UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT)
Área de Nutrição Experimental

Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros citoprotetores em ratos submetidos a exercício de força.

Thaís Menezes Hypólito

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT)
Área de Nutrição Experimental

Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros citoprotetores em ratos submetidos a exercício de força.

Thaís Menezes Hypólito

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

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

Hypólito, Thaís Menezes

H998e Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e
L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros citoprotetores
em ratos submetidos a exercício de força / Thaís Menezes
Hypólito. -- São Paulo, 2016.
93p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade
da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades
em Nutrição Humana Aplicada.

Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando

1. Nutrição experimental : Ciência dos Alimentos I. T. II.
Tirapegui Toledo, Julio Orlando, orientador.

641.1 CDD

Thaís Menezes Hypólito

Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina
livres ou conjugadas sobre parâmetros citoprotetores em ratos
submetidos a exercício de força.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Júlio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 08 de agosto de 2016.

Sucesso é a arte de colocar amor na sua determinação.

(Pedro Henrique – Um Cartão)

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô, meu querido Professor Pardal, que me ensinou que a sede de conhecimento move o mundo; aos meus pais, irmãos e noivo por me apoiarem incondicionalmente e por todo amor que me dão.

Agradecimentos

A minha família, por todo apoio, amor e carinho. Pai, obrigada por ser meu maior incentivador e meu porto seguro. Mãe, obrigada por todo esforço que você faz por nós todos os dias. Gorda e Re, vocês são os melhores irmãos que alguém poderia ter.

Ao meu noivo, pela paciência, cuidado e amor. Não sei o que teria sido de mim sem você.

Ao meu vôzinho, que não pode acompanhar o final desta jornada comigo, mas que é minha maior fonte de inspiração. Tudo o que eu faço é por você Professor Pardal.

Aos meus tios, Aires e Cida por me auxiliarem na revisão do texto e sempre se disponibilizarem a me ajudar.

As famílias Menezes e Hypólito por conseguirem ser o furacão mais amoroso do mundo.

Aos meus sogros, Graça e Élcio, aos meus cunhados, Juliana e Julio e ao meu sobrinho Ian, por serem minha segunda família.

Aos meus filhos de quatro patas, Jack e Stella, não consigo imaginar meu mundo sem o amor infinito que vocês me dão todos os dias.

A Bruna, minha alma gêmea, por estar sempre presente, mesmo quando está longe.

As minhas primas (Ju, Bella, Ci e Nessa) que entendem as ausências, fazem rir até a barriga doer e por serem as melhores, sempre.

A Carol e Vivi, minhas melhores piores amigas do mundo, que fazem as centenas de quilômetros que nos separam parecerem insignificantes.

A Rose, minha psicóloga querida.

A Jaque e Raquel, por me realocarem no grupo de vocês, quando achei que tudo estava quase perdido. Por compartilhar comigo sabedoria e técnicas valiosas e fundamentais e por estarem sempre dispostas a ajudar.

A Kelcylene, meu anjo salvador e uma amiga incrível. O que seria de mim no laboratório se não tivesse você?

A Audrey, que perdeu o título de colega de trabalho, mas ganhou o de BFF.

A Clara, por todo companheirismo e ajuda nas disciplinas e por se tornar minha amiga pra vida.

Ao André, por ter me ajudado quando eu precisei e por ser essa pessoa tão bacana.

A Lulu e ao Chris, por tornarem o trabalho mais divertido.

Aos colegas Kadu, Van, Henrique e Dai pela convivência diária.

Aos colegas de departamento, em especial Éric e Amandinha que me salvaram muitas vezes e estarem sempre dispostos a me socorrer quando necessário.

Ao pessoal da secretaria, Edilson, Monica, Roberta e Cléo, por toda ajuda e por suportarem minhas perguntas infinitas.

A Elaine, por ter sido incrível durante o meu processo de inscrição no mestrado e mais incrível ainda durante o final deste, e por me ajudar quando ninguém mais se disponibilizou a fazer.

Ao Emidio e Michele, por terem aberto as portas quando eu era apenas uma aluna da graduação e por me ensinarem tanto.

A Prof^a Fabi Poltronieri, por ser simplesmente incrível. Quando crescer quero ser uma excelente profissional igual a você.

Ao Prof. Julio, meu orientador querido, nunca vou poder agradecer o suficiente pela oportunidade que você me deu e por todo respeito e carinho que recebi de você durante esses três anos.

RESUMO

HYPÓLITO, T. M. **Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros citoprotetores em ratos submetidos a exercício de força.** 2016. Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO: As contrações musculares decorrentes do exercício de força podem causar dano à estrutura muscular com consequente lesão. Quando a lesão ocorre, há sinalização local que favorece a chegada de linfócitos, neutrófilos e macrófagos para que haja reparação tecidual e com isso, ocorre inflamação local. Se o tecido não for reparado rapidamente e for continuamente lesionado, esta inflamação local pode se tornar sistêmica. Em conjunto com a resposta inflamatória, ocorre a ativação de sistemas citoprotetores do organismo, como as heat shock proteins (HSP) e a sirtuina 1 (SIRT-1). Ambas tem ação similar em um dos fatores de transcrição inflamatórios mais conhecidos, o NF- κ B. Tanto as HSP quanto a SIRT-1 sofrem influência positiva da glutamina. A produção corporal de glutamina durante o exercício intenso não é suficiente para suprir a demanda. Sendo assim, a procura por formas eficazes de suplementação deste aminoácido aumenta a cada dia, pois sua utilização na sua forma livre tem baixa eficácia. Novos estudos vêm demonstrando que a suplementação do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina tanto quanto a suplementação com L-alanina e L-glutamina ambos na sua forma livre, em solução, podem ser alternativas eficazes.

OBJETIVO: Avaliar os efeitos da suplementação crônica com L-glutamina e L-alanina, nas suas formas livres ou conjugadas, sobre a via inflamatória do NF- κ B e as possíveis inibições desta via, decorrente da citoproteção conferida pela ativação das HSP e SIRT-1 no fígado de ratos submetidos a treinamento de força.

MÉTODOS: Foram utilizados 40 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* distribuídos em cinco grupos experimentais: sedentário (SED), animais não-treinados que receberam apenas água filtrada; controle (CTRL), animais treinados que receberam apenas água filtrada; alanina (ALA), animais treinados que receberam suplementação com L-alanina na sua forma livre a 4%; Glutamina + Alanina (GLN+ALA), animais treinados que receberam suplementação com L-alanina e L-glutamina, ambos na sua forma livre, em solução a 4%; e dipeptídeo (DIP), animais treinados que receberam suplementação com L-alanil-L-glutamina a 4%. Os animais foram submetidos ao protocolo de subida em escada com carga progressiva durante oito semanas e receberam a suplementação nos últimos 21 dias de experimento.

RESULTADOS: Os grupos CTRL, GLN+ALA e DIP apresentaram ganho de peso menor ($p=0.00001$ vs. SED). Não houve diferença estatística entre o grupo SED e o grupo ALA. O grupo SED apresentou ganho de peso significativo quando comparados aos animais dos outros grupos ($p=0.03$). Os animais suplementados apresentaram menor consumo ($p<0.05$ vs. SED). Grupo DIP apresentou atividade reduzida da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA quando comparado aos outros grupos ($p=0.005$). A suplementação com GLN+ALA foi mais eficaz em restaurar a glutaminemia hepática ($p<0.003$ vs. CTRL e ALA). Os animais que foram suplementados com dipeptídeo apresentaram aumento no estoque de glutamina quando comparados com o

grupo ALA ($p < 0.003$). O grupo DIP apresentou aumento significativo de SIRT-1 ($p < 0.05$), quando comparado com os outros grupos. As intervenções nutricionais foram capazes de aumentar os estoques de HSP70 no fígado ($p < 0.05$ vs. CTRL). O grupo ALA apresentou maior expressão da enzima glutamina sintetase ($p < 0.05$). As enzimas hepáticas AST, ALT e LDH não apresentaram diferença significativa.

CONCLUSÃO: O exercício de força, com o protocolo utilizado neste experimento, não foi suficiente para causar inflamação sistêmica e, isto pode ter ocorrido por conta da eficácia da suplementação em atenuar os parâmetros inflamatórios a nível local, no tecido muscular. A suplementação com glutamina e alanina na sua forma livre ou como dipeptídeo foi eficaz em diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, aumentar os níveis de glutamina no fígado, aumentar os estoques de HSP70 e de SIRT-1 no tecido hepático.

Palavras-chave: glutamina, exercício físico, citoproteção.

ABSTRACT

HYPÓLITO, T. M. Effects of oral chronic supplementation with L-glutamine and L-alanine in their free form or as a dipeptide on cytoprotective parameters in rats submitted to resistance exercise. **Sao Paulo in 2016**. Master Degree – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil.

INTRODUCTION: Muscle intense contractions caused by resistance exercise can promote muscle damage, which favors the arrival of lymphocytes, neutrophils and macrophages to tissular repair and occurs local inflammation. If the tissue is not quickly repaired and is continuously injured, an acute-phase inflammatory response. In conjunction with the inflammatory response there is activation of cytoprotective system, such as heat shock proteins (HSP) and sirtuin 1 (SIRT1). Both have similar action in one of the most known inflammatory transcription factors, NF- κ B and act preventing the phosphorylation of I κ B α protein, which is complexed to NF- κ B. Both HSP as SIRT1 suffer positive influence of glutamine. Glutamine is the most abundant amino acid in the human body, classified as conditionally essential in stressful situations such as intense exercise, because body's production is not enough to meet demand. Thus, the search for effective ways of this amino acid supplementation increases every day, as it is widely known that supplementation of this single amino acid in its free form has low efficiency, since more than 50% is ingested is retained in the enterocyte. Further studies have shown that supplementation of the dipeptide L-alanyl-L-glutamine as well as L-alanine and L-glutamine supplementation both in free form in solution may be effective alternatives.

OBJECTIVE: Evaluate the effects of chronic supplementation of L-glutamine and L-alanine, in its free form or as dipeptide, in the inflammatory pathway of NF- κ B and possible inhibition of this pathway, resulting from cytoprotection afforded by the activation of HSP and SIRT1 in the liver of rats with resistance training.

METHODS: 40 adult male rats of the Wistar strain were used. The animals were divided into five groups: sedentary (SED), non-trained animals that received only filtered water; control (CTRL), trained animals that received only filtered water; alanine (ALA), trained animals receiving supplementation with L-alanine in its free form at 4%; Glutamine + Alanine (GLN + ALA), trained animals receiving L-alanine and L-glutamine supplementation both in its free form in a solution at 4%; and dipeptide (DIP) trained animals receiving supplementation of L-alanyl-L-glutamine at 4%. The animals were submitted to climb a ladder protocol for eight weeks with progressive load and receive supplementation in the last 21 days of the experiment.

RESULTS: CTRL, GLN+ALA and DIP groups presented lower weight gain ($p=0.00001$ vs. SED). SED group showed significant weight gain compared to animals of other groups ($p=0.03$). Supplemented animals presented lower consumption ($p<0.05$ vs. SED). DIP group showed lower Total DNA-binding activity of NF- κ B p65, when compared with other groups ($p=0.005$). Supplementation with GLN+ALA It was more effective in restoring liver glutaminemia ($p<0.003$ vs. CTRL e ALA). Animals were supplemented with dipeptide showed an increase in glutamine stores when compared with ALA group ($p<0.003$). DIP group showed a significant increase of SIRT -1 ($p<0.05$),

when compared with other. Nutritional interventions were able to increase HSP70 stores in liver ($p < 0.05$ vs. CTRL). ALA group had higher expression of enzyme glutamine synthetase ($p < 0.05$).

CONCLUSÃO: Resistance exercise with protocol used in this experiment , it was not enough to cause systemic inflammation , and this may have occurred due to the effectiveness of supplementation in attenuating the inflammatory parameters locally in the muscle tissue. Supplementation of glutamine and alanine in free form or as dipeptide was effective in decreasing the binding activity of NF- κ B DNA , increased levels of glutamine in the liver , increase HSP70 stocks and SIRT -1 in liver tissue .

Keywords: glutamine, physical exercise, cytoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Peso total e Peso relativo dos fígados (g)

Figura 2. Atividade de ligação do fator de transcrição NF- κ B ao DNA

Figura 3. Expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α

Figura 4. Expressão da SIRT-1 no tecido hepático

Figura 5. Expressão da HSP70 no tecido hepático

Figura 6. Expressão da enzima Glutamina Sintetase no fígado

Figura 7. Atuação da via clássica do NF- κ B

Figura 8. Animal sendo submetido ao treinamento de força

Figura 9. Esquema do protocolo de treinamento

Figura 10. Consumo individual de ração por semana, utilizando as médias semanais de cada animal

Figura 11. – Concentração plasmática da enzima lactato-desidrogenase (U/L)

Figura 12. – Concentração plasmática da enzima alanina aminotransferase (U/L)

Figura 13. – Concentração plasmática da enzima aspartato aminotransferase (UI/L)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso dos animais e consumo de ração (g)

Tabela 2. Concentração de glutamina hepática expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ADP – adenosina difosfato

ALA – alanina

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

ATACR – aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada

ATP – adenosina trifosfato

ATPase – enzima adenosina trifosfatase

BCAA – branched chain amino acids (aminoácidos de cadeia ramificada)

CP – creatina fosfato

DIP – dipeptídeo L-alanil-L-glutamina

ERO – espécie reativa de oxigênio

ERN – espécie reativa de nitrogênio

GABA – ácido gama-aminobutírico

GH – hormônio do crescimento

GLN – glutamina

GLS – enzima glutaminase

GS – enzima glutamina sintetase

GSH – glutathione

GSSG – glutathione oxidada

HRP - *horseadish peroxidase*

HSE – heat shock element (elemento do choque térmico)

HSF1 – heat shock factor 1 (fator de transcrição de choque térmico)

HSP – heat shock protein (proteínas do choque térmico)

HSR – resposta do choque térmico

IKK – IκB Kinase (proteína quinase do IκB)

IL-1β – interleucina 1β

IL-6 – interleucina 6

IL-10 – interleucina 10

IκB – proteína inibidora do NF-κB

K⁺ - íon potássio

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos 1

Na^+ - íon sódio

NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF- κ B – fator nuclear kappa B

PepT-1 – proteína transportadora de glicopeptídeo

Pi – fosfato inorgânico

SIRT - sirtuína

TF – treinamento de força

TNF- α – fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3.	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	Exercício Físico e Glutamina	24
3.2	Aspectos Bioquímicos da Glutamina	26
3.3	Exercício Físico, Glutamina e Citoproteção	28
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Animais	34
4.2	Desenho Experimental	34
4.3	Grupos Experimentais	34
4.4	Protocolo de Treinamento	35
4.5	Dieta e Suplementação	36
4.6	Eutanásia dos Animais e Coleta de Amostras	37
4.7	Parâmetros Avaliados durante o Experimento	37
4.8	Parâmetros Avaliados Pós-eutanásia	37
4.8.1	Análises por Western Blotting	38
4.8.1.1	Extração de Proteína	38
4.8.1.2	Preparo de Gel de Poliacrilamida	38
4.8.1.3	Preparo de Lisado de Proteínas para SDS-PAGE e “Western Blotting”	39
4.8.1.4	Sondagem de Proteínas com Anticorpos	39
4.8.1.5	Revelação com Sistema Quimioluminescente	40
4.9	Transaminases	40
4.10	Dosagem de citocinas	40
4.11	Ensaio de ligação da unidade p65 do NF-kB	41
4.12	Análise estatística	41
5.	ARTIGO	42
	Introdução	44

	Material e Métodos	46
	Resultados	51
	Discussão	54
	Conclusão	59
	Legendas das Tabelas	60
	Legendas das Figuras	61
	Referências	64
	Tabelas	69
	Figuras	70
6.	RESULTADOS ADICIONAIS	76
6.1	Consumo individual de ração por semana	76
6.2	Parâmetros Plasmáticos	77
6.2.1	Lactato Desidrogenase	78
6.2.2	Alanina Aminotransferase	79
6.2.3	Aspartato Aminotransferase	81
7.	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

A atividade física é definida de acordo com a Organização Mundial da Saúde como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos, que demanda gasto energético (WHO, 2004).

