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

**Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres
ou como dipeptídeo sobre o estresse oxidativo e HSP27 em ratos
submetidos a exercício resistido.**

Jaqueline Santos Moreira Leite

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Julio Orlando

Tirapegui Toledo

São Paulo
2015

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

Leite, Jaqueline Santos Moreira
L533e Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina
livres ou como dipeptídeo sobre o estresse oxidativo e HSP27 em
ratos submetidos a exercício resistido / Jaqueline Santos Moreira
Leite. -- São Paulo, 2015.
81p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.

Orientador: Tirapegui Toledo, Julio Orlando

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

641.1 CDD

Jaqueline Santos Moreira Leite

**Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres
ou como dipeptídeo sobre o estresse oxidativo e HSP 27 em ratos
submetidos a exercício resistido**

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

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Julio Orlando Tirapegui Toledo
Orientador /Presidente da Banca

Newton Nunes
1º examinador

Milton Rocha Moraes
2º examinador

São Paulo, 14 de abril de 2015

"Não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas."

Albert Einstein

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida, por sempre me mostrar seu plano. A nossa senhora por me proteger e me iluminar, por sempre estar comigo nos momentos de alegria e tristeza.

Aos meus pais José e Vera, meus irmãos Danilo, Murilo e Bruno por serem os maiores incentivadores para a realização deste sonho e por entenderem a distância e minha ausência em vários momentos ao longo desta jornada.

Ao meu Orientador Julio Tirapegui por me dar a oportunidade de ser orientada por ele, e por todo aprendizado e confiança em mim depositada.

Ao meu namorado Roberto por todo apoio, companheirismo e compreensão durante esta jornada.

Ao meu amigo Dr. Vinicius Fernandes Cruzat, por toda ajuda e incentivo desde o início deste projeto de mestrado.

Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo e amizade, em especial a Raquel Raizel por toda ajuda durante este mestrado.

Aos meus amigos de Campo Grande e São Paulo por todo apoio nos momentos de alegria e tristeza.

LEITE, J.S.M. **Efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina livres ou como dipeptídeo sobre o estresse oxidativo e HSP27 em ratos submetidos a exercício resistido.** São Paulo, 2015. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Introdução: O exercício resistido em nível atlético pode promover estresse oxidativo crônico, fato que implica em uma resposta imuno-inflamatória exacerbada com consequente redução de desempenho e efeitos à saúde. Ao mesmo tempo, exercícios de caráter intenso elevam o consumo de glutamina por células e tecidos, reduzindo assim a disponibilidade deste aminoácido ao organismo. Todavia, estudos avaliando o metabolismo da glutamina em exercício do tipo resistido ainda são escassos. A síntese de antioxidantes, tais como a glutatona (GSH) e proteínas citoprotetoras como proteínas de choque térmico (HSPs) podem ser influenciadas pela disponibilidade de glutamina. **Objetivo:** Avaliar o efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina e L-alanina, ambas na forma livre ou como Dipeptídeo sobre o estresse oxidativo e citoproteção mediado pela HSP 27 em ratos submetidos a exercício resistido. **Métodos:** Cinquenta ratos Wistar machos adultos (n = 10 por grupo) foram distribuídos em 5 grupos experimentais: Sedentário (SED), Treinado (CTRL) e suplementados com DIP, solução com L-glutamina e L-alanina livres (GLN+ALA) e somente L-Alanina (ALA), e foram submetidos ao protocolo de subida em escada durante 6 semanas, suplementados na água de beber em uma solução à 4%, nos últimos 21 dias do experimento. Foram analisados: teste de carga máxima, lactato sanguíneo, glutamina e glutamato (plasma, fígado e músculo –Tibial e EDL), creatina kinase e mioglobina (plasma) transaminases (plasma), glutatona oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) (papa de hemácias, fígado e músculo – Tibial e EDL), TBARS (fígado e músculo- Tibial e EDL) e, expressão de HSP-27 e Glutamina Sintetase (músculo Tibial). **Resultados:** Os resultados demonstraram que o protocolo de exercício resistido reduziu a concentração de glutamina no músculo ($p<0,05$), aumentou a razão [GSSG/GSH] no fígado, papa de hemácia e músculo ($p<0,05$), e consequentemente houve aumento de TBARS nos tecidos. Já as suplementações com L-glutamina e L-alanina livres e como dipeptídeo aumentaram as concentrações de glutamina no plasma e tecidos ($p<0,05$), melhoraram a razão de [GSSG/GSH] no fígado, papa de hemácias e músculo ($p<0,05$). Também foi encontrado aumento da expressão de HSP 27 no Tibial, redução de TBARS nos tecidos, e creatina kinase no plasma ($p<0,05$). **Conclusão:** As suplementações com L- glutamina e L- alanina livres ou como dipeptídeo aumentam a síntese de GSH e a expressão de HSP 27, atenuando assim o estresse oxidativo causado pelo exercício resistido.

Palavras- chaves: HSP 27, Glutatona, Exercício físico

LEITE, J.S.M. **Effect of chronic oral supplementation with L-glutamine and L-alanine, both in its free form or as dipeptide on oxidative stress and HSP27 in rats submitted to resistance exercise.** São Paulo in 2015. Master-Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

ABSTRACT

Introduction: Athletic Resistance exercise way promotes chronic oxidative stress, which implies in exacerbated immune inflammatory response with consequent reduction in performance and health effects. At the same time, intense exercise improves consumption of glutamine for cells and tissues, thereby reducing the availability of this amino acid to the body. However, studies evaluating the glutamine metabolism in resistance exercise are still scarce. The synthesis of antioxidants such as glutathione (GSH) and cytoprotective proteins such as heat shock proteins (HSPs) can be influenced by the availability of glutamine. **Objective:** To evaluate the effect of chronic oral supplementation with L-glutamine and L-alanine, both in its free form or as dipeptide on oxidative stress and the cytoprotection mediated by HSP 27 in rats subjected to resistance exercise. **Methods:** Fifty (n = 10 per group) Wistar adult rats were divided into 5 groups: Sedentary (SED), Trained (CTRL) and supplemented with DIP, solution with L-glutamine and free L-alanine (GLN + ALA) and L-alanine (ALA). The trained groups were underwent to climb stairs protocol for six weeks. Supplementations were offered in 4% solution in drinking water in the last 21 days of the experiment. Were analyzed: maximum load test, blood lactate, glutamine and glutamate (in plasma, liver and muscle *Tibialis* and EDL), creatine kinase and myoglobin (plasma), transaminase (plasma), oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione (erythrocytes, liver and muscle- *Tibialis* and EDL), TBARS (liver and muscle *Tibialis*- and EDL), HSP-27 and Glutamine Synthetase expression (*Tibialis* muscle). **Results:** The results showed that resistance exercise protocol reduced glutamine concentration in muscle (p <0.05) increased the ratio [GSSG / GSH] in the liver, erythrocytes and muscle (p <0.05), and TBARS increase the tissue. The Supplementation with L-glutamine and L-alanine and free dipeptide and increased glutamine concentrations in the plasma and tissues (p <0.05), improved the ratio of [GSSG / GSH] in liver, erythrocytes and muscle (p <0.05). HSP 27 expression was also increased in *Tibialis* Muscle. There was reduction of TBARS in tissues and creatine kinase in plasma (p <0.05). **Conclusion:** Supplementations with L-glutamine and L-alanine in its free form or as dipeptide increase the synthesis of GSH and Expression HSP 27, thus reducing oxidative stress caused by resistance exercise.

Keywords: HSP 27, Glutathione, Exercise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema com a origem de espécies reativas durante o processo de isquemia e reperfusão sanguínea.....	8
Figura 2- Funções da glutamina no organismo. Adaptado de Borges, Rogero e Tirapegui (2008).....	16
Figura 3- Quadro com estudos com suplementação de glutamina em humanos nas diferentes modalidades de esportiva. Adaptado de Cruzat, Alvarenga e Tirapegui (2010).....	21
Figura 4- Esquema do protocolo de treinamento utilizado no experimento.....	29
Figura 5- Carga máxima dos animais durante o experimento.....	40
Figura 6- Delta de concentração de lactato a cada mudança de carga	42
Figura 7- Conteúdo de proteína no músculo Tibial.....	52
Figura 8- Conteúdo de proteína no músculo EDL.....	53
Figura 9- Expressão proteica de glutamina sintetase no músculo tibial.....	54
Figura 10- Expressão proteica de HSP 27 no músculo tibial.....	55
Figura 11- Quadro com o resumo dos resultados encontrados no sangue.....	56
Figura 12- Quadro com resultados encontrados no fígado.....	57
Figura 13- Resumo dos resultados encontrados no músculo Tibial.....	58
Figura 14- Quadro com os resultados encontrados no músculo EDL.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Média de consumo de ração durante o experimento, ingestão hídrica, ingestão de Aa e Ingestão de glutamina	37
Tabela 2- Ganho de peso corporal durante o experimento e peso dos músculos	39
Tabela 3- Concentração de Glutamina e Glutamato plasmáticos.....	41
Tabela 4- Concentração de lactato em repouso a cada mudança de carga	42
Tabela 5- Concentração plasmática de Creatina quinase e Mioglobina	43
Tabela 6 - Concentração plasmática de ureia, creatinina, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e Gama-glutamyl transferase (GGT).....	44
Tabela 7- Concentração eritrocitária de Glutathione reduzida (GSH), Glutathione oxidada (GSSG) e razão GSSG/GSH.....	45
Tabela 8 –Concentração de glutamina, glutamato e razão glutamina e glutamato (GLN/GLU) no fígado.....	46
Tabela 9 - Concentração de glutamina, glutamato e razão glutamina e glutamato (GLN/GLU) no musculo Tibial	47
Tabela 10 - Concentração de glutamina, glutamato e razão glutamina e glutamato (GLN/GLU) no musculo EDL.....	48
Tabela 11- Concentração de Proteínas Reativas ao Ácido Tiobarbiturico (TBARS).....	49
Tabela 12- Concentração de Glutathione reduzida (GSH), Glutathione Oxidada (GSSG) e razão GSSG/GSH no fígado.....	50
Tabela 13 Concentração de Glutathione Reduzida (GSH) e Glutathione Oxidada (GSSG) e razão GSSG/GSH no músculo Tibial.....	51
Tabela 14- Concentração de Glutathione oxidada (GSSG) e Reduzida (GSH) e razão GSSG/GSH no músculo EDL.....	52

