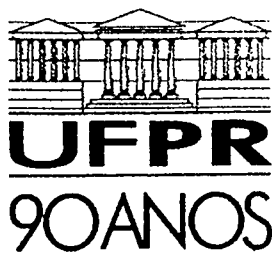


MAURÍCIO DARLEI LISSA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA
SOBRE A RESPOSTA IMUNITÁRIA DE LINFÓCITOS E
MACRÓFAGOS, OBTIDOS DE RATOS SUBMETIDOS AO
TREINAMENTO DE NATAÇÃO**

Dissertação de Mestrado defendida
como pré-requisito para a obtenção do
título de Mestre em Educação Física,
no Departamento de Educação Física,
Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
COORDENAÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

TERMO DE APROVAÇÃO

MAURICIO DARLEI LISSA

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA SOBRE A
RESPOSTA IMUNITÁRIA DE LINFÓCITOS E MACRÓFAGOS,
OBTIDOS DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE
NATAÇÃO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física – Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa Fisiologia da Performance, do Departamento de Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador)
Departamento de Fisiologia / UFPR

Professor Dr. Luiz Fernando Pereira (PUC – Pr)

Professor Dr. Raul Osiecki
Departamento de Educação Física / UFPR

Curitiba, 28 de Setembro de 2004



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO

Nº 091

A Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituída pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care).

Processo nº: 27691/04-17 Data de Aprovação: 07/06/04 13ª RO

Projeto Pesquisa Título : "EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE L-GLUTAMINA NA PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE NATAÇÃO".

Autores: Luiz Cláudio Fernandes - responsável;; Maurício Darlei Lissa - acadêmico:
Evenson Araujo Nunes, Ricardo Key lamazak, Ricardo Antonio Tanhoffe -
colaboradores.

Departamento : Fisiologia

Curitiba, 07 de junho de 2004.

Prof. Dr. SILVIO MARQUES ZANATA
Secretário

Profa. Dra. ANETE CURTE FERRAZ
Presidente

Dedico este trabalho a minha mãe (*in memoriam*), que foi a chave mestra na minha vida. A minha Áquilla por ter me agüentado durante todos esses anos, e por seu eterno amor. Ao meu orientador e amigo Luiz Cláudio, por sua generosidade. E a todos os brasileiros que fazem desse país algo melhor a cada dia, principalmente os mais humildes.

Acreditar que depois de uma dia de tempestade, haverá um lindo dia de Sol, mais bonito e mais vibrante, que todos os outros.

AGRADECIMENTOS

São tantos!

Primeiramente a esse maravilhoso Deus, que me deu a vida novamente.

Ao meu orientador prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes por sua dedicação, persistência, amizade e por seu profissionalismo, que me fizeram crescer como homem social e humano.

Aos amigos do laboratório: Alessandra, Claudinha, Dalva (Dalvíssima), Evelise, Gleisson (Gleicildo), Heloísa (Loli), Heloísa (Helô), Júlia (Juleca), Luciéle, Natália (mandona), Ricardo Key (Ri), Rogéria (mau-humor), Sandro (Sandrinho), Vanessa. Principalmente ao Everson (Cyber ou Sven), pela ajuda no protocolo de treinamento e na digitação do trabalho, e pelos: Não!...Maurício, que me ajudaram muito na discussão do meu trabalho.

Ao meu amigo Ricardo A. Tanhoffer (wheelchairs), que me mostrou um caminho (sobre as suas rodas), e uma visão (que fica na altura do horizonte), mais privilegiados para quem faz da vida uma caminho e uma visão mais bonitos, que simplesmente parar e ficar lamentando-se.

Aos professores Drs. Luiz Fernando Pereira e Raul Osiecki pelas sugestões e discussões do meu trabalho.

A minha maravilhosa Áquilla pela persistência comigo, que foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Aos meus irmãos: Débora e Marcelo e aos meus sobrinhos: Natasha, Cainnã, Caíque e Marcela, que são algumas das fontes da minha inspiração.

A tia Fia por sua bondade e generosidade.

A amiga Tânia Mara Azevedo da Silveira, por fazer da vida uma grande festa cheia de brilhos, gatos, música, cerveja e baldes de serotonina. E também por levantar-se sempre, mesmo quando os tombos são doloridos.

Ao seu Ronaldo pela demonstração de vitória, mesmo nas adversidades.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 GLUTAMINA.....	1
1.2 GLUTAMINA E SISTEMA IMUNITÁRIO.....	5
1.3 GLUTAMINA E EXERCÍCIO FÍSICO DE LONGA DURAÇÃO.....	11
1.4 GLUTAMINA, SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO FÍSICO DE LONGA DURAÇÃO.....	16
2.0 HIPÓTESES E OBJETIVOS	21
2.1 HIPÓTESES.....	21
2.2 OBJETIVO GERAL.....	21
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	22
3.2 POPULAÇÃO/AMOSTRA.....	22
3.3 INSTRUMENTO E PROCEDIMENTOS.....	22
3.3.1 PROGRAMA DE TREINAMENTO.....	23
3.3.1.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	24
3.3.2 SOBRECARGAS DE CHUMBO.....	25
3.3.3 SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA.....	25
3.3.4 CONTROLE DO PESO DOS ANIMAIS.....	25
3.3.5 ORTOTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	25
3.4 METODOLOGIAS DOS ENSAIOS UTILIZANDO LINFÓCITOS.....	26
3.4.1 OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS.....	26
3.4.2 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS.....	26
3.5 METODOLOGIAS DOS ENSAIOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS.....	27
3.5.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	27
3.5.2 SOLUÇÕES.....	27
3.5.3 ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	28
3.5.4 MENSURAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO.....	28
3.5.5 VOLUME LISSOSSOMAL.....	29

4.0 ANÁLISES SÉRICAS	30
4.1 MENSURAÇÃO DE GLICOSE SÉRICA.....	30
4.2 MENSURAÇÃO DE GLUTAMINA SÉRICA.....	30
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6.0 RESULTADOS	32
7.0 DISCUSSÃO	39
8.0 CONCLUSÃO	47
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: METABOLISMO DA GLUTAMINA E DO GLUTAMATO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

FIGURA 2: INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS, LINFÓCITOS T e MACRÓFAGOS

FIGURA 3: ESQUEMA GENERALIZADO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO MODERADO E INTENSO NA FUNÇÃO IMUNITÁRIA E SUSCETIBILIDADE À INFECÇÕES

FIGURA 4: MODELO DE REGULAÇÃO NEUROENDOCRINOLÓGICA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E B EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO

FIGURA 5: PAPEL BIOLÓGICO DE IL-6

FIGURA 6: MUDANÇAS NAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS PLASMÁTICAS EM RELAÇÃO AO EXERCÍCIO INTENSO

FIGURA 7: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLICOSE (mg/dL)

FIGURA 8: CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLUTAMINA (mM)

FIGURA 9: PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS

FIGURA 10: PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

FIGURA 11: VOLUME LISOSSOMAL DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

FIGURA 12: ÍNDICE DE FAGOCITOSE DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

LISTA DE ABREVIATURAS

Con A – CONCANAVALINA A

CRH – HORMÔNIO LIBERADOR DA CORTICOTROFINA

CTL- GRUPO CONTROLE

Dh – DESIDROGENASE

ERO – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

EX – GRUPO TREINADO, SEM SUPLEMENTAÇÃO

EX/GLN - GRUPO TREINADO, COM SUPLEMENTAÇÃO

GLN – GRUPO NÃO TREINADO, COM SUPLEMENTAÇÃO

IFN- γ - INTERFERON GAMA

IgA – IMUNOGLOBULINA A

IL-1 e IL-6 – INTERLEUCINA 1 e INTERLEUCINA 6

iNOS – ÓXIDO NITRICO SINTASE induzível

ITRS – INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

MHC I e II – COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE I e II

NAPDH – NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDIO FOSFATO (forma reduzida)

NK – CÉLULAS *NATURAL KILLERS*

NO – ÓXIDO NITRICO

O₂⁻ - ÂNION SUPERÓXIDO

ROS – ESPÉCIES REATIVA DE OXIGÊNIO

TCA – CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO

TCAI – CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO INTERMEDIÁRIO

TG – TRIGLICEROL

TNF- α – FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

RESUMO

Este estudo teve como objetivos analisar as respostas imunitárias da proliferação dos linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos, as respostas fagocíticas, a produção do ânion superóxido e o volume lisossomal dos macrófagos peritoneais, retirados de ratos *Wistar*, machos, 60 a 90 dias de vida, divididos nos seguintes grupos: CTL – não treinados; GLN – não treinados e suplementados com L-glutamina; EX – treinados e, EX/GLN – treinados e suplementados com L-glutamina. Os ratos foram suplementados com L-glutamina (0,125g/kg de peso corporal) por gavagem, e os não suplementados receberam água destilada. Os ratos EX e EX/GLN foram submetidos ao treinamento de natação de 6 semanas, em piscinas individuais com água aquecida a 32°C, com sobrecarga de chumbo colocada no dorso do animal, na carga de 6% da massa corporal do animal. Na primeira semana, os animais nadaram sem sobrecarga, para ambientação ao meio aquático. Nas outras semanas nadaram com sobrecarga, começando com 30 minutos de duração, e chegando ao final da sexta semana a nadar 1h30 minutos, sem intervalo. Dois dias após o último dia de treinamento, os animais foram ortotanasiados por deslocamento cervical e retirou-se o sangue, os linfonodos mesentéricos e os macrófagos peritoneais para análise. A glicemia e a glutaminemia não foram diferentes, $p > 0,05$, entre os grupos. Aumento significativo ($p < 0,05$), na proliferação linfocitária, na fagocitose, na produção do ânion superóxido e no volume lisossomal foram observados no grupo EX/GLN, comparados com o grupo EX. Portanto, nossos resultados sugerem que a suplementação de L-glutamina foi eficaz em reverter o papel imunossupressor do exercício físico de longa duração e alta intensidade.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the immunitary response of lymphocytes from mesenteric limphonodes, phagocytosis, production of anion superoxide and lysosome volume from peritoneal macrophages, withdrawn from male *Wistar* rats, 60 – 90 days old, set up as follow: CTL – non exercised; GLN – non exercised and supplemented with L-glutamine; EX – exercised and EX/GLN – exercised and supplemented with L-glutamine. The rats received by gavage L-glutamine (0.125g/kg b.w.) and the controls distilled water. Rats from EX and EX/GLN groups trained during 6 weeks, in single swimming pools with warm water (32°C), bearing load of 6% of body weigth. In the first week they swan with no load for adaptation. Then, they swan with the load starting with 30 minutes long and at the enf of the 6th week swan for 1hour and 30 minutes, no break. Two days later the animals were killed by cervical dislocation and blood, limphonodes e peritoneal macrophages were withdrawn. Glycemia and glutaminemia were not different ($p>0.05$) between the groups. In the EX/GLN group there was a significant increase ($p<0,05$), in the rate of lymphocyte proliferation, phagocytosis, production of anion superoxide and lysosome volume. Thus, our results suggest that supplementation with L-glutamine to these animals was able to reverse the immunosuppression effect of long term and high intensity exercise.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 GLUTAMINA

Em 1873, a glutamina foi pela primeira vez considerada importante molécula biológica, quando foi demonstrado, por evidências indiretas, ser componente estrutural de proteínas (HLASIWETZ; HABERMANN, 1873). Em 1883, foi encontrada livre abundantemente em certas plantas (SCHULZE; BOSSHARD, 1883), e nos anos 30 estudos sobre o metabolismo de glutamina revelaram que tecidos de mamíferos tem a capacidade de hidrolisar e sintetizá-la (KREBS, 1935). com isso Rose (1938), classificou-a como aminoácido não-essencial baseado nos estudos que mostraram que ela não era requerida como nutriente da dieta. Nos anos 50, Eagle e colaboradores (1955), reportaram que a glutamina era importante para células *in vitro*, e sua concentração na circulação foi mostrada ser mais do que o dobro da concentração de qualquer outro aminoácido (MEISTER, 1980).

A glutamina está envolvida na transferência de nitrogênio entre órgãos, desintoxicação de amônia, manutenção do balanço ácido-base durante a acidose, como possível regulador direto da síntese e degradação protéica, precursora de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos, necessária para o crescimento e diferenciação celular. veículo de transporte de cadeia carbônica entre órgãos, fornece energia para células de rápida proliferação, tais como enterócitos e células do sistema imunitário. age como precursora da ureogênese e gliconeogênese renal, e de mediadores como o ácido gama aminobutírico (GABA) e glutamato, promove melhora na permeabilidade e integridade intestinal, aumenta a resistência às infecções por aumentar a função fagocitária, e fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno (VASCONCELOS; TIRAPGUI, 1998; KREIDER, 1999). Em situações de estresse, tanto como trauma clínico, quanto em inanição ou exercício intenso e prolongado, a concentração de glutamina no sangue está diminuída (CASTELL, 2003).

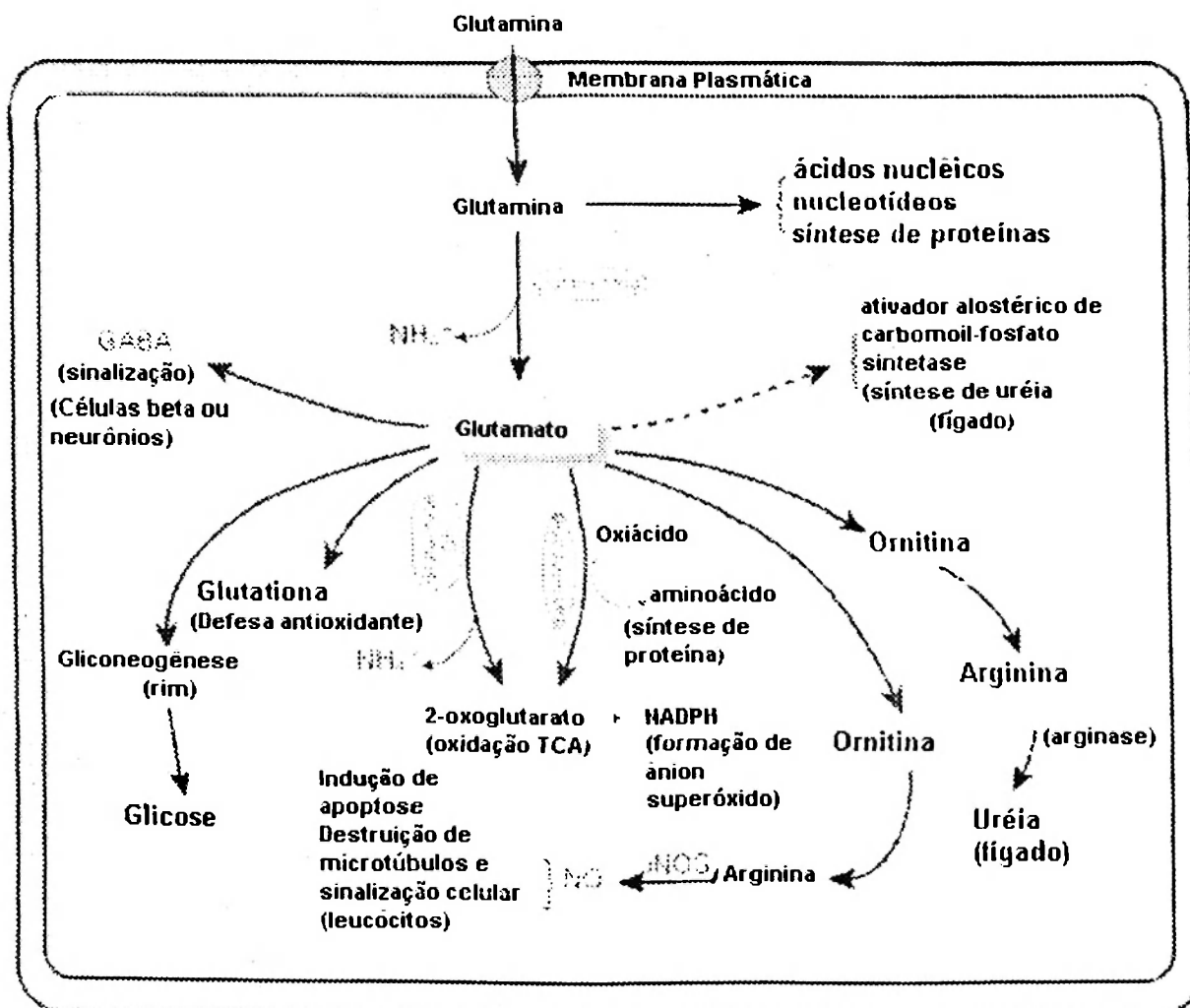


Figura 1: Metabolismo da glutamina e do glutamato em células de mamíferos. Adaptado de NEWSHOLME e colaboradores (2003).