O exercício físico é a prática de atividade física com determinada regularidade, frequência e duração com o objetivo de promover e manter a saúde, ou com intenção de atingir determinado padrão estético por modificação de composição corporal, normalmente como lazer e integração social (WHO, 2004).

É importante ressaltar que o exercício físico e a prática de esportes resultam em aumento da demanda energética corporal, em decorrência das contrações musculares realizadas, gerando uma série de adaptações fisiológicas nos sistemas corporais, em especial no sistema cardiovascular. As adaptações ocorrem de acordo com tipo, duração e intensidade do exercício, estando geralmente relacionadas ao aumento do consumo máximo de oxigênio, aumento do fluxo sanguíneo, expansão do volume plasmático, melhora da função endotelial, vasodilatação da musculatura ativa com consequente diminuição da resistência vascular periférica, hipertrofia ventricular esquerda, angiogênese, potencialização da ação e aumento da sensibilidade à insulina, assim como na redução do risco e tratamento da obesidade, redução da massa adiposa, melhora do perfil lipídico, aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da gordura visceral. O efeito protetor causado pelos exercícios físicos e pela prática de esportes ocorre em decorrência de alterações metabólicas, hormonais e imunitárias que favorecem uma resposta inflamatória, resultando em uma resposta de proteção adaptativa e preparando o organismo para estímulos mais intensos (ADAMSON et al., 2014; HASKEL et al., 2007; JAKICIC & OTTO, 2006; BRUM et al., 2004; ARAÚJO, 2001).

Atletas competitivos seguem rigorosamente com seus regimes de treinamento para estimular tais adaptações fisiológicas e buscar melhoria no desempenho. Os treinamentos são intensificados em determinados períodos, principalmente em momentos próximos às competições. Entretanto, o aumento intencional no volume de treinamento, associado a períodos limitados de

recuperação, pode apresentar consequências deletérias ao organismo do atleta (LE MEUR et al., 2014; YAN et al., 2009), como catabolismo proteico, aumento do estresse oxidativo, supressão do sistema imune e lesão muscular, problemas intrinsecamente relacionados entre si (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014; GLEESON, 2007).

Esta prática pode levar ao chamado '*overreaching* funcional', definido como um acúmulo de treinamento com curtos períodos de descanso, que leva à diminuição temporária de desempenho, podendo ou não apresentar sintomas fisiológicos e psicológicos como cansaço, alterações no sono, perda de apetite e peso, ansiedade, diminuição da motivação, problemas de concentração, alterações na função imune e variações de humor. A restauração da capacidade de desempenho pode levar dias ou até semanas (LE MEUR et al., 2014; LE MEUR et al., 2013; MEEUSEN et al., 2012; YAN et al., 2009; HALSON & LANCASTER, 2004; HALSON et al., 2003).

Dentre os exercícios mais estudados no *overreaching*, está o treinamento de força (MEEUSEN et al., 2012).

O treinamento de força pertence a uma ampla categoria de atividades que produzem contrações musculares em resposta à resistência de uma força externa. Estudos realizados com esse tipo de treinamento confirmaram como alguns dos seus efeitos, melhora na funcionalidade muscular levando a um aumento da força e da área seccional transversa da fibra muscular. Por causa dos benefícios advindos desse tipo de exercício muitas pessoas optam por sua prática, porém o treinamento inadequado ou excessivo pode causar graves lesões, ocasionando processo inflamatório local e sistêmico, podendo comprometer a saúde do indivíduo (HONG et al., 2014; OGASAWARA et al., 2014; FINSTERER, 2012; YAN et al., 2009).

A resposta local a uma lesão tecidual envolve a produção de citocinas que são liberadas no local da inflamação. Estas citocinas facilitam o influxo de linfócitos, neutrófilos, monócitos e outras células que auxiliam na recuperação do tecido lesionado. A resposta inflamatória local é acompanhada de uma resposta inflamatória sistêmica conhecida como resposta de fase aguda. Esta resposta inclui a produção de proteínas de fase aguda provenientes do fígado, como proteína C-reativa e transferrina. A citocina interleucina 6 (IL-6) parece

ser o primeiro estímulo para a produção destas proteínas (PEDERSEN, 2000; PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Durante estes quadros inflamatórios, há ativação de sistemas protetores para compensação, dentre os quais destacam-se a sirtuína 1 (SIRT-1) e as proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* –HSP).

As sirtuínas são uma família de enzimas dependentes de dinucleotídeos de nicotinamida e adenina (NAD⁺) que possuem atividade de desacetilase. Composta por sete integrantes (SIRT-1 a SIRT-7) que atuam em diversas funções celulares, a mais estudada delas é a SIRT-1. Uma das funções da SIRT-1 é agir na inibição da resposta inflamatória, por meio da desacetilação de histonas e fatores de transcrição, tal como o Fator Nuclear kappa B (NF-κB), reprimindo assim a transcrição de genes associados à resposta inflamatória. A SIRT-1 também pode ser ativada pela L-glutamina, através de glucosaminas, o que conduz a ativação do fator de transcrição de choque térmico (HSF) e do elemento do choque térmico (HSE) através da desacetilação destes, provocada pela SIRT-1 (CORBI et al., 2013; KAUPPINEN et al., 2013; KOTAS; GORECKI; GILLUM, 2013; XIE; ZHANG; ZHANG, 2013; WESTERHEIDE et al., 2009).

As HSP tem papel importante na sobrevivência celular, modulando a resposta inflamatória e remodelando proteínas desnaturadas. A expressão de HSP parece ser dependente das concentrações de glutamina. Entretanto, após exercício intenso, os níveis de glutamina plasmática estão reduzidos. Além disso, outras células do sistema imune também utilizam a glutamina, sendo assim, a redução corporal deste aminoácido diminui a proteção celular, tornando-o essencial no estresse metabólico. O aumento de HSP resulta do aumento de liberação de citocinas pró-inflamatórias, e este aumento pode ser atenuado pela glutamina. Além disso, as HSP são capazes de modular a resposta inflamatória, agindo diretamente na via do NF-κB (KAUPPINEN et al., 2013; ZUHL et al., 2012; CRUZAT et al., 2009; SCHELL et al., 2005).

O NF-κB é um fator de transcrição essencial para a expressão de genes relacionados à inflamação, responsável por regular a expressão de mais de 150 genes codificadores de citocinas, proteínas de fase aguda e reguladores de apoptose nas células do sistema imune. Normalmente localizado no citoplasma como heterodímero, composto por duas subunidades: p50 e p65 (relA) em um complexo com a proteína inibidora IκB, geramente a IκBα. Sob

estimulação, esta proteína é fosforilada pelo complexo IKK nos sítios que iniciam a ubiquitinação e degradação via proteassoma. Com a degradação da I κ B α , ocorre a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde se inicia a transcrição de genes que codificam componentes pró-inflamatórios (FINSTERER, 2012; SINGLETON; BECKEY; WISCHMEYER, 2005; SUN; ANDERSSON, 2002).

Tanto as HSP como a SIRT-1 agem inibindo a fosforilação do complexo I κ B α , evitando assim a translocação do heterodímero do NF- κ B do citoplasma para o núcleo. Além destes dois fatores de citoproteção, a glutamina também pode interferir nesta via inflamatória. Segundo Singleton e colaboradores (2005) (2005), a glutamina por si só também foi capaz de suprimir a via do NF- κ B, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Segundo Cruzat e colaboradores (2009), a glutamina foi capaz de atenuar a ativação do complexo do NF- κ B por meio da inibição da degradação da proteína inibidora I κ B- α (KAUPPINEN et al., 2013; SCHELL et al., 2005).

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no corpo humano e é importante para inúmeros tipos de células, tendo importante papel em muitas funções essenciais. Considerando a capacidade do corpo humano em conseguir sintetizá-lo, a glutamina pode ser considerada um aminoácido não-essencial, porém, esta classificação depende da homeostase corporal, pois em condições de alto catabolismo, a produção realizada somente pelos tecidos corporais é insuficiente para suprir as necessidades, tornando-se assim um aminoácido condicionalmente essencial (PETRY et al., 2014; CRUZAT & TIRAPEGUI, 2009).

A glutamina circulante é um substrato chave para as células de rápida divisão celular, como enterócitos, células do sistema imune e monócitos, como também é fundamental para os hepatócitos e células musculares além de ser modulador do metabolismo intermediário dos aminoácidos e expressão das HSP (CRUZAT et al., 2014; AGOSTINI & BIOLO, 2010; CURI et al. 2007).

Por causa do seu status de condicionalmente essencial em algumas situações metabólicas específicas, a busca por formas exógenas que possam suprir as necessidades de glutamina, é constante (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015).

Contudo, a suplementação via oral com L-glutamina livre possui baixa eficiência no que diz respeito à restauração da glutaminemia, seja ela plasmática, hepática ou muscular, dado que cerca de 50% do que chega ao lúmen intestinal acaba sendo metabolizado pelos enterócitos (ROGERO et al., 2006; CRUZAT et al., 2009)

Neste contexto, a suplementação oral crônica com dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) tem se provado mais eficaz ao manter a glutaminemia corporal. As soluções contendo L-glutamina e L-alanina, ambas na forma livre, têm apresentado efeitos semelhantes ao dipeptídeo, porém os efeitos do aminoácido alanina em relação à restauração da glutaminemia corporal ainda não foram totalmente elucidados (ROGERO et al., 2006; CRUZAT et al., 2009, 2010).

No que diz respeito ao órgão avaliado, durante a prática esportiva, o fígado exerce um importante papel, tendo em vista sua função relacionada a diversas vias metabólicas extremamente utilizadas durante o exercício físico (PETRY et al., 2014). Porém, são poucos os estudos que avaliam a função deste órgão na relação com a suplementação com glutamina associada ao exercício físico.

Considerando que o treinamento de força intenso causa diminuição de glutaminemia corporal e possível aumento de inflamação crônica e sistêmica, podendo causar diversos prejuízos à saúde do atleta, este trabalho tem como objetivo avaliar a ação da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina, na sua forma livre ou como dipeptídeo, sobre a ativação dos sistemas de citoproteção HSP70 e SIRT-1, decorrentes da possível inflamação mediada pelo via do NF- κ B, em ratos submetidos a exercício de força.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação crônica com L-glutamina e L-alanina, nas suas formas livres ou como dipeptídeo, sobre o aumento da expressão de proteínas de atividade citoprotetora como a HSP70 e a SIRT-1 e a possível inibição da via do NF- κ B no fígado de ratos submetidos a treinamento de força.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos das intervenções nutricionais sobre determinados parâmetros no fígado de ratos:

- Via do NF- κ B
- Expressão de HSP
- Expressão de SIRT-1
- Síntese de glutamina hepática

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Exercício e glutamina

A prática regular de exercícios de intensidade moderada é fundamental para reduzir os riscos de doenças crônicas não transmissíveis. Entretanto, a prática de exercícios de maneira prolongada ou exaustiva aumenta a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos, como o catabolismo proteico, lesão muscular decorrente do perfil pró-inflamatório da prática excessiva, aumento do estresse oxidativo e supressão do sistema imune (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014; GLEESON, 2007).

O exercício físico gera mudanças consideráveis na função imune, relacionada com respostas fisiológicas tanto metabólicas quanto hormonais. A maioria destas respostas é mediada por hormônios, como adrenalina, cortisol, hormônio do crescimento e citocinas pró e anti-inflamatórias. Estas mudanças dependem da intensidade, duração e tipo de exercício praticado (GLEESON, 2007; GLEESON; NIEMAN; PEDERSEN, 2004).

Durante e após o exercício físico intenso e prolongado, há uma diminuição das concentrações plasmáticas e intramusculares de glutamina. Há alguns possíveis mecanismos envolvidos nesta diminuição. Pode ocorrer maior captação de glutamina destinada a ser usada em processos anapleróticos e gliconeogênese, pois durante este tipo de exercício ocorre diminuição dos estoques de glicogênio hepático e aumento das concentrações do hormônio cortisol, cujas ações no metabolismo do aminoácido glutamina são aumentar sua captação hepática e estimular seu efluxo muscular. Com a maior oferta de glutamina hepática em conjunto com a redução nos estoques de glicogênio hepático e o aumento do cortisol, o fígado se utiliza da glutamina para gliconeogênese, para que haja reposição dos seus estoques de glicogênio. A diminuição de síntese deste aminoácido, também ocorre nesta circunstância devido a alterações no seu transporte, já que a glutamina é transportada por um mecanismo saturável dependente de Na^+ , e esta diminuição é evidenciada pela diminuição da enzima glutamina sintetase. A alta utilização de glutamina pelas células do sistema imune após este tipo de exercício, também pode ser uma das causas de sua depleção (TIRAPEGUI; CRUZAT, 2015; DOS SANTOS et al., 2009; MENDES et al., 2006).

O tipo de esporte praticado também afeta a concentração de glutamina de forma diferente. Exercícios de resistência e *endurance* caracterizados por intenso gasto energético e duração prolongada, estão associados com diminuição da disponibilidade de glutamina de forma mais evidenciada. Porém, de forma semelhante à prática de exercício extenuante de forma aguda, o exercício submáximo leva a depleção prolongada de glutamina quando comparado a animais sedentários, sendo os efeitos atenuados em até 24 horas após a prática (SANTOS et al., 2007).

Atletas que realizaram treinamento de *endurance* com aumento progressivo de intensidade por cerca de seis semanas, apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de glutamina, sugerindo que nos exercícios de intensidade moderada, há adaptações fisiológicas que previnem o organismo de depleção de glutamina (KARGOTICH et al., 2007).

Apesar das alterações da glutaminemia decorrentes da prática esportiva, estudos demonstram que a suplementação de glutamina é capaz de atenuar as lesões musculares e inflamação induzida pelo exercício exaustivo (CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010).

A suplementação oral com glutamina para atletas tem efeito benéfico ao atenuar a diminuição da glutaminemia induzida pelo exercício, que pode causar diminuição do número de linfócitos e aumentar o risco de doenças respiratórias (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014).

A suplementação oral aguda com glutamina na sua forma livre ou como dipeptídeo é capaz de aumentar a concentração plasmática de glutamina no organismo entre 30 e 120 minutos após a ingestão (CASTELL et al., 1997).

O dipeptídeo contendo L-glutamina é uma solução altamente estável e solúvel, geralmente utilizado em nutrição enteral e parenteral e é capaz de levar à circulação altos níveis de L-glutamina e L-alanina. Este fato, provavelmente se deve a proteína transportadora de glicopeptídeo (PepT-1), localizada nos enterócitos e, que possui um mecanismo de transporte mais eficiente para di e tripeptídeos do que para aminoácidos livres. Dessa forma, a glutamina proveniente do dipeptídeo é capaz de evitar o metabolismo dos enterócitos e passar praticamente intacta pelo lúmen intestinal, chegando em grandes quantidades à circulação, aumentando a disponibilidade de glutamina

para as células do sistema imune e outros tecidos (CRUZAT et al., 2014; CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010; ROGERO et al., 2006)

A alanina, seja na forma de dipeptídeo ou na sua forma livre em solução com a glutamina, é capaz de poupar o metabolismo deste último para que seja usado por tecidos onde haja alta demanda (ROGERO et al., 2006).

Estudos *in vivo* mostram que a suplementação com L-glutamina, seja na sua forma livre em solução com a L-alanina, ou como dipeptídeo L-alanil-L-glutamina é capaz de aumentar as concentrações hepática e muscular de glutamina, o que por sua vez, aumenta os níveis teciduais de glutathione (GSH), diminuindo o estresse oxidativo causado pelo exercício intenso (CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009).

3.2 Aspectos Bioquímicos da Glutamina

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante de corpo humano. Possui peso molecular de aproximadamente 146kDa e é polar, possuindo assim uma característica hidrofílica, que faz com que seja facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (NEWSHOLME et al., 2003).