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

O₂⁻ - Radical superóxido	GSSG - Glutathiona oxidada
O₂ -Oxigênio	HO₂ - Hidroperóxido
1RM - 1 repetição máxima	H₂O₂ - Peroxido de hidrogênio
AACR - Aminoácidos de cadeia ramificada	HK - Hexoquinase
ADP - Adenosina difosfato	HRP - Peroxidase de rábano
ALT -Alanina aminotransferase	HSPs - Proteínas de choque térmico
AST - Aspartato aminotransferase	IGF - Fatores de crescimento semelhante à insulina
ATP - Adenosina trifosfato	IL-1β - Interleucina 1 beta
C-CG - C- glutamilcisteína	IL-6 – Interleucina 6
CK - Creatina quinase	ITRS – Síndrome do trato respiratório superior
CSS - GSH sintetase	KOH -Hidróxido de potássio
DNA - Ácido desoxirribonucleico	MDA -Malondialdeído
DPI - Diphenylionium	mM - Nanomolar
DTNB - 5,5- ditio-bis- (2- nitrobenzóico)	MPA - Ácido metafosfórico
EDL - Extensor longo dos dedos	Na⁺ - Ion sódio
ERN - Espécies reativas ao nitrogênio	NAD⁺ -Adeninanicotinamida dinucleotideo
ERO - Espécies reativas de oxigênio	NEM - N-etilmaleimida
FOR - Overreaching funcional	NF-κB - Fator nuclar kappa B
G-6-PDH - Glicose- 6 -fosfato desidrogenase	NH₃ -Íon amônia
GA - Glutaminase	NH₄ - Ion amônio
GABA - Ácido gamabutirico	NO[•] - Óxido nítrico
GCL - glutamato- cisteína – ligase	OH⁻ - Radical hidroxila
GCLM - gene glutamato cisteína -ligase	ONOO[•] - Peroxinitrito
GDH - glutamato desidrogense	OR - Overreaching
GLS – Glutaminase	RNA - ácido ribonucleico
GPx - Glutathiona peroxidase	RSH - Resíduos de cisteína
GS -Radical thiol	
GSH - Glutathiona reduzida	

RSOH- Ácido sulfênico

TBA- Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substancias reativas ao
ácido tiobarbitúrico

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VO₂ máx- Volume de oxigênio máximo

XDH- Xantina desidrogenase

XO- Xantina Oxidase

SIRT-1 – Sirtuina -1

Hur- Antígeno humano R

TCA- Ácido tricloroacético

PCR- Proteína C reativa

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	4
2.OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 Exercício intenso, lesão e estresse oxidativo.....	7
3.2... Exercício físico intenso e Glutamina.....	10
3.3 Proteínas de choque térmico (HSPs) e Exercício Físico	13
3.4 Aspectos bioquímicos e metabólicos da glutamina.....	14
3.5 Glutamina e exercício físico.....	17
3.6 Efeitos da suplementação de glutamina.....	18
3.7 Alanina: aspectos metabólicos, exercício e suplementação.....	24
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Condições experimentais.....	27
4.1.1 Animais.....	27
4.1.2 Desenho experimental.....	27
4.1.3 Grupos Experimentais.....	27
4.1.4 Dieta e Suplementação.....	28
4.1.5 Protocolo de treinamento.....	28
4.1.6 Teste de Carga máxima.....	29
4.1.6 Eutanásia dos animais e coleta das amostras.....	30
4.2 Parâmetros plasmáticos e séricos.....	30
4.2.1 Lactato.....	30

4.2.2 Creatina quinase.....	30
4.2.3 Mioglobina.....	31
4.2.4 Glutamina e glutamato plasmático.....	31
4.2.5 Glutationa reduzida (GSH) e dissulfeto de glutaciona (GSSG) eritrocitária.....	32
4.2.6 Transaminases.....	33
4.2.7 Ureia e Creatinina.....	33
4.3 Parâmetros teciduais.....	34
4.3.1 Glutamina e glutamato tecidual	34
4.3.2 Glutationa reduzida (GSH) e dissulfeto de glutaciona (GSSG).....	34
4.3.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	35
4.3.4 Quantificação de proteína.....	35
4.3.5 Expressão proteica (Análises de Western Blotting).....	35
4.4 Análise estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Parâmetros biométricos.....	37
5.1.1 Consumo de ração e Ingestão hídrica.....	37
5.1.2- Peso corporal.....	38
5.1.3 Teste de Carga máxima.....	40
5.2 Parâmetros sanguíneos.....	41
5.2.1 Concentração de Glutamina e glutamato plasmática	41
5.2.2 Lactato.....	42
5.2.3 Parâmetros de Lesão.....	43
5.2.4 Transaminases, Ureia e Creatinina.....	44
5.2.5 Concentração de Glutationa oxidada e reduzida em eritrócitos.....	45

5.3 Parâmetros teciduais.....	46
5.3.1 Concentração de Glutamina e Glutamato hepática	46
5.3.2 Concentração de Glutamina e Glutamato muscular.....	47
5.3.3 Concentração tecidual de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	48
5.3.4 Concentração de glutathione reduzida e glutathione oxidada hepática	49
5.3.5 Concentração de glutathione reduzida e glutathione oxidada muscular.....	50
5.2.6 Conteúdo de proteína muscular.....	52
5.2.7 Expressão de glutamina sintetase.....	54
5.2.8 Expressão proteica HSP27.....	55
5.4 Resumo dos resultados	56
5.4.1 Sangue(plasma e papa de hemácias).....	56
5.4.2 Fígado.....	57
5.4.3 Músculo Tibial	58
5.4.4 Músculo EDL.....	59
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÃO.....	67
8.Referências bibliográficas.....	68
9 ANEXO	81
9.1 Carta de aprovação do projeto pelo comitê de ética no uso de animais - CEUA.....	81

1. INTRODUÇÃO

O exercício resistido é muito utilizado tanto por praticantes de atividade física quanto por atletas com o intuito de melhorar a força, ganho de massa muscular e, sobretudo o desempenho.

Durante o exercício a própria contração muscular aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) (GOMES *et al.* 2012). As ERON formadas durante o exercício são importantes para adaptação ao treinamento (MASON; WADLEY, 2014). Entretanto, o exercício quando praticado de forma intensa e sem o tempo de recuperação adequado pode exacerbar a produção de espécies reativas, implicando em um desbalanço entre as espécies reativas formadas e a capacidade antioxidante denominado estresse oxidativo (BRENTANO; KRUEL, 2011).

O elevado estresse oxidativo e o estresse mecânico causado pelo exercício geram lesão miofibrilar, e logo é iniciada uma resposta inflamatória aguda. Aumentando assim, as proteínas citoprotetoras, denominadas proteínas de choque térmico (HSPs). Estas proteínas atuam na organização e na estabilização das proteínas do citoesqueleto durante o estresse (WYTTEBACH *et al.*, 2002; BRENTANO; KRUEL, 2011).

Além disso, o estresse oxidativo elevado causa um desbalanço no estado redox intracelular, dado pelo aumento das concentrações intracelular de dissulfeto de glutathione (GSSG) e redução da concentração de glutathione (GSH) (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014a). A síntese *de novo* de GSH depende da disponibilidade intracelular de glutamato e, o fornecimento de glutamina para sua posterior conversão a glutamato é decisivo para a manutenção do estado redox celular (RUTTEN *et al.*, 2005). Deste modo, a suplementação com L- glutamina é utilizada como alternativa para atenuar a redução da glutaminemia em estados catabólicos.

Por outro lado, Cruzat e Tirapegui (2009), Petry *et al.* (2014a/b) demonstraram que a suplementação crônica com a solução contendo L-alanina e L-glutamina na forma livre é outra opção para restaurar a glutamina no plasma, músculo e fígado. Uma vez que, esta forma de suplementação apresenta resultados semelhantes quando comparada ao dipeptídeo. Deste modo levanta-se o questionamento se a presença do aminoácido L-alanina pode favorecer o metabolismo da L-glutamina (PETRY *et al.*, 2014; CRUZAT *et al.*, 2014 c).

Nesse sentido, o objetivo do presente projeto foi investigar os efeitos da suplementação oral crônica tanto com L-glutamina quanto com L-alanina, nas formas livres ou como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre a lesão, citoproteção e estado redox antioxidante mediado pela glutatona e HSP 27 em animais submetidos a treinamento resistido.

2.OBJETIVOS

2.1Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da suplementação oral crônica tanto com L-glutamina, quanto com L-alanina, ambas na forma livre ou como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre parâmetros relacionados à lesão, sistema antioxidante e citoproteção em animais submetidos a treinamento resistido.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do exercício resistido sobre a concentração da glutamina no plasma e em tecidos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Exercício intenso, lesão e estresse oxidativo

Tanto praticantes de atividade física quanto atletas, utilizam o exercício resistido para a melhora da força, manutenção e ganho de massa muscular. Porém, uma elevada carga de treinamento, programas de treinamentos inadequados e curtos intervalos de descanso causam graves lesões ocasionando processo inflamatório crônico e sistêmico, o que pode comprometer a saúde do indivíduo (BOWTELL *et al.*, 2011; RAHIMI, 2011; RAHMANI-NIA *et al.*, 2014).

Umas das hipóteses para a queda de desempenho durante treinamento intenso é o desequilíbrio entre a síntese e a remoção de ERON, processo conhecido como estresse oxidativo, o que culmina em lesões celulares e inflamação crônica, associadas ao exercício físico (JI, 1995).