A glutamina está presente em muitas proteínas e é o aminoácido mais abundante no plasma e nos tecidos. Ela representa cerca de 20% do total dos aminoácidos livres do plasma com concentrações que variam de 0,5 a 0,9 mM (CURI, 2000, p. 15; CASTELL, 2002). A glutamina é um aminoácido neutro não essencial, que pode ser sintetizado por, virtualmente, todos os tecidos do organismo, podendo tornar-se essencial em doenças que envolvam catabolismo intenso. Assim, quando a demanda é maior que a produção estabelece-se um quadro de deficiência de glutamina. Por esta razão, este aminoácido foi recentemente reclassificado como

“condicionalmente essencial” (LACEY; WILMORE, 1990). Parece que o tecido mais importante para síntese de glutamina é o muscular, que também estoca e libera glutamina. Portanto, a concentração plasmática de glutamina pode ser considerada a ligação metabólica entre o músculo e outras células, em particular, as do sistema imunitário (CASTELL; NEWSHOLME, 1997a).

O transporte de glutamina no músculo esquelético ocorre, predominantemente, via sistema transportador sensível a insulina (N^m). Em adição, tem sido mostrado que sua captação pelo músculo é regulada largamente pela sua disponibilidade (HUNDAL *et al.*, 1987). Tanto que a diminuição na concentração de glutamina diminui sua taxa de captação no músculo esquelético. A taxa de liberação através da membrana plasmática parece ser controlada por vários hormônios e pode ser influenciada por citocinas (NEWSHOLME; CALDER, 1997). Contudo, o metabolismo deste aminoácido até α -cetoglutarato (por transaminação) e subsequente oxidação no TCA gera até 30 mols de ATP por mol de glutamina. A síntese de glutamina ocorre preferencialmente no músculo esquelético, fígado e cérebro, enquanto a hidrólise ocorre nos rins, linfócitos, macrófagos, trato gastrointestinal e tecido adiposo (NEWSHOLME *et al.*, 1980; KOWALCHUCK *et al.*, 1988; CURI; NEWSHOLME, 1989). Dentro do próprio músculo, a concentração de glutamina pode servir como regulador chave para a síntese de proteínas (JEPSON *et al.*, 1988; RENNIE *et al.*, 1989). Neste caso, durante as condições catabólicas o músculo esquelético libera glutamina em alta taxa e seu nível declina (BABIJ *et al.*, 1986; RENNIE *et al.*, 1989).

Estudos *in vitro* têm provido evidências para dar suporte a esta hipótese, a diminuição na concentração de glutamina, em meio de cultura, abaixo daquela que normalmente encontra-se presente no plasma humano ($600\mu\text{M}$), diminui a taxa de proliferação, em resposta a estimulação com mitógeno, de linfócitos do sangue e lentifica o tempo de resposta durante a privação de alimentos (CASTELL; NEWSHOLME, 1997a).

As altas taxas de utilização de glicose e glutamina pelo macrófago podem, ser explicadas pela teoria da regulação em ramo (CRABTREE; NEWSHOLME, 1985). Observa-se, no macrófago, taxa elevada de glicólise e glutaminólise, porém, baixa

atividade metabólica pelas vias geradora de precursores biossintéticos, que surgem como ramificações das primeiras, quando a célula está quiescente. Este quadro permite rápida modulação do fluxo para as vias de produção de precursores, de acordo com a necessidade do macrófago de responder prontamente quando solicitado.

O metabolismo de glicose e glutamina pode ser avaliado pela determinação da atividade máxima das enzimas-chaves da via glicolítica, glutaminolítica, das pentoses e TCA. Enzima-chave é aquela que catalisa reação em não-equilíbrio, com $\Delta G < -5$ calorias, sendo capaz de regular o fluxo de metabólitos para a via metabólica celular. Para tanto, deve-se identificar quais as enzimas-chaves das vias metabólicas que se pretende estudar (COONEY *et al.*, 1986).

O estudo do metabolismo da glicose e glutamina pode ser levado a termo pela determinação da atividade máxima das enzimas hexoquinase, citrato sintase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutaminase-fosfato dependente.

A hexoquinase é enzima-chave da glicólise que catalisa a reação de fosforilação da glicose pelo ATP, com a formação de glicose-6-fosfato. Esta enzima é passível de regulação, imposta, por exemplo, pelo seu produto.

A citrato sintase é a enzima que controla a entrada de carbono no TCA. Esta reação, embora *in vitro* seja reversível, assume características de irreversibilidade pelo caráter cíclico da via, onde não se encontra acúmulo de substrato intermediário (KREBS, 1980).

A atividade máxima da glicose-6-fosfato desidrogenase constitui índice quantitativo do fluxo de substratos através da via das pentoses. Esta reação é termicamente reversível porém, devido à presença de uma lactonase de ampla distribuição e à rápida hidrólise da D-glicose- α -lactona-6-fosfato, produto desta reação, a mesma pode ser considerada efetivamente irreversível (BRODIE; LIPMANN, 1985).

A capacidade glutaminolítica pode ser avaliada pela determinação da atividade máxima da glutaminase, enzima-chave desta via (COONEY; NEWSHOLME, 1984). Esta enzima requer a presença de íons fosfatos para a manutenção de sua atividade máxima durante a hidrólise da glutamina a glutamato e amônia (NEWSHOLME; LEECH, 1983).

1.2 GLUTAMINA E SISTEMA IMUNITÁRIO

Indivíduos sadios se protegem contra os microorganismos através de muitos mecanismos distintos. Este mecanismo são barreiras físicas, células fagocitárias no sangue e tecidos, uma classe de linfócitos denominados matadores naturais (*natural killers-NK*), e diversas moléculas originárias do sangue, todos participantes na defesa do indivíduo em ambiente potencialmente hostil. Estes são os componentes da imunidade natural (também denominada nativa ou inata) (ABBAS *et al.*, 1997, p.4). Animais menos diferenciados possuem os chamados mecanismos imunitários inespecíficos, tais como a fagocitose de bactérias por células especializadas. Por outro lado, os animais mais diferenciados desenvolveram resposta imunitária adaptativa ou adquirida, que lhes proporciona reação flexível, específica e mais eficaz contra as diferentes agressões. Na resposta imunitária adaptativa observam-se três características importantes: memória, especificidade e o reconhecimento daquilo que é, e não é, próprio do organismo (ROITT, 1998, p.1). Existem evidências consideráveis que exercício exaustivo e prolongado está associado com efeitos adversos da função imunitária. Estes efeitos incluem diminuição da atividade citotóxica das células NK, menor número de linfócitos-T por 3-4 horas depois do exercício, diminuição na habilidade proliferativa de linfócitos; e diminuição na proporção de células T-*helper* (CD4) para T-supressor (CD8) (CASTELL *et al.*, 1997b). Estas células têm o papel de responder rapidamente, efetivamente e especificadamente ao desafio imunitário (NEWHOLME; CALDER, 1997).

O aminoácido, glutamina, é importante combustível para as células do sistema imunitário, como linfócitos e macrófagos e pode ter efeitos imunoestimulatórios (CASTELL *et al.*, 1997a). Ardawi e Newsholme (1983), estabeleceram a importância da glutamina como combustível de algumas células do sistema imunitário, em particular, linfócitos e macrófagos. Parry-Billings e colaboradores (1990b), sugeriram que se a concentração de glutamina plasmática estiver diminuída abaixo dos níveis fisiológicos, a função das células do sistema imunitário poderia ficar prejudicada. Subsequentemente, foi demonstrado que a diminuição na concentração de glutamina

em meio de cultura reduz a taxa de proliferação linfocitária e fagocitose macrófaga, apesar da presença de todos nutrientes requeridos por estas células.

Do metabolismo da glicose há formação de ribose-5-fosfato, a qual é precursora da síntese de RNA, DNA e glicerol-3-fosfato para a síntese de fosfolipídios. A alta capacidade secretória do macrófago (RAPPOLEE; WERB, 1988; STEIN; KESHAV, 1992) associada à sua incapacidade em acumular grânulos de secreção contendo tais produtos, exige desta célula um aparato para síntese protéica bastante desenvolvido. Este processo requer grande quantidade de RNAm e envolve a utilização de purinas, pirimidinas e ribose-5-fosfato, os quais podem ser obtidos a partir da glicólise e glutaminólise.

A glutaminólise fornece glutamato, amônia e aspartato, que são utilizados na síntese de purinas e pirimidinas, sendo estes fundamentais para a formação de DNA e RNA (NEWSHOLME *et al.*, 1989). A alta taxa de utilização de glutamina providencia um sistema tampão dinâmico para os intermediários da via incluindo glutamato intracelular e aspartato, que são requeridos para a síntese de nucleotídeos durante a proliferação de linfócitos ou pela produção de RNAm em macrófagos e linfócitos, e para reparar danos no DNA e RNA feitos pelas espécies reativas de oxigênio (NEWSHOLME *et al.*, 1985).

O metabolismo da glutamina no macrófago visa suprir as altas taxas de consumo de ATP por esta célula, que é capaz de produzir até 25% do total de ATP formado por células do músculo cardíaco em funcionamento, assim como, apresenta taxas de consumo de oxigênio comparáveis às células do rim e do coração (NEWSHOLME *et al.*, 1987). Uma vez que o macrófago, caracteristicamente, não apresenta atividade proliferativa, a alta taxa de utilização de glicose e glutamina, estão envolvidas na obtenção de precursores biossintéticos para a síntese de lipídeos, necessários, por exemplo, na reposição de grandes quantidades de membrana (o macrófago é capaz de incorporar quantidades de membrana equivalentes à totalidade de sua membrana plasmática em cerca de 30 minutos, mesmo no estado quiescente) (SHERR, 1990).

Curi e colaboradores, (1986, 1988), estudando a descarboxilação de [1-¹⁴C e 3-¹⁴C]-piruvato pelas mitocôndrias isoladas de linfócitos, *in vitro*, mostraram

que a conversão desse metabólito a acetil-CoA é muito maior que sua descarboxilação pelo TCA. Desta forma, o piruvato não é um substrato energético importante para o linfócito, como normalmente ocorre para a maioria das células de mamíferos. Trabalhos mais recentes demonstram que as unidades de acetil formadas a partir de piruvato podem ser utilizadas para a síntese de colesterol, triacilgliceróis e fosfolípidos, os quais são importantes constituintes da membrana plasmática e precisam ser produzidos durante o processo proliferativo (CURI *et al.*, 1989). Além disso, foi mostrado também que o transporte de acetil-CoA da mitocôndria para o citosol ocorre pela formação de acetoacetato (CURI *et al.*, 1989). O macrófago utiliza altas taxas de glicose, convertida a lactato de maneira praticamente estequiométrica, nas quais a elevada taxa de glicólise parcial está relacionada à necessidade de produção de membrana, pode ser suprida perfeitamente pelo metabolismo da glutamina (NEWSHOLME *et al.*, 1987). Outra característica importante desta célula é sua capacidade em utilizar em condições presentes nas proximidades do foco inflamatório, lactato como substrato para a manutenção das concentrações de creatina-fosfato, à semelhança do observado para células musculares cardíacas (LOIKE *et al.*, 1993). Em cultura, observa-se que o piruvato derivado da glutamina é praticamente todo metabolizado pelo TCA, enquanto aquele produzido pela quebra da glicose é oxidado por este ciclo na proporção de 1:20 (piruvato oxidado/piruvato produzido).

Desta forma, surge a necessidade, pelo macrófago, de conseguir discriminar o piruvato oriundo da glicólise daquele proveniente da glutaminólise (McKEEHAN, 1982), uma vez que, se as duas vias forem citoplasmáticas, ambas concorrerão para a formação deste "pool". Esta questão pode ser respondida se considerarmos a possibilidade de formação do piruvato originado da glutaminólise como sendo intramitocondrial. Outra evidência a favor da idéia que vincula o consumo elevado de glicose e glutamina pelo macrófago a fatores outros que não somente energéticos encontra-se na observação de que macrófagos, embora aptos a consumir ácidos graxos, não apresentam alterações no consumo de glicose e glutamina quando incubados na presença ou ausência de oleato (NEWSHOLME *et al.*, 1987).

Durante os processos inflamatórios, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (METCALF, 1971), assim como, redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que ocorre migração destas células em direção ao foco da lesão (FURTH *et al.*, 1973). No sítio inflamatório o macrófago passa por processo de ativação, definido como aquisição de competência para realizar tarefa complexa (ADAMS; HAMILTON, 1984). Exemplos de funções complexas incluem quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e de destruir tumores. O avanço dos estudos sobre ativação do macrófago evidencia seu papel de célula pluripotente, que permanece latente no tecido, a espera de algum sinal que a ative. Para a realização de suas funções no organismo, o macrófago lança mão de diferentes habilidades. A primeira função do macrófago descrita foi a fagocitose. Este processo inclui a migração da célula em direção ao agente estranho e seu reconhecimento, via receptores de membrana, da partícula ou microorganismo a ser ingerido. Posteriormente, ocorre a internalização e conseqüente formação da vesícula fagocítica, o processamento deste material pela macrófago, através da formação de fagolisossomos (vesícula fagocítica à qual uniu-se um lisossomo, carregado de enzimas e a extrusão dos restos, no processo de exocitose (ADAMS; HAMILTON, 1992). NADPH oxidase catalisa a produção de ânion superóxido (O_2^-) pela redução de um elétron de oxigênio, usando NADPH como doador de elétron. A geração (O_2^-) por esta enzima serve como ponto de início para a produção de outros agentes oxidantes, incluindo halogênios oxidativos, radicais livres e oxigênio *singlet*, estes metabólitos incluem o íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (BARBIOR, 1984; WHITACRE; CATHCART, 1992) que, ao serem sintetizados, promovem a elevação do consumo de oxigênio, da onde a denominação "burst" oxidativo (BARBIOR, 1984; BROZNA *et al.*, 1988).

Estes oxidantes são usados por macrófagos e neutrófilos para matar microorganismos invasores (BARBIOR, 1999), mas eles também causam muitos danos em tecidos próximos.