A glutamina está envolvida em diversas funções corporais: transferência de nitrogênio entre órgãos, detoxificação de amônia, manutenção do balanço ácido-básico durante a acidose, possível ação reguladora direta da síntese e degradação protéica, precursor de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos, necessária para o crescimento e diferenciação celular, transporte de cadeia carbônica entre os órgãos, fornecimento de energia para células de rápida proliferação como enterócitos e células do sistema imune, precursor da ureogênese e gliconeogênese hepática, precursor de mediadores como o GABA (ácido gama-aminobutírico) e glutamato, promove melhora na permeabilidade e integridade intestinal, eleva a resistência à infecção por aumento da função fagocitária e fornece energia aos fibroblastos aumentando a síntese de colágeno (MENDES et al. 2006).

A glutamina pode doar átomos de nitrogênio para síntese de purinas, pirimidinas e açúcares aminados, sendo importante em muitas vias metabólicas que, sendo dependentes da glutamina, são também conhecidos como vias glutaminolíticas (NEWSHOLME et al., 2003).

Por ser largamente utilizada por diversos tecidos do corpo humano, o metabolismo da glutamina pode ser classificado de acordo com a taxa de utilização dos tecidos: alguns tipos de células, como as do sistema imune, rins e intestino possuem alta taxa de utilização deste aminoácido e, portanto, são considerados tecidos predominantemente consumidores. Enquanto o músculo esquelético, fígado e pulmões são considerados predominantemente produtores de glutamina (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015; AGOSTINI; BIOLO, 2010).

O músculo esquelético é considerado quantitativamente o maior local de síntese, armazenamento e liberação de glutamina, com taxa de síntese de aproximadamente 50mmol/hora. No entanto o fígado é o tecido que exhibe maior efetividade de síntese de glutamina (NEWSHOLME et al., 2003; NEU et al., 1996).

A síntese endógena de glutamina é realizada a partir de glutamato e amônia, com auxílio da enzima glutamina sintetase (AGOSTINI & BIOLO, 2010). O glutamato, como precursor da glutamina, é sintetizado através da transaminação dos aminoácidos de cadeia ramificada, também conhecidos como *Branched Chain Amino Acids* (BCAA): isoleucina, leucina e valina. A síntese de glutamina ocorre preferencialmente no músculo esquelético, pois os BCAA são predominantemente metabolizados neste tecido. Ao ser metabolizado no tecido muscular, o BCAA não entra na via de metabolismo hepático, e conseqüentemente tem sua concentração plasmática rapidamente aumentada após a ingestão (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015; AGOSTINI & BIOLO, 2010).

No caso da formação de glutamina a partir do BCAA no tecido muscular esquelético, este último sofre transaminação a partir da enzima aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR), liberando α -cetoglutarato e glutamato e fornecendo seu grupamento amina para o piruvato, formando alanina ou incorporando amônia livre para a resíntese de glutamina. Isto sugere que a formação de glutamina pode ser associada à utilização de substratos para a produção de energia e conseqüentemente a disponibilidade de glutamina seria afetada pela chegada de nutrientes no músculo esquelético. (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015; BIOLO & AGOSTINI, 2010; BIOLO et al., 2006).

As principais enzimas intracelulares envolvidas no metabolismo da glutamina são a glutaminase (GLS) e a glutamina sintetase (GS). A glutaminase é responsável por hidrolisar a glutamina, convertendo-a em amônia e glutamato. Já a glutamina sintetase é responsável pelo trabalho reverso, sintetizando glutamina a partir de amônia e glutamato (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001; LABOW et al., 2001).

No processo de síntese de glutamina durante fases de alto catabolismo, o músculo esquelético é extremamente importante, não apenas pela sua capacidade de síntese deste aminoácido, mas por ter imensa representatividade, já que este tecido compõe cerca de 40% da massa corporal total. Sendo assim, sua capacidade de síntese é bastante considerável (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015).

A síntese de glutamina é potencializada quando há aumento da concentração de glicose muscular mediada por insulina, bem como o aumento da quantidade de aminoácidos de cadeia ramificada. Em atletas, a suplementação de carboidratos é capaz de manter os níveis de glutamina plasmática estáveis, quando comparado ao grupo placebo (BIOLO et al., 2006; BACURAU et al., 2002).

O exercício físico pode afetar a produção de glutamina no músculo e sua disponibilidade no plasma, além disso, o tipo de fibra muscular também pode influenciar a síntese de glutamina, sendo que fibras do tipo I possuem cerca de três vezes mais estoque de glutamina do que as fibras do tipo II. Este fato é atribuído à alta atividade da glutamina sintetase e a alta disponibilidade de ATP para a síntese deste aminoácido (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015; AGOSTINI & BIOLO, 2010).

3.3 Exercício, inflamação e citoproteção

O exercício de força requer contrações musculares intensas e submete as miofibrilas a uma grande força mecânica, podendo ocasionar lesão muscular (VELLA et al., 2012). As lesões musculares decorrentes deste tipo de contração podem causar diminuição de força e funcionalidade muscular e causar dor local (PEAKE et al., 2005).

Em decorrência das lesões musculares causadas pelo exercício, ocorre um processo de inflamação transitória, envolvendo o recrutamento e a ativação

de células do sistema imune no tecido lesionado, incluindo macrófagos e neutrófilos. Estas células tem a capacidade de remover resíduos celulares da área lesionada, além de liberar citocinas que facilitam o processo de reparação tecidual (BAEZA-RAJA & MUÑOZ-CÁNOVEZ, 2004; CLARKSON & HUBAL, 2002).

Caso a reparação tecidual não seja rapidamente realizada, pode ocorrer necrose das miofibrilas. Se houver lesões contínuas, sem que as primeiras tenham sido reparadas, pode haver instauração de resposta inflamatória crônica, podendo agravar ainda mais as lesões pré-existentes (SILVA;MACEDO, 2011).

A inflamação é um evento patológico, porém a inflamação muscular local em nível moderado é essencial na reparação tecidual necessária após a lesão muscular induzida pelo exercício, além de auxiliar na adaptação muscular, óssea e de tecidos conectivos (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014; PEAKE et al., 2005). Apesar de já ser bem documentada a importância da inflamação após o exercício, o mecanismo molecular que media esta resposta, é pouco conhecido (VELLA et al., 2012).

A inflamação subsequente que ocorre em resposta ao dano muscular é induzida e intensificada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Além disso, citocinas (na sua maioria pró-inflamatórias), histaminas, prostaglandinas e serotonina são liberadas, causando edema, dor e inflamação até a recuperação total do tecido lesionado. As reações inflamatórias locais podem ser induzidas durante a apoptose de células musculares ou necrose, através da ativação de macrófagos e citocinas pró-inflamatórias (CRUZAT;KRAUSE;NEWSHOLME, 2014; CRUZAT;TIRAPEGUI, 2009).

Durante a prática de exercício físico, ocorre a produção de ERO e ERN. No caso da prática intensa ou extenuante, esta produção se torna exacerbada, causando um desequilíbrio, onde há excesso de formação de substâncias oxidantes, chamado de estresse oxidativo. Estes radicais livres favorecem a ativação de um importante fator de transcrição de mediadores inflamatórios, o NF- κ B, um fator de transcrição que age como regulador central de vias de sinalização de estresse e tem sido identificado como potencial regulador da

inflamação induzida pelo exercício físico (BAKKAR & GUTTRIDGE, 2010; DELHALLE et al., 2004).

Em condições normais, o NF- κ B se encontra no citoplasma, em um complexo inativo com a proteína inibidora I κ B. Sob estimulação, geralmente em resposta a citocinas pró-inflamatórias, o complexo IKK regula a degradação da I κ B por meio de fosforilação e posteriormente, poliubiquitinação, permitindo que o NF- κ B se desloque do citoplasma para o núcleo (Figura X) (VELLA, et al., 2012; SCHELL et al., 2005; DELHALLE et al., 2004).

Figura 7. Atuação da via clássica do NF- κ B

O estímulo recebido pela célula, geralmente em resposta à citocinas pró-inflamatórias, ativa a fosforilação do complexo IKK. Este, por sua vez, fosforila a proteína I κ B que se encontra no citoplasma em um complexo inativo com o NF- κ B. Após a fosforilação, a proteína I κ B sofre ubiquitinação e se solta do NF- κ B, deixando-o livre no citoplasma. A I κ B é então degradada pelo proteassoma e o NF- κ B chega ao núcleo da célula e se liga a fita de DNA estimulando a transcrição de fatores pró-inflamatórios.

O membro mais comum da família NF- κ B é o heterodímero p65/p50, sendo as duas subunidades capazes de induzir a ligação do NF- κ B ao DNA, enquanto apenas a unidade p65 é capaz de iniciar a transcrição (BAKKA & GUTTRIDGE, 2010).

Este fator de transcrição, em condições fisiológicas, confere proteção contra morte celular, regulando genes antiapoptóticos. Entretanto, em condições não fisiológicas, quando há estímulo exacerbado, o resultado é uma

maior susceptibilidade a apoptose, com consequente aumento da morte celular (HADDAD; ABDEL-KARIM, 2011).

Estudos realizados com roedores têm demonstrado alterações transitórias em vários componentes da via de sinalização do NF- κ B. Estudos usando humanos identificaram o exercício como um potente estímulo para ativação do NF- κ B, onde foi avaliado que após exercício de força, a subunidade p65 do NF- κ B é fosforilada através da via de degradação do I κ B α (VELLA et al., 2012).

Vella e colaboradores (2012) avaliaram dez participantes de atividades recreativas, que foram submetidos a exercícios de força intensos de membros inferiores, equivalente a 80% da força máxima. A biópsia do músculo vasto lateral de ambas as pernas dos participantes demonstrou diminuição da expressão da proteína inibitória I κ B- α e aumento da expressão da subunidade p65 do NF- κ B duas horas após o exercício, voltando a níveis basais quatro horas após. Além disso, genes associados à via de sinalização do NF- κ B tiveram sua expressão aumentada depois da sessão aguda de exercícios.

Kim e colaboradores (2009) após uma única sessão de treinamento verificaram o aumento da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, dependente da intensidade do exercício realizado.

A prática de exercício submáximo agudo em esteira, bem como a contração de células musculares *in vitro* foram capazes de ativar a sinalização de IKK em ratos, resultando no aumento da atividade do NF- κ B logo após o exercício (HO et al., 2005).

Porém, em um estudo de Vella e colaboradores, a biópsia muscular realizada entre 10 minutos e uma hora pós-exercício não encontrou evidências de aumento da expressão da via do NF- κ B, sendo necessário ao menos duas horas para verificação de aumento da expressão (VELLA et al., 2012).

Neste contexto, é possível observar que o exercício físico é capaz de estimular esta via inflamatória. A partir disso, se torna necessário estudar a utilização de suplementos que possam atenuar esta via de forma eficaz. Com este intuito, a ação da glutamina foi avaliada, levando-se em conta sua função primordial no sistema imune. Encontrou-se que a glutamina por si só foi capaz de atenuar a ativação de inúmeras vias inflamatórias relacionadas ao NF- κ B. A administração de glutamina posteriormente à lesão intestinal induzida foi capaz

de diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA e consequentemente reduzir os danos teciduais (CHEN et al., 2008; SINGLETON et al., 2005).

A função citoprotetora da L-glutamina é comumente associada com as HSP, em especial a sua ação na potencialização da expressão da HSP70, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Através do HSF1, a glutamina é capaz de facilitar a transcrição da HSP70, levando a síntese *de novo* desta proteína do choque térmico, em um processo que depende ao menos parcialmente da ativação da via das glucosaminas. Porém a via pela qual a glutamina aumenta a expressão da HSP70 é na sua maior parte desconhecida (PETRY et al., 2014; SINGLETON et al., 2005; WISCHMEYER, 2002).

As proteínas do choque térmico são avaliadas como 'proteínas de estresse', consideradas fundamentais no processo de recuperação e proteção celular. Em condições fisiológicas, as HSP atuam facilitando o enovelamento de novas cadeias peptídicas e translocação de proteínas. Contudo, sob situações de estresse, estas proteínas desempenham um papel citoprotetor, aumentando a sobrevivência celular. (SCHOENFELD, 2013; CRUZAT et al., 2009).

A resposta de choque-térmico (HSR) é um mecanismo evolutivo conservado pelas células que são capazes de tolerar fatores estressores tanto ambientais como inflamatórios. Esta proteção é concedida através da síntese de proteínas chamadas proteínas de choque-térmico (HSP), que protegem as células de desnaturação e facilitam sua reparação (SCHELL et al., 2005).

A HSP70 pode induzir diferentes respostas inflamatórias, de acordo com a sua localização: intra ou extracelular. Enquanto a HSP70 localizada no meio intracelular possui efeitos antiinflamatórios, a HSP70 localizada no meio extracelular possui efeito oposto (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014).

O exercício físico é conhecido como indutor da expressão de HSP70, promovendo um aumento especialmente da HSP70 no meio extracelular (PETRY et al., 2014; KRAUSE; RODRIGUES-KRAUSE, 2011). Durante o exercício, as HSP, sobretudo a HSP70 agem como facilitador de biogênese mitocondrial e regulador de vias apoptóticas (SCHOENFELD, 2013). Além disso, enquanto as HSP70 aparentemente são capazes de estabilizar a estrutura miofibrilar e auxiliar proteínas com menor estabilidade a recuperar

sua conformação, as HSP72 estão normalmente restritas a células mantidas sob estresse (PAULSEN et al., 2007).

Investigadores sugerem que o efeito anti-inflamatório das HSP se deve a sua ação na inibição do fator de transcrição NF- κ B. Grossman e colaboradores verificaram que ocorre uma inibição transitória da fosforilação do I κ B, que é dependente do período de recuperação entre a proteína do choque térmico e o fator estressor (GROSSMAN et al., 2002; YOO et al., 2000).

As HSP também podem ser reguladas por outra proteína com função citoprotetora, a SIRT-1. Esta última, pode ser ativada pela glutamina através da via das glucosaminas e, conseqüentemente ativar o HSF e o HSE, desacetilando-os e desta forma, regulando conjuntamente as HSP (SCHELL et al., 2005; KAUPPINEN et al., 2013).

A SIRT-1 é um homólogo humano do regulador de informação silenciosa (Sir)-2 encontrado em leveduras. Ela faz parte de uma família de outras seis sirtuínas (SIRT-1 – SIRT- 7) e é considerada um sensor metabólico, pois tanto a sua expressão quanto a sua atividade são sensíveis à disponibilidade de nutrientes. Pode ser encontrada no fígado, tecido adiposo, músculo e cérebro. A sua expressão é associada à regulação de diversos processos celulares, como biogênese mitocondrial, resposta ao estresse, sobrevivência celular e estado redox. A concentração de cofatores metabólicos e intermediários no interior da célula, incluindo nicotinamida, NAD⁺ e NADH, regulam a sua atividade de desacetilase (GUARENTE, 2013; KITADA et al., 2013; KOTAS; GORECKI; GILLUM, 2013).

A SIRT-1 e o NF- κ B apresentam características de um *crosstalk* antagônico, com o NF- κ B possuindo um fenótipo pró-inflamatório com metabolismo glicolítico, enquanto a SIRT-1 possui respiração oxidativa e resposta antiinflamatória (KAUPPINEN et al., 2013).

A SIRT-1 pode inibir direta ou indiretamente a transcrição gênica do NF- κ B através da desacetilação da unidade relA/p65 em lisina³¹⁰, e simultaneamente, o NF- κ B inibe a atividade da SIRT-1 (KAUPPINEN et al., 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos machos adultos (aproximadamente 60 dias) da linhagem Wistar albinos cedidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram distribuídos em gaiolas conforme os grupos experimentais mantendo-se um animal por caixa, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$, com 15 a 20 trocas de ar por hora, obedecendo a ciclo biológico invertido de 12h claro/12h escuro.

Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Vale ressaltar que o projeto para a elaboração desse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), Protocolo CEUA/FCF/493 (ANEXO I).