Tanto a força mecânica quanto o aumento das ERON elevados, causam danos à membrana celular ocasionando a ruptura da matriz extracelular, lamina basal e do sarcolema, o que gera microtraumas significativo nas fibras musculares (BRENTANO; KRUEL, 2011). Assim, componentes intracelulares são liberados para a circulação tais como, creatina kinase (CK) e mioglobina (MASON; WADLEY, 2014, RAHMANI-NIA *et al.*, 2014).

O exercício resistido em humanos, para esforços estáticos, com uma contração superior a 20% de 1 Repetição Máxima (1RM) promove pressão intramuscular, a qual aumenta de forma linear com a tensão muscular, provocando colapamento capilar, processo chamado isquemia, o que exacerba o metabolismo anaeróbico (Barros *et al.*, 2004). Além disso, estudos indicam que o principal mecanismo de síntese de espécies reativas é o processo de isquemia e reperfusão tecidual em exercícios onde a predominância do metabolismo é anaeróbia (BLOOMER; GOLDFARB, 2004, FINAUD, LAC; FILAIRE, 2006).

No processo de isquemia e reperfusão tecidual ocorre aumento do fluxo sanguíneo para os músculos ativos, ao passo que outros tecidos ficam em situação de hipóxia. A enzima xantina desidrogenase (XDH) tem um importante papel na formação de ácido úrico pela degradação das purinas. Durante a isquemia ocorre hipóxia tecidual, e a XDH é convertida em xantina oxidase (XO). No retorno da oxigenação dos tecidos em estado de

hipóxia, ou seja, na fase chamada de reperfusão sanguínea, grande quantidade de oxigênio é ofertada a célula, neste momento há reação entre oxigênio (O_2) e hipoxantina, catalisada pela enzima XO, no qual promove a síntese de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente a esta reação, a hipoxantina é convertida a xantina e em seguida a ácido úrico (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006).

Durante a reperfusão sanguínea também ocorre geração simultânea de outras espécies reativas, tais como o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$). Estes radicais reagem entre si formando peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), o qual é um potente oxidante (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2005; FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2010). Bem como durante o exercício há o aumento das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, e sua oxidação pode produzir ânion superóxido e outros derivados não hidrogenados (MORALES-ALAMO; CALBET, 2013).

Figura 1- Esquema com a origem de espécies reativas durante o processo de isquemia e reperfusão sanguínea.

Legenda: ATP- Adenosina trifosfato / ADP- adenosina difosfato/ AMP –adenosina monofosfato / O_2 - oxigênio / $O_2^{\cdot-}$ - ion superóxido/ $OH^{\cdot}$ Radical hidroxila/ H_2O_2 - peróxido de hidrogênio.

O aumento da concentração de lactato durante o exercício intenso pode ter efeitos oxidantes. Na formação do lactato são liberados íons H^+ . Os íons H^+ formados aceleram a taxa de conversão de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , os quais podem reagir com Fe^{2+} gerando $OH^{\cdot -}$. A acidose causada pelo aumento do lactato leva a conversão de $O_2^{\cdot -}$ para hidróperóxido (HO_2), considerado o radical mais reativo, principalmente com lipídios e responsável por facilitar a dissociação de proteínas ligadas ao ferro (MORALES-ALAMO; CALBET, 2013).

As ERO e ERN formadas durante o exercício em quantidades fisiológicas são importantes para algumas funções do organismo como crescimento e proliferação de células e vasodilatação, porém se produzidos de forma exacerbada como, em exercício intenso e ou/ exaustivo podem reagir com moléculas ou componentes da célula, tais como proteínas, ácidos nucleicos, íons metálicos e fosfolípidos de membrana (peroxidação lipídica) (GOMES; SILVA; DE OLIVEIRA, 2012). Este efeito promove alterações na permeabilidade e no valor de potencial elétrico da membrana celular, com redução de sua fluidez e balanço hídrico, escoamento de íons cálcio entre outros e, lesões ao DNA, o que culmina em morte celular (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; POWERS; JACKSON, 2008).

A elevada produção de espécies reativas no músculo esquelético é associada à fadiga muscular durante o exercício. Os principais radicais envolvidos nestes processos são: $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH^{\cdot -}$. Estes podem afetar processos celulares, que incluem a recapitação de cálcio intracelular, deixando menos cálcio disponível para a contração muscular, o que ocasiona um efeito inibidor na força muscular (MURPHY; DUTKA; LAMB, 2008, LAMB; WESTERBLAD, 2011).

Diversos estudos demonstram que logo após uma sessão de exercício resistido intenso há aumento de biomarcadores de estresse oxidativo no plasma e tecidos, como exemplo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de proteínas carboniladas e diminuição da capacidade total antioxidante (GOLDFARB; MCKENZIE; BLOOMER, 2007, GOLDFARB *et al.*, 2008).

O exercício intenso crônico pode gerar estresse oxidativo. Scheffer *et al.* (2012) compararam três protocolos de exercício resistido: resistência, força e hipertrofia, durante doze semanas, em ratos submetidos a protocolo de subida em escada. Neste estudo observou-se que o protocolo de hipertrofia causa maior produção de $O_2^{\cdot -}$ maior

concentração de TBARS, proteínas carboniladas e menor concentração de grupos thiol no músculo.

Para reparação do tecido lesionado após o exercício é iniciado uma resposta inflamatória aguda, no qual envolve a produção e liberação de citocinas no sítio da inflamação, mediando migração de células inflamatórias como neutrófilos, monócitos, linfócitos para reparação tecidual (PEDERSEN; ROHDE; ZACHO, 1996, HOFFMAN-GOETZ; SPAGNUOLO, 2007, PAULSEN *et al.*, 2007, CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010, FINSTERER, 2012).

Os radicais livres formados durante o exercício físico induzem a ativação de um importante regulador da transcrição de mediadores inflamatórios, o NF- κ B. O NF- κ B existe normalmente como um complexo citoplasmático inativo, mas quando ativo induz a transcrição de uma variedade de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina -6 (IL-6), fator de necrose tumoral - α (TNF- α) e interleucina 1beta (IL-1 β) e proteínas apoptóticas, além de aumentar produção de ERO por neutrófilos e macrófagos (CRUZAT, 2008, SOUSA *et al.*, 2010).

O elevado estado inflamatório após exercício intenso, principalmente quando realizado de forma crônica é associado ao edema no tecido muscular e sensação de dor tardia, o que prejudica o processo de recuperação celular (SIMPSON *et al.*, 2005). Além disso, este processo inflamatório crônico é associado ao aumento de infecções do trato respiratório superior (ITRS) em atletas em fase intensa de treinamento que pode levar queda do desempenho (PEDERSEN; TOFT, 2000; GLEESON, 2007).

3.2 Exercício físico intenso e Glutathione

A fim de neutralizar as ERO e ERN formadas existe em nosso organismo uma rede de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que controlam estrategicamente as ERO e ERN formadas (GOMES; SILVA; DE OLIVEIRA, 2012). O músculo esquelético possui estes antioxidantes estrategicamente compartimentalizados tanto no citoplasma quanto nas organelas (principalmente nas mitocôndrias), assim como no espaço extracelular e na circulação sanguínea (POWERS; JACKSON, 2008).

Considerado o principal antioxidante não enzimático e em maior concentração no organismo, a glutathione (GSH) é fundamental para manter o balanço redox celular. A GSH

pode reagir diretamente com as ERO em reações não enzimáticas ou atuar como doadora de elétrons na redução de peróxidos, catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPx). Assim como, este antioxidante é capaz de regenerar outros antioxidantes à sua forma ativa, como a vitamina C (VALENCIA, MARIN; HARDY, 2001; CHEN *et al.*, 2013).

O principal local de síntese deste antioxidante é o fígado. A síntese de GSH ocorre através de duas reações sucessivas. A primeira reação, catalisada pela Glutamato-cisteína-ligase (GCL), a qual liga os aminoácidos L-glutamato a L-cisteína para formar c-glutamilcisteína (c-CG). A segunda reação catalisada pela enzima GSH sintetase (GSS) onde ocorre a ligação do aminoácido glicina ao c-GC, formando o tripeptídeo L-glutamil-L-cysteinil-glicina (MEISTER, 1988, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002). Portanto, os aminoácidos glutamato e cisteína são considerados limitantes para síntese de GSH. Rutten, Engelen, Schols, *et al.* (2005) correlacionaram os níveis destes aminoácidos e os de glutathione e observaram alta correlação entre a concentração de glutamato e a concentração de glutathione muscular ($r=0,88$). Enquanto cisteína e glicina apresentam uma correlação menor, de 0,07 e 0,11, respectivamente.

Na célula a glutathione é distribuída no retículo endoplasmático, mitocôndria e núcleo. A GSH é o principal antioxidante solúvel em água que mantém a homeostase redox nestes compartimentos intracelulares. No fígado, cerca de 10% do GSH total citosólico é ativamente transportado para o interior das mitocôndrias, de forma que as concentrações de GSH nas mitocôndrias são comparáveis às concentrações citosólicas. Deste modo, a glutathione exerce um papel crucial no funcionamento da mitocôndria, pois esta é responsável por estabilizar as espécies reativas de oxigênio formadas (GRIFFITH; MEISTER, 1985, GARCIA-RUIZ *et al.*, 1994). No núcleo, a GSH tem a função de estabilizar proteínas sulfidrilas necessárias para expressão, transcrição e reparo no DNA (HWANG; SINSKEY; LODISH, 1992).

Em situações catabólicas, tais como em doenças ou exercício intenso, ocorre um desvio do estado redox intracelular, dado pela razão entre as concentrações intracelulares de dissulfeto de glutathione e de glutathione, isto é, da relação $[GSSG]/[GSH]$, no sentido da redução de GSH e aumento das quantidades de GSSG (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014a).