Assim, suas produções devem ser bem reguladas para assegurar que eles sejam gerados somente quando e onde requeridos (PITHON-CURI *et al.*, 2002). A produção e liberação de metabólitos reativos do oxigênio, promovida pela endocitose, faz parte dos mecanismos microbicidas utilizados pelo macrófago.

A realização destas funções pelo macrófago permite sua participação em processos mais elaborados. Entre estes, destaca-se o papel de apresentador de antígenos para células do sistema imunitário (linfócitos T e células B). Para a efetivação desta tarefa, o macrófago realiza a internalização da partícula ou microorganismo, associados à moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e classe I (MHC-I) permite o reconhecimento dos produtos pelos linfócitos T (CD4+) e (CD8+), respectivamente. Este processo inclui transcrição gênica e consequente aumento da expressão desta moléculas (MHC I e II) na membrana celular do macrófago (CRESSWELL, 1985) e não apenas a apresentação do antígeno ao linfócito T, mas também sua ativação, através da interação com outros receptores (QIN *et al.*, 1989; MIYAZAKI *et al.*, 1993).

As citocinas são glicoproteínas produzidas pelas células de defesa após a ativação por estímulos específicos. As citocinas podem atuar de maneira autócrina e parácrina, dependendo do tipo celular e expressão do receptor (DUNLOP; CAMPBELL, 2000). O TNF- α é a primeira citocina liberada, em resposta a endotoxinas bacteriana (LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano), pelos monócitos e macrófagos. O TNF- α ativa neutrófilos, monócitos e macrófagos, para iniciar a destruição de células tumorais e bactérias, aumenta a expressão de moléculas de adesão na superfície de neutrófilos e células endoteliais, estimula os linfócitos T e B, regula o sistema de histocompatibilidade MHC e iniciam a produção de outras citocinas próinflamatórias como a IL-1 e IL-6 (CALDER, 1998 a,b)

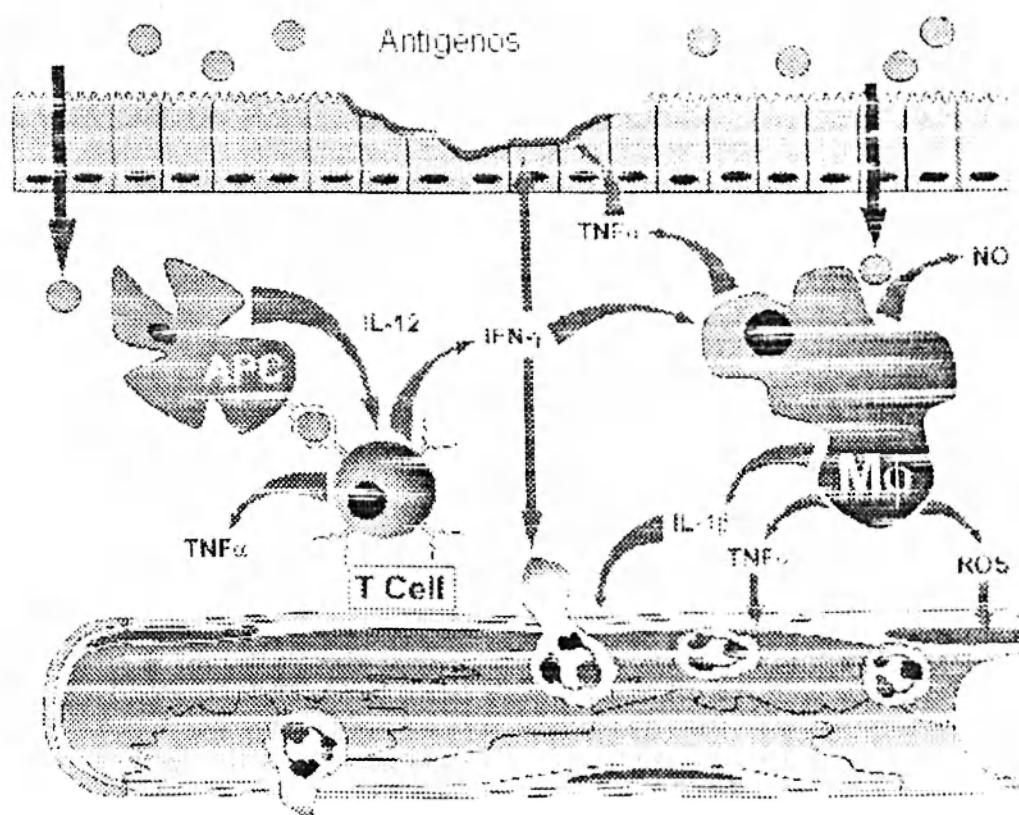


Figura 2: Interação entre células apresentadoras de antígeno (APC), Linfócitos T (T Cell) e macrófagos (Mφ). Adaptado de PAVLICK e colaboradores (2002).

1.3 GLUTAMINA E EXERCÍCIO FÍSICO DE LONGA DURAÇÃO

Em comparação ao catabolismo de carboidratos e lipídios, a quebra de proteínas é fonte de energia relativamente menor para a prática de exercícios. Em muitas situações, o catabolismo de proteínas contribui com menos de 5% para a provisão de energia para a atividade muscular durante atividades físicas. O catabolismo da proteína pode fornecer aminoácidos tanto cetogênicos quanto glicogênicos, os quais são eventualmente oxidados por desaminação e conversão em um dos substratos intermediários no ciclo do TCA ou, pela conversão do ácido piruvico ou ácido acetoacético e, eventual transformação para acetil-CoA. No entanto, em quadros de inanição ou de esgotamento do estoque de glicogênio, o catabolismo de proteína torna-se importante fonte de energia para a prática de exercícios (MAUGHAN *et al.*, 2000, p.129). Alguns estudos sugerem que a glutamina seja mais relevante que a alanina como precursor neoglicogênico em exercícios de longa duração (GRAHAM *et al.* 1995; WAGENMAKERS, 1998).

O conteúdo de intermediários do TCAI têm sido mostrado expandir durante os primeiros minutos de contração muscular. A expansão do TCAI no início da contração muscular deve-se, primariamente, ao aumento na taxa de anaplerose (reenchimento do TCAI) no início do exercício (GIBALA *et al.*, 1998; BRUCE *et al.*, 2001). Evidência experimental atual diz que a suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) em bebidas de atletas durante a competição, produz melhora na performance e na percepção de esforço mental, embora a revisão da literatura não confirme algum efeito ergogênico importante da ingestão do AACR (AGUILÓ *et al.*, 2000).

É possível que o catabolismo de certos aminoácidos tenha função anaplerótica para o TCAI e que isto poderia ser importante para sustentar alta produção de energia para o processo oxidativo. Além disso, várias hipóteses ligam amônia e/ou aminoácidos com a fadiga central e periférica durante exercício. Assim, o músculo treinado intensamente altera seu metabolismo de aminoácidos, o que poderia ter impacto significativo em vários aspectos da resposta ao exercício (GRAHAM *et al.*, 1997). Amônia, alanina, glutamina e glutamato são componentes encontrados, tanto na

circulação, ou como metabólitos livres dos estoques musculares. Eles podem ser metabolizados rapidamente na atividade muscular e podem ser trocados não somente entre o músculo e o plasma, mas também entre o plasma e outros tecidos, como o fígado (GRAHAM; MACLEAN, 1998).

Overtraining é um processo de treinamento excessivo acima de período prolongado de tempo. A síndrome do *overtraining* ocorre como resultado de alta carga de treinamento e/ou alta intensidade de treinamento, com inadequada recuperação entre sessões de treinamento. Sinais e sintomas de síndrome de *overtraining* podem incluir decremento da performance, alteração em estados de humor, mudanças hormonais, dor acumulada no músculo, fadiga persistente e piora da função imunitária. Recuperação completa de síndrome de *overtraining* pode levar semanas ou meses e pode requerer redução considerável na carga de treinamento ou parada completa do treinamento (LEHMANN *et al.*, 1993). Sugere-se que a baixa massa corporal é fator de risco para infecções (HEATH *et al.*, 1991). O excesso de treinamento pode causar imunossupressão, resultando em incidência mais elevada à infecção e mais lenta para a cura do ferimento, no atleta em *overtraining*. Excesso de treinamento e treinamento agudo exaustivo têm sido associados com diminuição da concentração plasmática de glutamina. Também a concentração de glutamina plasmática pode declinar agudamente depois de exercício intenso e durante períodos de treinamento intenso (HISCOCK; MACKINNON, 1998). Conseqüentemente, a atividade do músculo esquelético pode diretamente influenciar o sistema imunitário. Tem sido hipotetizado (chamado de a "hipótese da glutamina") que no exercício intenso, a demanda de glutamina pelo músculo e órgãos é tanta que o sistema linfóide pode ser forçado a entrar em débito de glutamina, que temporariamente afetaria a sua função (KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001a). Moriguchi e Niwa (1995), mostraram que a suplementação com L-glutamina evitou a diminuição da resposta proliferativa de linfócitos induzida pelo exercício devido ao aumento da captação e utilização de glutamina por linfócitos. Newsholme e colaboradores (1988), propuseram que células imunitárias poderiam usar mensageiros como as citocinas, liberadas das diferentes células do sistema imunitário, para se

comunicarem com o músculo esquelético, regulando assim a frequência de liberação da glutamina.

Excesso de treinamento ou treinamento agudo exaustivo de curta duração ocorre em um ciclo de treinamento de sobrecarga, seguido por um ciclo de recuperação, conduzindo para uma super compensação. Atletas de alto nível, freqüentemente, experimentam síndrome de excesso de treinamento em algum estágio de suas carreiras. Sintomas de excesso de treinamento foram observadas: em mais de 60% de corredores de distância pelo menos uma vez durante suas carreiras; em 21% dos nadadores da equipe nacional da Austrália durante uma temporada de meio ano; em 33% dos jogadores de basquetebol de nível nacional da Índia durante seis semanas de treinamento de campo; e em mais de 50% de jogadores de futebol semi-profissional depois de 5 meses da temporada competitiva (GASTMANN; LEHMANN, 1998). Existe evidência substancial associando exercício exaustivo e prolongado, como maratona, com efeitos adversos na função imunitária (FITZGERALD, 1991; NIEMAN, 1997; ROBSON *et al.* 1999), estes efeitos incluem:

- diminuição da atividade citolítica das células *natural killer* (NK);
- número mais baixo de linfócitos T circulantes por 3 a 4 horas depois do exercício;
- diminuição da razão de células CD4 e CD8;
- queda na habilidade proliferativa de linfócitos;
- queda na atividade do neutrófilo;
- prejuízo na síntese de anticorpos;
- queda dos níveis de imunoglobulinas no sangue e saliva.

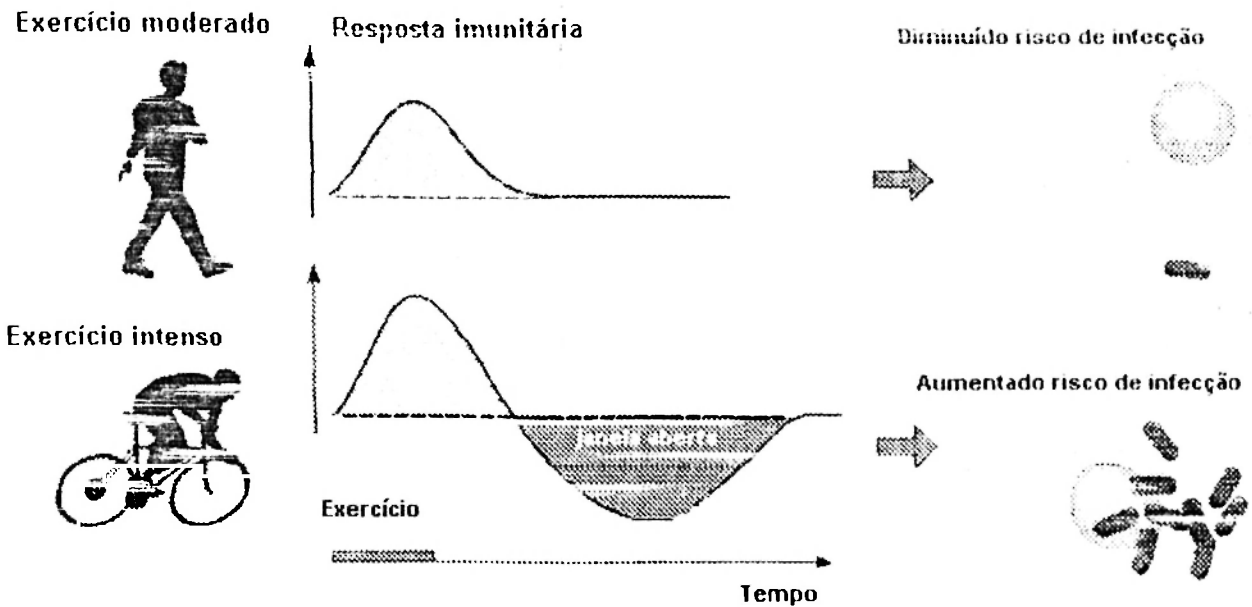


Figura 3: Esquema generalizado dos efeitos do exercício moderado e intenso na função imunitária e suscetibilidade à infecções. Durante exercício moderado e intenso, o sistema imunitário é ativado (como mostrado pela mobilização dos linfócitos para a circulação), mas o exercício intenso é seguido por um período de queda na função imunitária, diminuindo a atividade das células (NK) *natural killer*, proliferação linfocitária e níveis de IgA salivar, durante a queda da função imunitária existe uma "janela aberta" de oportunidade para patógenos. Modificado de FEBBRAIO e PEDERSEN (2002).

Treinamento de exercício crônico, envolvendo turnos de exercício intenso, tem sido associado tanto com efeitos deletérios, quanto com benefícios em imunocompetência. Pouco é conhecido sobre o efeito do treinamento de endurance de intensidade baixa para moderada sobre a resposta imunitária. Atletas quando expostos ao estresse agudo e crônico, podem apresentar supressão do sistema imunitário e da geração de espécies reativas de oxigênio. Durante o exercício, o aumento da utilização de O_2 leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como indicado pelo estado redox da glutathiona sangüínea (SASTRE *et al.*, 1992; SEN *et al.*, 1994). Este tripeptídeo thiol é encontrado na maioria das células e protege contra danos oxidativos (MEISTER; ANDERSON, 1983). Também, glutathiona é de importância para a iniciação e progressão da ativação linfocitária (FIDELIUS *et al.*, 1987).

O estresse do exercício é proporcional à intensidade e duração do exercício, relativo à capacidade máxima do atleta (CASTELL *et al.*, 1997a; BLANCHARD *et al.*, 2001; VENKATRAMAN; PENDERGAST, 2002). Existe alta incidência de infecções em atletas depois de exercício prolongado e extenuante, comparado com sedentários ou indivíduos exercitando-se moderadamente (CASTELL *et al.*, 1996; CASTELL *et al.*, 1997b; MOOREN *et al.*, 2001; CASTELL, 2002), em particular as infecções do trato respiratório superior (ITRS) (BRENNER *et al.*, 1994; WEIDNER, 1994), de fato, a incidência aumentou em corredores de endurance quando treinados em excesso 97km/semana (NIEMAN *et al.*, 1990; HEATH *et al.*, 1991). Isto sugere que algumas imunodepressões podem ocorrer em alguns atletas devido ao estresse de treinamento pesado e/ou competição (CASTELL, 2002). Função imunitária muda dramaticamente depois de cada série de exercício prolongado e intenso. Durante um certo período a imunidade altera-se (que pode ser entre 3 e 72 horas após a última série), onde vírus e bactérias podem ganhar uma posição segura, aumentando o risco de infecções subclínicas e clínicas (NIEMAN, 2001).