4.2 Desenho Experimental

O experimento teve duração de oito semanas (PETRY *et al.*, 2014; SCHEFFER *et al.*, 2012; CRUZAT *et al.*, 2010). A distribuição nas gaiolas se deu de forma randomizada, sem que houvesse diferença significativa na média de peso entre os grupos experimentais. A primeira semana de experimento foi destinada à adaptação do animal ao ambiente e ao protocolo de exercício. O protocolo de treinamento teve início a partir da segunda semana e a suplementação foi ofertada nos últimos 21 dias do experimento (PETRY *et al.*, 2014; CRUZAT *et al.*, 2010; ROGERO *et al.*, 2004) na água de beber dos animais (UENO *et al.*, 2011; PRADA *et al.*, 2007). O controle do volume ingerido pelos animais foi monitorado diariamente. Os animais foram eutanaseados por venosecção uma hora após a última sessão de treinamento.

4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em cinco grupos:

- **SED-** Animais não treinados que receberam água (n=8).
- **CTRL** - Animais treinados que receberam água (n=8).

- **DIP** - Animais treinados, suplementados com L-alanil-L-glutamina (n=8).
- **GLN+ALA** - Animais treinados, suplementados com L-alanina e L-glutamina livres (n=8).
- **ALA** - Animais treinados, suplementados com L-alanina (n=8).

4.4 Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento de força consistiu em sistema de subida em escada, adaptado de Hornberger & Farrar (2004) e Scheffer *et al.* (2012). Os animais realizaram escalada em escada vertical (1,1m x 0,18m, degrau de 2-cm, inclinada à 80°), cujo tamanho permitiu que o animal realizasse de oito a doze movimentos dinâmicos a cada escalada. A carga foi fixada na base da cauda dos animais, com fita de auto-fusão. Este protocolo simulou a prática do exercício de força em animais. Na fase de adaptação ao protocolo de treinamento os animais realizaram apenas uma série, de oito escaladas consecutivas, carregando carga equivalente a 5% do seu peso corporal.

Figura 8. Animal sendo submetido ao treinamento de força

Após o período de adaptação, o treinamento foi iniciado, com intervalos de 48 horas de descanso entre as sessões, durante seis semanas. Nas duas primeiras semanas de treinamento os animais realizaram três séries (oito a dez escaladas consecutivas a cada série) carregando carga equivalente a 25% da sua massa corporal. Na terceira semana de treinamento, os animais realizaram quatro séries com carga de 50%. Na quarta semana e metade da quinta semana, cinco séries com carga de 75% e na segunda metade da quinta semana até metade da sexta semana, seis séries com 100% da massa corporal. As séries foram realizadas com dois minutos de descanso entre uma e outra.

Figura 9 – esquema do protocolo de treinamento

4.5 Dieta e Suplementação

Durante todo o experimento os animais receberam ração comercial padrão, *ad libitum*, cedida pelo biotério (NUVILAB CR1 IRRADIADA, Nuvital Nutrientes LTDA, Curitiba) e o consumo foi calculado três vezes por semana. A suplementação foi realizada via oral na água beber dos animais (UENO *et al.*, 2011; PRADA *et al.*, 2007) nos últimos 21 dias do experimento (PETRY *et al.*, 2014; CRUZAT *et al.*, 2010; ROGERO *et al.*, 2004). As suplementações foram diluídas em água a uma concentração de 4% (CRUZAT *et al.*, 2010) e ofertadas de forma *ad libitum*. O controle do volume ingerido pelos animais foi monitorado diariamente.

A quantidade de aminoácidos presentes nas soluções dos grupos GLN+ALA e ALA foi calculada com base na concentração de aminoácidos contidos na solução comercial do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (Fresenius

Kabi – Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda., fornecido pela empresa Fórmula Medicinal – Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil), de forma a garantir que as soluções fossem isocalóricas e contivessem a mesma quantidade de aminoácidos (ROGERO *et al.*, 2004; ROGERO *et al.*, 2006).

4.6 Eutanásia dos animais e coleta de amostras

Os animais foram eutanasiados por venosecção uma hora após o último treinamento (ROGERO *et al.*, 2006). O fígado foi retirado e parcialmente subdividido em alíquotas que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Logo após foi realizada a pesagem das frações subdivididas e o armazenamento em freezer (- 80°C) para posteriores análises.

4.7 Parâmetros avaliados durante o experimento

- Peso corporal
- Consumo de ração
- Consumo de suplemento

4.8 Parâmetros avaliados pós-eutanásia

Fígado

- Glutamina sintetase
- SIRT-1
- HSF1
- HSP 70
- Atividade de ligação do fator de transcrição NF-κB ao DNA
- IL-6
- IL-10
- IL-1β
- MCP-1
- TNF-α
- Glutamina

Plasma

- LDH

- AST
- ALT

4.8.1 Análises por Western Blotting

4.8.1.1 Extração de proteína

Para quantificar a concentração da proteína no homogenato foi utilizado o kit comercial *BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific)*, onde o princípio da técnica é a Proteína BCA, que combina a redução conhecida de Cu^{2+} para Cu^{+1} por proteínas em meio alcalino, com a detecção colorimétrica altamente sensível e seletivo do cation de cobre (Cu^{+1}) por ácido bicinconínico.

Para a homogeneização foi utilizado homogeneizador elétrico tipo *Polytron (Ika T10 basic)* na velocidade máxima, em três *burst* de cerca de 30 segundos cada. A velocidade elevada foi utilizada para dissociar e romper o tecido. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi higienizado com álcool 70% e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

Para o ensaio, os homogenatos de fígado foram diluídos em água deionizada a 40x. Os padrões de albumina foram diluídos em diluição seriada 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 e 0. Os reagentes de detecção foram misturados em proporção 1:50. Na microplaca foi adicionado 10 μl de amostra diluída e padrões e, após foi adicionado 200 μl do reagentes de detecção e realizada a leitura no leitor de microplaca à 562 nm (Synergy H1/ Biotek). As leituras foram plotadas a partir da curva de albumina.

4.8.1.2 Preparo de gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado conforme protocolo de Sambrook *et al.* (1989), descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empilhamento) constituída de poliacrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (separação) foi preparado com 10 a 12% de poliacrilamida, 380 mM Tris. HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônia e 0,077 % TEMED.

4.8.1.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e “Western blotting”

As amostras foram combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol. Amostras contendo 30 µg de proteína foram previamente aquecidas em banho-maria por cinco minutos com o intuito de desnaturar as proteínas. Logo em seguida, as amostras foram pipetadas no gel de poliacrilamida, com ponteiras para gel (diâmetro da ponta 0,57 mm), balizado por marcador padrão de peso molecular *Full-Range Rainbow* de 12.000 a 225.000 Da (*Amersham GE Healthcare- RPN800E*). A eletroforese foi realizada em cubas para gel (*Bio-Rad*), a 120 V, tanto durante a corrida quanto durante o empilhamento.

❖ Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose):

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose (*AmershamHybond ECL Nitrocellulose*) foi hidratada e então um "sanduíche" foi montado na seguinte ordem: esponja, duas folhas de papel filtro de 3 mm (*Whatman*), gel, membrana, duas folhas de papel de filtro de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese (*Bio-Rad*), na presença de tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 8,3), sob corrente de 500mA, por 180 minutos. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 min, com corante Ponceau (1% ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8% NaCl, 0,2% KCl, 0,2% KH₂(PO)₄, 1,15% Na₂H(PO)₄, 0,5% Tween].

4.8.1.4 Sondagem de proteínas com anticorpos

A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários: SIRT-1 (1:1000 Santa Cruz Biotechnology), HSP-70 total (1:1000 Santa Cruz Biotechnology), HSF1 (1:1000 Santa Cruz biotechnology), NF-κB total e fosforilada (1:500 Santa Cruz Biotechnology), glutamina sintetase (1:500 Santa Cruz Biotechnology), β-actina contendo peroxidase (1:1000 Sigma-Aldrich).

Para a sondagem das proteínas de interesse com os anticorpos primeiramente, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com proteínas de albumina bovina a 5%, em tampão PBST, por 20 minutos. A solução de bloqueio foi desprezada e a membrana foi lavada três vezes, sendo cada lavagem realizada por cinco minutos, com 5 mL de PBST (15mL). Logo após, a membrana foi encubada com anticorpo específico para proteína de interesse em solução contendo 2% de albumina bovina, *overnight*, em leve *shake*, na geladeira, conforme bula. Após a encubação, o anticorpo foi retirado e a membrana lavada novamente por três vezes, durante cinco minutos, com PBST. Após a segunda lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário IgG *anti-rabbit*, em solução com proteína de albumina bovina a 2% em tampão PBST durante duas horas. Após a incubação, o processo de lavagem foi repetido.

A análise do conteúdo celular de β -Actina foi utilizada como normalizador, utilizando os mesmos métodos, porém com incubação por uma hora, e instrumentos para a incubação com anticorpo anti β -actina contendo peroxidase (1:1000 *Sigma-Aldrich*).

4.8.1.5 Revelação com sistema Quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes um e dois do kit *ECL Advance (GE Healthcare)*, composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio, a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. Os blots foram visualizados pelo sistema de bioimagem *ImageQuant™ 400 (GE Healthcare)* e analisados pelo *software QuantityOne (Bio-Rad)*.

4.9 Transaminases

As concentrações plasmáticas das transaminases Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e Gama Glutamil Transferase (γ GT) foram analisadas através de kit comercial Labtest por metodologia de cinética UV através do equipamento Labmax 240 (Labtest).

4.10 Dosagem de citocinas

Para a análise das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β , MCP-1 e TNF- α no fígado dos animais foi utilizado o kit *MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Bead Panel* (MerckMillipore). Para a extração do tecido utilizou-se tampão PBS (pH=7,4) com inibidores de protease e fosfatase. As determinações foram feitas em equipamento automático MAGPIX® seguindo-se as instruções do fabricante.

4.11 Ensaio de ligação da unidade p65 do NF- κ B ao DNA

Para avaliar a ligação das subunidades p50 e p65 do NF- κ B à região promotora do DNA foi utilizado o *kit NF- κ B p50/p65 transcription®* (Abcam). O kit utiliza placa contendo 96 poços onde a sequência alvo do NF- κ B está imobilizada. O ensaio consiste na incubação da fração proteica total ou nuclear das amostras na placa, possibilitando que as moléculas de NF- κ B presentes no extrato reconheçam a sequência-alvo imobilizada e se liguem. Em seguida, os anticorpos primários específicos marcaram as proteínas ligadas por meio da adição de anticorpos secundários conjugados a HRP (*Horseadish Peroxidase*) e uma leitura colorimétrica sensível a 450 nm tornou possível a quantificação da absorbância e da ligação.

4.12 Análise estatística

Os parâmetros foram apresentados segundo os objetivos citados na presente pesquisa. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A normalidade foi previamente analisada pelo teste *Shapiro-Wilk*. Os resultados observados nos grupos experimentais, após o término da primeira etapa da intervenção, foram analisados através do Teste T de *Student* para amostras independentes, para verificar a igualdade entre as médias de resultados dos grupos SED e CTRL, e ANOVA *One Way*, para análise de variância entre o grupo CTRL e os grupos suplementados, seguido de teste de *Tukey*. A homogeneidade de variâncias foi previamente testada pelo teste de Levene. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%, para rejeitar a hipótese de nulidade e a elaboração dos cálculos e gráficos foi realizada através do pacote *Graphic pad prisma 5*.

5 ARTIGO

Efeito da suplementação oral crônica com L-alanina e L-glutamina, na sua forma livre ou como dipeptídeo sobre parâmetros citoprotetores em ratos submetidos ao exercício de força.

Thaís Hypólito¹; Raquel Raizel¹, M.Sci.; Jaqueline Santos Moreira Leite¹, M.Sci.; Audrey Yule Coqueiro¹; Kelcylene Gomes da Silva¹, M.Sci.; Vinicius Fernandes Cruzat², Ph.D.; Julio Tirapegui^{1†}, Ph.D.

Título curto: Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanina e do exercício de força na citoproteção celular.

Número de palavras: 5109

Número de figuras: 6

Número de tabelas: 2

1 Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, São Paulo – SP, Brasil.

2 Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 2415, São Paulo – SP, Brasil

Autores correspondentes:

Julio Tirapegui

Avenida Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, São Paulo – SP, Brasil.

Tel.: +55-11-3091-3309

E-mail adress: tirapegu@usp.br

Thaís Hypólito

Avenida Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14, São Paulo – SP, Brasil

Tel.: +55-11-3091-3309

E-mail adress: thaishypolito@usp.br

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar os efeitos da suplementação crônica com L-glutamina e L-alanina, nas suas formas livres ou conjugadas, sobre a via inflamatória do NF- κ B e as possíveis inibições desta via, decorrente da citoproteção conferida pela ativação das HSP e da SIRT-1 no fígado de ratos submetidos ao treinamento de força.

MÉTODOS: Foram utilizados 40 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* distribuídos em cinco grupos experimentais: sedentário (SED), animais não-treinados que receberam apenas água filtrada; controle (CTRL), animais treinados que receberam apenas água filtrada; alanina (ALA), animais treinados que receberam suplementação com L-alanina na sua forma livre a 4%; Glutamina + Alanina (GLN+ALA), animais treinados que receberam suplementação com L-alanina e L-glutamina, ambos na sua forma livre, em solução a 4%; e dipeptídeo (DIP), animais treinados que receberam suplementação com L-alanil-L-glutamina a 4%. Os animais foram submetidos ao protocolo de subida em escada com carga progressiva durante oito semanas e receberam a suplementação nos últimos 21 dias de experimento.

RESULTADOS: Os grupos CTRL, GLN+ALA e DIP apresentaram ganho de peso inferior ($p=0.00001$ vs. SED). Não houve diferença estatística entre o grupo SED e o grupo ALA. O grupo SED apresentou ganho de peso significativo quando comparado aos animais dos outros grupos ($p=0.03$). Os animais suplementados apresentaram menor consumo alimentar ($p<0.05$ vs. SED). O grupo DIP apresentou atividade reduzida da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA quando comparado aos outros grupos ($p=0.005$). A suplementação com GLN+ALA foi mais eficaz em restaurar a glutaminemia hepática ($p<0.003$ vs. CTRL e ALA). Os animais que foram suplementados com dipeptídeo apresentaram aumento no estoque de glutamina quando comparados com o grupo ALA ($p<0.003$). O grupo DIP apresentou aumento significativo de SIRT-1 ($p<0.05$), quando comparado com os outros grupos. As intervenções nutricionais foram capazes de aumentar os estoques de HSP70 no fígado ($p<0.05$ vs. CTRL). O grupo ALA apresentou maior expressão da enzima glutamina sintetase ($p<0.05$).

CONCLUSÃO: O exercício de força empregado não promoveu inflamação sistêmica possivelmente em decorrência da eficácia da suplementação em atenuar os parâmetros inflamatórios no tecido muscular. A suplementação com glutamina e alanina na sua forma livre ou como dipeptídeo foi eficaz em diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, aumentar os níveis de glutamina no fígado, aumentar os estoques de HSP70 e de SIRT-1 no tecido hepático.

Palavras-chave: glutamina, exercício físico, citoproteção.

INTRODUÇÃO

A prática excessiva de exercícios físicos é utilizada no âmbito esportivo, com o intuito de estimular adaptações fisiológicas a fim de melhorar o desempenho físico dos atletas, porém, quando associada a curtos períodos de descanso, pode promover prejuízos ao organismo (LE MEUR et al., 2014; YAN et al., 2009).

Estudos acerca deste tema usualmente envolvem exercício de força, o qual é largamente conhecido pelos seus benefícios, como por exemplo, melhora na funcionalidade muscular e aumento da área seccional transversa. Sua prática requer intensas contrações musculares, onde as miofibrilas são submetidas à grande força mecânica. (OGASAWARA et al., 2014; VELLA et al., 2012). No entanto, o treinamento excessivo pode acarretar importantes lesões teciduais (HONG et al., 2014; FINSTERER, 2012; YAN et al., 2009).

