 2010** Vínculo: Prestação de serviço técnico , Enquadramento funcional: Responsável técnica , Carga horária: 10, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Prestação de serviço técnico especializado em Nutrição e alimentação escolar.

### 9. Clínica Emagrecimento - EMAVRECENTRO

#### Vínculo Institucional

**2010 - 2010** Vínculo: Prestação de serviço técnico , Enquadramento funcional: Nutricionista Clínica , Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Atendimento nutricional especializado em emagrecimento.

## 10. HOTEL MANGABEIRAS LTDA - HOTEL MANGABEI

**Vínculo  
Institucional**

**2010 - 2010** Enquadramento funcional: Responsável Técnico , Carga horária: 20, Regime: Parcial  
Outras informações:  
ELABORAÇÃO E IMPLANTAÇÃO DE MANUAL DE BOAS PRÁTICAS.

## 11. Cutabá Esports Clube - CEC

**Vínculo  
Institucional**

**2010 - 2010** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Nutricionista , Carga horária: 8, Regime: Parcial

## 12. Pausa Nobre Buffet - PAUSA NOBRE BUFF

**Vínculo  
Institucional**

**2009 - 2010** Vínculo: Coletista formal , Enquadramento funcional: Responsável Técnico , Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Atividades**

**04/2009 - 03/2010** Serviço Técnico Especializado, Pausa Nobre Buffet  
Especificação:  
Tratamentos, Controle de Custos e Supervisão de produção.

## 13. 3 Machado Buffet - 3MACHADOBUFFET

**Vínculo  
Institucional**

**2009 - 2010** Vínculo: Coletista formal , Enquadramento funcional: Responsável Técnico , Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Atividades**

**04/2009 - 03/2010** Serviço Técnico Especializado, 3Machado Buffet  
Especificação:  
Tratamentos e Supervisão de produção em eventos.

## 14. Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

**Vínculo  
Institucional**

- 2011 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2010 - 2011** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Pós Graduação Lato Sensu , Carga horária: 20, Regime: Parcial
- 2008 - 2009** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
Bolsista de Iniciação Científica/UFMT, com o projeto de pesquisa "Avaliação do Estado Nutricional em menores de cinco anos de Cutabá", sob número 2/014/03, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso - FAPEMAT, tendo como orientadora a professora doutora Gisela Soares Brunken.

## Projetos

## Projetos de pesquisa

- 2016 - 2017** Effects of L-alanyl-L-glutamine on the components of insulin and mTOR/S6K signaling pathways and cytoprotection in C2C12 musculoskeletal cells.
- Descrição: The dipeptide L-alanyl-L-glutamine has been widely used as a stable L-glutamine source for supplementation and it has been demonstrated to prevent skeletal muscle wasting in rats treated with glucocorticoid, and amelioration of glucose tolerance and insulin sensitivity in critically ill patients. However, whether Ala-Gln modulates component(s) of the insulin and mTOR/S6K signaling pathway or other pathways in normal and insulin resistant C2C12 skeletal muscle cells remains to be elucidated.
- Situação: Concluído Natureza: Projeto de pesquisa  
Alunos envolvidos: Doutorado (1);  
Integrantes: Raquel Raízel; Vinícius Fernandes Cruzat; Julio Trapegi; NEWSHOLME, PHILIP (Responsável); Rodrigo Carlessi; Younan Chen; Kevin Keane
- 2016 - Atual** Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo, sobre parâmetros associados à fadiga em ratos submetidos ao exercício resistido.
- Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa  
Alunos envolvidos: Doutorado (3);  
Integrantes: Raquel Raízel; Julio Trapegi (Responsável); Thais Hypólito; Audrey Yule Coqueiro  
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP
- 2015 - 2018** Vitamin D status and inflammation of Chronic Disease
- Descrição: Goal: To confirm the role of vitamin D status in the low grade chronic inflammation of chronic disease. Methods: Systematic Review, Cross Sectional Study, Observational Study
- Situação: Concluído Natureza: Projeto de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (2);  
Integrantes: Raquel Raízel (Responsável); ; NEWSHOLME, PHILIP; Kevin Keane; Jordan Rowlands; Emily Caltan; Mario John Soares; Yuanfang Zhao
- 2013 - 2015** Efeito da intervenção Nutricional e do Treinamento Resistido em Ratas Overfedonizadas situ em Ratos Submetidos a um Protocolo de Treino Intenso.
- Situação: Concluído Natureza: Projeto de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado profissionalizante (2); Doutorado (5);  
Integrantes: Raquel Raízel; Jacqueline Santos Moreira Leite; Vinícius Fernandes Cruzat; Julio Trapegi (Responsável); Thais Hypólito; Audrey Yule Coqueiro; LIMA, VANESSA B. S.; Dalena Viana; Henrique Quintas Teixeira Ribeiro; Carlos Eduardo Carvalho Martins; Gilberto Elji Shiguemoto; Marcus Vinícius de Souza; Leandro Dias Gonçalves Ruffoni; Marina Rodrigues Barbosa; Anderson Diogo de Souza Lino; Cecília Tardivo Meiri; Ivaniir Santana de Oliveira Pires  
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP
- 2013 - Atual** Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros inflamatórios e a expressão de proteínas de choque térmico em ratos submetidos a treinamento resistido.
- Descrição: O exercício de força intenso gera estresse metabólico, estresse oxidativo e ativação de resposta inflamatória que pode comprometer a saúde de atletas. Sistemas protetores como as proteínas de choque térmico (HSP) são ativados para garantir a sobrevivência celular atuando no remodelamento de proteínas desnaturadas e modulação da resposta inflamatória. Estas proteínas parecem dependentes de concentrações adequadas de glutamina, bem como os leucócitos, os quais utilizam estas bases desse aminoácido. Contudo, os níveis de glutamina são reduzidos após exercício resistido intenso. A suplementação oral com L-glutamina livre tem baixa eficácia na restauração da glutaminemia corporal e a utilização de dipeptídeo (L-alanyl-L-glutamina) tem sido a melhor alternativa. Além disso, a suplementação de L-glutamina e L-alanina nas formas livres tem resultados semelhantes. Espera-se então, que a suplementação crônica com L-glutamina e L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo (conjugadas) seja capaz de restaurar a glutaminemia corporal atenuando processos lesivos e inflamatórios, além de aumentar a expressão de HSP em ratos submetidos a exercício resistido.
- Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);  
Integrantes: Raquel Raízel (Responsável); ; Jacqueline Santos Moreira Leite; Vinícius Fernandes Cruzat; Bárbara Portes Dias; João Henrique Motarelli Sora; Julio Trapegi; Audrey Yule Coqueiro
- 2011 - 2013** A saúde do adolescente na atenção primária de Cuiabá, sob a ótica da multidisciplinaridade.
- Descrição: A pesquisa visa ampliar a compreensão das características de saúde dos adolescentes vinculados a Estratégia de Saúde da Família de Cuiabá-MT, contribuindo para aproximar a equipe de saúde dos adolescentes, subsidiar os gestores com informações sobre riscos comuns que os afetam e fomentar o desenvolvimento de programas multidisciplinares em promoção de saúde.
- Situação: Em andamento Natureza: Projeto de pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);  
Integrantes: Raquel Raízel; Sebastião Junior Henrique Duarte; Anália Dreyer Machado; Tamires Corbet Ribeiro; Valdemar Guedes da Silva; Christianne de Faria Coelho Ravagnani (Responsável)  
Financiador(es): Ministério da Saúde-MS