Perda de proteína muscular ocorre também durante infecção severa e inflamação aguda. Inflamação aguda induzida por ferida altera aminoácidos e metabolismo de proteínas (MERCIER *et al.*, 2002). A resposta hipermetabólica para infecções bacterianas altera a homeostasia de proteína corporal total, conduzindo a balanço nitrogenado negativo e redistribuição de proteína corporal (PAPET *et al.*, 2002). Foi demonstrado que o metabolismo linfocitário aumenta durante exercício intervalado agudo (SHEWCHUK *et al.*, 1997). Numerosos estudos têm demonstrado alterações significantes nas concentrações plasmática e tecidual de glutamina durante e após exercício intenso e prolongado (CASTELL; NEWSHOLME, 1997a; CASTELL; NEWSHOLME, 1997b; ANTONIO; STREET, 1999). Quando a demanda energética é alta (no caso de exercício prolongado), a resposta é mais pronunciada, como evidenciado pela elevação concomitantemente dos hormônios contrarreguladores. Há diminuição na disponibilidade de substrato produzindo elevação do cortisol, adrenalina e hormônio do crescimento, podendo ter efeito mais exagerado na função imunitária (MITCHELL *et al.*, 1998). Em estudos de Krishna e colaboradores (2000), verificaram

que a glutamina é importante veículo para o transporte de nitrogênio para o fígado e mostra que o aumento de glucagon, induzido pelo exercício, é crítico para o metabolismo hepático da glutamina. Os dados de seus estudos mostram que, especificamente, o exercício aumentou o glucagon, a ureogênese, a transferência do grupo amino da glutamina para a uréia. Estes dados mostraram que, no início, a perturbação fisiológica do exercício é realizada pelo glucagon, pois ele é regulador fisiológico do metabolismo da glutamina hepática *in vivo*.

1.4 GLUTAMINA, SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO FÍSICO DE LONGA DURAÇÃO

Baseado nos dados de vários estudos mostraram que o exercício físico pode alterar a concentração de glutamina disponível para as células de defesa, a sua suplementação tem sido recomendada para atletas que são submetidos a programas de exercício intenso e de longa duração.

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a incidência de infecções no trato respiratório superior está aumentado durante a 1ª a 2ª semanas, depois de uma série de exercícios prolongados e extenuantes (NIEMAN *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1993). Um estudo em Los Angeles mostrou que atletas de maratona tornaram-se doentes depois da corrida, numa proporção seis vezes maior do que atletas não participantes, com nível similar de treinamento (CASTELL *et al.*, 1996). Isto sugere que exercício regular e moderado melhora o sistema imunitário diminuindo a suscetibilidade a infecção em indivíduos sedentários, mas que em indivíduos que praticam treinamento excessivo ou intenso, têm maior risco à infecções (CASTELL *et al.*, 1996; CASTELL, 2002). Bassit e colaboradores (2000), observaram magnitude similar de diminuição de 40% na incidência de infecção em triatletas depois suplementação diária com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR). Como precursores de glutamina, os AACR mantiveram as concentrações da glutamina plasmática e os autores atribuíram isto a diminuição na incidência de doenças.

Estudos demonstraram que, durante e após o exercício exaustivo, ocorre um aumento da captação de glutamina por diversos órgãos, o que supera as taxas de síntese e liberação de glutamina pelo músculo esquelético, acarretando na diminuição do fornecimento deste aminoácido para as células do sistema imunitário (ROHDE *et al.*, 1998; GIBALA, 2001).

O controle hormonal da resposta inflamatória, imune e não imune parece ser fruto da necessidade de se manter o equilíbrio dinâmico entre o ambiente e os processos orgânicos, já que os hormônios ao se contra-regularem, prestam-se a estes objetivos. Através de efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo celular, os hormônios podem alterar o transcorrer da resposta, modificando parâmetros como o número de leucócitos circulantes, diminuição da migração celular para a área inflamada e as funções microbicida e fagocitária (GARCIA LEME, 1989). Como participante da resposta inflamatória, o macrófago está sujeito também à modulação hormonal. Cury (1986), demonstrou que o diabetes experimental, os hormônios liberados pela camada cortical da adrenal e os hormônios tiroidianos são capazes de alterar a funcionalidade do macrófago (migração, aderência à fibra de nylon e a capacidade de redução de "Nitroblue tetrazolium").

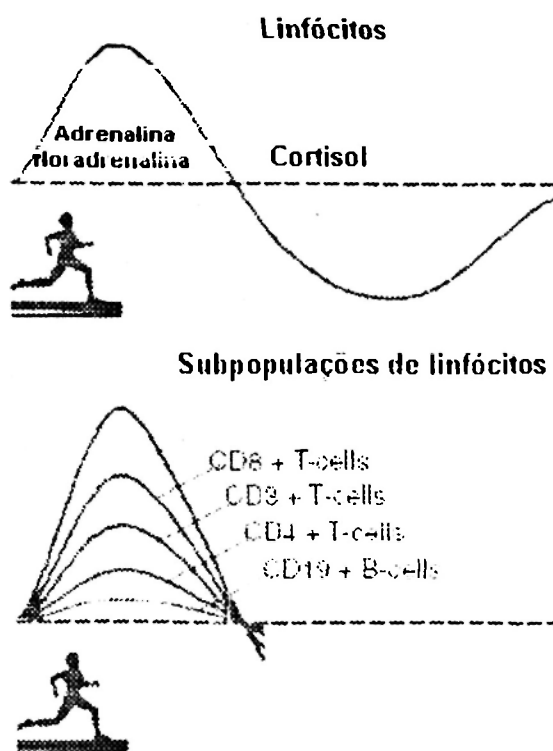


Figura 4: Modelo de regulação neuroendocrinológica de subpopulações de linfócitos T e B em resposta ao exercício. Modificado de FEBBRAIO e PEDERSEN (2002).

A IL-6 é produzida por muitas células diferentes, mas a principal fonte, *in vivo*, são monócitos/macrófagos, fibroblastos e células endoteliais vasculares (AKIRA *et al.*, 1993) e células do músculo esquelético (NAGARAJU *et al.*, 1998). Estímulo típico para a produção de IL-6 são TNF- α e IL-1 (PEDERSEN *et al.*, 2003).

O estresse físico promove a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal resultando num aumento das concentrações plasmáticas de ACTH e cortisol, assim como de substâncias produzidas pela camada medular da adrenal. Dentre os estímulos físicos capazes de desencadear o estresse destacam-se o trauma severo, queimaduras grandes cirurgias, hipoglicemia, febre, exercício físico e frio. Infecções ou a exposição de leucócitos mononucleares a endotoxinas bacterianas, causam aumento da produção de IL-1 e IL-6, que estimulam a liberação hipotalâmica de CRH, IL-2 e TNF- α que, por

sua vez, promovem a secreção de ACTH (BATEMAN *et al.*, 1989, MILENKOVIC *et al.*, 1989). Nestas circunstâncias observa-se, também, alterações na atividade simpato-adrenal. Animais de experimentação apresentam aumento de secreção da camada medular da adrenal como componente da resposta aguda à injúria (CHIEN, 1967; PINARDI *et al.*, 1979; YOUNG *et al.*, 1983). A importância destas alterações pode ser evidenciada pelo aumento de mortalidade observado durante a fase aguda de resposta à injúria em animais adrenalectomizados (YOUNG *et al.*, 1987)

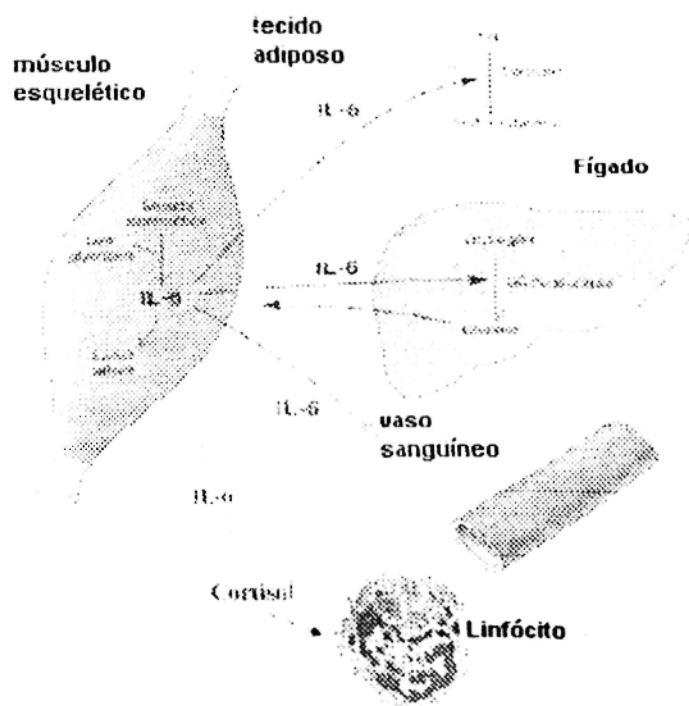


Figura 5: Papel biológico de IL-6. Este papel ainda não está bem esclarecido, porém evidências acumuladas sugerem que a contração muscular produz e libera IL-6 e que esta liberação é aumentada ainda mais se o glicogênio muscular é baixo. O papel da IL-6 é para induzir a lipólise, se isto também contribui para a manutenção da homeostase da glicose durante exercício é menos clara. IL-6 pode também inibir a resistência à insulina induzida pelo TNF- α e estimula produção de cortisol. IL-6 derivada do músculo modula, indiretamente, a queda da função imunitária induzida pelo exercício. Modificada de PEDERSEN e colaboradores (2003).

Considerando seu papel no músculo esquelético com a síntese de proteína, é possível que a diminuição na absorção de glutamina possa inibir a produção de IL-6, embora esta relação não tenha sido mostrada anteriormente (HISCOCK *et al.*, 2003)

Exercício prolongado e intenso como maratona resulta em um menor aumento na concentração plasmática de TNF- α (PEDERSEN *et al.*, 1998; SUZUKI *et al.*, 2000) No entanto, existe um moderado aumento na concentração sistêmica destas citocinas, mas o fato é que o aparecimento de IL-6 na circulação é de longe o mais marcado e que seu aparecimento procede o de outras citocinas (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002)(figura 6)

Aumento no plasma de IL-6 em resposta ao exercício de longa duração é independente do dano muscular, ao passo, que o dano muscular *per se* é seguido por mecanismos de reparo, incluindo a invasão de macrófagos dentro do músculo levando a produção de IL-6 (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002).

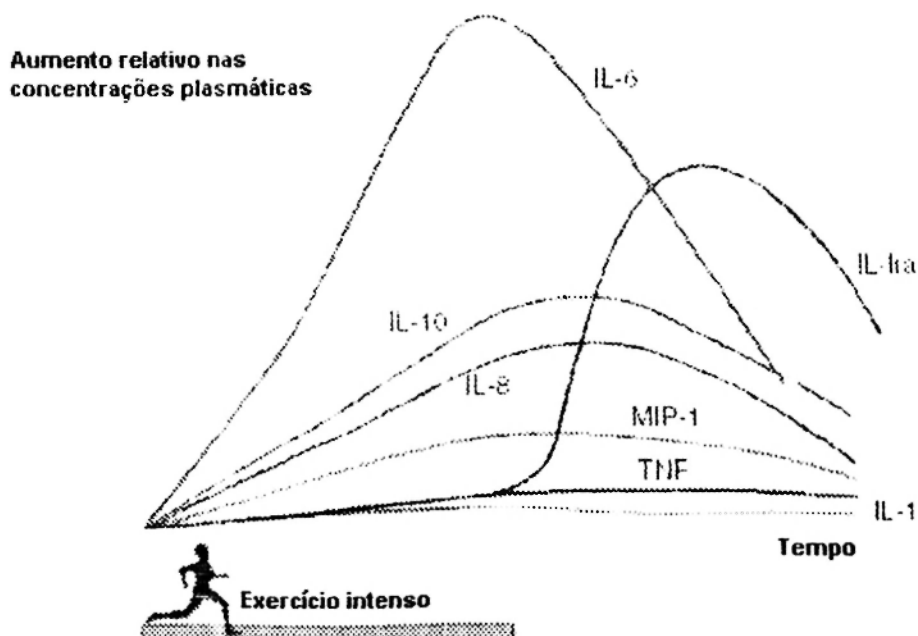


Figura 6: Mudanças nas concentrações de citocinas plasmáticas em relação ao exercício intenso. TNF, fator de necrose tumoral. IL, interleucina; IL-1 ra, receptor antagonista; MIP, proteína inibitória de macrófago. Modificada de FEBBRAIO e PEDERSEN (2002).

2.0 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

Uma vez que, a glutamina é importante modulador do sistema imunitário, bem como, provedor de energia, aventamos a hipótese que a suplementação com glutamina minimiza os efeitos de imunossupressão causada pela atividade física de alta intensidade e longa duração.

H 0 – a suplementação com L-glutamina não minimiza os efeitos causados pelo treinamento de natação na resposta imunitária;

H 1 – a suplementação com L-glutamina minimiza os efeitos causados pelo treinamento de natação na resposta imunitária.

2.2 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da suplementação com L-glutamina sobre os parâmetros imunitários das células de defesa, em ratos submetidos a exercício de natação de longa duração e alta intensidade.

2.3 Objetivos Específicos

- Analisar a glicemia e a glutaminemia;
- Investigar a taxa de proliferação de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos;
- Avaliar a fagocitose, a produção do ânion superóxido e o volume lisossomal dos macrófagos retirados do peritônio.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos, 10 animais para cada grupo: 1) controle (CON) – não treinados sem suplementação; 2) L-glutamina (GLN) – não treinados e suplementados com L-glutamina; 3) treinados (EX) – treinados e sem suplementação; 4) L-glutamina+treinamento (EX/GLN) – treinados e suplementados com L-glutamina.

3.2 População/Amostra

Foram utilizados 40 ratos *Wistar*, machos, adultos (entre 60 a 90 dias de idade), pesando de 250 a 350 gramas, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram mantidos no biotério, em gaiolas coletivas em número de cinco, em ambiente claro/escuro (12h/12h), com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$), ração e água *ad libitum*.

3.3 Instrumento e procedimentos

Os animais dos grupos EX e EX/GLN foram submetidos ao treinamento de natação, com água aquecida a 32°C . A natação tem sido utilizada como modelo de exercício físico por vários grupos de pesquisa. Esta modalidade de exercício apresenta pelo menos dois tipos de estresse: um caracterizado pelo próprio exercício físico e outro pela necessidade de sobreviver na água (VIEIRA *et al.*, 1988). O sistema de natação é constituído de dez tubos de PVC de 48 cm de profundidade por 24 cm de diâmetro (piscinas), ligados por meio de mangueiras a um tubo central, que contém uma

serpentina para aquecimento da água. A água aquecida circula para dentro das piscinas mantendo a temperatura por todo o período de treinamento. Dentro de cada piscina foi adaptado outro tubo de profundidade de 55 cm e diâmetro de 23 cm, no qual foi perfurado todo o fundo de maneira a formar uma peneira, modificado de VIEIRA e colaboradores (1988).