As lesões teciduais geram processo de inflamação transitória local, envolvendo o recrutamento e ativação de células do sistema imune, incluindo neutrófilos e macrófagos que são responsáveis pela remoção de tecidos celulares da área lesionada, além da produção de citocinas, que são liberadas no local da inflamação, para que ocorra reparação do tecido lesionado (BAEZA-RAJA & MUÑOZ-CÁNOVEZ, 2004; CLARKSON & HUBAL, 2002). Porém, a prática excessiva e períodos insuficientes de descanso impedem que a reparação tecidual local ocorra de forma adequada, podendo gerar uma resposta inflamatória de nível sistêmico (PEDERSEN, 2000; PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000).

A inflamação subsequente decorrente da lesão muscular é induzida e intensificada pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, situação comum durante a prática esportiva e que se torna exacerbada em condições de prática intensa e extenuante. Neste contexto, pode haver desequilíbrio do sistema antioxidante, com excesso de produção de substâncias oxidantes (CRUZAT;KRAUSE;NEWSHOLME, 2014; BAKKAR & GUTTRIDGE, 2010; CRUZAT;TIRAPEGUI, 2009). Uma das consequências deste desequilíbrio no sistema antioxidante é o aumento da transcrição do Fator Nuclear kappa B (NF-κB), um importante fator de transcrição de mediadores pró-inflamatórios que tem sido identificado como potencial

regulador da inflamação induzida pelo exercício físico (BAKKAR & GUTTRIDGE, 2010; DELHALLE et al., 2004).

No intuito de amenizar os danos causados pela resposta inflamatória exacerbada, sistemas citoprotetores, dentre os quais destacam-se a sirtuína 1 (SIRT-1) e as proteínas do choque-térmico (HSP) são ativados.

A expressão da SIRT-1 é associada à regulação de diversos processos celulares, como biogênese mitocondrial, resposta ao estresse, sobrevivência celular e estado redox. Além disso, a SIRT-1 age na inibição da resposta inflamatória por meio da desacetilação de histonas e fatores de transcrição como o NF- κ B (KAUPPINEN et al., 2013; KOTAS; GORECKI; GILLUM, 2013). A SIRT-1 também pode ser ativada pela L-glutamina, através de glucosaminas, o que conduz a ativação do fator de transcrição de choque térmico (HSF) e do elemento do choque térmico (HSE) através da desacetilação destes, provocada pela SIRT-1. A ativação destes dois fatores regula a transcrição das HSP (CORBI et al., 2013; XUE; ZHANG; ZHANG, 2013; WESTERHEIDE et al., 2009; SCHELL et al., 2005).

As HSP tem papel importante na sobrevivência celular, dado que agem modulando a resposta inflamatória e remodelando proteínas desnaturadas, sendo consideradas fundamentais no processo de recuperação e proteção celular. Sua expressão é estimulada pelo exercício e parece ser dependente das concentrações de glutamina, em especial na potencialização da expressão da HSP70 (PETRY et al., 2014; KAUPPINEN et al., 2013; ZUHL et al., 2012)

Como fator chave entre os dois sistemas de citoproteção supracitados, está a glutamina. Este aminoácido é altamente relacionado com imunidade celular. Estudos acerca da sua função observaram que a glutamina por si só é capaz de atenuar a ativação de inúmeras vias inflamatórias relacionadas ao NF- κ B. Chen e colaboradores, avaliaram a ação da glutamina na via do NF- κ B e constataram que a administração deste aminoácido posteriormente à lesão intestinal induzida foi capaz de diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA e consequentemente reduzir danos teciduais (CHEN et al., 2008; SINGLETON et al., 2005).

Tendo em vista o papel fundamental desempenhado pela glutamina, no que diz respeito à citoproteção e inibição de vias inflamatórias, a avaliação deste aminoácido no contexto do exercício de força, se torna essencial.

A glutamina cumpre um importante papel na citoproteção durante a prática intensa de exercícios físicos, situação esta, onde este aminoácido pode ser considerado condicionalmente essencial. Sendo assim, se torna fundamental a busca por formas exógenas que possa suprir as necessidades de glutamina (TIRAPEGUI & CRUZAT, 2015).

Sabe-se que a suplementação oral com L-glutamina livre possui baixa eficiência no que diz respeito à restauração da glutaminemia, uma vez que cerca de 50% do que é ingerido é metabolizado pelos enterócitos (ROGERO et al., 2006; CRUZAT et al., 2009). No que concerne à otimização da absorção de glutamina quando suplementada por via oral, alguns estudos testaram a hipótese de suplementação oral crônica na forma de dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, alternativa que tem se provado mais eficaz quando comparada com a ingestão da glutamina na sua forma livre. Outra alternativa que tem apresentado resultados similares aos obtidos com o dipeptídeo, é a utilização de solução contendo L-alanina e L-glutamina, ambas na sua forma livre. Os efeitos da alanina na restauração da glutaminemia corporal não foram totalmente elucidados (ROGERO et al., 2006; CRUZAT et al., 2009, 2010).

Considerando que o treinamento de força intenso pode causar lesões nas miofibrilas, gerando resposta inflamatória em nível sistêmico, este trabalho tem como objetivo avaliar a ação da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina, na sua forma livre ou como dipeptídeo, sobre o processo inflamatório de nível sistêmico mediado pela via do NF- κ B e a ativação de sistemas de citoproteção decorrentes da possível inflamação em ratos submetidos a exercício de força.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 40 ratos machos adultos (aproximadamente 60 dias) da linhagem Wistar albinos cedidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram distribuídos em gaiolas conforme os grupos experimentais mantendo-se, um animal por caixa, em ambiente climatizado a 22 ± 2 °C, com umidade relativa do ar de $55 \pm$

10%, com 15 a 20 trocas de ar por hora, obedecendo a ciclo biológico invertido de 12h claro/12h escuro.

Todos os cuidados e procedimentos realizados com os animais seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Vale ressaltar que o projeto para a elaboração desse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), Protocolo CEUA/FCF/493.

Desenho Experimental e Grupos Experimentais

O experimento teve duração de oito semanas (PETRY *et al.*, 2014; SCHEFFER *et al.*, 2012; CRUZAT *et al.*, 2010). A distribuição nas gaiolas ocorreu de forma randomizada, sem que houvesse diferença significativa na média de peso entre os grupos experimentais. Durante as duas primeiras semanas, foi realizada a adaptação dos animais ao ambiente e ao protocolo de exercício. O protocolo de treinamento teve início a partir do início da terceira semana e a suplementação foi ofertada nos últimos 21 dias do experimento (PETRY *et al.*, 2014; CRUZAT *et al.*, 2010; ROGERO *et al.*, 2004) na água de beber dos animais (UENO *et al.*, 2011; PRADA *et al.*, 2007). O controle do volume ingerido pelos animais foi monitorado diariamente. Os animais foram eutanaseados por venosecção uma hora após a última sessão de treinamento. O fígado foi retirado e parcialmente subdividido em alíquotas que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Logo após foi realizada a pesagem das frações subdivididas e o armazenamento em freezer (- 80°C) para posteriores análises

Os animais foram distribuídos em cinco grupos:

- **SED-** Animais não treinados que receberam água (n=8).
- **CTRL** - Animais treinados que receberam água (n=8).
- **DIP** - Animais treinados, suplementados com L-alanil-L-glutamina (n=8).
- **GLN+ALA** - Animais treinados, suplementados com L-alanina e L-glutamina livres (n=8).
- **ALA** - Animais treinados, suplementados com L-alanina (n=8).

Protocolo de Treinamento

O protocolo de treinamento de força consistiu em sistema de subida em escada, adaptado de Hornberger & Farrar (2004) e Scheffer *et al.* (2012). Os animais realizaram escalada em escada vertical (1,1m x 0,18m, degrau de 2-cm, inclinada à 80°), cujo tamanho permitiu que o animal realizasse de oito a doze movimentos dinâmicos a cada escalada. A carga foi fixada na base da cauda dos animais, com fita de auto-fusão. Este protocolo simula a prática do exercício de força em animais. Na fase de adaptação ao protocolo de treinamento os animais realizaram apenas uma série, de oito escaladas consecutivas, carregando carga equivalente a 5% do seu peso corporal.

Após o período de adaptação, o treinamento foi iniciado, com intervalos de 48 horas de descanso entre as sessões, durante seis semanas. Nas duas primeiras semanas de treinamento os animais realizaram três séries (oito escaladas consecutivas a cada série) carregando carga equivalente a 25% da sua massa corporal. Na terceira semana de treinamento, os animais realizaram quatro séries com carga de 50%. Na quarta semana e metade da quinta semana, cinco séries com carga de 75% e na segunda metade da quinta semana até metade da sexta semana, seis séries com carga equivalente a 100% da massa corporal. As séries foram realizadas com dois minutos de descanso entre uma e outra.

Dieta e Suplementação

Durante todo o experimento os animais receberam ração comercial padrão, *ad libitum*, cedida pelo biotério (NUVILAB CR1 IRRADIADA, Nuvital Nutrientes LTDA, Curitiba) e o consumo foi calculado três vezes por semana. A suplementação foi realizada via oral na água beber dos animais (UENO *et al.*, 2011; PRADA *et al.*, 2007) nos últimos 21 dias do experimento (PETRY *et al.*, 2014; CRUZAT *et al.*, 2010; ROGERO *et al.*, 2004). As suplementações foram diluídas em água a uma concentração de 4% (CRUZAT *et al.*, 2010) e ofertadas de forma *ad libitum*. O controle do volume ingerido pelos animais foi monitorado diariamente.

A quantidade de aminoácidos presentes nas soluções dos grupos GLN+ALA e ALA foi calculada com base na concentração de aminoácidos contidos na solução comercial do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (Fresenius

Kabi – Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda., fornecido pela empresa Fórmula Medicinal – Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil), de forma a garantir que as soluções fossem isocalóricas e contivessem a mesma quantidade de aminoácidos (ROGERO et al., 2004; ROGERO et al., 2006).

Parâmetros teciduais

O fígado foi cirurgicamente retirado após o sacrifício e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para análises subsequentes. A proteína hepática foi quantificada utilizando o kit *BCA Protein Assay* (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Para análise de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α , amostras de fígado (250 mg) foram homogeneizadas em 1mL de *PBS buffer* contendo inibidor de fosfatase e protease e realizada com kit de imunoenensaio (Millipore). Citocinas foram expressas em pg/mg do total de proteínas.

Para avaliar a ligação das subunidades p50 e p65 do NF- κ B à região promotora do DNA foi utilizado o *kit NF- κ B p50/p65 transcription®* (Abcam). O kit utilizou placa contendo 96 poços onde a sequência alvo do NF- κ B ficou imobilizada. O ensaio consistiu na incubação da fração proteica total ou nuclear das amostras na placa, possibilitando que as moléculas de NF- κ B presentes no extrato reconhecessem a sequência-alvo imobilizada e se ligassem. Em seguida, os anticorpos primários específicos marcaram as proteínas ligadas por meio da adição de anticorpos secundários conjugados a HRP (*Horseadish Peroxidase*) e uma leitura colorimétrica sensível a 450 nm tornou possível a quantificação da absorbância e da ligação.

Western Blotting

Para a homogeneização foi utilizado homogeneizador elétrico tipo *Polytron* (Ika T10 basic) na velocidade máxima. A velocidade elevada foi utilizada para dissociar e romper o tecido. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi higienizado com álcool 70% e água ultrapura. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

Para quantificar a concentração da proteína no homogenato foi utilizado o kit comercial *BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific)*, onde o princípio da técnica é a Proteína BCA, que combina a redução conhecida de Cu^{2+} para Cu^{+1} por proteínas em meio alcalino, com a detecção colorimétrica altamente sensível e seletivo do cation de cobre (Cu^{+1}) por ácido bicinconínico.

Quantidades iguais de proteínas foram solubilizadas em tampão *laemmli* e sujeitas a SDS-PAGE (10%). Após, as membranas foram transferidas para membrana de nitrocelulose *Hybond-C Super (GE Healthcare, AMERSHAM, Biosciences, UK)*. As membranas foram bloqueadas por uma hora utilizando albumina bovina sérica a 5%.

As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: SIRT-1 (1:1000 Santa Cruz *Biotechnology*), HSP70 total (1:1000 Santa Cruz *Biotechnology*), Glutamina Sintetase (1:500 Santa Cruz *Biotechnology*) *overnight* em leve *shake*. A análise do conteúdo celular de β -Actina foi utilizada como normalizador, utilizando os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo anti β -actina contendo peroxidase (HRP) (1:1000 *Sigma-Aldrich*). Posteriormente foi realizada incubação com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) marcado com enzima peroxidase (*Sigma-Aldrich*) diluído 1:1000 em solução bloqueadora a 2% durante uma hora. Após lavagem em tampão, as membranas foram reveladas utilizando kit para *western blotting* de quimiluminescência eletrogerada (ECL, *GE Healthcare*). As imagens foram reveladas pelo sistema de bioimagem *ImageQuanti*™ 400 (*GE Healthcare*), com captura de imagem durante sete minutos. As imagens foram quantificadas pelo *Software Quantity One (Bio-Rad)*. O resultado da expressão das proteínas foi demonstrado utilizando-se unidades arbitrárias (UA).

Análises Estatísticas

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. A normalidade foi previamente analisada pelo teste Shapiro-Wilk. Os resultados observados nos grupos experimentais, após o término da primeira etapa da intervenção, foram analisados através do Teste T de Student para amostras independentes, para verificar a igualdade entre as médias de resultados dos grupos SED e CTRL, e ANOVA One Way, para análise de variância entre o grupo CTRL e os grupos suplementados, seguido de pós-teste de Tukey. A homogeneidade de

variâncias foi previamente testada pelo teste de Levene. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5%, para rejeitar a hipótese de nulidade. A elaboração dos cálculos e gráficos foi realizada através do pacote Graphic pad prisma 5.

RESULTADOS

Peso Corporal, Consumo Alimentar e Ingestão de Líquidos

Conforme apresentado na Tabela 1, é possível verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais tanto na fase inicial do experimento quanto no início do treinamento. Contudo, comparando-se os pesos finais dos animais, verificou-se que o ganho de peso foi menor nos grupos CTRL, GLN+ALA e DIP ($p=0.00001$ vs. SED). Em relação ao ganho de peso ao longo do treinamento, os animais sedentários apresentaram ganho de peso significativo quando comparados aos animais dos outros grupos ($p=0.03$).

O protocolo de exercício de força promoveu redução do consumo alimentar entre os grupos suplementados ($p<0.05$ vs. SED). Não houve diferença no consumo de água entre os grupos SED e CTRL, enquanto o consumo de suplemento foi maior no grupo GLN+ALA ($74,79 \pm 6,165$ mL/dia) do que nos grupos ALA ($67,47 \pm 5,267$ mL/dia) e DIP ($52,93 \pm 4,804$ mL/dia).

Peso total e relativo do fígado

O tecido hepático foi utilizado, neste experimento, com o intuito de avaliar a existência de inflamação de nível sistêmico decorrente do exercício intenso e com curtos períodos de descanso. Extraído imediatamente após o sacrifício, os fígados dos animais foram pesados.

Em relação ao peso total, os animais do grupo SED apresentaram tamanho do órgão superior em relação aos animais dos outros grupos ($p=0.003$). Quando utilizada a medida de peso relativo, o resultado se repetiu, sendo que os animais do grupo SED apresentaram peso relativo do fígado maior do que os outros grupos ($p<0.0001$) (Figura 1).

Atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição NF- κ B p65

O NF- κ B é um importante fator de transcrição que controla a expressão de genes relacionados à inflamação, esta transcrição é realizada pelo DNA. A atividade de ligação do NF- κ B ao DNA foi avaliada em extrato nuclear do tecido hepático.

Na Figura 2 é possível observar que o exercício de força não foi capaz de alterar a atividade nuclear do NF- κ B p65 no tecido hepático, demonstrando que apesar da intensidade do exercício, a inflamação não atingiu níveis sistêmicos. No entanto, a administração com dipeptídeo L-alanil-L-glutamina foi eficaz em reduzir a atividade deste fator de transcrição, quando comparado com as outras intervenções e o grupo controle ($p=0.005$).