A elevada síntese de espécies de reativas de oxigênio e nitrogênio durante o exercício intenso aumenta as concentrações plasmáticas de MDA, proteínas carboniladas e a taxa de GSSG/GSH (GOLDFARB; MCKENZIE; BLOOMER, 2007; GOLDFARB *et al.*, 2008). Bloomer *et al.*(2005) em estudo com homens submetidos a um protocolo submáximo de agachamento demonstraram que após o término da sessão de exercício ocorreu redução de 20% da concentração de GSH e aumento da concentração de GSSG em 22%. Já Goldfarb, McKenzie e Bloomer(2007) avaliaram o impacto das concentrações de Glutathione em mulheres treinadas, após uma sessão de leg press a 75% de 1RM e observaram que ao término do exercício e 2 horas após o exercício, a taxa de GSSG/GSH estava aumentada.

Estudo crônico com atletas de handball demonstrou que em fase de pré e durante a competição há estresse oxidativo elevado, com aumento de MDA e grupos thiols. O handball é considerado um exercício misto entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio. Porém, durante o treinamento, cerca de 90% da energia utilizada advém do metabolismo aeróbio. Sob esta condição, estima-se que 1-5% do oxigênio total consumido resulta na formação de ânion superóxido, além disso, a auto-oxidação da oxi-hemoglobina pode contribuir para a geração de EROS durante o exercício. O acúmulo de prótons pela acidose láctica, um potente fator pró-oxidante, pode contribuir para a formação de EROS durante o treinamento (MARIN *et al.*, 2013).

Alguns estudos relacionaram a GSH com a manutenção da força durante o exercício, principalmente em fibras de contração rápida (MURPHY; DUTKA; LAMB, 2008; LAMB; WESTERBLAD, 2011). O H_2O_2 formado durante o exercício pode reagir com a mioglobina e formar $OH^\cdot$, e este oxida resíduos de cisteína (RSH) da cadeia de miosina diminuindo a sensibilidade ao cálcio. Esta oxidação é denominada de RSox, o qual pode envolver cisteína ou formação de espécies como RSOH, que é considerada irreversível. Ambos radicais H_2O_2 e $OH^\cdot$ podem reagir com GSH e formar radical thiol (GS) e este último forma um resíduo cisteína altamente reativo (R1SH) em fibras de contração rápida, causando aumento reversível da sensibilidade ao Ca^{2+} e melhora da força (LAMB; WESTERBLAD, 2011).

Estudo conduzido por Murphy, Dutka e Lamb (2008) avaliou a diminuição da força no músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL) de ratos expostos a H_2O_2 . Estes autores

observaram que na presença de glutatona (5mM) ocorre manutenção de força e aumento da velocidade de contração muscular, neste tecido de contração rápida.

3.3 Proteínas de choque térmico (HSPs) e Exercício Físico

As HSPs são uma família de proteínas cuja principal função é citoproteção principalmente em situação de estresse por manter a integridade estrutural da célula e facilitar a formação de elementos do citoesqueleto celular. Em condições fisiológicas as HSPs atuam como proteína chaperona, facilitando o enovelamento das novas cadeias peptídicas e a translocação de proteínas (MILNE; NOBLE, 2008; SCHOENFELD, 2013). Estas proteínas são classificadas de acordo com peso molecular em kDa, tais como HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 (FITTIPALDI *et al.*, 2013; SCHOENFELD, 2013).

O exercício físico intenso é associado com agentes estressores, que incluem aumento de temperatura, distúrbios metabólicos, alteração no efluxo de cálcio, aumento da produção de espécies reativas, alterações hormonais além do estresse mecânico do tecido, o que culmina no aumento de HSPs nos tecidos (NOBLE; SHEN, 2012; FITTIPALDI *et al.*, 2013).

Após exercício resistido nota-se um aumento da HSP 27 no tecido muscular tanto após o exercício agudo (TUPLING *et al.*, 2007) quanto crônico (LIU *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000; PAULSEN *et al.*, 2007). Classificada como HSPs de baixo peso molecular, a HSP 27 atua tanto na organização e na estabilização de proteínas do citoesqueleto, quanto mantendo os altos níveis intracelular de GSH (MOUNIER; ARRIGO, 2002; WYTENBACH *et al.*, 2002; SALINTHON; TYAGI; GERTHOFFER, 2008).

Um dos fatores que podem induzir a síntese de HSPs é o H_2O_2 , uma importante espécie reativa de sinalização gerada durante a contração muscular (JACKSON, 2008). Em um estudo conduzido por Folkesson *et al.* (2013) com objetivo de avaliar a expressão de HSP 70 e 27 no músculo vasto lateral em atletas submetidos a diferentes protocolos de exercício, dentre eles o exercício resistido, observou-se que no exercício resistido a expressão de HSP27 é maior em fibras do tipo II, consideradas glicolíticas.

A expressão de HSPs é mediada por uma família de reguladores de transcrição, denominados fatores de transcrição de choque térmico (HSF). O fator de transcrição de choque térmico (HSF-1), importante para a regulação gênica de HSPs em situações de

estresse, é encontrado tanto no citoplasma quanto no núcleo da célula em um estado de monômero inativo ou em complexo com HSP70 e HSP90 (AKERFELT *et al.*, 2010). HSF-1 quando ativados aumentam sua fosforilação, obtendo assim maior afinidade de ligação aos HSE, que estão dispostos na região promotora de genes alvo da HSP (BENJAMIN; CHRISTIANS, 2002; MILNE; NOBLE, 2008). Assim, este mecanismo permite que sinais específicos para que se inicie o processo de síntese, transcrição e tradução do mRNA de HSP (MILNE; NOBLE, 2008).

3.4 Aspectos bioquímicos e metabólicos da glutamina

A glutamina é um L- aminoácido, com peso molecular de aproximadamente 146 kDa. É classificada de acordo com seu grupamento R não carregada, mas é polar, o que significa uma característica hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases. Este aminoácido pode ser classificado como condicionalmente essencial, pois em situações de estresse, como grandes cirurgias, sepse e exercícios intensos, a disponibilidade deste aminoácido fica prejudicada ao organismo, ao passo que este tem que vir através da alimentação (WRAY, MAMMEN E HASSELGREN, 2002).

Seu conteúdo intracelular varia de acordo com o tipo de célula entre 2 e 20mM e seu conteúdo extracelular é de aproximadamente de 7mM (NEWSHOLME *et al.*, 2003). Estudos cinéticos estimam que cerca de 80g de glutamina circula na corrente sanguínea por dia, mas somente 5 - 8g são provenientes da alimentação (AGOSTINI; BIOLO, 2010). A glutamina é sintetizada no fígado, pulmões, possivelmente no tecido adiposo e no músculo esquelético. Os órgãos que consomem glutamina são rins, intestino e células do sistema imune (ROWBOTTOM, KEAST; MORTON, 1996).

O músculo esquelético é quantitativamente o principal local de síntese, estoque e liberação de glutamina, com uma taxa de síntese de 50 mmol/h sendo considerado o mais abundante entre todos os aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003; VAN DE POLL *et al.*, 2004). Deste modo, principalmente em situações de estresse onde há aumento da demanda de glutamina por outros órgãos e tecidos, o músculo esquelético exerce um papel metabólico essencial na regulação da glutaminemia (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000).

A síntese de glutamina no músculo esquelético no período pós-absortivo ocorre através da captação de glutamato da circulação (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000). Cerca de

40% da glutamina sintetizada advêm do glutamato. O catabolismo proteico leva à síntese de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR), glutamato, aspartato e asparagina. O esqueleto carbono destes aminoácidos é utilizado para a síntese de glutamina (CRUZAT, ALVARENGA; TIRAPEGUI, 2010).

Os AACR são quase que exclusivamente transaminados a α -cetaglutarato para formar glutamato ou doam seu grupo amino para o piruvato, gerando alanina ou incorporam amônia formando glutamina (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000). Porém, os AACR não são completamente metabolizados, porque 2-oxoisovalerato desidrogenase, a enzima chave de controle da sua taxa de oxidação, apresenta-se quase totalmente na forma inativa no músculo esquelético. Deste modo, os AACR no músculo esquelético, são inicialmente utilizados como doadores de nitrogênio para formar glutamina e alanina (MEIJER, 2003).

Duas principais enzimas envolvidas no metabolismo da glutamina são a glutaminase e a glutamina sintetase. A glutaminase é responsável pela hidrólise de glutamina à glutamato e amônia. O que disponibiliza glutamato para ciclo do ácido triácarboxílico, síntese de glutatona entre outros (RUTTEN, *et al.*, 2005). Já a enzima glutamina sintetase é uma aminotransferase responsável pela síntese de glutamina a partir do glutamato e íon amônio na presença de ATP. Deste modo, a glutamina sintetase exerce um papel chave no metabolismo do nitrogênio (AGOSTINI; BIOLO, 2010).

Embora ainda controverso, pesquisadores sugerem que a glutamina possa promover um aumento do volume celular e estimular a síntese proteica. A explicação para este fato seria o transporte de glutamina para a célula, pois este é feito por transporte ativo através de bomba Na^+K^+ . Neste transporte há absorção de água e liberação de potássio, aumentando a hidratação da célula e consequentemente o volume celular (VARNIER *et al.*, 1995; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003).

A glutamina tem o transporte entre as células mais veloz dentre os 20 aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003). Alguns hormônios estimulam o influxo ou efluxo de glutamina para a célula. A insulina e fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) estimulam o transporte de glutamina para o meio intracelular, enquanto glicocorticóides estimulam o transporte de glutamina para o meio extracelular (WINDMUELLER, 1982, PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989).

A concentração de glutamina pode variar dependendo do tipo de fibra predominante no músculo estudado. Fibras do tipo I, as mais oxidativas, podem apresentar uma concentração três vezes maior em comparação às fibras do tipo II, que são mais glicolíticas (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). Este fato está relacionado com a maior atividade da glutamina sintetase e a maior disponibilidade de ATP em fibras tipo I (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001). A glutamina está envolvida em uma série de vias bioquímicas e metabólicas (CRUZAT, 2013). Dentre elas a manutenção do equilíbrio ácido-base, síntese de degradação proteica, modulação da resposta inflamatória e substrato para gliconeogênese.