3.3.1 Programa de treinamento

Os animais dos grupos EX e EX/GLN foram submetidos a treinamento diário (2^a a 6^a feira), nas quartas-feiras os animais descansaram e, não foram suplementados. O Treinamento começou com duração de 30 minutos na primeira semana, até chegar a 1 hora e meia de treinamento, sem intervalo; durante 6 semanas (sendo que a primeira semana foi realizado sem sobrecarga, para adaptação do animal ao meio aquático). A sobrecarga de treinamento era de chumbo, representando 6% da massa corporal do animal (KOKUBUN, 1990).

3.3.1.1 Protocolo de treinamento

<u>Grupos</u>	<u>Protocolo de natação e suplementação</u>	<u>1ª Semana</u> (sem carga – 45 minutos)	<u>2ª a 6ª semana</u> (6% da carga corporal – iniciou-se com 30 min.- terminou com 1h30min.)
CTL (não treinado/sem suplementação)	Adaptação ao treinamento	EX e EX/GLN	-
GLN (não treinado/com suplementação)	Treinamento de Natação	-	EX/GLN
EX (treinado/sem suplementação)			
EX/GLN (treinado/com suplementação)	Suplementação (L-glutamina – 0,125g/kg)	-	GLN e EX/GLN

3.3.2 Sobrecargas de chumbo

A carga que foi utilizada foi confeccionada com bolinhas de chumbo após a pesagem dos animais. Sempre que houve variação do peso, a carga foi reajustada. O chumbo foi armazenado em bolsinhas feitas com esparadrapo e presas ao dorso do animal por meio de um elástico de 3 cm de espessura, preso ao dorso do animal. No elástico foi costurado um velcro que facilitou a colocação da carga no rato.

3.3.3 Suplementação com L-glutamina

Os ratos dos grupos GLN e GLN/TREN receberam a suplementação de 0,125g/kg de L-glutamina, da empresa Labsynth-Produtos para Laboratórios Ltda-SP, através de sonda orogástrica (gavagem) durante as 5 semanas de treinamento, logo após o treinamento. Os outros grupos receberam água destilada.

3.3.4 Controle do peso dos animais

Todos os ratos foram pesados nas quartas-feiras, sempre no mesmo horário, para que fossem reajustadas as sobrecargas e a suplementação.

3.3.5 Ortotanásia dos animais

Os ratos foram ortotanasiados por decapitação, dois dias após o último dia do treinamento. Foram retiradas amostras de sangue para análises, os linfonodos mesentéricos e os macrófagos peritoneais.

3.4 METODOLOGIAS DOS ENSAIOS UTILIZANDO LINFÓCITOS

3.4.1 Obtenção de Linfócitos

Dos animais sacrificados, os linfonodos mesentéricos foram retirados e dissecados. Os linfócitos foram obtidos por compressão destes tecidos em cilindro de malha, composto por dois cilindros de aço inox de diferentes diâmetros, de modo que um se encaixe no outro, cujas extremidades contêm um sistema de malha. Através deste sistema foram obtidos linfócitos íntegros e isolados de gordura (VIEIRA *et al.*, 1990). Os linfócitos foram mergulhados em solução salina 0,9% e posteriormente filtrados em papel filtro especial (Whatman nº 105), centrifugados (Eppendorf Centrifuge 5810 R) a 1200-1400 rpm, 4°C, durante seis minutos. Após a centrifugação, os linfócitos foram ressuspensos, filtrados e mergulhados em solução hemolítica por 15 minutos, em banho Maria a 37°C, para remoção das hemácias.

3.4.2 Capacidade proliferativa de linfócitos

Uma vez isolados os linfócitos (2×10^5 células por poço) foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e na presença de antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 wells (volume final de 200 μ L), a 37° C em atmosfera de 95% O₂ / 05% CO₂, por 72 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/poço de solução do mitógeno Concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após este período, as células foram contadas em citometria de fluxo, durante 30s. Os dados foram expressos em porcentagem do controle sem estimulação.

3.5 METODOLOGIAS DOS ENSAIOS UTILIZANDO MACRÓFAGOS

3.5.1 Obtenção de Macrófagos

Para obtenção de macrófagos peritoneais, os animais após decapitação foram inoculados com 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS – estéril), pH 7,4 na cavidade peritoneal. Trinta segundos após a administração, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido, contendo as células, foi aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur de plástico, estéril. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em 3 mL de PBS.

3.5.2 Soluções

Os reagentes usados na preparação das soluções foram obtidos da Reagen (Quimibrás Industria Química Ltda, RJ). Solução de tampão fosfato salina, pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consistiu de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro (Sigma) foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e a solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 20 mL da solução estoque em 5 mL de PBS. A solução de vermelho fenol (Sigma) para os ensaios de produção de H₂O₂ consistiu de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/mL peroxidase "horseradish" (Sigma) em PBS pH 7,4 a 340 mOsm, e previamente adicionou-se 0,05% de zymosan (2,3 x 10⁸ partículas/mL - Sigma), para os ensaios de fagocitose, obtendo-se uma solução diluindo-se 40 mg de zymosan em 6 mL de PBS e adicionou-se 600 µL de vermelho neutro.

3.5.3 Atividade Fagocítica

Utilizou-se o método descrito por PIPE e colaboradores (1995). Foram depositados 100 µL da solução de macrófagos obtidos como descrito acima, em placa do tipo ELISA e adicionou-se 10 mL de zymosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Após este procedimento, adicionou-se 100 µL de fixador para interromper o processo de fagocitose. Trinta minutos depois, a placa foi lavada com PBS e, posteriormente, centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm, a fim de remover o zymosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração. Após 30 minutos, procedeu-se a leitura das placas a 550 nm utilizando-se leitor de Elisa Microplate reader Bio-rad – (Benchmark). Os dados foram expressos em absorbância (nm).

3.5.4 Mensuração do Ânion Superóxido

Foi mensurado pelo método descrito por PIPE e colaboradores (1995), onde ocorre redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Em uma placa tipo ELISA alíquotas de 100 µl de solução contendo macrófagos foram adicionadas aos pocinhos e em seguida se adicionou 100 µl de NBT (2,5 mg/ml em PBS) contendo 5 mg/ml de zymosan por 30 minutos. Para ativar os macrófagos utilizou-se 10 µL de éster de forbol miristato acetato (PMA – 5 µg/mL). As células foram centrifugadas (1.500 rpm por 5 minutos) lavadas com PBS e centrifugadas novamente. Após fixadas com 100 µl de metanol 50% e incubadas por 10 minutos, foram então centrifugadas novamente e secas com ar quente. Em seguida as células foram solubilizadas com 120 µl de KOH 2M e 140 µl de dimetil sulfóxido (DMSO). Após 30 minutos de incubação, procedeu-se a leitura da placa utilizando Microplate reader Bio-rad – (Benchmark) a 550 nm. Os dados foram expressos em absorbância (nm).

3.5.5 Volume lisossomal

Para esta análise utilizou-se o método descrito por PIPE e colaboradores (1995), onde em placa do tipo ELISA depositou-se 100 μ L da solução de macrófagos e adicionou-se 20 μ L de vermelho neutro a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os *well* lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 μ l de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando espectrofotômetro Microplate reader Bio-rad – (Benchmark). Os dados foram expressos em absorbância (nm).

4.0 ANÁLISES SÉRICAS

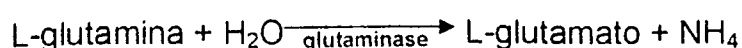
4.1 Mensuração da glicose plasmática

A glicose foi quantificada por método colorimétrico, utilizando-se sistema enzimático de glicose PAP (Labetest Diagnóstica –MG), seguindo-se as especificações do fabricante. A leitura foi feita em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia Biotech) a 505 nm.

4.2 Mensuração de glutamina plasmática

A determinação de glutamina plasmática foi realizada segundo a metodologia descrita por LUND (1985). A determinação de L-glutamina no plasma foi realizada em duas etapas:

Reação A: deaminação da L-glutamina para L-glutamato



Reação B: desidrogenação do L-glutamato para α -cetoglutarato acompanhada pela redução do NAD^+ + H_2O $\xrightarrow{\text{glutamato desidrogenase}}$ α -cetoglurato + NH_4^+ + NADH

A conversão de NAD^+ para NADH foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm, sendo esta conversão proporcional à quantidade de L-glutamina inicial.

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, e foram submetidos a ANOVA, seguido de pós teste de TUKEY, com nível de significância para $p < 0,05$ e, teste t de *Student*, quando indicado.

6.0 RESULTADOS

Não houve diferença estatística significativa na glicemia e na glutaminemia.

Houve diferença estatística significativa na taxa de proliferação linfocitária dos linfócitos retirados dos linfonodos mesentéricos. E também houve diferença estatística significativa na produção do ânion superóxido, volume lisossomal e índice de fagocitose dos macrófagos retirados do peritônio.

No grupo EX/GLN a proliferação linfocitária foi 19,22% maior, quando comparada ao grupo EX. No grupo GLN foi 5,52% maior, quando comparada a do grupo EX. No grupo CTL foi 3,4% maior, quando comparada a do grupo EX.

A produção do ânion superóxido pelos macrófagos do grupo EX/GLN foi 39,74% maior, quando comparada à do grupo EX; foi 25,51% maior, quando comparada à do grupo CTL e, foi 6,65% maior, quando comparada à do grupo GLN. Ainda no grupo GLN a produção foi 31,01% maior, quando comparado ao grupo EX e, foi 17,68% maior, quando comparada à do grupo CTL.

O volume lisossomal no grupo EX/GLN foi significativamente maior (21,62%), quando comparado ao dos macrófagos dos animais do grupo EX, bem como ao dos grupos CTL (6%) e GLN (3,17%). Em adição, no grupo GLN este estava maior quando comparado ao do grupo EX (17,8%) e ao do grup CTL (2,8%).

O índice de fagocitose no grupo EX/GLN foi 26,97% e 13,75% maior quando comparado ao do grupo EX e CTL, respectivamente.

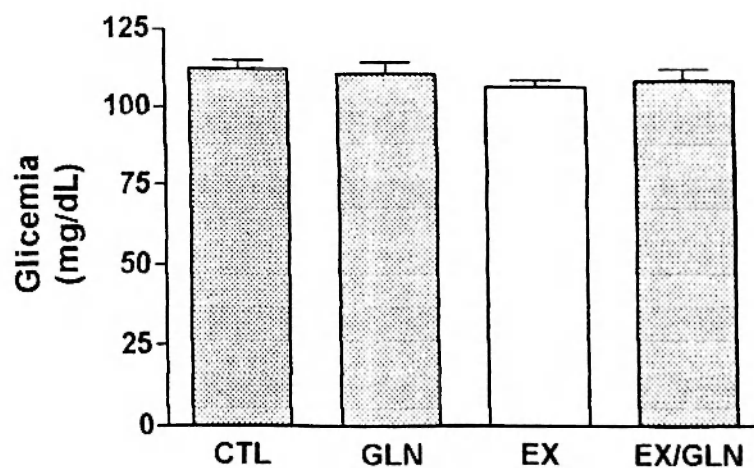


Figura 7. Concentração sérica de glicose (mg/dL) dos animais dos grupos: (CTL) - não treinados sem suplementação; (GLN) não treinados e suplementados; (EX) - treinados sem suplementação; (EX/GLN) - treinados e suplementados. Os dados representam a média \pm EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos.

DADOS	CTL	GLN	EX	EX/GLN
MEDIA	112,50	110,70	106,50	108,30
EPM	2,81	3,63	2,34	3,95

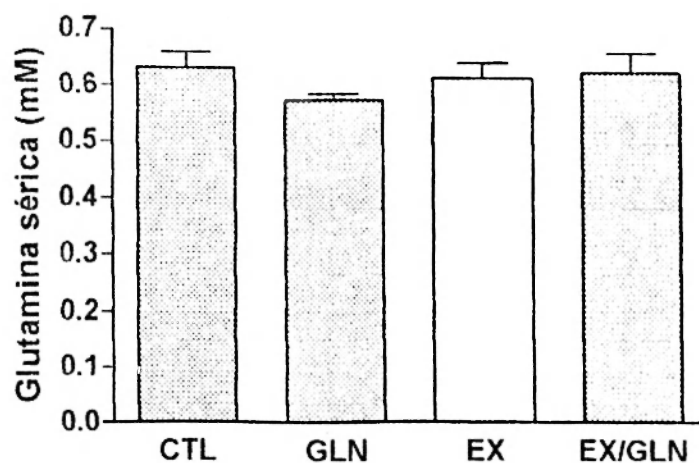


Figura 8: Concentração sérica de glutamina (mM) dos animais dos grupos: (CTL) – não treinados sem suplementação; (GLN) – não treinados e suplementados; (EX) - treinados sem suplementação; (EX/GLN) - treinados e suplementados. Os dados representam a média \pm EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos.

DADOS	CTL	GLN	EX	EX/GLN
MÉDIA	0,63	0,57	0,61	0,62
EPM	0,03	0,01	0,03	0,03

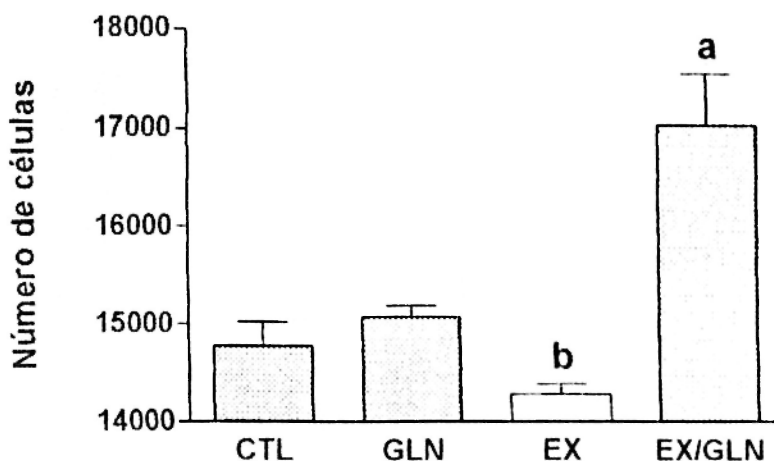


Figura 9: Proliferação dos linfócitos animais dos grupos: (CTL) – não treinados sedentários sem suplementação; (GLN) – não treinados e suplementados; (EX) - treinados sem suplementação; (EX/GLN) treinados e suplementados. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0.0001$) quando comparada ao grupo (EX).

a) diferença significativa ($p < 0.001$) quando comparada ao grupo (CTL);

a) diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparada ao grupo (GLN);

b) diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparada aos grupos (CTL); (GLN), analisado pelo teste "t".