Citocinas e glutamina hepáticas

O protocolo de treinamento de força aplicado neste estudo, bem como a suplementação, não foram capazes de alterar os níveis de citocinas, tanto as anti-inflamatórias (IL-6 e IL-10) quanto as pró-inflamatórias (IL-1 β , MCP-1 e TNF- α), demonstrando que o exercício utilizado não foi capaz de alterar parâmetros inflamatórios a níveis sistêmicos (Figura 3). Estes dados corroboram com os resultados encontrados acima.

A tabela 2 mostra a concentração hepática de glutamina, sendo possível observar a ausência de diferença estatística entre os grupos CTRL e SED, demonstrando que o exercício de força não foi capaz de depletar os estoques hepáticos de glutamina. Porém os animais suplementados com glutamina e alanina apresentaram maiores concentrações hepáticas deste aminoácido ($p<0.003$ vs. CTRL e ALA). Os animais que foram suplementados com dipeptídeo apresentaram aumento no estoque de glutamina quando comparados com o grupo ALA ($p<0.003$). Este resultado sugere que as suplementações contendo glutamina foram eficazes em melhorar a disponibilidade de glutamina no fígado.

Western Blottings

SIRT-1

O exercício de força não foi capaz de alterar as concentrações de SIRT-1 no tecido hepático, quando comparados os grupos SED e CTRL. Entretanto, o grupo DIP apresentou aumento significativo de SIRT-1 ($p < 0.05$), quando comparado com os outros grupos, demonstrando que a suplementação com dipeptídeo foi capaz de aumentar a capacidade citoprotetora do tecido avaliado (Figura 4). Este dado corrobora com o resultado encontrado na análise da atividade de ligação do fator de transcrição NF- κ B ao DNA, onde foi possível verificar uma menor atividade do fator de transcrição no grupo DIP. Uma vez que sabe-se que a SIRT-1 e o NF- κ B agem em *crosstalk* antagônico, é possível afirmar que os níveis aumentados da SIRT-1 neste grupo associado com a diminuição dos níveis de atividade de ligação do NF- κ B ao DNA estão relacionadas.

HSP-70

A avaliação do conteúdo hepático da HSP-70 demonstrou que as intervenções nutricionais foram capazes de aumentar os estoques desta proteína no fígado ($p < 0.05$ vs. CTRL). Além disso, foi possível verificar que as suplementações associadas ao exercício de força, também foram capazes de aumentar os estoques de HSP-70 no fígado ($p < 0.05$ vs. SED), apesar do exercício isolado não apresentar alterações significativas (Figura 5).

Glutamina Sintetase

A expressão hepática de glutamina sintetase estava aumentada no grupo ALA, quando comparado com os outros grupos ($p < 0.05$) (Figura 6). Uma vez que este grupo recebeu apenas o aminoácido alanina na sua forma livre, e este aminoácido pode ser utilizado para a gliconeogênese ao invés de ser utilizado para formação de glutamina, a depleção dos estoques de glutamina e o aumento da demanda podem explicar esta elevação.

DISCUSSÃO

No primeiro dia de treinamento, todos os animais foram pesados para confirmar não haver diferença significativa de peso entre os eles. Ao final do experimento, os animais dos grupos CTRL, GLN+ALA e DIP apresentaram peso final estatisticamente menor do que os animais distribuídos nos outros grupos (Tabela 1). Este resultado demonstra que o exercício físico foi capaz de promover manutenção do peso corporal dos animais, diminuindo a velocidade de ganho de peso. O grupo ALA, apesar de ter sido submetido ao treinamento físico, não apresentou diferença significativa em relação ao peso quando comparado com os animais sedentários. Este fato pode ser explicado pela função gliconeogênica deste aminoácido (CRUZAT et al., 2014; PETRY et al., 2014).

Por outro lado, a expressão hepática de glutamina sintetase, enzima responsável pela síntese de glutamina nos tecidos produtores, estava aumentada no grupo ALA, quando comparado com os outros grupos (Figura 6). Uma vez que este grupo recebeu apenas o aminoácido alanina na sua forma livre, e este aminoácido pode ser utilizado para a gliconeogênese ao invés de ser utilizado para formação de glutamina, a depleção dos estoques de glutamina e o aumento da demanda podem explicar este aumento (BATTEZZATI et al., 1999). A hipótese de utilização da alanina pela via gliconeogênica pode ser reforçada pelos resultados obtidos.

O ponto inicial a ser observado neste estudo, no que se refere à citoproteção é a atividade de ligação do fator de transcrição do NF- κ B ao DNA.

O NF- κ B é um fator de transcrição que age como regulador central de vias de sinalização de estresse e tem sido identificado como potencial regulador da inflamação induzida pelo exercício físico (BAKKAR & GUTTRIDGE, 2010).

Em condições normais, o NF- κ B se encontra no citoplasma, em um complexo inativo com a proteína inibidora I κ B. Sob estimulação, geralmente em resposta a citocinas pró-inflamatórias, o complexo IKK regula a degradação da I κ B por meio de fosforilação e posteriormente, poliubiquitinação, permitindo que o NF- κ B se desloque do citoplasma para o núcleo. Ao chegar ao núcleo, o NF- κ B se liga a fita de DNA estimulando a transcrição de diversos fatores pró-

inflamatórios (VELLA, et al., 2012; SCHELL et al., 2005; DELHALLE et al., 2004).

Na Figura 2 é possível observar que o exercício de força não foi capaz de alterar a atividade nuclear do NF- κ B p65 no tecido hepático, demonstrando que apesar da intensidade do exercício, a inflamação não atingiu níveis sistêmicos. No entanto, a administração com dipeptídeo L-alanil-L-glutamina foi eficaz em reduzir a atividade deste fator de transcrição, quando comparado com os outros animais treinados. Este resultado demonstra que apesar de possivelmente não ter havido inflamação sistêmica, a administração com suplemento contendo glutamina na sua forma livre foi eficaz em diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, diminuindo consequentemente a transcrição de componentes inflamatórios.

O NF- κ B é um fator de transcrição essencial para a expressão de genes relacionados à inflamação, responsável por regular a expressão de mais de 150 genes codificadores de citocinas (FINSTERER, 2012; SINGLETON; BECKEY; WISCHMEYER, 2005).

Muitas citocinas tendem a aumentar substancialmente após sessão de intenso treinamento, especialmente quando vários grupos musculares são utilizados simultaneamente na mesma sessão (BUONOCORE et al., 2015).

O exercício estimula de forma moderada a intensa o aumento das concentrações de interleucinas, dentre elas, a IL-6 e IL-10. Além disso, também estimula em menor intensidade o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a proteína quimiotática de monócitos -1 (MCP-1) e a IL-1 β . Uma vez secretadas, as citocinas podem mediar a comunicação intercelular de forma local ou sistêmica (PEAKE et al., 2015).

As citocinas, além de agirem nos seus tecidos-alvos, também conseguem estimular a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo da célula, onde ele se ligará a fita de DNA, aumentando a produção de componentes inflamatórios (GLEZER et al., 2000).

Corroborando com os resultados da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, as citocinas analisadas no tecido hepático não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 3). Apesar deste resultado poder sugerir que o protocolo de treinamento não foi eficaz em promover inflamação sistêmica, alguns estudos apontam que determinadas citocinas agem e permanecem

circulantes apenas no local onde foram produzidas, o que pode sugerir que a suplementação foi eficaz em suprir estas vias ainda no tecido muscular, controlando a inflamação e mantendo-a apenas no local afetado pelo exercício (FEBBRAIO et al., 2003; 2003).

De acordo com Singleton e colaboradores (2005), a glutamina por si só foi capaz de suprimir a via do NF- κ B, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, reforçando a hipótese de que a suplementação com glutamina e alanina na sua forma livre ou como dipeptídeo foi capaz de agir de maneira efetiva nos músculos, impedindo que a inflamação se estendesse a níveis sistêmicos (SINGLETON et al., 2005).

Em relação aos estoques hepáticos de glutamina, a tabela 2 mostra que não houve diferença significativa entre os grupos CTRL e SED, demonstrando que o exercício de força não foi capaz de depletar os estoques hepáticos de glutamina. Porém os animais suplementados com glutamina e alanina apresentaram concentrações hepáticas superiores deste aminoácido ($p < 0.003$ vs. CTRL e ALA), o que pode ser associado com a redução da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA observada neste mesmo grupo. Uma vez que a glutamina age diminuindo a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, essa associação de resultados demonstra que a glutamina é eficaz em suprimir a via do NF- κ B (SINGLETON et al. 2005). Além disso, os animais que foram suplementados com dipeptídeo apresentaram aumento no estoque de glutamina quando comparados com o grupo ALA ($p < 0.003$). Este resultado demonstra que as suplementações contendo glutamina foram eficazes em melhorar a disponibilidade de glutamina no fígado.

A função citoprotetora da L-glutamina é comumente associada com as *heat shock proteins*, em especial a sua ação na potencialização da expressão da HSP70, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. (PETRY et al., 2014; SINGLETON et al., 2005).

As proteínas do choque térmico são avaliadas como 'proteínas de estresse', consideradas fundamentais no processo de recuperação e proteção celular. Em condições fisiológicas, as HSP atuam facilitando o enovelamento de novas cadeias peptídicas e translocação de proteínas. Contudo, sob situações de estresse, estas proteínas desempenham um papel citoprotetor,

aumentando a sobrevivência celular. (SCHOENFELD, 2013; CRUZAT et al., 2009).

O exercício físico é conhecido como indutor da expressão de HSP70, promovendo um aumento especialmente da HSP70 no meio intracelular. Durante o exercício, as HSP, sobretudo a HSP70 agem como facilitador de biogênese mitocondrial e regulador de vias apoptóticas (PETRY et al., 2014; SCHOENFELD, 2013; KRAUSE; RODRIGUES-KRAUSE, 2011).

Investigadores sugerem que o efeito anti-inflamatório das HSP se deve a sua ação na inibição do fator de transcrição NF- κ B. Grossman e colaboradores verificaram que ocorre uma inibição transitória da fosforilação do I κ B, que é dependente do período de recuperação entre a proteína do choque térmico e o fator estressor (GROSSMAN et al., 2002; YOO et al., 2000).

No presente estudo, a avaliação do conteúdo hepático da HSP70 demonstrou que as intervenções nutricionais foram capazes de aumentar os estoques desta proteína no fígado quando comparados com o grupo CTRL. Além disso, foi possível verificar que as suplementações associadas ao exercício de força, também foram capazes de aumentar os estoques de HSP70 no fígado, apesar do exercício isolado não apresentar alterações significativas (Figura 5). Apesar do efeito da HSP70 aparentemente estar relacionado com a inibição da via do NF- κ B, os resultados encontrados neste estudo sugerem que o aumento da HSP70 não está diretamente associado à supressão desta via inflamatória e os estoques desta proteína citoprotetora podem aumentar, sem que necessariamente haja diminuição efetiva da atividade de ligação do NF- κ B ao DNA em condições onde não há inflamação sistêmica. Além disso, os grupos que apresentaram valores superiores de glutamina hepática são os mesmos que apresentaram aumento da expressão de HSP70, demonstrando a clara associação entre ambas.

As HSP também podem ser reguladas pela SIRT-1 (KAUPPINEN et al., 2013). A SIRT-1 é um homólogo humano do regulador de informação silenciosa (Sir)-2 encontrado em leveduras. Considerada um sensor metabólico, pois tanto a sua expressão quanto a sua atividade são sensíveis à disponibilidade de nutrientes. A sua expressão é associada à regulação de diversos processos celulares, como biogênese mitocondrial, resposta ao

estresse, sobrevivência celular e estado redox. (GUARENTE, 2013; KITADA et al., 2013; KOTAS; GORECKI; GILLUM, 2013).

A SIRT-1 e o NF- κ B apresentam características de um *crosstalk* antagônico, com o NF- κ B possuindo um fenótipo pró-inflamatório com metabolismo glicolítico, enquanto a SIRT-1 possui respiração oxidativa e resposta anti-inflamatória. A SIRT-1 pode inibir direta ou indiretamente a transcrição gênica do NF- κ B através da desacetilação da unidade relA/p65 em lisina³¹⁰, e simultaneamente, o NF- κ B inibe a atividade da SIRT-1 (KAUPPINEN et al., 2013).

No presente estudo, o exercício de força não foi capaz de alterar as concentrações de SIRT-1 no tecido hepático, quando comparados os grupos SED e CTRL. Entretanto, o grupo DIP apresentou aumento significativo de SIRT-1 ($p < 0.05$), quando comparado com os outros grupos, demonstrando que a suplementação na forma de dipeptídeo foi capaz de aumentar a capacidade citoprotetora do tecido avaliado (Figura 4). Este dado corrobora com o resultado encontrado na análise da atividade de ligação do fator de transcrição NF- κ B ao DNA, onde foi possível verificar uma menor atividade do fator de transcrição no grupo DIP. Uma vez que sabe-se que a SIRT-1 e o NF- κ B agem em *crosstalk* antagônico, é possível afirmar que os níveis aumentados da SIRT-1 neste grupo associado com a diminuição dos níveis de atividade de ligação do NF- κ B ao DNA estão relacionadas (KAUPPINEN et al., 2013).

CONCLUSÃO

O exercício de força, com o protocolo utilizado neste experimento, não foi suficiente para causar inflamação sistêmica e, isto pode ter ocorrido por conta da eficácia da suplementação em atenuar os parâmetros inflamatórios a nível local, no tecido muscular.

A suplementação com glutamina e alanina na sua forma livre ou como dipeptídeo foi eficaz em diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, aumentar os níveis de glutamina no fígado, aumentar os estoques de HSP70 e de SIRT-1 no tecido hepático.

LEGENDA DAS TABELAS

Tabela 1 – Peso dos animais e consumo de ração (g)

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo SED quando comparado com os grupos CTRL, GLN+ALA e DIP (p=0.0001).

Representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo SED quando comparado ao CTRL, ALA, GLN+ALA e DIP (p=0.03 Tukey).

\$ Representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo SED quando comparado ao CTRL, ALA, GLN+ALA e DIP (p=0.002 Tukey)

& Representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo SED quando comparado ao CTRL, ALA, GLN+ALA e DIP (p=0.0001).

Tabela 2. Concentração de glutamina hepática expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco e $\mu\text{mol/g}$ de proteína

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

* Representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo GLN+ALA quando comparado aos grupos SED, CTRL e ALA (p<0.05).

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Peso total e Peso relativo dos fígados (g)

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

@ p=0.003 vs SED

* p<0.0001 vs SED

Figura 2. Atividade de ligação do fator de transcrição NF-κB ao DNA

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

& p=0.005 vs DIP

Figura 3. Expressão das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF-α

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 4. Expressão da SIRT-1 no tecido hepático

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

@ p<0.05 vs DIP

Figura 5. Expressão da HSP70 no tecido hepático

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

p<0.05 vs CTRL

Figura 6. Expressão da enzima Glutamina Sintetase no fígado

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

° p<0.05 vs ALA

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio à pesquisa, concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo: 2012/21087-4) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida (CNPq).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

T.H., R.R., J.S.M.L., V.F.C., J.T.: formulação do projeto. T.H., R.R., J.S.M.L., A.Y.C.: condução da pesquisa. T.H., R.R., K.G.S.: análise dos dados. T.H.: escrita do artigo. R.R., K.G.S., A.Y.C., J.T.: revisão do artigo.