## Áreas de atuação

1. Nutrição
2. Análise Nutricional de População
3. Nutrição Esportiva

## Idiomas

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

**Espanhol** Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

## Prêmios e títulos

- 2016 Menção Honrosa, XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia
- 2015 Menção Honrosa, XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia

## Produção

Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1. **COQUEIRO, A. Y.; GODOIS, A. M.; RAZEL, R.; TIRAPEGUI, J.**  
Creatine como antioxidante em estados metabólicos envolvendo estresse oxidativo.. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício* , v.11, p.124 - 137, 2017.  
Palavras-chave: Creatina; Exercício Físico; Estresse oxidativo  
Áreas do conhecimento : Nutrição Esportiva  
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://www.rbpfev.com.br/index.php/rbpfev/ver/titulo/1090992/>
2. **COQUEIRO, AUDREY YULE; RAZEL, RAQUEL; HYPOLITO, THAIS MENEZES; TIRAPEGUI, JULIO**  
Effects of supplementation with L-glutamine and L-serine in the body composition of rats submitted to resistance exercise. *REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DO ESPORTE* , v.08, p.1 - , 2017.  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi: 10.1018/revce.2017.08.003/](https://doi.org/10.1018/revce.2017.08.003/)
3. **RAZEL, R.; GODOIS, A. M.; SILVA, V. G.; ESPINOSA, M. M.; MACHADO, A. D.; DUARTE, S. J. H.; RAAGNANI, C. F. C.**  
Ingestão de frutas e verduras por adolescentes e fatores associados: uma abordagem ecológica. *Adolescência & Saúde (UERJ)* , v.13, p.63 - 72, 2017.  
Palavras-chave: Frutas; Verduras; Adolescente  
Áreas do conhecimento : Análise Nutricional de População  
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://www.adolescenciaesaude.com/default.asp?artigo.asp?id=621/>
4. **RAZEL, RAQUEL; GODOIS, ALLAN DA MATA; COQUEIRO, AUDREY YULE; VOLTARELLI, FABRÍCIO AZEVEDO; FETT, CARLOS ALEXANDRE; TIRAPEGUI, JULIO; RAAGNANI, FABRÍCIO CESAR DE PAULA; COELHO-RAAGNANI, CHRISTIANNE DE FAISA**  
Pre-season dietary intake of professional soccer players. *NUTRITION AND HEALTH* , v.1, p.026010601773701 - , 2017.  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi: 10.1177/0260106017737014/](https://doi.org/10.1177/0260106017737014/)

5. **doi** CALTON, E. K.; KEANE, K. N.; RAZEL, R.; ROWLANDS, J.; SOARES, M. J.; NEWSHOLME, PHILIP  
Winter to summer change in vitamin D status reduces systemic inflammation and bioenergetic activity of human peripheral blood mononuclear cells. *Redox Biology*. **15**, v.12, p.814 - 820, 2017.  
Palavras-chave: Peripheral Blood Mononuclear Cells, Bioenergetics, Vitamin D, Season, Inflammation, Insulin sensitivity  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323311717300599>
6. **doi** RAZEL, RAQUEL; GUEDES DA SILVA, VALDEMAR; DA MATA GODOIS, ALLAN; MARTÍNEZ ESPINOSA, MARIANO; DREYER MACHADO, AMÉLIA; JUNIOR HENRIQUE DUARTE, SEBASTIÃO; DE FARIA COELHO RAUAGNANI, CHRISTIANNE  
Comportamentos de risco à saúde de adolescentes e atividades educacionais de Estratégia Saúde da Família em Curitiba, Mato Grosso, 2011. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. , v.25, p.1 - 2, 2016.  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.5123/s1679-49742016000200008](https://doi.org/10.5123/s1679-49742016000200008)
7. **doi** RAZEL, RAQUEL; LEITE, JAQUELINE SANTOS MOREIRA; HYPÓLITO, THAÍS MENEZES; COQUEIRO, AUDREY YULIE; NEWSHOLME, PHILIP; CRUZAT, VINÍCIUS FERNANDES; TIRAPEGUI, JULIO  
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**, v.116, p.470 - 479, 2016.  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
8. **doi** LEITE, JAQUELINE SANTOS MOREIRA; RAZEL, RAQUEL; HYPÓLITO, THAÍS MENEZES; ROSA, THIAGO DOS SANTOS; CRUZAT, VINÍCIUS FERNANDES; TIRAPEGUI, JULIO  
L-glutamine and L-alanine supplementation increase glutamine-GSH axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism (Print)*. **45**, v.28, p.eprn-2016-0049 - , 2016.  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1139/apnm-2016-0049](https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0049)
9. **doi** GODOIS, ALLAN DA MATA; RAZEL, RAQUEL; RODRIGUES, VANESSA BEHRENDIS; RAUAGNANI, FABRÍCIO CESAR DE PAULA; FETT, CARLOS ALEXANDRE; VOLTARELLI, FABRÍCIO AZEVEDO; COELHO-RAUAGNANI, CHRISTIANNE DE FARIA  
Perda hídrica e perfil de hidratação em atletas de futebol. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte (Impressa)*. **20**, v.20, p.47 - 50, 2014.  
Palavras-chave: Desidratação, Ingestão de Líquidos, Futebol  
Áreas do conhecimento : Nutrição Esportiva  
Setores de atividade : Atividades esportivas e de recreação e lazer  
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
10. COSTA, N. M.; RAZEL, R.; SANTINI, E.; REIS FILHO, A. D.  
Suplementos alimentares para o emagrecimento: eficácia questionável. *RBNE - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*. , v.6, p.25 - 32, 2012.  
Palavras-chave: Ácido Linoléico Conjugado, L-Carnitina, Suplementação, Emagrecimento, Obesidade  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana  
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Meio digital
11. RAZEL, R.; PAULETTO, C.; REIS FILHO, A. D.; MELO, S. P.; KALIL, J. A.; VEIRA, V. C. S.; RAUAGNANI, C. F. C.  
Avaliação Nutricional e Consumo Alimentar de pacientes com Insuficiência renal crônica em hemodíalises. *Nutrição em Pauta*. , v.19, p.9 - 13, 2011.  
Palavras-chave: Avaliação Nutricional, Hemodíalises, Insuficiência Renal  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana  
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Impresso
12. RAZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D.  
Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência e Saúde*. , v.4, p.68 - 74, 2011.  
Palavras-chave: Simbióticos, Prebióticos, Probióticos  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana  
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Impresso