DADOS	CTL	GLN	EX	EX/GLN
MÉDIA	14772	15075	14286	17032
EPM	252	116	102	517

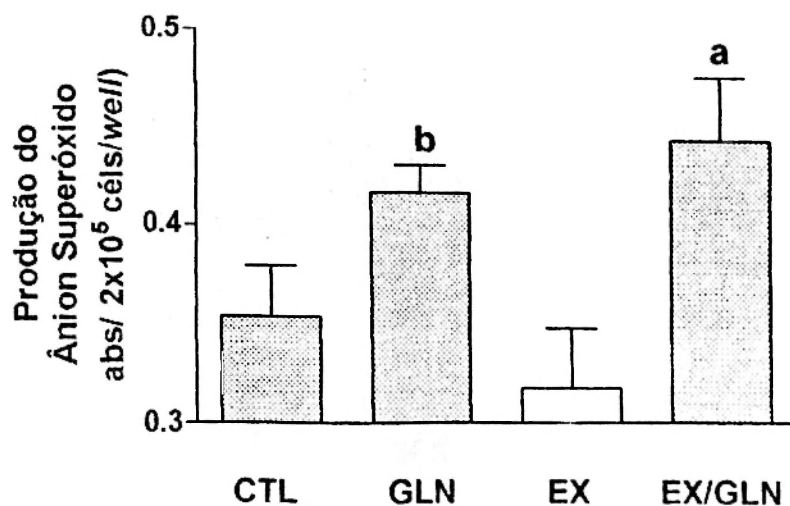


Figura 10: Produção do ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos grupos: (CTL) – não treinados sem suplementação; (GLN) – não treinados e suplementados; (EX) - treinados sem suplementação, (EX/GLN) - treinados e suplementados. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos (CTL); (EX)

b) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos (CTL); (EX), analisado pelo teste "t".

DADOS	CTL	GLN	EX	EX/GLN
MÉDIA	0,35	0,42	0,32	0,44
EPM	0,02	0,01	0,03	0,03

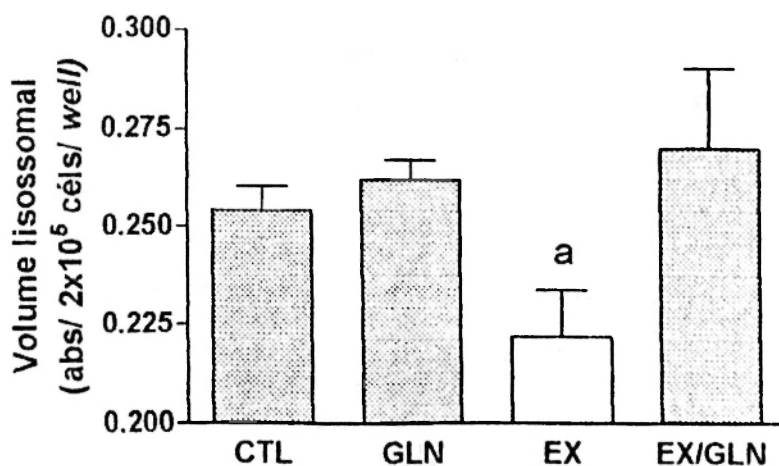


Figura 11: Volume lisossomal dos macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos grupos: (CTL) – não treinados sem suplementação; (GLN) – não treinados e suplementados; (EX) - treinados sem suplementação; (EX/GLN) - treinados e suplementados. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos (CTL); (GLN); (EX/GLN), analisado pelo teste t.

DADOS	CTL	GLN	EX	EX/GLN
MÉDIA	0,25	0,26	0,22	0,27
EPM	0,006	0,005	0,012	0,021

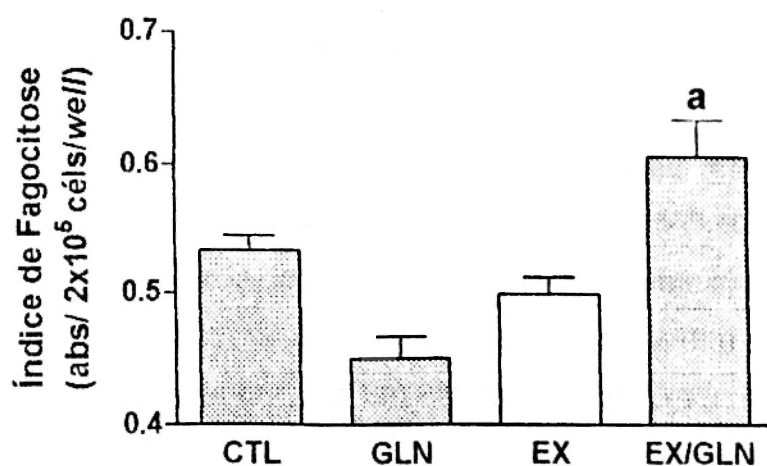


Figura 12: Índice de fagocitose dos macrófagos peritoneais obtidos dos animais dos grupos. (CTL) – não treinados sem suplementação; (GLN) – não treinados e suplementados; (EX) - treinados sem suplementação; (EX/GLN) - treinados e suplementados. Os dados representam a média \pm EPM.

a) diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos (CTL); (GLN); (EX).

CTL	GLN	EX	EX/GLN
0,533	0,4497	0,4775	0,6063
0,012	0,016	0,023	0,027

7.0 DISCUSSÃO

A glutamina é essencial para a proliferação e função adequada de linfócitos e para o funcionamento normal dos macrófagos (NEWSHOLME *et al.*, 1988; WALLACE; KEAST, 1992). A importância do metabolismo da glutamina pelos linfócitos foi comprovada pela observação de que essas células possuem atividade elevada da glutamina e que esta aumenta durante um estímulo imunológico *in vivo* (NEWSHOLME *et al.*, 1989).

Glicose e glutamina são avidamente utilizadas pelos linfócitos ativados, contudo, estes substratos são parcialmente oxidados, sendo a glicose convertida principalmente a lactato e a glutamina em glutamato, aspartato e lactato (ARDAWI; NEWSHOLME, 1983, 1984). As dietas contendo glutamina, ministradas via enteral quanto parenteral, em situações clínicas, têm sido mostradas ter efeitos benéficos na função intestinal e em particular, no sistema imunitário em humanos e animais. O estresse do exercício prolongado e exaustivo pode também baixar a concentração plasmática de glutamina. Isto pode, em parte, ser responsável pelo aparecimento de imunossupressão em atletas de endurance (CASTELL; NEWSHOLME, 1997a). De fato a concentração plasmática de glutamina está diminuída em atletas depois de exercício extenuante e prolongado (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1993), mas o mecanismo ainda não é conhecido (CASTELL *et al.*, 1996). Em nosso estudo não encontramos diferença estatística significativa nas concentrações séricas de glicose e glutamina, avaliadas após 2 dias do último dia de treinamento (figuras 7 e 8). Estes resultados podem ser, talvez, explicados pelo livre acesso dos animais a água e alimentação, antes do sacrifício, corroborando com a hipótese de Hiscock e colaboradores (2003), eles hipotetizaram que a suplementação com glutamina ou proteína rica em glutamina atenuaria a diminuição da concentração de glutamina plasmática induzida pelo exercício

Embora a depressão, no plasma, das concentrações de glutamina ocorram durante estados críticos de doença e outros estados severos traumáticos, o organismo tem mecanismos efetivos para controlar a homeostase da glutamina, mesmo quando a

ingestão é variável e há mudanças na demanda de glutamina. O organismo pode falhar nesta homeostase somente quando a massa corporal magra é severamente depletada, limitando assim a sua habilidade em converter os estoques de proteína em glutamina livre (LABOW *et al.*, 2001). Concentração plasmática de glutamina foi monitorada por um período de 21 horas em 4 voluntários saudáveis sem restrições dietéticas e foi encontrado estar habitualmente aumentada depois de 2 horas da ingestão de uma refeição contendo proteínas (CASTELL *et al.*, 1995).

Castell e Newsholme (1997a), administraram na água de beber glutamina 0,1 g/kg de massa corporal e 5 g/sujeito no máximo, observaram que houve aumento significativo na concentração de glutamina plasmática dentro de 30 minutos em humanos saudáveis, e este nível retornou próximo ao de jejum depois de aproximadamente 2 horas. Shewchuk e colaboradores (1997), suplementaram ratos com glutamina (2% de peso úmido na alimentação), durante uma semana, e submeteram-los a 4 horas de exercício de natação, demonstraram que o exercício de natação não alterou a concentração plasmática de glutamina. Por outro lado, a concentração plasmática de glutamina foi mostrada estar aumentada em atletas depois de um exercício de pouca duração (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1992; POORTMANS *et al.*, 1974), inversamente, em atletas de exercícios exaustivos e prolongados tanto maratonas completas como sessões de treinamento intenso ela está diminuída (CASTELL *et al.*, 1996; PARRY-BILLINGS *et al.* 1992).

Nos estudos de Krzywkowski e colaboradores (2001 a,b), a concentração de glutamina do plasma foi mostrada estar diminuída por volta de 15% após 2 horas, no grupo placebo (maltodextrina), mas esta diminuição foi também abolida com suplementação de 3,5g e 17,5 g de glutamina em 500 mL de solução, respectivamente, e também com a suplementação com proteína, quando submetidos ao exercício em cicloergômetro de Krogh a 75% do VO_2 MÁX. Hiscock e Pedersen (2002), mostraram que depois de repetidas séries de exercício de alta intensidade, a concentração plasmática de glutamina pode somente diminuir, significativamente, algumas horas na recuperação. Esta diminuição de glutamina plasmática, depois de exercício exaustivo, pode ser um fator responsável pela alta incidência de imunossupressão presente no

atleta de endurance (CASTELL *et al.*, 1996). Parry-Billings e colaboradores (1990), reportaram que atletas com a síndrome do *overtraining* apresentam baixa concentração plasmática de glutamina, a qual manteve-se baixa mesmo depois de muitas semanas de descanso. Isto foi diferente do nosso trabalho, pois não encontramos diferenças, após dois dias do último dia de treinamento.

Exercício de intensidade apropriada é potente estimulador para a secreção de GH e cortisol (KANALEY *et al.*, 2001). Em animais tratados com dexametasona durante 8 dias, a concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio diminuiu em 45% em relação ao controle (HUNDAL *et al.*, 1991). É possível que a liberação de glutamina da musculatura esquelética tenha suprido a glutamina plasmática por estímulos da IL-6 na produção do cortisol (figura 5), para uma possível gliconeogênese renal para suprir uma necessidade energética na situação de depleção de estoques de glicogênio muscular, e importante também para o tamponamento da acidez do íon H^+ pela NH_3 , que é derivada da desaminação da glutamina, convertendo-se no íon NH_4^+ . TNF- α e IL-6 aumentam a produção hipotalâmica de CRH o qual atua na secreção de ACTH pela adeno-hipófise e este estimula a liberação de cortisol pelas suprrenais (GRIFFIN; OJEDA, 1996, p.75). O aumento na disponibilidade de glutamina aumentaria o seu próprio transporte para dentro do músculo, e este acúmulo acarretaria em maior produção de IL-6 pela musculatura ativa. Em relação ao sistema imunitário, a IL-6 pode exercer efeito indireto na queda da proliferação linfocitária, figura 9, pela estimulação da liberação de cortisol, pois este é conhecido pela sua atividade imunossupressora. Em recentes estudos de Pedersen e colaboradores (2003), demonstraram que a liberação de IL-6 pelo músculo esquelético em atividade está relacionada positivamente à intensidade do trabalho, captação de glicose e concentração de adrenalina plasmática. Além disso, foi observado correlação inversa entre a alta liberação de IL-6 tardiamente durante o exercício e o conteúdo de glicogênio ao final do exercício. Estes achados estão de acordo com a hipótese de que a IL-6 contribui para a homeostase da glicose durante o exercício (HELGE *et al.*, 2002).

Apesar da concentração de glutamina no plasma não ser diferente entre os grupos (figura 8), a proliferação linfocitária foi maior no grupo EX/GLN quando

comparada à dos grupos CTL, GLN e EX. O grupo EX apresentou imunodepressão quando comparado com os 3 grupos. Muitas evidências sugerem que a glutamina é usada em altas taxas pelos linfócitos e macrófagos, mesmo em estado quiescente (NEWSHOLME, 1994). Moriguchi e Niwa (1995), demonstraram que a suplementação com glutamina em ratos preveniu a diminuição induzida pelo exercício, tanto da concentração plasmática com glutamina quanto da proliferação linfocitária. Estes autores concluíram que a suplementação com glutamina pode ter exercido efeito, afetando diretamente a responsividade de linfócitos frente a mitógenos via disponibilização aumentada de combustível. A influência da glutamina na resposta proliferativa de linfócitos também foi examinada em ratos (ARDAWI; NEWSHOLME, 1983; SZONDY; NEWSHOLME, 1989), e resultados similares foram obtidos com proliferação ótima em concentrações plasmática de ~600mM de glutamina (ARDAWI; NEWSHOLME, 1983). Moraska e colaboradores (2000), submeteram ratos a período de treinamento durante 8 semanas, em esteira, a 75% do VO_2 MAX. Demonstraram que a proliferação dos linfócitos, retirados dos linfonodos mesentéricos estimulados *ex vivo*, estava diminuída significativamente, quando comparada à dos sedentários. No estudo de Castell e Newsholme (1998), foi mostrado diminuição de 30% no número de linfócitos circulantes nos primeiros 15 minutos de corrida. Num trabalho realizado em corredores de maratona, suplementados previamente com glutamina, foi observado que o número de linfócitos circulantes foram restaurados, e níveis basais restaurados 16 horas após a maratona. Estes dados corroboram os nossos dados, pelo grupo EX, mostrado na figura 9. Krzywkowski e colaboradores (2001a), suplementaram dez atletas com 3.5g de glutamina/ 500mL na água de beber e os submeteram a exercício em bicicleta ergométrica. Demonstraram que a suplementação foi hábil em abolir o declínio da glutamina plasmática, mas não induziu a efeito imunoestimulatório, como observado por nós (figura 9). Pedersen e colaboradores (1999), tiveram resultados em que a suplementação com glutamina aboliu o declínio da concentração plasmática de glutamina induzida pelo exercício, entretanto a resposta imunitária não foi afetada após o exercício. Estes dados diferentes dos nossos podem ser explicados pelos diferentes

protocolos. De fato, eles verificaram logo após ou até duas horas após o exercício, enquanto o nosso estudo verificou dois dias após o último dia de treinamento.

Tem sido observado que atletas ficam vulneráveis a agentes infecciosos por muitas horas depois de exercício exaustivo e prolongado e que isto pode ser, parcialmente, devido à diminuição da disponibilidade de glutamina plasmática. Em contraste, exercício de baixa intensidade e regular parece ser benéfico para o sistema imunitário (NIEMAN, 1997). Foi investigado por Castell e colaboradores (1996), a incidência de doença durante os 7 dias depois do exercício extenuante. Mais de 200 atletas participando de diferentes modalidades de esportes como remo, maratona ou corrida de meia distância. Os níveis de infecções relatados pelo mesmos foram menores em corredores de meia distância e elevados em corredores depois de uma ultramaratona completa e em remadores de elite, depois de um período de treinamento de inverno intensivo. A maioria das doenças reportadas foram DTRS. A incidência de doenças, nos corredores de maratona que consumiram glutamina foi significativamente menor (32%), do que no grupo placebo (n=151). Existe evidência, *in vitro*, de que a habilidade proliferativa de linfócitos obtidos de atletas depois exercício de endurance, é menor (FRY *et al.*, 1992; SHINKAI *et al.*, 1992).

Trabalhos (WATFORD *et al.*, 1979; ARDAWI; NEWSHOLME, 1983; KOVACEVIC; McGIVAN, 1983; BRAND *et al.*, 1984; NEWSHOLME *et al.*, 1987; NEWSHOLME *et al.*, 1988), demonstraram que os macrófagos, embora considerados células terminais (GORDON, 1986), apresentam taxas elevadas de utilização de glicose e glutamina, à semelhança de células de divisão rápida tais como linfócitos, enterócitos, timócitos e células tumorais. Macrófagos ativados apresentam produção elevada de O_2^- e H_2O_2 , aumentando, assim, a sua capacidade microbicida e tumoricida. Em adição tem aumento do tamanho celular, do conteúdo de lisossomos e da capacidade fagocitária. O macrófago ativado sintetiza e libera diversas citocinas (NATHAN *et al.*, 1984; RAPOLLE; WERB, 1988; ADAMS; HAMILTON, 1992; WALLIS; ELLNER, 1994).