A glutamina pode ser hidrolisada no citosol a glutamato e atuar na síntese de ácido gama-butiírico (GABA), na gliconeogênese e no metabolismo da úreia nos rins (NEWSHOLME *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que o glutamato é substrato para a síntese do principal antioxidante não enzimático, a glutatona e, evidências experimentais demonstram que quando é aumentada a disponibilidade de glutamato ao organismo, a síntese deste antioxidante é melhorada (RUTTEN *et al.*, 2005; CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010, CRUZAT 2013).

Figura 2- Funções da glutamina no organismo. Adaptado de Borges, Rogero e Tirapegui (2008).

3.5 Glutamina e Exercício Físico

O exercício físico principalmente os de alta intensidade e longa duração alteram a utilização de substrato energético, a sensibilidade à insulina e utilização de proteínas (AGOSTIN; BIOLO, 2010). Inicialmente durante o exercício ocorre uma acelerada liberação de glutamina pela musculatura esquelética, o que aumenta a concentração de glutamina. Porém este aumento é transitório e decorrente da elevada síntese de amônia produzida pela alta demanda energética por ATP durante a contração muscular (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). A redução na glutaminemia pode ser observada com a prática de exercício acima de uma hora, entretanto é variável, pois depende do tipo e intensidade do exercício praticado (ZANKER *et al.*, 1997; GLEESON, 2007).

O exercício intenso e/ ou exaustivo tem um impacto maior na redução da glutaminemia quando comparado a exercícios de curta duração (ROBSON *et al.*, 1999). Os mecanismos para redução da glutamina corporal envolvem primeiramente a redução da síntese pelo músculo esquelético, devido a alterações do transporte cinético deste aminoácido. A glutamina é transportada por um mecanismo saturável, por um sistema dependente de Na^+ . O aumento das concentrações intracelulares de Na^+ acarreta em um efluxo de glutamina a partir do músculo (DOHM; TAPSCOTT ;KASPEREK, 1987).

Além disso, a elevada concentração plasmática do hormônio cortisol durante o exercício aumenta a captação de glutamina pelo fígado para gliconeogênese, e síntese de proteínas de fase aguda. Cabe ressaltar que a glutamina carregada para o fígado pode ser utilizada para a síntese de glutatona (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001). Já os hormônios do crescimento estimulam a captação deste aminoácido pelo rim e intestino (STUMVOLL *et al.*, 1999).

O aumento do lactato sanguíneo durante o exercício aumenta a captação de glutamina pelos rins. A elevada concentração de lactato na corrente sanguínea altera o pH do sangue causando acidose metabólica (VAN DE POLL *et al.*, 2004). A eliminação dos íons H^+ pelos rins envolve o fornecimento de amônia oriunda da glutamina. A amônia formada a partir da glutamina escapa das células do túbulo renal por um processo de difusão passiva, e se une a prótons H^+ formando íons amônio (NH_4^+). A excreção de íons

H⁺ auxilia na manutenção do balanço ácido-base (CRUZAT; ALVARENGA; TIRAPEGUI, 2010).

Rennie *et al.* (1981) em um estudo com humanos demonstrou que após 3,75 horas de ciclismo à 50% do VO₂ máximo a concentração plasmática reduziu de 557 umol/L para 470 umol/L. Já em estudo conduzido por Rohde *et al.* (1996) com triatletas submetidos a uma competição com natação, ciclismo e corrida houve redução da glutaminemia após duas horas do término da prova.

A maioria dos estudos descritos na literatura evidenciam redução da glutaminemia corporal após exercícios de predominância aeróbia, entretanto são escassos os estudos com exercício com predominância anaeróbia. Um destes conduzido por Blomstrand e Essen-Gustavsson (2009) demonstrou que duas horas após uma sessão de musculação com *leg press* a 80% de uma repetição máxima (1RM), ocorreu redução da concentração de glutamina de 30% na fibra do tipo I e 35% na fibra do tipo II, no músculo vaso lateral. Portanto, ainda são necessários mais estudos relacionando este tipo de exercício e a redução da glutamina corporal.

3.6 Efeitos da suplementação de glutamina

Diversas pesquisas utilizam suplementação de L-glutamina por via oral no intuito de atenuar a redução da glutamina corporal, induzida após exercícios físicos intensos (LAGRANHA *et al.*, 2005, ROGERO *et al.*, 2006, CRUZAT ;TIRAPEGUI, 2009). Em atletas no estado de repouso, a concentração plasmática de glutamina aumenta cerca de 30 minutos após a ingestão oral de uma solução com de 100 mg/kg de peso de L-glutamina, e retorna aos valores basais no decorrer de aproximadamente duas horas (CASTELL; NEWSHOLME, 1997).

Atletas em fase de treinamento intenso têm maior susceptibilidade a infecções, principalmente do trato respiratório superior (ITRS) devido à imunossupressão (AGOSTINI; BIOLO, 2010). Uma vez que células do sistema imune utilizam a glutamina em seu metabolismo, a suplementação com L- Glutamina tem sido estudada como estratégia nutricional para atenuar ou reverter este processo (CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010). Castell e Newsholme (1997) avaliaram o efeito da suplementação de

5 g L- glutamina em 330 ml de água logo após uma maratona e notaram que os atletas suplementados obtiveram menor percentual de ITRS. Em estudo recente Sasaki *et al.* (2013) avaliaram o efeito da suplementação de L- glutamina (1500 mg antes e após exercício) em judocas, durante duas semanas de treinamento intenso, estes demonstraram que a suplementação contribuiu para melhora na função dos neutrófilos e prevenção do dano muscular.

A lesão causada pelo exercício excêntrico é associada com dor muscular pós-exercício (RAHMANI NIA *et al.*, 2013). Rahmani Nia *et al.* (2013) avaliaram o efeito da suplementação crônica com glutamina em praticantes de atividade física submetidos à exercício excêntrico até exaustão, sob os parâmetros de dor tardia, atividade eletromiográfica e amplitude de movimento. Neste estudo a suplementação somente atenuou dor muscular tardia.

A síndrome do supertreinamento (overtraining) pode acarretar redução crônica da glutaminemia do atleta, além de fraqueza muscular, ativação de citocinas, alterações hematológicas e hormonais. Dong *et al.* (2013) associaram a suplementação de glutamina e a Diphenyliodonium (DPI), um anti-inflamatório inibidor de NADPH oxidase, em ratos submetidos à protocolo de overtraining e encontraram melhora da função dos neutrófilos após o overtraining.

. A Glutathione (GSH) é o principal antioxidante não enzimático do organismo. A glutamina ao ser hidrolisada eleva a disponibilidade de glutamato ao organismo e consequentemente pode elevar a síntese de GSH. Estudos em ratos submetidos a protocolo de exercício intenso demonstraram que a suplementação crônica de glutamina foi capaz de elevar a síntese de novo de glutathione e diminuir a razão de GSSH/GSH (CRUZAT, ROGERO; TIRAPEGUI, 2010; PETRY *et al.*, 2014a/b).

A glutamina também pode atuar no mecanismo de citoproteção através das proteínas de choque térmico (HSPs). A disponibilidade de glutamina à célula modula a expressão da HSPs, por mecanismo ainda sob investigação. Deste modo a maior disponibilidade de glutamina à célula pode aumentar a capacidade em resistir a estímulos oxidativos causados pelo exercício intenso (WISCHMEYER, 2002). Estudo em animais submetidos a protocolo de exercício intenso em esteira e suplementados com dipeptídeo, L-glutamil- L- alanina, ou solução com L-alanina e L-glutamina mostrou que este tipo de

intervenção nutricional melhora a disponibilidade da HSP 70 nas células musculares, deste modo aumentou a capacidade de citoproteção celular (PETRY, *et al.*, 2014a).

A suplementação do dipeptídeo L-alanil- L-glutamina pode ser utilizado como estratégia para melhorar a hidratação durante o exercício físico (HOFFMAN *et al.*, 2010; HOFFMAN *et al.*, 2012). Este dipeptídeo melhora a absorção de eletrólitos, especialmente em um pH intestinal baixo, comum durante os exercícios físicos. Em pesquisa realizada com atletas de basquete no qual foi utilizada solução com 1 g de dipeptídeo em 500 ml de água durante o treinamento, houve maior agilidade e reação visual quando comparado a atletas que receberam somente água (HOFFMAN *et al.*, 2012).

A figura 3 relaciona alguns estudos utilizando a suplementação por via oral com L-glutamina, tanto na forma livre ou como dipeptídeo em humanos, em várias modalidades esportivas.

REFERÊNCIA	AMOSTRA E EXERCÍCIO	SUPLEMENTAÇÃO	PARAMÊTROS AVALIADOS	RESULTADOS
Castell; Newsholme (1997)	18 corredores: Maratona de Bruxelas	5g de GLN em 330 ml de água 1h após exercício	Contagem de células, IL-1 α , IL-2, IL-6, GLN, ALA, BCAA plasmática e norepinefrina	Nenhum efeito
Walsh et al. (1998)	7 atletas submetidos a dois treinos separados, com Intensidade de 60% VO ₂ máx	Após 90 minutos de exercício, 1,2% de glutamina diluída em 250ml de suco de limão sem açúcar Em intervalos de 15 min. durante e até 2h após o fim da atividade	Cortisol, de granulação e atividade de neutrófilos	Redução na concentração de glutamina após o exercício. Nenhum efeito sobre a leucocitose e a degranulação de neutrófilos.
Krzywkowski et al. (2001a)	Dez atletas do sexo masculino submetidos a bicicleta ergométrica a 75% do VO ₂ máx durante 2h.	Após 60 min de exercício, solução em 500ml de água com ou glutamina (3,5g) ou matodextrina (3,5g) para o grupo placebo, Mais 4 doses em um intervalo de 45 min	Concentração de leucócitos, linfócitos plasmáticos,	A população de linfócitos diminui após 2h de exercício, mesmo após suplementação. Não houve influencia sobre o tráfego de linfócitos, células, NK, proliferação de cel. T, catecolaminas, insulina, GH
Krzywkowski et al. (2001b)	11 atletas submetidos a exercício de bicicleta ergométrica a 75% VO ₂ máx durante 2 h em 3 dias.	Após 60 min de exercício, solução em 500ml de água com ou 3,5g de GLN ou 3,5g de malto para o grupo placebo . Mais 4 doses protéicas com 13,7 g de caseinato de sódio em intervalos de 45 min.	IgA salivar, glutamina plasmática	A suplementação aumentou a concentração de glutamina plasmática mas não alterou os níveis de IgA comparado ao grupo placebo.
Carvalho-Peixoto, Alves; Cameron (2007)	15 corredores submetidos à 4 sessões de 120 minutos de corrida (aprox. 34km).	70mg/kg de peso de GLN ou 1g/kg de peso de CHO ou 70mg/kg e 1g/kg de peso Diluído em 200 ml de água 1h antes do exercício	Amônia plasmática antes, a cada 30 minutos e ao término do exercício	Redução de amônia plasmática principalmente após 60 minutos de exercício.
Hoffman et al. (2010)	10 homens fisicamente ativos, desidratados 2,5% da massa corporal e reidratados com a suplementação à 1,5% e submetidos a ciclismo à 75% do VO ₂ -max até exaustão	Reidratados até à 1,5% de massa corporal com DIP (0,2g/kg de peso ou 0,5g/ kg de peso por litro) ou placebo com água	Amostras após exercício e 24h após de lactato, sódio potássio, glicose, Proteína-C- Reativa, IL-6, MDA, cortisol, testosterona, ACTH, GGH, e CK	Homens suplementados com DIP (0,2g/kg de peso) apresentaram maior tempo de exaustão.