#### Artigos aceitos para publicação

1. RAZEL, R.; COQUEIRO, A. Y.; BONVINI, ANDREA; GODOIS, A. M.; TIRAPEGUI, J.

**CITOPROTEÇÃO E INFLAMAÇÃO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM GLUTAMINA E ALANINA SOBRE A LESÃO MUSCULAR INDUZIDA PELO EXERCÍCIO RESISTIDO.** RBNE - Revista Brasileira de Nutrição Esportiva, , 2017.

Palavras-chave: *Glutamina, Lesão, Inflamação, Sistema Imune, Exercício Resistido*

Área de conhecimento: *Nutrição Esportiva*

Referências adicionais: *Português.*

### Livros publicados

1. **RAIZEL, R.; GODOIS, A. M.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Fatores associados à ingestão de frutas e verduras de adolescentes. *Antagoricht Saarbrücken : Novas Edições Acadêmicas*, 2017 p.84.  
Palavras-chave: *Adolescentes, Frutas, Verduras*  
Referências adicionais: *Brazil/Português. ISBN: 9783330999009*

### Capítulos de livros publicados

1. **RAIZEL, R.; PEDROSA, R.; ROSSI, L.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Avaliação de Atletas In: *Avaliação Nutricional: Teoria e Prática 2 ed.*Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017, p. 300-  
Referências adicionais: *Brazil/Português. ISBN: 9788527715478*

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **COQUEIRO, A. Y.; RAIZEL, R.; BONFINI, A.; HYPOLITO, T.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Effect of glutamine and alanine supplementation on adipokines of rats submitted to resistance exercise In: *LII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica*, 2017, São Paulo.  
LII SUPFAB, , 2017.  
Referências adicionais: *Brazil/Português.*
2. **GARCIA, A.; COQUEIRO, A. Y.; LARA, R.; RAIZEL, R.; BONFINI, A.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Effect of glutamine and alanine supplementation on liver and muscle glycogen in rats submitted to heavy resistance exercise In: *LII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica*, 2017, São Paulo.  
LII SUPFAB, , 2017.  
Referências adicionais: *Brazil/Português.*
3. **LARA, R.; COQUEIRO, A. Y.; GARCIA, A.; RAIZEL, R.; BONFINI, A.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Effect of glutamine and alanine supplementation on muscle damage parameters in rats submitted to heavy resistance exercise In: *LII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica*, 2017, São Paulo.  
LII SUPFAB, , 2017.  
Referências adicionais: *Brazil/Português.*
4. **BONFINI, A.; COQUEIRO, A. Y.; RAIZEL, R.; DIAS, C. C.; FOCK, R. A.; SORELLI, P.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Effects of fetal bovine serum deprivation on cell cycle synchronization and viability of new 264.7 macrophages In: *LII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica*, 2017, São Paulo.  
LII SUPFAB, , 2017.  
Referências adicionais: *Brazil/Português.*
5. **RAIZEL, R.; COQUEIRO, A. Y.; BONFINI, ANDREA; HYPOLITO, T.; TIRAPÉGUI, J.**  
Glutamina e alanina atenuam marcador de apoptose e protegem músculo esquelético de ratos submetidos ao exercício resistido intenso In: *14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN*, 2017, São Paulo.  
14º Congresso Nacional da SBAN, , 2017.  
Referências adicionais: *Brazil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
6. **COQUEIRO, A. Y.; RAIZEL, R.; BONFINI, ANDREA; HYPOLITO, T.; GARCIA, A.; LARA, R.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Glutamina e alanina melhoram marcador de fadiga sem alterar a força muscular de ratos submetidos ao exercício resistido intenso In: *14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN*, 2017, São Paulo.  
14º Congresso Nacional da SBAN, , 2017.  
Referências adicionais: *Brazil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
7. **TIRAPÉGUI, JULIO; HYPOLITO, T.; RAIZEL, R.; COQUEIRO, A. Y.; MARTINS, C. E. C.; UMA, VANESSA B. S.; RIBEIRO, H. Q. T.; BONFINI, ANDREA**  
Glutamine and Alanine Supplementation Improves Cytoprotective Parameters in Rats Submitted to Progressive Resistance Exercise In: *American College of Sports Medicine*, 2017  
*Medicine & Science in Sports & Exercise*, , 2017.  
Referências adicionais: *Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital*