CONFLITO DE INTERESSES

O autor declara não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- BAEZA-RAJA, B.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. p38 MAPK-induced nuclear factor- κ B activity is required for skeletal muscle differentiation role: role of interleukin -6. *Mol Biol Cell* , v.15, p.2013-26, 2004.
- BAKKAR, N.; GUTTRIDGE, D. C. NF- κ B signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev* , v.90, p.495-511, 2010.
- BATTEZZATI, A.; HAISCH, M.; BRILLON, D.J.; MATTHEWS, D.E. Splanchnic utilization of enteral alanine in humans. *Metabol Clin Exp*, v.48, p.915-21, 1999.
- CHEN, G., SHI, J.; QI, M.; YIN, H.; HANG, C. Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappa B activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats. *Inflamm Res*, v.57, p.57-64, 2008.
- CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition* , v.25, n.4, p.428-35, 2009.
- CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. *Cell Biochem Funct* , v.28, p.24–30, 2010.
- CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *J Int Soc Sports Nutr* , v.11, n.61, p. 1-13, 2014.
- CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* , v.81, p. S52-S69, 2002.
- CORBI, G.; CONTI, V.; RUSSOMANNO, G.; LONGOBARDI, G.; FURGI, G.; FILIPPELLI, A.; FERRARA, N. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol* , v. 4, p. 1-14, 2013.
- DELHALLE, S.; BLASIUS, R.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. A beginner's guide to NF- κ B signaling pathways. *Ann NY Acad Sci*, v.1030, p.1-13, 2004.
- DOS SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; DE MELLO, M. T.; BATISTA JR., M. L.; ROSA, L. F. B. P. C. Effect of exercise on glutamine synthesis and transport in skeletal muscle from rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* , v.36, p.770-75, 2009.

FEBBRAIO, M. A.; STEENBERG, A.; KELLER, C.; STARKIE R. L.; NIELSEN, H. B.; KRUSTUP, P.; OTT P.; SECHER, N. H.; PEDERSEN, B. K. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol*, v.549, p. 607-12, 2003.

FEBBRAIO, M.A.; STEENBERG, A.; STARKIE, R.L.; McCONNELL, G. K.; KINGWELL, B. A. Skeletal muscle interleukin-6 and tumor necrosis factor- α release in healthy subjects and patients with type 2 diabetes at rest and during exercise. *Metabolism*, v.52, p. 939-44, 2003.

FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musc Disord*, v.13, p. 1471-2474, 2012.

GLEESON, M. NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise, nutrition and immune function. *J Sports Sci* , v. 22, n.1, p.115-25, 2004.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* , v.103, p. 693-99, 2007.

GROSSMAN, B. J.; SHANLEY, T. P.; ODOMS, K.; DUNSMORE, K. E.; DENENBERG, A. G.; WONG, H. R. Temporal and mechanistic effects of heat shock on LPS-mediated degradation of I kappa B alpha in macrophages. *Inflammation* , v.26, p. 129-36, 2002.

GUARENTE, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Gene Develop*, v. 27, n. 19, p. 2072–85, 2013.

HONG, A.; HONG, S.; SHIN, Y. Effects of Resistance Training on Muscle Strenght , Endurance and Motor Unit According to Ciliary Neurotrophic Polymorphism in Male College Students. *J Sports Sci Med* , v.13, p.680-8, 2014.

HORNBERGER, T. A. JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* , v. 29, p. 16–31, 2004.

KAUPPINEN, A.; SUURONEN, T.; OJALA, J.; KAARNIRANTA, K.; SALMINEN, A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* , v.25, n.10, p.1939-48, 2013.

KITADA, M. et al. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys acta*, v. 1830, n. 10, p. 4820–27, 2013.

KOTAS, M. E.; GORECKI, M. C.; GILLUM, M. P. Sirtuin-1 is a nutriente-dependent modulator of inflammation. *Adipocyte* , v.2, p. 113-18, 2013.

KRAUSE, M.; RODRIGUES-KRAUSE, J. C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. *Med Hypotheses* , v. 76, n.2, p. 286-90, 2011.

LE MEUR, Y. ; LOUIS, J.; AUBRY A.; GUÉNERON, J.; PICHON, A.; SCHAAL, K.; CORCUFF, J.; HATEM, S. N.; ISNARD, R.; HAUSSWIRTH, C. Maximal exercise limitation in functionally overreached triathletes: role of cardiac adrenergic stimulation. *J Appl Physiol*, v.117, n.2, p.214-22, 2014.

OGASAWARA, R.; SATO, K.; MATSUTANI, K.; NAKAZATO, K.; FUJITA, S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Endocrinol Metab* , v.306, p.E1155-E1162, 2014.

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

PEDERSEN, B. K. Exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol* , v.78, p.532-35, 2000.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol Reviews* , v.80, n.3, p.1055-81, 2000.

PETRY, E. R.; CRUZAT, V. F.; HECK, T. G.; LEITE, J. S. M.; BITTENCOURT JR, P. I. H.; TIRAPEGUI, J. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life Sci* , v.94, n.2, p.130-36, 2014.

PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; DE SOUZA, C. T.; SCHENKA, A. A.; ZECCHIN, H. G.; VASSALLO, J.; VELLOSO, L. A.; CARNEIRO, E.; CARVALHEIRA, J. B. C.; CURI, R.; SAAD, M. J. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia*, v.50, p.1949-1959, 2007.

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

ROGERO, M. M.; MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas Com Overtraining. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.49, p.359-368, 2005.

SCHEFFER, D. L.; SILVA, L. A.; TROMM, C. B.; ROSA, G. L.; SILVEIRA, P. C. L.; SOUZA, C. T.; LATINI, A.; PINHO, R. A. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab*, v.37, p.1239-1246, 2012.

SCHELL, M. T.; SPITZER, A. L.; JOHNSON, J. A.; LEE, D.; HARRIS, H. W. Heat Shock Inhibits NF- κ B activation in a dose- and time-dependent manner. *J Surg Res*, v.129, n. 1, p.90-3, 2005.

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

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokines release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock*, v.24, n.6, p. 583-89, 2005.

UENO, P. M.; ORIÁ, R. B.; MAIER, E. A.; GUEDES, M.; AZEVEDO, O. G.; WU, D.; WILLSON, T.; HOGAN, S. P.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L.; POLK, D. B.; DENSON, L. A.; MOORE, S. R. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.301, p.612-622, 2011.

VELLA, L.; CALDOW, M. K.; LARSEN, A. E.; TASSONI, D.; GATTA, P. A. D.; GRAN, P.; RUSSEL, A. P.; CAMERON-SMITH, D. Resistance exercise increases NF- κ B activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, v. 302, p. R667-73, 2012.

WESTERHEIDE, S. D.; ANCKAR, J.; STEVENS Jr, S. M.; SISTONEN, L.; MORIMOTO, R. I. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*, v. 233, p. 1063-66, 2009.

XUE, H.; SLAVOV, D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine-mediated dual regulation of heat-shock transcription factor-1 activation and expression. *J Biol Chem*, v.287 n. 48, p. 40400-13, 2012.

YAN, B.; JYNE, A.; WANG, G.; LU, H.; HUANG, X.; LIU, Y.; ZHA, W.; HAO, H.; ZHANG, Y.; LIU, L.; GU, S.; HUANG, Q.; ZHENG, Y.; SUN, J. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training. *J Appl Physiol*, v.106, p. 531–538, 2009.

YOO, C. G.; LEE, S.; LEE, C. T.; KIM, Y. W.; HAN, S. K.; SHIM, Y. S. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* , v. 164, p. 5416-20, 2000.

Tabela 1. Peso dos animais e consumo de ração (g)

	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Peso animal primeiro dia de experimento	252,30 ± 24,14	241,00 ± 12,90	282,60 ± 21,35	284,40 ± 8,56	254,90 ± 14,77
Peso animal primeiro dia de treinamento	319,90 ± 16,16	301,70 ± 13,87	327,90 ± 21,87	337,50 ± 11,72	306,30 ± 11,81
Peso animal último dia de treinamento	400,00 ± 11,28	370,80* ± 14,27	378,0 ± 17,93	364,00* ± 20,06	347,00* ± 19,61
Ganho de peso durante treinamento	78,00 ± 10,19	38,48 # ± 7,73	32,83 # ± 4,78	36,39 # ± 3,28	35,09 # ± 3,80
Consumo de ração durante todo experimento	170,50 ± 6,19	153,70\$ ± 13,17	152,80\$ ± 10,21	153,30\$ ± 10,05	150,80\$ ± 8,02
Consumo de ração durante treinamento	191,60 ± 11,25	165,20& ± 14,42	161,60& ± 8,60	160,40& ± 8,94	157,60& ± 7,58

Tabela 2. Concentração de glutamina hepática expressos em µmol/g de tecido fresco e µmol/g de proteína

	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina					
Mmol/mg de tecido fresco	6,26±0,66*	6,08±0,59*	5,61±0,29*	8,09± 1,4	7,75±1,2
Mmol/mg de ptn	2,74± 0,54	4,23±1,63	4,09±0,663	3,93±1,07	3,64±0,254

Figura 1. Peso total e Peso relativo dos fígados (g)

Figura 2. Atividade de ligação do fator de transcrição NF- κ B ao DNA

Figura 3. Expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α

Figura 4. Expressão da SIRT-1 no tecido hepático

Figura 5. Expressão da HSP70 no tecido hepático

Figura 6. Expressão da enzima Glutamina Sintetase no fígado

6 RESULTADOS ADICIONAIS

Neste tópico serão apresentados os resultados não utilizados para elaboração do artigo científico. Consumo alimentar avaliado por semana, ALT, AST, LDH.

6.1 Consumo individual de ração por semana

Figura 10. Consumo individual de ração por semana, utilizando as médias semanais de cada animal

Ratos da linhagem *Wistar* ($n=8$), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A partir do gráfico acima, é possível observar que houve menor consumo de ração durante as trocas de cargas do treinamento, sugerindo que o exercício físico, em sua fase de adaptação, quando o organismo é submetido a treinamentos mais intensos, é capaz de suprimir o consumo alimentar.

6.2 Parâmetros Plasmáticos

Lesões nas membranas celulares durante o exercício, podem causar o extravasamento de proteínas do meio intracelular para o meio extracelular. Por causa disso, essas proteínas podem ser consideradas biomarcadores de lesão celular. Dentre os biomarcadores mais avaliados estão LDH (lactato desidrogenase), ALT (alanina aminotransferase) e AST (asparagina aminotransferase) (KALAFATI et al., 2010).

As proteínas supracitadas, são importantes enzimas com ação intracelular, porém não possuem nenhuma atividade plasmática. Como biomarcadores, estas proteínas podem indicar o órgão de ocorrência da lesão. A enzima ALT é específica do fígado e, alterações neste marcador podem indicar lesão no respectivo órgão, por outro lado, a LDH é largamente utilizada no metabolismo muscular e, por isso, alterações nas suas concentrações plasmáticas apontam para aumento da permeabilidade ou lesão de células musculares (DI BONITO et al., 20009; SKENDERI et al., 2008).

Geralmente, parte-se do princípio que exercícios exaustivos podem causar lesão celular seguida pelo extravasamento das enzimas intracelulares: LDH, ALT e AST e outras enzimas relacionadas (BRANCACCIO; LIPPI; MAFFULI, 2010).

Estudo conduzido por Romagnoli e colaboradores (2014), verificou que o *baseline* das enzimas ALT e LDH se encontravam normalmente aumentados em humanos considerados treinados, quando comparados com sedentários. Outro estudo, que avaliou exercício físico máximo demonstrou elevação transitória das enzimas musculares e hepáticas (BURGER-MENDONCA; BIELAVSKY; BARBOSA, 2008).

Evidentemente, as alterações nas enzimas biomarcadoras de lesão hepática estão diretamente relacionadas com a intensidade do exercício praticado (RAMOS et al., 2013). O tempo e a quantidade do extravasamento extracelular dos marcadores de lesão dependem de características como o grau de treinamento do atleta, tipo, intensidade e duração do exercício, bem como o período de recuperação pós-treino (LIPPI et al., 2008). Para que estas tenham seus níveis aumentados, é necessário que a intensidade do exercício tenha sido muito alta, o que parece não ter sido o caso do protocolo utilizado

no presente estudo, sendo que não houve alterações significativas nestas enzimas.

6.2.1 Lactato Desidrogenase

Figura 11 – Concentração plasmática da enzima lactato-desidrogenase (U/L)

Ratos da linhagem *Wistar* ($n=8$), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Não houve diferença significativa nas amostras referentes à quantidade plasmática da enzima lactato desidrogenase. Este fato sugere que não houve lesão tecidual significativa, a ponto de haver extravasamento dessa enzima para o meio extracelular. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa, é possível perceber que o grupo alanina possuiu menores concentrações desta enzima. A lactato-desidrogenase é a enzima responsável pela interconversão de piruvato a lactato, além de ser um biomarcador de lesão

celular. Este resultado pode estar relacionado com a atividade glicogênica da alanina.

6.2.2 Alanina Aminotransferase (ALT)

As transaminases fazem parte de um grupo de importantes enzimas que catalisam a transferência de um grupamento amina de um aminoácido para um cetoácido. A ALT, assim como a aspartato aminotransferase (AST) são importantes para a detecção de disfunções metabólicas, principalmente ligadas ao fígado, pois é neste órgão onde elas desempenham um importante papel no metabolismo dos aminoácidos (BARBOSA et al., 2010).

Figura 12 – Concentração plasmática da enzima alanina aminotransferase (U/L)

Ratos da linhagem *Wistar* (n=8), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na

forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Não houve diferença estatisticamente significativa na dosagem da enzima alanina aminotransferase, demonstrando que provavelmente não houve danos no tecido hepático, decorrentes do exercício de força. Porém, é possível notar uma menor concentração desta enzima no grupo GLN+ALA. Sabe-se que no músculo e em alguns outros tecidos que degradam aminoácidos como combustível, os grupos aminos são coletados na forma de glutamato, por transaminação. O glutamato pode ser convertido em glutamina para transporte ao fígado ou pode transferir seu grupo α -amino para o piruvato, um produto da glicólise muscular facilmente disponível pela ação da alanina-aminotransferase (ALT). A alanina assim produzida passa para o sangue e segue para o fígado. No citosol dos hepatócitos, a alanina-aminotransferase transfere o grupo amino a alanina para o α -cetoglutarato, formando piruvato e glutamato, ou seja, a diminuição de ALT no grupo GLN+ALA possivelmente está relacionada ao aminoácido glutamina.

6.2.3 Aspartato aminotransferase (AST)

Figura 13 – Concentração plasmática da enzima aspartato aminotransferase (UI/L)

Ratos da linhagem *Wistar* ($n=8$), divididos em cinco grupos, sendo um grupo SED recebendo apenas água e quatro grupos treinados : CTRL, ALA, GLN+ ALA e DIP submetidos a treinamento de força com subida em escada durante seis semanas e suplementados de forma crônica por via oral com água, L-alanina na forma livre, solução de L-glutamina e L-alanina na forma livre e dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, respectivamente durante 21 dias. Dados expressos em média e desvio padrão.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Apesar de não demonstrar diferença estatisticamente significativa, a aspartato aminotransferase, assim como a alanina aminotransferase seguiram o mesmo padrão, demonstrando que não houve lesão hepática com o protocolo de exercício realizado no presente trabalho. Porém, novamente é possível observar com redução nos níveis desta enzima no grupo GLN+ALA. A ação de ambas as aminotransferases é semelhante, ambas agem transferindo um grupamento amino de um aminoácido para um cetoácido, com a diferença que a AST não é específica do fígado, estando também presente em células

musculares. A diminuição específica neste grupo, pode estar relacionada com a presença do aminoácido L-glutamina.

7 CONCLUSÃO

O exercício de força, com o protocolo utilizado neste experimento, não foi suficiente para causar inflamação sistêmica e, isto pode ter ocorrido por conta da eficácia da suplementação em atenuar os parâmetros inflamatórios a nível local, no tecido muscular.

Além disso, não houve alterações nas enzimas hepáticas que pudessem sugerir dano tecidual. Estes dados corroboram com a insuficiência de inflamação sistêmica encontrada.