Figura 3- Quadro com estudos com suplementação de glutamina em humanos nas diferentes modalidades de esportiva . Adaptado de Cruzat, Alvarenga e Tirapegui (2010)

Abreviaturas: IL= intereleucinas, , MDA = malondialdeído, IgA= imunoglobulina A, ACTH= Hormônio Adrenocorticotrófico, PCR –proteína C Reativa, GH= hormônio do crescimento , GLN= glutamina, Malto= maltodextrina, NK =Natural Killer, CK= creatina quinase

Cabe ressaltar que a maioria de trabalhos experimentais que utilizam L-glutamina na forma livre e por via oral, tanto em humanos, quanto em modelos experimentais, indicam baixa eficácia neste tipo de intervenção nutricional (ROGERO *et al.*, 2006; CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009). Isto se deve ao fato de que mais de 50% do total de L-glutamina fica retida no lúmen intestinal, deixando-a menos disponível para a corrente sanguínea (D'SOUZA; POWELL-TUCK, 2004).

Uma alternativa bastante estudada é a suplementação com L-glutamina conjugada ou também conhecida como dipeptídeo, tal como a L-alanil-L-glutamina. Esta suplementação apresenta melhor eficácia em restaurar a glutaminemia corporal quando comparada a L-glutamina na forma livre (KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2006). Rogero *et al.* (2006) compararam os tipos de suplementação na forma livre e dipeptídeo após protocolo de natação exaustiva, e observaram que a suplementação na forma de dipeptídeo foi 22% mais eficaz em restaurar a glutaminemia em relação à forma livre.

Este mesmo grupo de pesquisadores avaliou a resposta cinética da concentração de glutamina. A concentração de glutamina foi mensurada nos tempos 0, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos após a suplementação com glutamina livre ou em dipeptídeo. Neste estudo observou-se que em ambas as suplementações o pico da glutamina foi em 30 minutos e volta aos valores basais em 120 minutos após a suplementação, entretanto o dipeptídeo apresentou valores maiores quando comparado à glutamina livre (ROGERO *et al.*, 2006).

Outra forma de suplementação estudada em modelos experimentais, seja na nutrição clínica ou esportiva é a suplementação com a solução de aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livres (CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010). Estudos com animais submetidos à protocolo intenso de natação e suplementados cronicamente durante 21 dias com dipeptídeo L-glutamil-L-alanina (1,5 g/kg de peso) ou solução com L-glutamina e L-alanina na forma livre (1g/kg de peso e 0,67 g/kg de peso) demonstraram que as duas suplementações apresentaram resultados semelhantes em restaurar a glutamina corporal. No músculo tanto a suplementação com dipeptídeo ou solução com glutamina e alanina aumentaram 74,9% e 87,6% quando comparado ao grupo controle (CRUZAT, 2008).

O mesmo protocolo de suplementação foi utilizado em ratos submetidos ao exercício intenso de esteira e apresentou resultados semelhantes em restaurar a

glutaminemia, houve um aumento de 28% no grupo suplementado com solução com L-glutamina e L-alanina livres e 33,4% no grupo dipeptídeo (PETRY *et al.*, 2014a). O mesmo resultado ocorreu em modelo experimental de endotoxemia, nestas as suplementações com L- glutamina e L-alanina livres ou como dipeptídeo reverteram significativamente o quadro de deficiência de glutamina causada por esta patologia (CRUZAT *et al.*, 2014b/c).

Nestes estudos a semelhança nos resultados entre o dipeptídeo e a solução com L- glutamina e L-alanina pode ser decorrente da presença da alanina livre na solução. A concentração de alanina pode ter se elevado rapidamente, pois sua absorção ocorre de forma presencial pelo transportador (BROER, 2008). A absorção de L-alanina pode diminuir na presença de alguns aminoácidos neutros, mas não a glutamina (SIGRIST-NELSON; MURER; HOPFER, 1975).

Bem como, estudo demonstrou que a L-alanina pode aumentar a concentração de L-glutamina. Na oxidação da L-alanina o grupo amino é liberado. Este pode ser transportado para o fígado em forma de L-glutamina (KORACH-ANDRE *et al.*, 2002). Entretanto ainda são necessários mais estudos para afirmar se a L-alanina pode ter algum efeito em melhorar a disponibilidade de glutamina ao organismo.

Estudos em modelos animais utilizam a suplementação com L-glutamina administrada na água de beber dos animais como forma de suplementação crônica, uma vez que os animais consomem constantemente a suplementação (PRADA *et al.*, 2007; BUNPO *et al.*, 2008; UENO *et al.*, 2011).

Prada *et al.* (2007) avaliaram o efeito da suplementação de glutamina sobre a resistência a insulina em ratos obesos, onde a suplementação foi administrada em solução a 4% de glutamina ou alanina. Neste estudo eles observaram aumento de 53% na concentração plasmática de glutamina nos animais suplementados com glutamina, entretanto nos animais suplementados com L-alanina não houve efeito e consequentemente a suplementação com glutamina reduziu a massa adiposa, e melhorou a sinalização da insulina no fígado e no músculo.

3.7 Alanina: aspectos metabólicos, exercício e suplementação

A L-alanina é um dos aminoácidos não essenciais mais abundantes no plasma, com uma concentração entre 0,5-0,7 mmol/L (SALVUCCI; NEUFELD; NEWSHOLME, 2013). No músculo esquelético corresponde de 7 a 10% na proteína muscular (GOLDSTEIN E NEWSHOLME, 1976).

A L-alanina é sintetizada no rim, intestino e principalmente no músculo esquelético (BATTEZZATI *et al.*, 1999). No músculo esquelético cerca de 60% do esqueleto carbônico para a formação deste aminoácido provêm da glicose e o restante de outras fontes (GOLDSTEIN; NEWSHOLME, 1976). A alanina sintetizada no músculo é transportada para o fígado onde é reconvertida a glicose. Este processo metabólico é denominado ciclo alanina-glicose (GOLDSTEIN; NEWSHOLME, 1976). Deste modo, este aminoácido apresenta um papel fundamental na gliconeogênese (CHIASSON *et al.*, 1975; BATTEZZATI *et al.*, 1999).

No fígado este aminoácido pode ser rapidamente transanimado a piruvato. O piruvato formado pode reduzir a lactato, descarboxilar para acetilcoenzima A ou carboxilar para oxalacetato. O oxalacetato pode entrar no ciclo do ácido cítrico e gerar energia (BATTEZZATI *et al.*, 1999). A ingestão de grandes quantidades de L- alanina (50g) seja em repouso ou durante o exercício reduz a cetogênese, através do fornecimento do oxaloacetato ao fígado, não só para gliconeogênese, mas também para síntese de citrato (KORACH-ANDRE *et al.*, 2002).

Diversos estudos demonstram que L- alanina aumenta a secreção de insulina em células β -pancreáticas (BRENNAN *et al.*, 2002; KIELY *et al.*, 2007). Este aminoácido pode estimular a secreção de insulina por três independentes e complementares mecanismos de ação: primeiro a L-alanina é metabolizada em altas taxas, aumentando a produção de ATP o que resulta no aumento da secreção de insulina por meio da K^+_{ATP} dependente. Em outra via a L-alanina estimula a secreção de mensageiros que estimulam a secreção de insulina, como L- glutamato e citrato agindo como via de amplificação para secreção de insulina. Além disso, a L-alanina/ Na^+ é uma co-transportadora que media a despolarização para secreção de insulina (SALVUCCI; NEUFELD; NEWSHOLME, 2013).

O principal aminoácido liberado durante o exercício, a alanina tem seu efluxo aumentado 2 vezes para a corrente sanguínea durante o exercício, e pode chegar a 2,5

vezes em exercícios prolongados (DOHM; TAPSCOTT; KASPEREK, 1987; WILLIAMS; CHINKES; WOLFE, 1998). Isto se deve a acelerada oxidação de aminoácidos e o catabolismo de nucleotídeos durante o exercício, o que produz um aumento da carga de nitrogênio. O nitrogênio é incorporado em outros compostos ou liberados como amônia livre. O estado hiperamonemia é potencialmente tóxico, e este é evitado pela incorporação do nitrogênio a aminoácidos. (FELIG; WAHREN, 1971; BIER, 1989).

As taxas relativas de síntese de alanina e glutamina parecem ser determinadas pela disponibilidade intracelular de piruvato e α -cetoglutarato. O aumento da intensidade do exercício eleva a disponibilidade intramuscular de piruvato a partir de glicogenólise e o grupo amino proveniente do catabolismo de aminoácidos, nucleotídeos e purina é aumentado. Assim, a taxa absoluta da síntese de L-alanina e a liberação de L-alanina a partir do músculo são aumentadas progressivamente conforme a intensidade do exercício (ERIKSSON *et al.*, 1985; WAGENMAKERS *et al.*, 1991).