8. **RAIZEL, R.; COQUEIRO, A. Y.; BONVINI, A.; HYPOLITO, T.; TIRAPÉGUI, J.**  
L-glutamine containing supplements improve energy status and muscle protection of rats submitted to progressive resistance exercise In: *LII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica*, 2017, São Paulo.  
LII SUPFAS. São Paulo: FCF USP, 2017.  
*Referências adicionais* : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro
9. **BONVINI, ANDREA; COQUEIRO, A. Y.; RAIZEL, R.; FOCK, R. A.; BORELLI, P.; ROGERO, M. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada aumenta a viabilidade celular em macrófagos raw 264.7 estimulados com LPS In: *14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN*, 2017, São Paulo.  
14º Congresso Nacional da SBAN. , 2017.  
*Referências adicionais* : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
10. **KRUPPELIS, F.; ALVES, H. H. O.; RAIZEL, R.; CARLESSI, R.; PITHON-CURI, T. C.; NEWSHOLME, PHILIP**  
The role of glutamine in neutrophil metabolism and functional integrity In: *Science on the Swan Conference*, 2017, Perth.  
Science on the Swan Conference. Perth. , 2017.  
Palavra-chave: Autophagy; ROS; Apoptosis; Heat-shock proteins; NF- $\kappa$ B  
Áreas do conhecimento : Imunologia Celular  
*Referências adicionais* : Austrália/Inglês. Meio de divulgação: Outro
11. **RAIZEL, R.; CARLESSI, R.; CHEN, Y.; CRUZAT, V. F.; KEANE, K.; KRUPPELIS, F.; ROWLANDS, J.; ROWLES, J.; WALZ, N.; TIRAPÉGUI, J.; NEWSHOLME, PHILIP**  
Effect of L-Alanyl-L-glutamine on insulin and mTOR/S6K signalling pathways in insulin-resistant C2C12 myotubes In: *The Australian Society for Medical Research*, 2016, Perth.  
ASMR Medical Research Week® Scientific Symposium in Western Australia. , 2016. p.107 - 107  
Áreas do conhecimento : Bioquímica da Nutrição  
*Referências adicionais* : Austrália/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
12. **TIRAPÉGUI, J.; COQUEIRO, A. Y.; RAIZEL, R.; HYPOLITO, T.; LEITE, J. S. M.**  
L-glutamine And L-alanine Alleviate Fatigue Markers in Rats Submitted To Resistance Training In: *American College of Sports Medicine*  
American College of Sports Medicine. , 2016.  
*Referências adicionais* : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
13. **CALTON, E.; KEANE, K.; RAIZEL, R.; ROWLANDS, J.; NEWSHOLME, PHILIP; SOARES, M.**  
The Impact of Vitamin D status on the bioenergetics of peripheral blood mononuclear cells: a cross sectional analysis in Australian adults In: *The Australian Society for Medical Research*, 2016, Perth.  
ASRM Scientific Symposium in Western Australia. , 2016. p.114 - 114  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
*Referências adicionais* : Austrália/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
14. **LEITE, J. S. M.; RAIZEL, R.; HYPOLITO, T.; CRUZAT, V. F.; TIRAPÉGUI, J.**  
L-glutamine And L-alanine alleviate oxidative stress in Rats Submitted To Heavy Resistance Training In: *American College of Sports Medicine*, 2016.  
American College of Sports Medicine. , 2016.  
*Referências adicionais* : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
15. **RAIZEL, R.; LEITE, J. S. M.; HYPOLITO, T.; COQUEIRO, A. Y.; TIRAPÉGUI, J.**  
L-glutamine and L-alanine improve HSP70 expression in rats submitted to heavy resistance training In:  
*XVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 2015, Punta Cana.  
XVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. , 2015.  
*Referências adicionais* : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
16. **LEITE, J. S. M.; RAIZEL, R.; HYPOLITO, T.; CRUZAT, V. F.; TIRAPÉGUI, J.**  
Efeito de suplementação com L-glutamina e L-alanina livres ou dipeptídeo sobre glutatona muscular em ratos submetidos ao exercício resistido In: *V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício*, 2014, Londrina-Pr.  
V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício. Londrina-Pr. , 2014. v.V. p.34 - 34  
*Referências adicionais* : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

17. **GODOIS, A. M.; RAIZEL, R.; SILVA, V. G.; AMORIM, M. R.; RAVAGNANI, F. C. P.; RAVAGNANI, C. F. C.** Ingestão de macronutrientes segundo parâmetros de potência de atletas In: V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício., 2014, Londrina-Pr.  
V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício.. Londrina-Pr. , 2014. v.V. p.157 - 157  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
18.  **RAIZEL, R.; LEITE, J. S. M.; HYPOLITO, T.; DIAS, B. P.; BONA, J. H. M.; CRUZAT, V. F.; TIRAPÉGUI, J.**  
L-glutamine and L-alanine improves glutamine stores in rats submitted to high intensity resistance training. In: 19th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2014, Amsterdam, The Netherlands.  
19th Annual Congress of the European College of Sport Science. Amsterdam, The Netherlands: , 2014. v.19. p.626 - 626  
Palavras-chave: *Dipeptide, L-Alanyl-L-Glutamine, Resistance training*  
Áreas do conhecimento : *Nutrição*  
Referências adicionais : *Holanda/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.ecss2006.com/asp/CONGRESS/00\_X\_Display\_Abstracts\_Text.asp?MyAbstractID=2208]*
19. **ARRUDA, A. B. M.; SILVA, V. G.; GODOIS, A. M.; RAIZEL, R.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Associação entre eventos de promoção e prática de atividade física em adolescentes In: 12 Congresso Brasileiro de Medicina de Família e Comunidade, 2013, Belém - Pará.  
12 Congresso Brasileiro de Medicina de Família e Comunidade. Belém: , 2013. v.12. p.385 - 385  
Palavras-chave: *Atividade Física, Adolescentes, Estratégia Saúde da Família*  
Áreas do conhecimento : *Educação Física, Epidemiologia, Saúde Pública*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.cmfc.org.br/index.php/brasileiro/article/view/486]*
20. **RODRIGUES, V. B.; GODOIS, A. M.; NABUCO, H. C. G.; RAIZEL, R.; SILVA, V. G.; RAVAGNANI, F. C. P.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Avaliação da dieta de atletas profissionais de futebol In: 25 Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte., 2013, Salvador.  
25 Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte.. Salvador: , 2013.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição Esportiva*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
21. **NABUCO, H. C. G.; GODOIS, A. M.; RODRIGUES, V. B.; RAIZEL, R.; SILVA, V. G.; RAVAGNANI, F. C. P.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Ingestão de suplementos alimentares entre atletas de um clube de futebol profissional. In: 25 Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte., 2013, Salvador.  
25 Congresso Brasileiro de Medicina do Exercício e do Esporte.. Salvador: , 2013.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição Esportiva*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
22. **SILVA, V. G.; RAIZEL, R.; JORGE, A. A.; HOLLAND, M. L. L.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Nível de atividade física e qualidade do sono em adolescentes In: 12 Congresso Brasileiro de Medicina de Família e Comunidade, 2013, Belém - Pará.  
12 Congresso Brasileiro de Medicina de Família e Comunidade. Belém: , 2013.  
Áreas do conhecimento : *Saúde Materno-Infantil*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
23. **SILVA, V. G.; ANDRADE, I. M.; RAIZEL, R.; ALEXANDRE, M. G.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Associação entre a participação em aulas de educação física escolar e nível de atividade física em adolescentes In: 35 Simposio Internacional de Ciências do Esporte. Esporte e atividade física. O legado para a saúde da população, 2012, São Paulo.  
Revista Brasileira de Ciência e Movimento. São Paulo: , 2012. v.20. p.47 - 47  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
24. **RIBEIRO, T. C.; LOPES, M. B. M.; RAIZEL, R.; DUARTE, S. J. H.; RAVAGNANI, C. F. C.; STOPPIGLIA, L. F.**  
Associação entre a prática de atividade física e fatores relacionados à depressão em adolescentes de Cuiabá-MT In: 35 Simposio Internacional de Ciências do Esporte. Esporte e atividade física. O legado para a saúde da população, 2012, São Paulo.  
Revista Brasileira de Ciência e Movimento. São Paulo: , 2012. v.20. p.53 - 53  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*