A produção de ânion superóxido foi maior no grupo EX/GLN quando comparada à dos 3 grupos e no grupo EX menor comparada com os 3 outros grupos (figura 10). Isto sugere que a glutamina está envolvida na via metabólica da formação desse radical livre, pela produção no TCAI de α -cetoglutarato e NADPH, e que na sua ausência ou redução, há comprometimento na produção desse radical livre para destruir agentes invasores. O NADPH é utilizado na lipogênese, importante para a reposição da membrana internalizada, e como substrato para a NADPH-oxidase na geração de ânion superóxido (NEWSHOLME *et al.*, 1989; NEWSHOLME *et al.*, 1987). A velocidade de utilização da glutamina é influenciada pela disponibilidade da glutamina, por fatores hormonais, pelo transporte através da membrana plasmática ou mitocondrial e pela velocidade catalítica máxima da enzima-chave, a glutaminase. Esta enzima, em macrófagos, apresenta alta atividade catalítica necessitando da presença de íons fosfato para produzir glutamato, amônia e NADPH (CURI, 2000, p.191). A atividade da glutaminase pode ser alterada pela dieta e vários hormônios, tais como glicocorticóides (SERRANO *et al.*, 1993), catecolaminas (COSTA ROSA *et al.*, 1991), insulina e hormônios tireoideanos (COSTA ROSA *et al.*, 1992). Estes hormônios, principalmente o cortisol e as adrenalina, estão diretamente diretamente ligados a atividade física de longa duração e alta intensidade, para suprir as concentrações plasmáticas de glicose e glutamina

Nos lisossomos são armazenados enzimas líticas para a degradação de matérias intra e extra-celulares, no processo de digestão intra-celular. O volume lisossomal foi maior no grupo EX/GLN quando comparado ao dos demais grupos, e o do grupo EX estatisticamente menor que os outros 3 grupos. Isto demonstra, figura 11, que o exercício tem características de reduzir a capacidade de produzir ou armazenar essas enzimas e que a suplementação foi hábil em impedir esta ação provocada pelo exercício. Devido às necessidades de precursores biossintéticos, podemos entender as altas taxa de glicose e glutamina utilizadas pelo macrófago. Na glicólise parcial temos como produto da primeira reação, catalisada pela hexoquinase, a formação de glicose-6-fosfato, que pode ser desviada para a via das pentoses, numa reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase. Na via das pentoses ocorre a formação de NADPH e

ribose-5-fosfato (NEWSHOLME *et al.*, 1989; NEWSHOLME; NEWSHOLME; CURI, 1987), então há formação de RNAm, importante para síntese das enzimas lisossomais, assim, aumentando o volume do lisossomo.

Outra característica importante do macrófago é a fagocitose, a qual está aumentada no grupo EX/GLN quando comparada aos demais grupos figura 12. Isto nos leva a sugerir que a suplementação impediu a redução na resposta fagocítica produzida pelo exercício.

Ceddia e Woods (1999), mostraram que o exercício suprime a capacidade apresentadora de antígeno do macrófago. Quatro dias consecutivos de exercício exaustivo resultaram na depressão da habilidade do macrófago em apresentar antígenos para as células T. Assim, é possível que algumas das supressões imunitárias depois de exercício exaustivo repetido (NIEMAN, 1997), devem-se em parte, por diminuição na apresentação de antígenos pelo macrófago aos linfócitos T (CEDDIA, WOODS, 1999). Davi e colaboradores (1997), mostraram que resistência antiviral de macrófagos alveolares de camundongos é suprimida 8 horas após exercício extremo e prolongado até a fadiga. Este efeito é devido, em parte, pelo aumento de catecolaminas circulantes. Muitos estudos têm mostrado importantes relatos da teoria da "janela aberta", período em que o organismo torna-se imunodeprimido, sujeito a contrair a infecções por organismos estranhos. Parry-Billings e colaboradores (1990); Newsholme e Calder (1997), mostraram que a capacidade de fagocitose por macrófagos peritoneais e a taxa de produção de citocinas de camundongos é dependente de glutamina, havendo diminuição quando a taxa da concentração plasmática de glutamina foi $<600\mu\text{M}$. Em ratos com sepsis, foi mostrado que suplementação parenteral com glutamina, parcialmente, preveniu a diminuição da blastogênese linfocitária e aumentou o índice de fagocitose quando comparada com a nutrição parenteral padrão (YOSHIDA *et al.*, 1993).

Portanto, a suplementação com L-glutamina no grupo EX/GLN foi capaz de estimular os parâmetros da resposta do macrófago, evitando os efeitos deletérios da atividade física de longa duração e alta intensidade. A produção do ânion superóxido, fagocitose e capacidade lítica, funções que expressam a atividade antimicrobiana do

macrófago, também são alteradas pelas variações na concentração de glicil-glutamina em monócitos humanos, nos experimentos de incubação (RÜGGEBERG *et al.*, 1997).

Segundo Curi (2000, p.195), o metabolismo de glutamina pode modular a capacidade fagocítica, secretória, apresentação de antígenos e a diferenciação de células monocíticas. Assim, alterações no metabolismo da glutamina em macrófagos podem constituir no mecanismo para explicar a ocorrência elevada de infecções em certas condições patológicas. Baseado em nossos achados, atletas que se submetem a este tipo de treinamento, ou similar, podem ter benefícios tanto na imunidade inata, quanto na adquirida, e conseqüentemente, diminuir o risco de adquirir doenças, em particular, às do trato respiratório superior (DTRS), se consumirem L-glutamina em doses adequadas, durante o treinamento. Se há benefício quando da administração prévia ao treinamento, isto deve ser investigado.

8.0 CONCLUSÃO

A suplementação com L-glutamina (0,125g/kg de peso corporal do animal), a animais submetidos a treinamento de natação durante 6 semanas, com sobrecarga de 6% da massa corporal do animal, foi capaz de:

- Evitar a imunossupressão causada pelo exercício intenso e de longa duração, observada no grupo exercitado (EX), determinada através da proliferação linfocitária.

- Aumentar a resposta fagocítica, a produção de ânion superóxido e volume lisossomal dos macrófagos no grupo (EX/GLN), quando comparado ao grupo (EX).

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997.

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. Molecular basis of macrophage activation: The macrophage. **Eds. C.E. Lewis & J.O'D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, 75-105, 1992.**

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, 2: 283-318, 1984.

AGUILÓ A.; CASTAÑO E.; TAULER P. Participation of blood cells in the changes of blood amino acid concentrations during maximal exercise. **J. Nutrition Biochemistry**, 11: 81-86, 2000.

AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv. Immunol.**, 54: 1-78, 1993.

ANTONIO, J.; STREET, C. Glutamine: a potentially useful supplement for athletes. **Can. J. Appl. Physiol.**, 24: 1-14, 1999.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Intracellular localization and properties of phosphate-dependent glutaminase of rat mesenteric lymph nodes. **Biochem. J.**, 217: 289-296, 1984.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem. J.**, 212: 835-842, 1983.

BABIJ, P.; HUNDAL, H.S.; RENNIE, M.J.; WATT, P.W. Effects of corticosteroid on glutamine transport in rat skeletal muscle. **J. Physiol. Lond.**, 374: 35P, 1986.

BARBIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, 93, 1464-1476, 1999.

BARBIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, 73: 599-601, 1984.

BASSIT, R.A.; SAWADA L.A.; BACURAU, R.F.P.; NAVARRO F.; COSTA ROSA, L.F.B.P. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 32(7): 1214-1219, 2000.

BATERMAN, A.; SINGH, A.; KIAL, T.; SOLOMON, S. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocr. Rev.**, 10: 92-112, 1989.

BLANCHARD, M.A.; JORDAN G.; DESBROW B. The influence of diet and exercise on muscle and plasma glutamine concentrations. **Med. Sci Sports Exerc.** 33(1): 69-74, 2001.

BRAND, K; WILLIAMS, J.F.; WEIDEMANN, M.J. Glucose and glutamine metabolism in rat thymocytes. **Biochem. J.**, 221: 471-475, 1984.

BRENNER, I.K.M.; SHEK, P.N.; SHEPHARD, R.J. Infection in athletes. **Sports Med.**, 17: 86, 1994.

BRODIE, A.F.; LIPMANN, F. Identification of a gluconalactonase. **J. Biol. Chem.**, 212: 677-685, 1985.

BROZNA, J.P.; HAUFF, N.F.; PHILLIPS, W.A.; JOHNSTON Jr., R.B. Activation of the respiratory burst in macrophages. **J. Immunol.**, 141: 1642-1647, 1988.

BRUCE M.; TEODOSIU D.C.; GREENHAFF P.L. Glutamine supplementation promotes anaplerosis but not oxidative energy delivery in human skeletal muscle. **AJP – Endocrinology and Metabolism.** 280(4): E669-E675, 2001.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr. Rev.** 56: S70-S83, 1998a.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proc. Nutr. Soc.** 57: 487-502, 1998b.

CASTELL, L.M. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and in immunodepression. **Sports Med.**, 33(5): 323-345, 2003.

CASTELL, L.M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition.** 18: 371-375, 2002.

CASTELL, L.M.; NEWSHOLME E.A. Glutamine and the effects of exhaustive exercise upon the immune response. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 76: 524, 1998.

CASTELL, L.M.; NEWSHOLME E.A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition.** 13: 738-742, 1997a.

CASTELL, L.M.; POORTMANS, J.R.; LECLERCQ, R.; BRASSEUR, M.; DUCHATEAU, J.; NEWSHOLME, E.A. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 75: 47-53, 1997b.

CASTELL, L.M.; POORTMANS J.R.; NEWSHOLME E.A. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? **Eur. Journal Apply Physiology**. 73: 488-490, 1996.

CASTELL, L.M.; LIU, C.T.; NEWSHOLME, E.A. Diurnal variation of plasma glutamine in normal and fasting humans. **Proc. Nutr. Soc.**, 54: 118A, 1995

CEDDIA, M.A.; WOODS, J.A. Exercício suppresses macrophage antigen presentation. **J. Appl. Physiol.**, 87(6): 2253-2258, 1999.

CHIEN, S. Role of the sympathetic nervous system in hemorrhage. **Physiol. Rev.**, 47: 214-288, 1967.

COONEY, G.; CURI, R.; MITCHELSON, A.; NEWSHOLME, P.; SIMPSON, M.; NEWSHOLME, E.A. Activities of some key enzymes of carbohydrate, ketone body adenosine and glutamine metabolism in liver and brown and white adipose tissues of the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 138: 687-692, 1986

COONEY, G.; NEWSHOLME, E.A. Does brown adipose tissue have a metabolic role in the rat? **Trends Biochem. Sci.**, 9: 303-305, 1984.

COSTA ROSA, L.F.B.P.; CURY, Y.; CURI, R. Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the Krebs cycle in rat macrophages. **J. Endocrinol.**, 135: 213-216, 1992.

COSTA ROSA, L.F.B.P.; CURY, Y.; CURI, R. Hormonal control of macrophage function and glutamine metabolism. **Bioch. Cell Biol.**, 69: 309-312, 1991

CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E.A. A quantitative approach to metabolic control. **Curr. Top. Cell Regul.**, 25: 21-76, 1985.

CRESSWELL, P. Intracellular Class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalised by receptor-mediated endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. - USA**, 82: 8188-8192, 1985.

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

CURI, R.; NEWSHOLME, E.A. The effect of adenine nucleotides on the rate and fate of glutamine utilization by incubated mitochondria isolated from rat mesenteric lymph nodes. **Mol. Cell Biochem.**, 86:71-76, 1989.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. **Biochem. J.**, 250:383-388, 1988.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 138: 318-322, 1986.

CURY, Y. **Influências hormonais sobre a mobilização, endocitose e aderência de macrófagos *in vivo* e *in vitro***. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1986.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **J. Biol. Chem.**, 218: 607-617, 1955.

FEBBRAIO, M.A.; PEDERSEN, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J.** 16: 1335-1347, 2002

FIDELIUS, R.K.; GINOUVES, P.; LAWRENCE, D.; TSAN, M.F. Modulation of intracellular glutathione concentration alters lymphocyte activation and proliferation. **Exp. Cell Res.**, 170: 26275, 1987.

FITZGERALD L. Overtraining increases the susceptibility to infection. **Int. J. Sports Med.**, 12: 55, 1991.

FRY, R.W.; MORTON, A.R.; CRAWFORD, G.P.M.; KEAST, D. Cell numbers and *in vitro* responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 64: 218-227, 1992.

FURTH, R. van; DIESSELHOFF-den DULK, M.M.C.; MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med.**, 138: 1314-1330, 1973.

GARCIA-LEME, J. In: **Hormones and inflammation**. Boca Raton, Flórida, 1989.

GASTMANN, U. A.; LEHMANN, M. J. Overtraining and the BCAA hypothesis. **Med. Sci. Sports Exerc.** 30 (7): 1173-1178, 1998.

GIBALA M.J.; MACLEAN D.A.; GRAHAM T.E.; SALTIN B. Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size and estimated cycle flux in human muscle during exercise. **AJP – Endocrinology and Metabolism.** 275 (2): E235-E242, 1998.

GIBALA, M.J. Regulation of skeletal muscle amino acid metabolism during exercise. **Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.**, 11: 87-108, 2001.

GRAHAM, T.E.; TURCOTTE, L.P.; KIENS, B. & RICHTER, E.A. Training and muscle ammonia and amino acid metabolism in humans during prolonged exercise. **J. Appl. Physiol.**, 78: 725-735, 1995.

GRAHAM, T.E.; TURCOTTE, L. P.; KIENS, B.; RICHTER, E. Effect of endurance training on ammonia and amino acid metabolism in humans. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 29 (5): 646-653, 1997.

GRAHAM, T.E.; MACLEAN, D.A. Ammonia and amino acid metabolism in skeletal muscle: human, rodent and canine models. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 30 (1): 34-46, 1998.

GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R. **Textbook of Endocrine Physiology**. Oxford University Press, 1996.

HLASIWETZ, H.; HABERMANN, J. Ueber die proteinstoffe. **Ann. Chem.**, 169: 150-166, 1873.

HEATH, G.W.; FORD, E.S.; CRAVEN, T.E. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 23: 152, 1991.

HELGE, J.W.; STALLKNECHT, B.; PEDERSEN, B.K.; GALBO, H.; KIENS, B.; RICHTER, E.A. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** (Lond)(In Press), 2002.

HISCOCK, N.; PEDERSEN, E.W.; KRZYWKOWSKI, K.; BOZA, J.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; PEDERSEN, B.K. Glutamine supplementation further enhances exercise-induced plasma IL-6. **J. Appl. Physiol.**, 95: 145-148, 2003.

HISCOCK, N.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced immunodepression-plasma glutamine is not the link. **J. Appl. Physiol.**, 93: 813-822, 2002.

HISCOCK, N.; MACKINNON, L.T. A comparison of plasma glutamine concentration in athletes from different sports. **Med. Sci. Sports Exerc.** 30 (12): 1693-1696, 1998.