A suplementação com glutamina e alanina na sua forma livre ou como dipeptídeo foi eficaz em diminuir a atividade de ligação do NF- κ B ao DNA, aumentar os níveis de glutamina no fígado, aumentar os estoques de HSP70 e de SIRT-1 no tecido hepático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, F.; BIOLO, G. Effect of physical activity on glutamine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* , v.13, p.58-64, 2010.
- ARAÚJO, CGS. Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial. Uma breve introdução. *Revista hipertensão*, 2001.
- BACURAU, R. F.; BASSIT, R. A.; SAWADA, L.; NAVARRO, F.; MARTINS, E. Jr.; COSTA ROSA, L. F. Carbohydrate supplementation during intense exercise and the immune response of cyclists. *Clin Nutr* , v.21, n.5 p. 423-29, 2002.
- BAEZA-RAJA, B.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. p38 MAPK-induced nuclear factor- κ B activity is required for skeletal muscle differentiation role: role of interleukin - 6. *Mol Biol Cell* , v.15, p.2013-26, 2004.
- BAKKAR, N.; GUTTRIDGE, D. C. NF- κ B signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev* , v.90, p.495-511, 2010.
- BARBOSA, A. A.; MÜLLER, E. S.; MORAES, G. H. K.; UMIGI, R. T.; BARRETO, S. L. T.; FERREIRA, R. M. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. *R Bras Zootec* , v.39, n. 2, 2010.
- BIOLO, G.; DE CICCIO, M.; DAL MAS, V.; LORENZON, S.; ANTONIONE, R.; CIOCCHI, B.; BARAZZONI, R.; ZANETTI, M.; DORE, F.; GUARNIERI, G. Response of muscle protein and glutamine kinetics to branched-chain enriched amino acids in intensive care patients after radical cancer surgery. *Nutrition* , v.22, n.5, p. 475-82, 2006.
- BRANCACCIO, P.; LIPPI, G.; MAFFULI, N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med*, v. 46, n.8, p.757-67, 2010.
- BRUM, P. C.; FORJAZ, C. L. M.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C. E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Rev Paul Educ Fís* , v.18, p.21-31, 2004.

- BURGER-MENDONCA, M.; BIELAVSY, M.; BARBOSA, F.C. Liver overload in Brazilian triathletes after half-ironman competition is related muscle fatigue . *Ann Hepatol*, v.7, p.245-8, 2008.
- 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* , v.75, p. 47-53, 1997.
- CHEN, G., SHI, J.; QI, M.; YIN, H.; HANG, C. Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappa B activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats. *Inflamm Res*, v.57, p.57-64, 2008.
- CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil* , v.81, p. S52-S69, 2002.
- CORBI, G.; CONTI, V.; RUSSOMANNO, G.; LONGOBARDI, G.; FURGI, G.; FILIPPELLI, A.; FERRARA, N. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol* , v. 4, p. 1-14, 2013.
- COUTTS, A. J.; REABURN, P.; PIVA, T. J.; ROWSELL, G. J. Monitoring for overreaching in rugby league players. *Eur J Appl Physiol* , v.99, p.313-24, 2007.
- CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; BORGES, M. C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte*, v.13, p.336-342, 2007.
- CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition* , v.25, n.4, p.428-35, 2009.
- CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. *Cell Biochem Funct* , v.28, p.24–30, 2010.

- CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *J Int Soc Sports Nutr* , v.11, n.61, p. 1-13, 2014.
- CRUZAT, V. F.; PANTALEÃO, L. C.; DONATO, J. Jr.; de BITTENCOURT, P. I. Jr.; TIRAPEGUI, J. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. *J Nutr Biochem* , v.25, p. 345-52, 2014.
- CURI, R.; NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LAGRANHA, C.; GORJÃO, R.; PITHON-CURI, T. C. Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*, v.12, p.344-57, 2007.
- DELHALLE, S.; BLASIUS, R.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. A beginner's guide to NF-Kb signaling pathways. *Ann NY Acad Sci*, v.1030, p.1-13, 2004.
- DI BONITO, P.; SANGUIGNO, E.; DiFRAIA, T.; FORZIATO, C.; BOCCIA, G.; SAITTA, F.; Association of elevated sérum alanine aminotransferase with metabolic factors in obese children: sex-related analysis. *Metab Clin Exp*, v.58, n.3, p.368-72, 2009.
- DOS SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; DE MELLO, M. T.; BATISTA JR., M. L.; ROSA, L. F. B. P. C. Effect of exercise on glutamine synthesis and transport in skeletal muscle from rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* , v.36, p.770-75, 2009.
- FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musc Disord*, v.13, p. 1471-2474, 2012.
- GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* , v.103, p. 693-99, 2007.
- GLEESON, M. NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise, nutrition and immune function. *J Sports Sci* , v. 22, n.1, p.115-25, 2004.

- GOMES, M. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, T. Nutrição e Atividade Esportiva. In: Julio Tirapegui. *Nutrição e Aspectos Atuais*. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 143-59.
- GROSSMAN, B. J.; SHANLEY, T. P.; ODOMS, K.; DUNSMORE, K. E.; DENENBERG, A. G.; WONG, H. R. Temporal and mechanistic effects of heat shock on LPS-mediated degradation of I kappa B alpha in macrophages. *Inflammation* , v.26, p. 129-36, 2002.
- GUARENTE, L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Gene Develop*, v. 27, n. 19, p. 2072–85, 2013.
- HADDAD, J. J.; ABDEL-KARIM, N. E. NF-κB cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: Therapeutic pattern or pseudoregulation? *Cell Immunol*, v.271, p.5-14, 2011.
- HALSON S.L.; LANCASTER, G. I.; JEUKENDRUP, A. E.; GLEESON, M. Immunological Responses to Overreaching in Cyclists. *Med Sci Sports Exerc* , v.35, n.5, p. 854-61, 2003
- HALSON, S. L; JEUKENDRUP, A. E. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med* , v. 31, no. 14, p. 967-981, 2004.
- HASKELL, W. L.; LEE, I. M.; PATE, R. R.; POWELL, K. E.; BLAIR, S. N.; FRANKLIN, B. A.; MACERA, C. A.; HEATH, G. W.; THOMPSON, P. D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, v. 116, p. 1081-93, 2007.
- HO, R. C.; HIRSHMAN, F. C.; LI, Y.; CAI, D.; FARMER, J. R.; ASCHENBACH, W. G.; WITCZAK, C. A.; SHOELSON, S. E.; GOODYEAR, L. J. Regulation of IκB kinase and NF-κB in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 289, p. c749-c801, 2005.
- HONG, A.; HONG, S.; SHIN, Y. Effects of Resistance Training on Muscle Strenght , Endurance and Motor Unit According to Ciliary Neurotrophic

Polymorphism in Male College Students. *J Sports Sci Med* , v.13, p.680-8, 2014.

- HORNBERGER, T. A. JR.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol* , v. 29, p. 16–31, 2004.

- JAKICIC, J. M.; OTTO, A. D. Treatment and prevention of obesity: what is the role of exercise? *Nutrition Reviews*, v. 64, p. S57-61, 2006.

- KALAFATI, M.; JAMURTAS, A.Z.; NIKOLAIDS, M.Z.; PASCHALIS, V.; THEODOROU, A.A.; SAKELLARIOU, G.K. Ergogenic and antioxidante effects of spirulina supplementation in humans. *Med Sci Sports Exerc*, v.42, n.1, p.142-51, 2010.

- KARGOTICH, S.; KEAST, D.; GOODMAN, C.; BHAGAT, C. I.; JOSKE, D. J.; DAWSON, B.; MORTON, A. R. Monitoring 6 weeks of progressive endurance training with plasma glutamine. *Int J Sports Med* , v.28, n.3, p.211-16, 2007.

- KAUPPINEN, A.; SUURONEN, T.; OJALA, J.; KAARNIRANTA, K.; SALMINEN, A. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cell Signal* , v.25, n.10, p.1939-48, 2013.

- KIM, S.; JUN, T.; LEE, Y.; NA, H.; SUHR, Y.; SONG, W. Effects of Exercise on Cyclooxygenase-2 Expression and Nuclear Factor- κ B DNA Binding in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Ann NY Acad of Sci*, v.1171, p.464-471, 2009.

- KITADA, M. et al. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys acta*, v. 1830, n. 10, p. 4820–27, 2013.

- KRAUSE, M.; RODRIGUES-KRAUSE, J. C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: possible targets outside the immune system and their

role for neurodegenerative disorders treatment. *Med Hypotheses* , v. 76, n.2, p. 286-90, 2011.

- KOTAS, M. E.; GORECKI, M. C.; GILLUM, M. P. Sirtuin-1 is a nutriente-dependent modulator of inflammation. *Adipocyte* , v.2, p. 113-18, 2013.

- LABOW, B. I.; SOUBA, W. W.; ABCOUWER, S. F. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism – glutaminase and glutamine synthetase. *J Nutr*, v. 131, p. 2467S-74S, 2001.

- LE MEUR, Y.; HAUSSWIRTH, C.; NATTA, F.; COUTURIER, F.; BIGNET, F.; VIDAL, P. P. A multidisciplinary approach to overreaching detection in endurance trained athletes. *J Appl Physiol*, v.114, n.1, p.411-20, 2013.

- LE MEUR, Y. ; LOUIS, J.; AUBRY A.; GUÉNERON, J.; PICHON, A.; SCHAAL, K.; CORCUFF, J.; HATEM, S. N.; ISNARD, R.; HAUSSWIRTH, C. Maximal exercise limitation in functionally overreached triathletes: role of cardiac adrenergic stimulation. *J Appl Physiol*, v.117, n.2, p.214-22, 2014.

- LIPPI, G.; SCHENA, F.; MONTAGNANA, M.; SALVAGNO, G.L.; GUIDI, G.C. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers . *Clin Chem Lab Med*, n.46, p.1313-8, 2008.

- MEEUSEN, R.; DUCLOS, M.; FOSTER, C.; FRY, A.; GLEESON, M.; NIEMAN, D.; RAGLIN, J.; RIETJENS, G.; STEINACKER, J.; URHAUSEN, A. Prevention, Diagnosis and Treatment of the Overtraining Syndrome: Joint Consensus Statement of the European College of Sports Science and the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc* , v.45, p.186-205, 2012.

- MENDES, R. R.; GOMES, M. R.; MARQUES, L. R.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Suplementos Ergogênicos e Atividade Física. IN: Julio Tirapegui. Nutrição e Aspectos Atuais. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 161-80.

- NEU, J.; SHENOY, V.; CHAKRABARTI, R. Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here? *FASEB J* , v.10, p. 829-37, 1996.

- NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M. M. R.; PHITON-CURI, T. C.; CURI, R. Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*, v.21, p.1-9, 2003.
- OGASAWARA, R.; SATO, K.; MATSUTANI, K.; NAKAZATO, K.; FUJITA, S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Endocrinol Metab* , v.306, p.E1155-E1162, 2014.
- PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* , v.18, p.6853-66, 1999.
- PAULSEN, G.; VISSING, K.; KALHOVDE, J. M.; UGELSTAD, I.; BAYER, M. L.; KADI, F.; SCHJERLING, P.; HALLÉN, J.; RAASTAD, T. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.2, p.44-53, 2007.
- PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercises in humans. *Exerc Immunol Rev* , v.11, p.64-85, 2005.
- PEDERSEN, B. K. Exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol* , v.78, p.532-35, 2000.
- PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol Reviews* , v.80, n.3, p.1055-81, 2000.
- PETRY, E. R.; CRUZAT, V. F.; HECK, T. G.; LEITE, J. S. M.; BITTENCOURT JR, P. I. H.; TIRAPEGUI, J. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life Sci* , v.94, n.2, p.130-36, 2014.
- PRADA, P. O.; HIRABARA, S. M.; DE SOUZA, C. T.; SCHENKA, A. A.; ZECCHIN, H. G.; VASSALLO, J.; VELLOSO, L. A.; CARNEIRO, E.; CARVALHEIRA, J. B. C.; CURI, R.; SAAD, M. J. L-glutamine supplementation

induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia*, v.50, p.1949-1959, 2007.

- RAMOS, D.; MARTINS, E.G.; VIANA-GOMES, D.; CASIMIRO-LOPES, G.; SALERNO, V.P. Biomarkers of oxidative stress and tissue damage released by muscle and liver after a single bout of swimming exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*, v. 38, p.507-11, 2013.

- ROBSON, P. J.; BLANNIN, A. K.; WALSH, N. P.; CASTELL, L. M.; GLEESON, M. Effect of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in males athletes. *Int J Sports Med* , v.20, n.2, p.128-30, 1999.

- ROGERO, M. M.; MENDES, R. R.; TIRAPEGUI, J. Aspectos Neuroendócrinos e Nutricionais em Atletas Com Overtraining. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.49, p.359-368, 2005.

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

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

- ROMAGNOLI, M.; ALIS, R.; ALOE, R.; SALVAGNO, G.L.; BASTERRA, J.; PAREJA-GALEANO, H.; SANCHIS-GOMAR, F.; LIPPI, G. Influence of training and a maximal exercise test in analytical variability of muscular, hepatic and cardiovascular biochemical variables. *Scand J Clin Lab invest*, v. 74, p.192-8, 2014.

- SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; ROSA, L. F. B. P. C. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci* , v.80, p.573-78, 2007.

- SCHEFFER, D. L.; SILVA, L. A.; TROMM, C. B.; ROSA, G. L.; SILVEIRA, P. C. L.; SOUZA, C. T.; LATINI, A.; PINHO, R. A. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab* , v.37, p.1239-1246, 2012.
- SCHELL, M. T.; SPITZER, A. L.; JOHNSON, J. A.; LEE, D.; HARRIS, H. W. Heat Shock Inhibits NF-kB activation in a dose- and time-dependent manner. *J Surg Res* , v.129, n. 1, p.90-3, 2005.
- SCHOENFELD, B. J. Potential Mechanisms for a Role of Metabolic Stress in Hypertrophic Adaptations to Resistance Training. *Sports Med*, v.43, p.179-194, 2013.
- SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. *Rev Bras Cineantropom Desemp Hum* , v. 13, p. 320-28, 2011.
- SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF-kB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokines release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock* , v.24, n.6, p. 583-89, 2005.
- SKENDERI, K.P.; TSIRONI, M.; LAZAROPOULOU, Z.; ANASTASIOU, C.A.; MATALAS, A.L.; KANAVAKI, I. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *Eur J Clin Invest*, v. 38, n.3, p.159-65, 2008.
- UENO, P. M.; ORIÁ, R. B.; MAIER, E. A.; GUEDES, M.; AZEVEDO, O. G.; WU, D.; WILLSON, T.; HOGAN, S. P.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L.; POLK, D. B.; DENSON, L. A.; MOORE, S. R. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.301, p.612-622, 2011.
- VELLA, L.; CALDOW, M. K.; LARSEN, A. E.; TASSONI, D.; GATTA, P. A. D.; GRAN, P.; RUSSEL, A. P.; CAMERON-SMITH, D. Resistance exercise increases NF-kB activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, v. 302, p. R667-73, 2012.

- WESTERHEIDE, S. D.; ANCKAR, J.; STEVENS Jr, S. M.; SISTONEN, L.; MORIMOTO, R. I. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* , v. 233, p. 1063-66, 2009.
- WISCHMEYER, P. E. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* , v. 18, p. 225-28, 2002.
- XUE, H.; SLAVOV, D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine-mediated dual regulation of heat-shock transcription factor-1 activation and expression. *J Biol Chem*, v.287 n. 48, p. 40400-13, 2012.
- YAN, B.; JYNE, A.; WANG,G.; LU, H.; HUANG, X.; LIU, Y.; ZHA, W.; HAO, H.; ZHANG, Y.; LIU, L.; GU, S.; HUANG, Q.; ZHENG, Y.; SUN, J. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training. *J Appl Physio*, v.106, p. 531–538, 2009.
- YOO, C. G.; LEE, S.; LEE, C. T.; KIM, Y. W.; HAN, S. K.; SHIM, Y. S. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I kappa B alpha through preventing I kappa B kinase activation in respiratory epithelial cells. *J Immunol* , v. 164, p. 5416-20, 2000.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 14.2015-P493

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeito da suplementação oral crônica de L-glutamina e L-alanina livres ou conjugadas sobre parâmetros inflamatórios no fígado de ratos submetidos a exercício de força intenso**" (Protocolo CEUA/FCF/493), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Thaís Menezes Hypólito**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **6 de março de 2015**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 10 de março de 2015.

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