25.  RAIZEL, R.; SILVA, H. F.; QUEIROZ, L. C. A.; MIKUNI, T.; ZORMAN, I. B.; ANGELO, V. R.; DUARTE, S. J. H.; MACHADO, A. D.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Associação entre consumo alimentar e participação de adolescentes em programas, relacionados à alimentação, desenvolvidos por unidades básicas de saúde de Cuiabá-MT. In: World Nutrition Rio 2012, 2012, Rio de Janeiro-RJ.  
World Nutrition Rio 2012. , 2012.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição, Saúde Coletiva, Análise Nutricional de População*  
Referências adicionais : *Brasil/Português.*
26. RAIZEL, R.; GODOIS, A. M.; BRANDAO, C. F. C. C. M.; RODRIGUES, V. B.; RAVAGNANI, F. C. P.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Avaliação da dieta de jogadores de futebol profissional em período de pré-competição In: IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2012, Londrina - Pr.  
IV CONGRESSO BRASILEIRO DE METABOLISMO, NUTRIÇÃO E EXERCÍCIO. Londrina - Pr. , 2012. p.145 - 145  
Áreas do conhecimento : *Nutrição, Nutrição Esportiva*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
27. RAIZEL, R.; GODOIS, A. M.; ESPINOSA, M. M.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Fatores associados a marcadores de alimentação saudável de adolescentes: uma abordagem social ecológica In: IV Encontro sobre Síndrome Metabólica: Abordagem Multidisciplinar, 2012, Poconé.  
IV Encontro sobre Síndrome Metabólica: Abordagem Multidisciplinar. , 2012.  
Áreas do conhecimento : *Análise Nutricional de População*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
28. RAIZEL, R.; ESPINOSA, M. M.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Fatores associados ao comportamento alimentar de adolescentes da estratégia de Saúde da Família de Cuiabá/MT In: 35 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte. Esporte e atividade física. O legado para a saúde da população, 2012, São Paulo.  
Revista Brasileira de Ciência e Movimento. São Paulo: , 2012. v.20.  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
29. ALEXANDRE, M. G.; RAIZEL, R.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Fatores associados ao comportamento sedentário de adolescentes: enfoque sócio ecológico In: IV Encontro sobre Síndrome Metabólica: Abordagem Multidisciplinar, 2012, Poconé.  
IV Encontro sobre Síndrome Metabólica: Abordagem Multidisciplinar. , 2012.  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
30. SILVA, V. G.; RAIZEL, R.; CARDOSO, C. J. S.; TANAKA, C. L. C.; AMORIM, J. L.; LEITE, H. F. D.; LIMA, L. P.; DUARTE, S. J. H.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Fatores de risco cardiovascular e associação com fatores sócio demográficos de adolescentes das unidades de saúde da família de Cuiabá-MT In: IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2012, LONDRINA/PR.  
IV CONGRESSO BRASILEIRO DE METABOLISMO, NUTRIÇÃO E EXERCÍCIO. , 2012.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição, Nutrição Esportiva*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
31. MACHADO, A. D.; SILVA, H. F.; ANGELO, V. R.; MORITA, L. H. M.; CANUTO, C. P. S.; FRANCO, C. P.; BEHNE, T. E. G.; SILVA, Z. M.; RAIZEL, R.; SILVA, V. G.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Obesidade abdominal, hábitos alimentares e atividade física em adolescentes de Cuiabá-MT. In: World Nutrition Rio 2012, 2012, Rio de Janeiro-RJ.  
World Nutrition Rio 2012. , 2012.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição, Análise Nutricional de População, Saúde Pública*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
32. THIELKE, M. I.; JORGE, A. A.; AMARAL, S.; ANGELO, V. R.; RAIZEL, R.; LOPES SOBRINHO, M. W.; DUARTE, S. J. H.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Qualidade do sono e comportamentos de risco à saúde de adolescentes In: IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2012, LONDRINA/PR.  
IV CONGRESSO BRASILEIRO DE METABOLISMO, NUTRIÇÃO E EXERCÍCIO. , 2012.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição, Educação Física, Saúde Coletiva*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*