Em exercícios extremos a oxidação de L- alanina é aumentada. Estudos em humanos demonstram que a oxidação da alanina representa 10% do total de energia produzida (WILLIAMS; CHINKES; WOLFE, 1998). Principalmente, por ter grande importância como substrato para gliconeogênese durante o exercício. A L-alanina pode atuar na gliconeogênese por duas vias: a primeira pela produção de glicose no fígado através da alanina- glicose, e a segunda como doadora de nitrogênio para a produção de outros aminoácidos. Além disso, a descarboxilação e a oxidação da alanina durante o exercício pode aumentar a conversão de alanina a glicose no fígado (KORACH-ANDRE *et al.*, 2002).

A suplementação de L-alanina diminui o catabolismo de aminoácidos essenciais em algumas condições, como erros inatos do metabolismo (BODAMER; HALLIDAY; LEONARD, 2000). Entretanto, os efeitos da suplementação de L-alanina e exercício físico ainda são limitados na literatura. Klein, Nyhan e Kern (2009) avaliaram o efeito da suplementação de L-alanina ou de carboidrato ou ambos, em humanos submetidos à exercício de ciclismo a 75% do V_{O_2max} , e demonstraram que a L-alanina é um aminoácido gliconeogênico e pode prevenir a utilização de outros aminoácidos como substrato energético. A exemplo, todas as suplementações aumentaram a concentração plasmática de glutamina pós- exercício (WILLIAMS; CHINKES ; WOLFE, 1998, KORACH-ANDRE *et al.*, 2002; KLEIN; NYHAN; KERN, 2009). Uma hipótese para o aumento de

glutamina no plasma ao consumir L-alanina, é o grupo amino resultante da oxidação de L-alanina, que pode ser transportado para o fígado em forma de L-glutamina para a conversão de glutamato a glutamina (KORACH-ANDRE *et al.*, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições experimentais

4.1.1 Animais

O presente estudo foi realizado com 50 ratos Wistar adultos (± 60 dias), machos, com média de peso de 234 ± 6 g cedidos pelo Biotério do Conjunto das Químicas localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, Protocolo CEUA/FCF/60/2012, nº 374 (Anexo). Foram mantidos 3 animais por caixa, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa do ar de 60% e obedecendo a um ciclo de luz invertido de 12 horas claro e 12 horas escuro (luz acesa às 14:00 horas).

4.1.2 Desenho experimental

A duração do experimento foi de oito semanas. Inicialmente os animais foram distribuídos em gaiolas conforme os grupos experimentais. A distribuição foi aleatória de forma que não houvesse diferença estatística significativa na média do peso corporal entre os grupos experimentais. As duas primeiras semanas foram destinadas à adaptação do animal ao ambiente e ao protocolo de exercício. O protocolo de treinamento iniciou-se a partir da terceira semana de experimento. A suplementação foi administrada nos últimos 21 dias do experimento, na água dos animais conforme descrito no item 4.1.3. Os animais foram eutanasiados por veno-seção no último dia do protocolo de treinamento, 1 hora após a última sessão de exercício. O peso dos animais foi monitorado três vezes por semana durante todo o período experimental.

4.1.3 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, conforme a suplementação administrada:

- **SED**-Animais não treinados, suplementados com água filtrada (n=10)
- **CTRL**-Animais treinados, suplementados com água filtrada (n=10)

- **ALA-** Animais treinados, suplementados com L-alanina (n=10).
- **GLN+ALA-** Animais treinados, suplementados com solução contendo L-alanina e L-glutamina livres (n=10).
- **DIP-** Animais treinados, suplementados com L-alanil-L-glutamina (n=10).

4.1.4 Dieta e Suplementação

Durante todo o experimento os animais foram alimentados com ração comercial cedida pelo biotério (NUVILAB CR1 IRRADIADA, Nuvital Nutrientes LTDA, Curitiba). A quantidade de ração e água foram ofertadas *ad libitum*. O consumo de ração foi monitorado três vezes por semana. A suplementação foi realizada nos últimos 21 dias do experimento, administrada na água de beber dos animais, diluídas em uma solução a 4% em água filtrada (PRADA *et al.*, 2007, CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009; CRUZAT *et al.*, 2014). Os grupos suplementados receberam solução de 4% de aminoácidos, o grupo DIP- recebeu L-alanil-L-glutamina, fabricado por Fresenius Kabi – Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda., fornecido pela empresa Fórmula Medicinal – Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil. O grupo GLN + ALA recebeu solução com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre, na mesma quantidade de aminoácidos presentes no dipeptídeo, fabricados por Synth. O grupo ALA recebeu o aminoácido L- alanina na concentração. Os grupos CTRL e SED receberam água filtrada. A suplementação foi ofertada de forma *ad libitum*, com monitoramento diário do consumo. A suplementação foi ofertada até 1 hora antes da última sessão de exercício no último dia de experimento.

4.1.5 Protocolo de treinamento

O treinamento resistido dos animais foi realizado em sistema de subida em escada, adaptado de Scheffer *et al.* (2012). Este treinamento simula o exercício resistido em animais, o qual consiste em escalar uma escada vertical com 1,1m de altura, 2cm entre os degraus, inclinada à 80°. Os animais escalaram carregando aparatos com carga (tubos com pesos acoplados a cauda do animal, com fita de alta fusão e fita adesiva). A carga foi determinada a partir do peso corporal.

A cada série o animal escalou de 8 a 10 vezes, com 2 minutos de intervalo entre as séries. As sessões de treinamento ocorreram pela manhã a cada 48 horas. As duas primeiras semanas foram destinadas a adaptação do animal ao protocolo de treinamento. Na fase de adaptação o animal carregava uma carga equivalente a 5% do peso corporal até conseguir realizar oito subidas consecutivas. A partir da terceira semana de experimento se iniciou o protocolo de treinamento que consiste em um treinamento progressivo, onde nas 2 primeiras semanas de treinamento os animais realizavam 3 séries com 25% do peso corporal. Na terceira semana realizavam 4 séries com 50% do peso corporal. Na quarta semana e metade da 5ª semana realizavam 5 séries com 75% do peso corporal. A metade da quinta semana e sexta semana realizavam 6 séries com 100% do peso corporal (figura 4).

Figura 4- Esquema do protocolo de treinamento utilizado no experimento

Legenda: Mim= minuto

4.1.6 Teste de Carga máxima

O teste de carga máxima foi realizado na terceira sessão de treinamento, nas cargas 25%, 50% 75% e 100%. O protocolo iniciou com o animal escalando com um aparato com peso que equivale a 75 % do peso corporal. O descanso entre cada

escalada foi de 120 segundos. Para a nova repetição foi adicionado um peso com 30 gramas ao aparato. Este procedimento foi repetido sucessivamente até que a carga alcance um peso que não permita que o rato consiga escalar. Então, a maior carga carregada com sucesso até o topo da escada foi considerada a capacidade máxima de carregamento dos animais para treinamento. Para o novo teste, o animal iniciou com a carga máxima carregada no teste anterior (HORNBERGER; FARRAR, 2004).

4.1.7 Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Todos os animais foram eutanasiados com os anestésicos Ketamina e Xilazina uma hora após a última sessão de treinamento. Foi coletado o sangue, em tubos heparinizados (500U), amostras de papa de hemácias, soro e plasma foram armazenadas em freezer (-80°C). O fígado e o músculo extensor longo dos dedos (EDL) e Tibial anterior foram removidos e imediatamente congelados utilizando um “freeze-clamp”, em nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-80°C) para posterior análise.

4.2 Parâmetros plasmáticos e séricos

4.2.1 Lactato

A dosagem do lactato sanguíneo foi realizado sempre na terceira sessão de treinamento, das cargas de 25%, 50% 75% e 100%. O sangue da cauda do animal foi recolhido em repouso e ao final da sessão de treinamento. Sendo coletados 25µl em tubos heparinizados e estabilizados em fluoreto de sódio. A dosagem de lactato foi realizado por técnica eletrométrica no aparelho Lactímetro Yellow Spring Instrumentes (Yellow Spring, USA).

4.2.2 Creatina quinase

A atividade total de creatina quinase (CK) foi determinada através do Kit CK- NAC liquiform (Labtest, Brasil) utilizado em espectrofotômetro termostatizado à 37°C conforme a metodologia descrita por Schumann *et al.* (2002). A atividade de CK foi determinada

através das seguintes reações: A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. A glicose -6-fosfato, na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorbância em 340 nm é proporcional à atividade da CK na amostra.

4.2.3 Mioglobina

A concentração plasmática de mioglobina foi realizada através do Kit comercial de Myoglobin Enzyme Immunoassay Test Kit, Marca USCNK , USA). O kit apresenta uma placa de microtitulação revestida com um anticorpo primário específico para mioglobina. 100ul de amostra foram adicionadas aos poços com uma solução contendo um anticorpo específico para mioglobina. Após esta etapa adicionou-se Adivina conjugada com peroxidase de rábano (HRP) aos poços da microplaca na qual foi encubado. Após adicionou-se a solução substrato TPM apenas nos poços que contém mioglobina.

A ligação do anticorpo conjugado com biotina e a enzima advina conjugada com peroxidase de rábano apresentou mudança de cor. A reação enzima- substrato foi finalizada com adição de solução de ácido sulfúrico e a alteração de cor foi determinado pelo espectrofotômetro (ElisaSynergy H1/ Biotek) a um comprimento de onda a 450 ± 10 nm. A concentração de mioglobina foi determinada na amostra a partir da curva padrão.

4.2.4 Glutamina e glutamato plasmático

A determinação de glutamina e glutamato plasmáticos foram realizadas por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), o qual recomenda a metodologia descrita por Lund (1995). Amostras de plasma foram congeladas a -80°C , para garantir a estabilidade. No dia da determinação dos conteúdos de glutamina e/ou glutamato, os plasmas foram homogeneizados com ácido tricloroacético (TCA) a 5% na proporção de 1:1 em homogeneizador (Ultra Turrax).