HUNDAL, H.S.; BABIJ, P.; TAYLOR, P.M.; WATT, P.W.; RENNIE, M.J. Effects of corticosteroid on the transport and metabolism of glutamine in rat skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1092: 376-383, 1991.

HUNDAL, H.S.; RENNIE, M.J.; WATT, P.W. Characteristics of L-glutamine transport in perfused rat skeletal muscle. **J. Physiol.**, 393: 283-305, 1987.

JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; BROADBENT, P.; PELL, J.M.; MILLWARD, D.J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, 255 (Endocrinol. Metab. 18): E166-E172, 1988.

KANALAY, J.A.; WELTMAN, J.Y.; PIEPER, K.S.; WELTMAN, A.; HARTMAN, M.L. Cortisol and growth hormone responses to exercise at different times of day. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 86(6): 2881-2889, 2001.

KOKUBUN, E. **Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos**. São Paulo, SP. Tese de Doutorado, 1990.

KOVACEVIC, Z.; MCGIVAN, J.D. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiologic significance. **Physiol. Rev.**, 63: 547-605, 1983.

KOWALCHUCK, J.M.; CURI, R.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. **Biochem. J.**, 249: 705-708, 1988.

KREBS, H.A. Aspects of metabolic regulation. **Febs Lett.**, 117: K1-K85, 1980.

KREBS, H. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem. J.**, 33: 1951-1969, 1935.

KREIDER, R.B. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Med.**, 27: 97-110, 1999.

KRISHNA, M.G.; COKER, R.H.; LACY, C.D.; ZINKER, B.A.; HALSETH, A.E.; WASSERMAN, D.H. Glucagon response to exercise is critical for accelerated hepatic glutamine metabolism and nitrogen disposal. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 279: E638-645, 2000.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; DRISTENSEN, J.H.; BOZA, J.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in function lymphocyte. **Am. J. Cell Physiol.**, 281: C1259-C1265, 2001a.

KRZYWKOWSKI, K.; PETERSEN, E.W.; OSTROWSKI, K.; LINK-AMSTER, H.; BOZA, J.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine and protein supplementation on exercise-induced decreases in salivary IgA. **J. Appl. Physiol.**, 91: 831-838, 2001b.

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

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev.**, 48: 297-309, 1990.

LEHMANN, M.; FOSTER, C.; KEUL, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 25: 854-862, 1993.

LOIKE, J.D.; KABACK, E.; SILVERSTEIN, S.C.; STEINBERG, T.H. Lactato transport in macrophages. **J. Immunol.**, 150: 1951-1958, 1993.

MAUGHAN R.; GLEESON M.; GREENHAFF P.L. **Bioquímica do Exercício e do Treinamento**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2000.

McKEEHAN, W.L. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. **Cell Biol. Int. Rep.**, 6: 635-650, 1982.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, 52: 711-760, 1983.

MEISTER, A. Catalytic mechanism of glutamine synthetase: overview of glutamine metabolism. In: Glutamine: **Metabolism, Enzymology and Regulation**, edited by Mora J. and Palacios R., New York: Academic, 1-40, 1980.

MERCIER S.; BREUILLÉ D.; MOSONI L. Chronic Inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. **J. Nutrition**. 132: 1921-1928, 2002.

METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. **J. Cell Physiol.**, 77: 277-280, 1971.

MILENKOVIC, L.; RETTORI, V.; SNYDER, G.D.; BEUTLER, B.; McCANN, S.M. Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. – USA**, 86: 2418-2422, 1989.

MITCHELL, J.B.; PIZZA, F.X.; PAQUET, A.; DAVIS, B.J.; FORREST, M.B.; BRAUN, W.A. Influence of carbohydrate status on immune responses before and after endurance exercise. **J. Appl. Physiol.**, 84(6): 1917-1925, 1998.

MIYAZAKI, T.; SUZUKI, G.; YAMAMURA, K. The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance. **Int. Immunol.**, 5: 1023-1033, 1993.

MOOREN F.C.; LECHTERMANN A.; FROMME A. Alterations in intracellular calcium signaling of lymphocytes after exhaustive exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. 242-248, 2001.

MORASKA, A.; DEAK, T.; SPENCER, R.L.; ROTH, D.; FLESHNER, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, 279: R1321-R1329, 2000.

MORIGUCHI, S.; NIWA, H. Glutamine supplementation prevents the decrease of mitogen response after a treadmill exercise in rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** 41: 115-125, 1995.

NAGARAJU, K.; RABEN, N.; MERRITT, G.; LOEFFLER, L.; KIRK, K.; PLOTZ, P. A variety of cytokines and immunologically relevant surface molecules are expressed by normal human skeletal muscle cells under proinflammatory stimuli. **Clin. Exp. Immunol.**, 113: 407-414, 1998.

NATHAN, C.F.; PERDERGAST, T.J.; WIEBE, M.E.; STANLEY, E.R.; PLATZER, E.; REMOLD, H.G.; WELTE, K.; DUBRIS, B.Y.; MURRAY, H.W. Activation of human macrophage. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. **J. Exp. Med.** 160: 600-605, 1984.

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

NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition**. 13: 728-730. 1997.

NEWSHOLME, E.A. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. **Int. J. Sports Med.**, 15(3): S142-S147, 1994

NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S.M. **Glutamine metabolism in different tissues:** Its physiological and pathological importance. In: Kinney, J.M. Borum, P.R. Perspective in Clinical Nutrition, Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1989, p.71-98

NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CHALLONER, M.A.; ARDAWI, M.S.M. A role for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma and burns. **Nutrition**, 4: 261-268, 1988.

NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. The role of the citric acid cycle in cells of the immune system and its importance in sepsis, trauma and burns. **Biochem. Soc. Symp.**, 54: 145-161, 1987.

NEWSHOLME, E.A.; CRABTREE, B.; ARDAWI, M.S.M. Glutamine metabolism in lymphocytes, its biochemical physiological and clinical importance. **Q. J. Exptl. Physiol.**, 70: 473, 1985.

NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. *In: Biochemistry for the medical sciences*. John Wiley & Sons. Chichester, NY, Toronto, Singapore, 1983.

NEWSHOLME, E.A.; CRABTREE, B.; ZAMMIT, V.A. Use of enzyme activities as indices of maximum rates of fuel utilization. **Excerpta Med. Int. Congr. Ser.**, 1980, p. 245-258.

NIEMAN, D. Does exercise alter immune function and respiratory infections? **President's Council on Physical Fitness and Sports**. 13: 1-8, 2001.

NIEMAN, D. Immune response to heavy exertion. **J. Appl. Physiol.**, 82: 1385, 1997.

NIEMAN, D.; JOHANSEN, L.M.; LEE, J.W. ARABATZIS, K. Infectious episodes before and after the Los Angeles marathon. **J. Sports Med Phys. Fitness**. 30: 289, 1990.

PAPET I.; RUOT B.; BREUILLÉ D. Bacterial infection affects protein synthesis in primary lymphoid tissues and circulation lymphocytes of rats. **J.Nutrition**. 132: 2028-2032, 2002.

PARRY-BILLINGS, M.; MATTHEWS, V.J.; NEWSHOLME, E.A.; BUDGETT, R.; KOUTEDAKIS, J. The overtraining syndrome: some biochemical aspects. In: **MacLeod D.A.D.; MAUGHAN, R.J.; WILLIAMS, C. MADELEY, C.R.; SHARP, J.C.M; NUTTON, R.W.** (eds). Intermittent high intensity exercise E & FN Spon, London, 215-225. 1993.

PARRY-BILLINGS, M.; BUDGERR R.; KOUTEDAKIS, Y. Plasma amino acid concentration in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 24: 1353, 1992.

PARRY-BILLINGS, M.; BLOMSTRAND E.; McANDREW, N.; NEWSHOLME, E.A. A communicational link between skeletal muscle, brain, and cells of the immune system. **Int. Sports Med.**, 11: S122, 1990.

PARRY-BILLINGS, M; EVANS J.; CALDER, P.C.; NEWSHOLME E.A. Does glutamine contribute to immunosuppression? **Lancet**. 336: 523, 1990.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free radical Biology & Medicine**. 33(3): 311-322, 2002.

PEDERSEN, B.K.; STEENSBERG, A.; KELLER, P.; KELLER, C.; FISCHER, C.; HISCOCK, N.; HALL, G.V.; PLOMGAARD, P.; FEBBRAIO, M.A. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. **Eur. J. Physiol.**, 446: 9-16, 2003.

PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; JENSEN, M.; KRZYWKOWSKI, K.; OSTROWSKI, K. Exercise and immune function effect of ageing and nutrition. **Proc. Nutr. Society**. 58: 733-742, 1999.

PEDERSEN, B.K.; OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; BRUUNSGAARD, K. The cytokine response to strenuous exercise. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 76: 505-511, 1998.

PETERS, E.M.; GOETZCHE, J.M.; BROBBELAAR, B.; HOAKES, T.D. Vitamin C supplementation reduces the incidence of post-race symptoms of upper respiratory infection in ultramarathon runners. **Am. J. Clin. Nutr.**, 57: 170-174, 1993.

PINARDI, G.; TALMACIU, R.K.; SANTIAGO, E.; CUBEDDU, L.X. Contribution of adrenal medulla, spleen and lymph, to the plasma levels of dopamine beta-hydroxylase and catecholamines induced by hemorrhagic hypotension in dogs. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 209: 176-184, 1979.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech. Fish Immunol.**, 4: 93-100, 1995.

PITHON-CURI, T.C.; LEVADA, A.C.; LOPES, L.R.; DOI, S.Q.; CURI, R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47^{phox}, p22^{phox} and gp91^{phox} in rat neutrophils. **Clinical Science**. 103: 403-408, 2002.

PITHON-CURI, T.C.; MELO, M.P.; AZEVEDO, R.B.; ZORN, T.M.T.; CURI, R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **Am. J. Physiol.**, 273, C1124-C1129, 1997.

POORTMAN, J.R.; SIEST, G.; GALTEAU, M.M.; HOUOT, O. Distribution of plasma amino acids in humans during submaximal prolonged exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 32: 143, 1974.

QIN, S.; COBBOLD, S.; BEMJAMIN, R.; WALDMANN, H. Induction of classical tolerance in the adult. **J. Exp. Med.**, 169: 779-794, 1989.

RAPPOLEE, D.A.; WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, 1: 47-55, 1988.

RENNIE, M.J.; MACLENNAN, P.A.; HUNDAL, H.S.; WERYK, B.; SMITH, K.; TAYLOR, P.M.; EGAN, C.; WATT, P.W. Skeletal muscle glutamine transport, intramuscular glutamine concentration and muscle-protein turnover. **Metabolism**. 38: 47-51, 1989.

ROBSON, P.J.; BLANNIN, A.K.; WALSH, N.P.; CASTELL, L.M.; GLEESON, M. Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. **Int. J. Sports Med.**, 20: 128, 1999.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Med. Sci. Sport. Exerc.**, 30: 856-862, 1998.

ROITT, M.R. **Imunologia**. 5ª ed. brasileira, São Paulo: Atheneu, 1998.

ROSE, W.C. The nutritive significance of the amino acids. **Physiol. Rev.**, 18: 109-136, 1938.

RÜGGERBERG, J.; STALMACH, E.; ZUBROD-EICHERT, C.; WAHN, V.; SCHROTEN, H. Antimicrobial functions of human monocytes depend on concentration of glutamine *in vitro*. **Ann. Nutr. Metab.**, 41: 371-375, 1997.

SASTRE, J.; ASENI, E.; GASCO, F.V.; PALLARDO, J.A. FERRERO; FURUKAWA, T.; VINA, J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood, prevention by antioxidant administration. **Am. J. Physiol.**, 263: 992-995, 1992.

SCHULZE, E.; BOSSHARD, E. Ueber das glutamine. **Landwirtsch Vers. Sta.**, 29: 295-307, 1883.

SEN, C.K.; RANKINE, T.; VÄISÄNEN, S.; RAURAMAA, R. Oxidative stress after exercise: effect of *N*-acetylcysteine supplementation. **J. Appl. Physiol.**, 76: 2570-2577, 1994.

SERRANO, M.A.R.; CURI, R.; PARRY-BILLINGS M.; WILLIAMS, J.F.; NEWSHOLME, E.A. Effects of glucocorticoids on lymphocyte metabolism. **Am. J. Physiol.**, 264: E24-E28, 1993.

SHERR, C.J. Regulation of mononuclear phagocyte proliferation by colony-stimulating factor-1. **Int. J. Cell Cloning**, 8(1): 46-62, 1990.

SHEWCHUK, L.D.; BARACOS, V.E.; FIELD, C. J. Dietary L-glutamine does not improve lymphocyte metabolism or function in exercise-trained rats. **Med. Sci. Sports Exerc.** 29 (4): 474-481, 1997.

SHINKAI, S.; SHORE, S.; SHEK, P.N.; SHEPHERD, R.J. Acute exercise and immune function. **Int. J. Sports Med.**, 13: 452-461, 1992.

STEIN, M. KESHAV, S. The versatility of macrophages. **Clin. Exp. Allergy**, 22: 19-27, 1992.

SUZUKI, K.; YAMADA, M.; KURAKAKE, S.; OKAMURA, N.; YAMAYA, K.; LIU, Q.; KUDOH, S.; KOWATARI, K.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. **Eur. J. Cell Physiol.**, 81: 281-287, 2000.

SZONDY, Z.; NEWSHOLME, E.A. The effect of glutamine concentration on the activity of carbamoyl-phosphate synthase II and on the incorporation of [³H]thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. **Biochem. J.**, 261: 979-983, 1989.

- VASCONCELOS, M.I.L.; TIRAPEGUI, J. Importância nutricional da glutamina. **Arq. Gastroenterol.**, 35: 207-215, 1998.
- VENKATRAMAN J.T.; PENDERGAST D.R. Effect of dietary intake on immune function in athletes. **Sports Med.** 32(5): 323-337, 2002.
- VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S.; CURI, R. Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. **Arq. Biol. Tecnol.** 33: 819-829, 1990.
- VIEIRA, R.; HAEBISCH H.; KOKUBUN E. Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arq. Biol. Tecnol.** 31(3): 387-394, 1988.
- WAGENMAKERS, A.J.M. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exerc. Sport. Sci. Ref.**, 26: 287-314, 1998.
- WALLACE, C.; KEAST, D. Glutamine and macrophage function. **Metabolism**, 41:1016-1020, 1992.
- WALLIS, R.S.; ELLNER, J.J. Cytokines and tuberculosis. **J. Leuk. Biol.**, 55: 676-681, 1994.
- WATFORD, M.; LUND, P.; KREBS, H.A. Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes. **Biochem. J.**, 178: 589-596, 1979.
- WEIDNER, T.G. Literature review: upper respiratory tract illness and sport and exercise. **Int. J. Sports.**, 15: 1, 1994.
- WHITACRE, C.M.; CATHCART, M.K. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens. **Cell Immunol.**, 144: 287-295, 1992.
- YOSHIDA, S.; YAMASAKI, K.; KAIBARA, A.; MIZOTE, H.; KAKEGAWA, T. Glutamine supplementation in septic rats. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, 1993.
- YOUNG, M.R.; ENDICOTT, R.A.; DUFFIE, G.P.; WEPSIC, H.T. Suppressor alveolar macrophages in mice bearing metastatic Lewis lung carcinoma tumors. **J. Leuc. Biol.**, 42: 682-688, 1987.