33.  RAIZEL, R.; RAVAGNANI, C. F. C.  
A Saúde do Adolescente na Atenção Primária de Cuiabá, sob a ótica da Multidisciplinaridade In: II Semana Acadêmica da Universidade Federal de Mato Grosso, IV Mostra da Pós-Graduação, 2011, Cuiabá-MT.  
II Semana Acadêmica da Universidade Federal de Mato Grosso. , 2011.  
Áreas do conhecimento : *Nutrição*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*
34. RAIZEL, R.; SANTOS, P. L.; THIELKE, M. I.; SILVA, H. F.; ANGELO, V. R.; SILVA, V. G.; DUARTE, S. J. H.; MACHADO, A. D.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Estilo de Vida Saudável, Comportamento de Risco e Associação com violência e tristeza em adolescentes da Estratégia de Saúde da Família de Cuiabá-MT In: VIII CBAFS Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2011, Gramado-RS.  
VIII CBAFS COngresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde. , 2011.  
Áreas do conhecimento : *Saúde Coletiva, Nutrição*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
35. SILVA, V. G.; RIBEIRO, T. C.; ARRUDA, A. B. M.; RAIZEL, R.; TANAKA, C. L. C.; ANGELO, V. R.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Influência Familiar no Nível e Atividade Física de adolescentes cadastrados na Estratégia de Saúde da Família de Cuiabá-MT In: VIII Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2011, Gramado-RS.  
VIII CBAFS Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde. , 2011.  
Áreas do conhecimento : *Saúde Coletiva*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
36. RAIZEL, R.; BARROS FILHO, G. B.; HOLLAND, M. L. L.; SILVA, C. H. F.; ARRUDA, A. B. M.; RAVAGNANI, F. C. P.; RAVAGNANI, C. F. C.  
Prevalência e Fatores associados à inatividade física em adolescentes de uma escola pública de Cuiabá-MT In: 34 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte, 2011, São Paulo.  
34 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte. , 2011.  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso*
37. Eliana Santini; RAIZEL, R.; NUNES, J. C.; REIS FILHO, A. D.; HOLLAND, M. L. L.; BRUNO, C. A. M.; KALIL, J. A.; COELHO, C. F.  
Análise da Ingestão dietética de Pacientes com Insuficiência Renal Crônica em Hemodiálise In: III Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2010, Londrina-Pr.  
III Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício. , 2010.  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
38. LOPES, M. B. M.; SCHAUFFERT, G.; CARVALHO, C. M. M.; RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. D.  
Comparação do Efeito Agudo do Treinamento de Força e da Hidroginástica Sobre os Níveis Glicêmicos de Diabéticas Tipo II In: II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste, 2010, Cuiabá-MT.  
II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste. , 2010.  
Palavras-chave: *Diabetes Mellitus, Exercício Físico, Idosas*  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*
39. REIS FILHO, A. D.; RAIZEL, R.; LOPES, M. B. M.; FETT, W. C. R.; COELHO, C. F.; VOLTARELLI, F. A.; FETT, C. A.  
Determinação da Gordura Corporal Predita por Métodos Antropométricos: Índice de Massa Corporal Versus Dobras Cutâneas em Idosas In: III Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2010, Londrina-Pr.  
III Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício. , 2010.  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*
40. REIS FILHO, A. D.; Eliana Santini; RAIZEL, R.; FETT, W. C. R.; FETT, C. A.  
Determinação da Gordura Corporal Predita por Métodos Antropométricos e Raios X de Dupla Varredura (DEXA) em Idosas Diabéticas In: II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste, 2010, Cuiabá-MT.  
II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste. , 2010.  
Palavras-chave: *Idosas, Obesidade, Saúde*  
Áreas do conhecimento : *Análise Nutricional de População*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*
41. LOPES, M. B. M.; SCHAUFFERT, G.; CARVALHO, C. M. M.; RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. D.  
Índice de Massa Corpórea e predisposição ao Risco Cardiometabólico de Idosas Participantes do Grupo de Hiperdia do PSF (Programa de Saúde da Família) no Município de Alta Floresta-Mato Grosso. In: II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste, 2010, Cuiabá-MT.  
II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste. , 2010.  
Palavras-chave: *Obesidade, Patologia, Atividade Física*  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*
42. REIS FILHO, A. D.; Eliana Santini; RAIZEL, R.; FETT, W. C. R.; FETT, C. A.  
Proposta de uma Equação para Estimativa do Percentual de Gordura Corporal em Idosas Diabéticas In: II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste, 2010, Cuiabá-MT.  
II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste. , 2010.  
Palavras-chave: *Idosas, Percentual de Gordura, Saúde*  
Áreas do conhecimento : *Educação Física*  
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

## Artigos em jornal de notícias

1. **RAIZEL, R.**  
Detox: Sim ou Não?. *Jornal Estado de Minas.*, p.2 - 4, 2015.  
*Palavras-chave:* Detox, Dieta  
*Áreas do conhecimento:* Nutrição  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Meio digital. *Home page:* [http://impresso.em.com.br/app/noticia/toda-semana/bem-viver/2015/03/01/interna\\_bemviver,142993/detox-sim-ou-nao.shtml](http://impresso.em.com.br/app/noticia/toda-semana/bem-viver/2015/03/01/interna_bemviver,142993/detox-sim-ou-nao.shtml)
2. **RAIZEL, R.; COELHO-RAVAGNANI, C. F.**  
Ingestão inadequada de frutas e verduras é tema de dissertação. *Portal da Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Cuiabá - MT, 2013.*  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Meio digital. *Home page:* <http://www.ufmt.br/ufmt/site/noticia/visualizar/10213/juliomuller>

## Apresentação de trabalho e palestra

1. **RAIZEL, R.; COQUEIRO, A. Y.; BONVINI, ANDREA; HYPOLITO, T.; TIRAPÉGUI, J.**  
Glutamina e alanina atenuam marcador de apoptose e protegem músculo esquelético de ratos submetidos ao exercício resistido intenso, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Meio digital; Local: MAKSOUD PLAZA HOTEL; Cidade: SÃO PAULO/SP; Evento: 14º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN; *Inst.promotora/financiadora:* Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição
2. **RAIZEL, R.; LEITE, J. S. M.; HYPOLITO, T.; COQUEIRO, A. Y.; NEWSHOLME, PHILIP; CRUZAT, V. F.; TIRAPÉGUI, J.**  
Anti-inflammatory and cytoprotective effects of l-glutamine containing supplements in rats submitted to resistance exercises, 2016. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Meio digital; Local: FCF/USP; Cidade: São Paulo/SP; Evento: Semana Farmacológica de Ciências e Tecnologia; *Inst.promotora/financiadora:* Universidade de São Paulo
3. **RAIZEL, R.; CARLESSI, R.; CHEN, Y.; CRUZAT, V. F.; KEANE, K. N.; KRUIPELIS, F.; ROWLANDS, J.; ROWLES, J.; WALZ, N.; TIRAPÉGUI, J.; NEWSHOLME, PHILIP**  
Effect of L-Alanyl-L-glutamine on insulin and mTOR/S6K signalling pathways in insulin-resistant C2C12 myotubes, 2016. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Meio digital; Local: Curtin University; Cidade: Perth, Australia; Evento: Australian Society for Medical Research (ASMR); *Inst.promotora/financiadora:* Curtin University
4. **RAIZEL, R.; COQUEIRO, A. Y.; LEITE, J. S. M.; HYPOLITO, T.; GODOIS, A. M.; TIRAPÉGUI, J.**  
Suplementação crônica com l-glutamina e l-alanina atenua lesão, inflamação e promove citoproteção em ratos submetidos a exercício resistido, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Impresso; Local: Aurora Shopping; Cidade: Londrina-PR; Evento: VI Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício (COMBRAMENE); *Inst.promotora/financiadora:* GEPEMENE
5.  **RAIZEL, R.; LEITE, J. S. M.; HYPOLITO, T.; DIAS, B. P.; BONA, J. H. M.; CRUZAT, V. F.; TIRAPÉGUI, J.**  
L-glutamine and L-alanine improves glutamine stores in rats submitted to high intensity resistance training, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Palavras-chave:* Dipeptide, L-Alanyl-L-Glutamine, Resistance training  
*Áreas do conhecimento:* Nutrição Esportiva  
*Referências adicionais:* Holanda/Inglês. *Meio de divulgação:* Meio digital. *Home page:* [http://www.ecss2006.com/asp/CONGRESS/00\\_X\\_Display\\_Abstracts\\_Text.asp?MyAbstractID=2208](http://www.ecss2006.com/asp/CONGRESS/00_X_Display_Abstracts_Text.asp?MyAbstractID=2208); Local: The Netherlands; Cidade: Amsterdam; Evento: 19th Annual Congress of the European College of Sport Science
6. **RAIZEL, R.; GODOIS, A. M.; BRANDÃO, C. F. C. M.; RODRIGUES, V. B.; RAVAGNANI, F. C. P.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Avaliação da dieta de jogadores de futebol profissional em período de pré-competição, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Áreas do conhecimento:* Nutrição Esportiva  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Impresso; Local: HOTEL SUMATRA; Cidade: LONDRINA/PR; Evento: IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício; *Inst.promotora/financiadora:* GEPEMENE-UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
7.  **RAIZEL, R.; SANTOS, P. L.; THIELKE, M. I.; SILVA, H. F.; ANGELO, V. R.; SILVA, V. G.; DUARTE, S. J. H.; MACHADO, A. D.; RAVAGNANI, C. F. C.**  
Estilo de Vida Saudável, Comportamento de Risco e Associação com Violência e Tristeza em Adolescentes da Estratégia de Saúde da Família de Cuiabá-MT, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
*Áreas do conhecimento:* Epidemiologia  
*Sectores de atividade:* Atividades de atenção à saúde humana  
*Referências adicionais:* Brasil/Português. *Meio de divulgação:* Outro; Local: FAURGÓS; Cidade: Gramado-RS; Evento: VIII Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde; *Inst.promotora/financiadora:* Sociedade Brasileira de Atividade Física e Saúde

8. RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. D.; *Eliana Santini* NUNES, J. C.; HOLLAND, M. L. L.; KALIL, J. A.; COELHO, C. F.  
Avaliação do Estado Nutricional e dieta de pacientes com IRC de acordo com o tempo de Hemodiálise, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
Palavras-chave: Insuficiência Renal Crônica  
Referências adicionais : Brasil/Português; Meio de divulgação: Outro; Local: Centro de Convenções Frei Caneca; Cidade: São Paulo; Evento: 11 Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade e Qualidade de vida.; Inst.promotora/financiadora: Revista Nutrição em Pauta
9. RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. D.; HOLLAND, M. L. L.; *Eliana Santini* KALIL, J. A.; NUNES, J. C.; COELHO, C. F.  
Avaliação Nutricional e Consumo Alimentar de Indivíduos com Insuficiência Renal Crônica em Hemodiálise, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
Áreas do conhecimento : Análise Nutricional de População  
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Universidade Federal de Mato Grosso; Cidade: Cuiabá-MT; Evento: II CONGRESSO BRASILEIRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA DO CENTRO-OESTE; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Mato Grosso
10. RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. D.; Flores, M. F.; VIEIRA JUNIOR, R. C.; COSTA, R. M.; *Eliana Santini* FIORINI, G.  
Estado Nutricional de Escolares do Sexo Feminino de uma Escola Particular do Município de Cáceres-MT, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
Áreas do conhecimento : Nutrição, Análise Nutricional de População  
Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana  
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Universidade Federal de Mato Grosso; Cidade: Cuiabá-MT; Evento: II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Mato Grosso
11. RAIZEL, R.; LOPES, M. B. M.; REIS FILHO, A. D.; FETT, C. A.; COELHO, C. F.  
Perfil de Alunos Iniciantes em Academia de Musculação, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)  
Referências adicionais : Brasil/Português; Meio de divulgação: Outro; Local: Sumatra Hotel; Cidade: Londrina-PR; Evento: II Congresso de Metabolismo, Nutrição e Exercício; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Educação Física do Centro de Educação Física e Esporte-Universidade Estadual de Londrina

#### Demais produções bibliográficas

1. RAIZEL, R.; PAULETTO, C.; COELHO, C. F.  
Avaliação nutricional e consumo alimentar de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização. , 2010. (Outra produção bibliográfica)  
Palavras-chave: Avaliação Nutricional, Hemodiálise, Insuficiência Renal  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
Referências adicionais : Brasil/Português; Meio de divulgação: Impresso
2. RAIZEL, R.  
Aspectos Atuais do Consumo de Fibra Solúvel no Controle Glicêmico de Pacientes Adultos com Diabetes Mellitus não Insulino-dependentes. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação. , 2008. (Outra produção bibliográfica)  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
Referências adicionais : Brasil/Português; Meio de divulgação: Impresso

#### Produção teórica

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. RAIZEL, R.  
Research profile: Raquel Raizel, 2016  
Áreas do conhecimento : Nutrição  
Referências adicionais : Austrália/Inglês. Home page: <http://healthsciences.curtin.edu.au/faculty-news/pvc-message-july-2016/diabetes-research/>

## Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(s) 19th Annual Congress of the European College of Sport Science, 2014. (Congresso)  
L-glutamine and L-alanine improves glutamine stores in rats submitted to high intensity resistance training.
2. V Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2014. (Congresso)
3. Absorption of drugs and nanoparticles through the skin, 2013. (Outra)
4. RMN-Brincando com quebra-cabeça no nível molecular, 2013. (Outra)
5. XII Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa., 2013. (Simpósio)
6. 35 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte, 2012. (Simpósio)  
Fatores associados ao comportamento alimentar de adolescentes da estratégia de Saúde da Família de Cuiabá/MT.
7. Apresentação Oral no(s) IV Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2012. (Congresso)  
AVALIAÇÃO DA DIETA DE JOGADORES DE FUTEBOL PROFISSIONAL EM PERÍODO DE PRÉ-COMPETIÇÃO.
8. Apresentação de Poster / Painel no(s) IV Encontro sobre Síndrome Metabólica: Abordagem Multidisciplinar, 2012. (Encontro)  
Fatores associados a marcadores de alimentação saudável de adolescentes: uma abordagem social ecológica.
9. Apresentação de Poster / Painel no(s) 34 Simpósio Internacional de Ciências do Esporte, 2011. (Simpósio)  
Prevalência e Fatores Associados à Inatividade Física em Adolescentes de uma Escola Pública de Cuiabá-MT.
10. Apresentação de Poster / Painel no(s) II Semana Acadêmica da UFMT, 2011. (Outra)  
A Saúde do Adolescente na Atenção Primária de Cuiabá: sob a ótica da multidisciplinaridade.
11. II Seminário de Integração Ensino-Serviço: A Interdisciplinaridade em foco, 2011. (Seminário)
12. Apresentação de Poster / Painel no(s) VIII CBAPS Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2011. (Congresso)  
Estilo de Vida Saudável, Comportamento de Risco e Associação com Violência e Tristeza em Adolescentes da Estratégia de Saúde de Cuiabá-MT.
13. Apresentação de Poster / Painel no(s) VIII Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2011. (Congresso)  
Estilo de Vida Saudável, Comportamento de Risco e associação com violência e tristeza em adolescentes da Estratégia de Saúde da Família de Cuiabá-MT.
14. Apresentação de Poster / Painel no(s) 11 Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade e Qualidade de Vida, 2010. (Congresso)  
Avaliação do Estado Nutricional e Dieta de pacientes com IRC de acordo com o tempo de hemodiálise.
15. 6 Fórum Nacional de Nutrição, 2010. (Outra)
16. I Congresso Brasileiro de Esportes: da base ao alto nível e XIV Campeonato UNICUIA, 2010. (Simpósio)
17. I Conferência Municipal de Saúde Mental-Intersetorial, 2010. (Outra)
18. Apresentação Oral no(s) II Congresso Brasileiro de Educação Física do Centro-Oeste, 2010. (Congresso)  
Análise da Ingestão Dietética de Pacientes com Insuficiência Renal Crônica em Hemodiálise.
19. Apresentação de Poster / Painel no(s) III Congresso Brasileiro de Metabolismo, Nutrição e Exercício, 2010. (Congresso)  
Perfil de Alunos Iniciantes em Academia de Musculação.
20. 4º Encontro de Atualização em Nutrição Clínica, 2008. (Encontro)

21. Aspectos Nutricionais, Metabólicos e Fisiológicos do Exercício, 2008. (Seminário)  
.
22. I Seminário de Segurança Alimentar e Nutricional dos Povos Indígenas - DSEI Cuiabá, 2008. (Seminário)  
.
23. 3ª Conferência Municipal de Saúde - Saúde e Qualidade de Vida: política de estado e desenvolvimento, 2007. (Outra)  
.
24. Curso de Nutrição Clínica - AVANT PREMIER, 2007. (Outra)  
.
25. I Conferência Regional de Segurança Alimentar e Nutricional, 2007. (Outra)  
.
26. III Encontro de Nutricionistas e Estudantes de Nutrição de Mato Grosso, 2007. (Encontro)  
.
27. Apresentação Oral no(a) Semana Mundial da Alimentação Saudável, 2007. (Outra)  
Avaliação e Orientação Nutricional.
28. Seminário Rotulagem de Alimentos, 2007. (Seminário)  
.
29. 1º Encontro de Nutricionistas e Estudantes de Nutrição De Mato Grosso, 2008. (Encontro)  
.
30. Apresentação (Outras Formas) no(a) Atividades em Comemoração ao Dia da Mulher, 2008. (Outra)  
Vitaminas e Minerais.
31. I Ciclo de Palestras de Doenças Infecto Contagiosas, 2008. (Outra)  
.
32. I Seminário Acadêmico de Cancerologia, 2008. (Seminário)  
.
33. Apresentação (Outras Formas) no(a) Prevenção de Diabetes e Hipertensão Arterial, 2008. (Outra)  
Avaliação Nutricional.
34. Qualidade de vida: alimento esta ideal, 2008. (Outra)  
.
35. Seminário de Nutrição e Envelhecimento Saudável, 2008. (Seminário)  
.
36. II Seminário de Sensibilização em Ações de Alimentação e Nutrição, 2005. (Seminário)  
.
37. Orgânico e Comércio Justo - Tendências e Oportunidades, 2005. (Encontro)  
.
38. Terapia Nutricional, 2005. (Outra)

## Organização de evento

1. **RAIZEL, R.**  
Aspectos Nutricionais, Metabólicos e Fisiológicos do Exercício, 2008. (Outro, Organização de evento)  
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

## Bancas

---

Bancas

### Participação em banca de trabalhos de conclusão

#### Graduação

1. **RAVAGNANI, C. F. C.; FETT, W. C. R.; RAIZEL, R.**  
Participação em banca de Laura Cristina de Amadeu Queiroz. Participação de adolescentes em programas vinculados à ESF em Cuiabá-MT: associação com comportamento de risco e saúde., 2012  
(Educação Física) Universidade Federal de Mato Grosso  
Palavras-chave: Adolescentes, Comportamento de risco  
Áreas do conhecimento : Educação Física, Epidemiologia  
Referências adicionais : Brasil/Português.
2. **SANTINI, E.; PONTI, G. V.; RAIZEL, R.**  
Participação em banca de Aline Alves Ferreira. Parâmetros antropométricos e avaliação do estado nutricional de praticantes de atividade física, 2011  
(Nutrição) Universidade de Cuiabá  
Áreas do conhecimento : Nutrição Esportiva  
Referências adicionais : Brasil/Português.
3. **RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. O.; SANTINI, E.**  
Participação em banca de Pollyanna de Andrade. Perfil Nutricional e Estilo de Vida de Adultos e Idosos do sexo masculino que frequentaram a clínica de nutrição em 2009 e 2010., 2011  
(Nutrição) Universidade de Cuiabá  
Palavras-chave: Perfil Nutricional, Estilo de Vida, Qualidade de Vida  
Áreas do conhecimento : Análise Nutricional de População  
Referências adicionais : Brasil/Português.
4. **RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. O.; SANTINI, E.**  
Participação em banca de Juliana do Vale. Perfil Nutricional e Estilo de Vida de Mulheres que Frequentaram a Clínica de Nutrição em 2009 e 2010., 2011  
(Nutrição) Universidade de Cuiabá  
Palavras-chave: Perfil Nutricional, Estilo de Vida, Sobrepeso  
Áreas do conhecimento : Análise Nutricional de População  
Referências adicionais : Brasil/Português.
5. **RAIZEL, R.; REIS FILHO, A. O.; SANTINI, E.**  
Participação em banca de Cristiano Thomáz Barros. Perfil Nutricional e Hábitos de Vida de praticantes de Exercício Físico atendidos na Clínica de Nutrição da UNIC., 2011  
(Nutrição) Universidade de Cuiabá  
Palavras-chave: Atividade Física, Perfil Nutricional, Hábitos de Vida  
Áreas do conhecimento : Análise Nutricional de População  
Referências adicionais : Brasil/Português.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 20/10/2017 às 12:47:36.