Após a homogeneização em TCA, neutralizou-se os plasmas utilizando 6 μL de Na_2CO_3 para cada 100 μL de sobrenadante coletado posteriormente a centrifugação a

16.000 x g por 2 min., a 4°C, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo 1,5 ml. O volume de Na₂CO₃ utilizado é suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5. Para o ensaio são utilizados 20 µL dos sobrenadantes em triplicata.

A primeira reação do ensaio de glutamina/glutamato consiste na desaminação enzimática da L-glutamina, por meio da enzima glutaminase (GA), gerando quantidades estequiométricas de amônio (NH₄⁺) e L-glutamato. Em seguida, o L-glutamato foi desidrogenado e convertido a α-cetoglutarato (2-oxoglutarato) via glutamato desidrogenase (GDH), na presença de NAD⁺. As quantidades de L-glutamina e/ou glutamato das amostras foram proporcionais à quantidade de NADH formado, medido a 340 nm em leitoras de microplaca de ELISA (SynergyH1/Biotek).

Glutaminase*

Glutamato Desidrogenase**

*L-glutamina amidoidrolase, EC 3.5.1.2

L-glutamato:NAD(P)⁺ oxidorreductase (desaminante), EC 1.4.1.3 (GDH**)

4.2.5 Glutathiona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG) eritrocitária

A determinação de GSH e GSSG em eritrócitos foi realizada utilizando a papa de hemácias dos plasmas de acordo com metodologia descrita por Sies e Akerboom (1984). Para tanto, é coletado 1 mL de sangue e separado o plasma heparinizado. A papa de hemácias obtida (cerca de 0,5 mL) foi homogeneizada com 5 volumes de ácido meta-fosfórico (MPA) (2,5 mL). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4°C em microcentrífuga (15.000 G) foi coletado o sobrenadante para as determinações.

Para o ensaio de GSSG, as amostras foram tratadas com N-etilmaleimida (NEM), a qual se conjuga com a GSH sem oxidá-la, ocorrendo em pH 6,0. Contudo, uma vez que a GSH foi oxidada nestes valores de pH foi adicionada solução tamponante em pH 6,0 (Pipes), contendo o agente neutralizador hidróxido de potássio (KOH). Nesta reação houve transformação de GSH em GSSG. Na sequência, o excesso de NEM foi extraído com solvente orgânico (acetato de etila) para evitar que reaja com as novas moléculas de GSH que foram formadas durante o ensaio de reciclagem com a GSSG redutase. O excesso de solvente, o qual inibe o ensaio da redutase foi removido por secagem em SpeedVac (Thermo Savant, modelo SPD131DDA) (SILVEIRA *et al.*, 2007).

As determinações das concentrações de GSH e GSSG foram realizadas em uma placa de ELISA, sendo pipetada 10 µl por amostra. Posteriormente, nas amostras foi adicionado 10 mM de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 0,17 mM de β-NADPH (Sigma, dissolvido em 0,5% (W/v) de NaHCO₃) e 0,5 U/ml de GSSG redutase (EC 1.6.4.2, Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA). As concentrações de GSH e GSSG foram medidas a 415 nm em leitora de microplaca de ELISA (Synergy H1/ Biotek).

4.2.6 Transaminases

As concentrações plasmáticas das transaminases Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (AST) e GamaGlutamil Transferase (GGT) foram analisadas através de kit comercial Labtet (Labtest) por metodologia de cinética UV através do equipamento Labmax 240 (Labtest).

4.2.7 Ureia e Creatinina

As concentrações plasmáticas de Ureia e Creatinina foram analisadas através de kit comercial Labtet (Labtest) por metodologia enzimática UV através do equipamento Labmax 240 (Labtest).

4.3 Parâmetros teciduais

4.3.1 Glutamina e glutamato tecidual

A determinação de glutamina e glutamato muscular (EDL e Tibial anterior) e hepático foram realizadas por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), que recomenda a metodologia descrita por Lund (1985). Após a obtenção cirúrgica, os tecidos foram congelados com auxílio de um “freeze-clamp” e pesados em seguida. (Lund 1985).

O processamento e análise foram realizados a temperatura de 4°C, onde os tecidos, ainda congelados, foram homogeneizados em TCA 5% à razão de 6 mL por grama de tecido. Para tal um homogeneizador de facas (Ultra Turrax) foi utilizado. Imediatamente após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas em 16.000 x g por 2 min., a 4°C. Após a centrifugação coletou-se o sobrenadante transferido para outro tubo de 600µL posteriormente neutralizou-se o conteúdo sobrenadante utilizando 6 µL de Na₂CO₃ para cada 100 µL de sobrenadante coletado. O volume de Na₂CO₃ utilizado foi suficiente para trazer o pH das amostras para cerca de 6,5. Para o ensaio foi utilizados 20 µL dos sobrenadantes em triplicata.

Para a determinação de Glutamina e glutamato nos tecidos utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 4.2.4.

4.3.2 Glutathiona reduzida (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG)

As determinações de GSH e GSSG nos tecidos muscular (EDL E tibial) e hepático foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Sies e Akerboom (1984); Para tanto, os tecidos obtidos cirurgicamente, imediatamente pesados e congelados utilizando um freeze-clamp, após foram mantidos em freezer -80°C. No dia do experimento os tecidos ainda congelados foram homogeneizados em MPA 5% à razão de 1 mL/g de tecido. Depois da homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15.000 x g, por 5 min a 4°C, sendo coletado o sobrenadante para as determinações.

Para determinação de GSH e GSSG foi utilizada mesma metodologia descrita no item 4.2.5.

4.3.3 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das TBARS foi realizada nos tecidos muscular (EDL e tibial) e hepático homogeneizados em TCA 5%, contendo 10 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) 29,5 mM por ml (Draper e Hadley, 1990). A proporção da mistura ao tecido foi de 5 ml por grama de tecido fresco. Posteriormente, as amostras são fervidas em banho-maria a 100°C por 30 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 2500 x g a 4 °C, sendo coletado o sobrenadante. A amostra coletada foi misturada em ácido tiobarbitúrico (TBA) na proporção de 1:1 em microplaca de ELISA e foi feita a leitura à 535 nm (Synergy H1/ Biotek, USA).

4.3.4 Quantificação de proteína

Para quantificar a concentração da proteína no homogenato foi utilizado o kit comercial BCA Protein Assay Reagent (Termo Scientific,). Para o ensaio, primeiramente os homogenatos de fígado e músculo foram diluídos em água deionizada 20 e 10x respectivamente. 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 de Elisa foi adicionado 10ul de amostra diluída e padrões, e após adicionou-se 200ul do reagente de detecção e foi feita a leitura em ELISA à 562 nm (Synergy H1/ Biotek,USA). As leituras foram plotadas a partir da curva de albumina.

4.3.5 Expressão proteica (Análise de Western Blotting)

A expressão proteica das HSP- 27 e glutamina sintetase foram analisadas no músculo Tibial Optou-se por este músculo devido à pequena quantidade de amostra no musculo EDL. Quantidades iguais de proteína, determinadas por metodologia descrita por Kit BC A, foram carregadas em gel poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (10%) para eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, Beguin e Gujer-Kellenberger, 1970) em cuba Mini-Protean-II (Bio-Rad). Após a corrida em gel, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Health, Care-Amersham) por eletrotransferência (Bio-

Rad). A membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários: HSP-27 (1:1000 Cell Signaling Technology,) e Glutamina sintetase (1:500 Santa Cruz,Dallas- USA.) 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 (1:1000 Sigma-Aldrich). Após incubação (overnight a 4°C) e lavagem, foi realizada a incubação com solução de anticorpo secundário (Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG) por 1 h. Terminada a incubação, lava-se com PBST. Para a revelação das membranas foi utilizado Kit ECL Western Blotting Detection Reagents (G.E,USA) por 2 minutos no equipamento Image quant GE(G.E ,USA)

4.4 Análise estatística

Os parâmetros foram apresentados segundo os objetivos citados na presente pesquisa. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média. 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 diferença 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. Um valor alfa de 5% foi adotado para rejeitar a hipótese de nulidade e a elaboração dos cálculos e gráficos foi realizada através do pacote estatístico SPSS versão 20.0 para Windows e Graphic pad prisma 5.

5.RESULTADOS

5.1 Parâmetros biométricos

5.1.1 Consumo de ração e Ingestão hídrica

Tabela 1- Média de consumo de ração durante o experimento, ingestão hídrica, ingestão de aminoácidos (AA) e Ingestão de glutamina

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Consumo de ração o experimento (g/dia)	27,32±1,68	21,96±1,83*	20,90±1,17*	22,21±2,65*	20,51±0,94*
Consumo antes da suplementação (g/dia)	27,06±0,49	25,91±0,53*	26,05±0,58	25,58±0,56*	24,51±0,48*
Consumo durante a suplementação (g/dia)	27,74±0,60	21,94±0,73*	21,03±0,31*	20,88±0,34*	21,16±0,38*
Ingestão hídrica (ml/dia)	42,02±0,32	39,46±0,29	63,14±0,37 [#]	64,37±0,46 [#]	52,49±0,96 [#]
Ingestão de AA (g/kg de peso de animal)	-	-	7,02±0,21	7,17±0,17	6,46±0,13 ^φ
Ingestão de glutamina (g/kg de peso de animal)	-	-	-	4,82± 0,11	4,35±0,08 ^φ

Ratos Wistar (N=10) submetidos a treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo SED (p<0,05 Test *Student*)

[#] Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo CTRL (p<0,05 Tukey HSD)

^φ Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo GLN+ALA(p<0,05 Tukey HSD)

O consumo de ração dos animais foi avaliado três vezes por semana. Nota-se que os animais do grupo sedentário apresentaram um consumo maior comparado aos grupos treinados. Em relação aos grupos treinados não houve diferença significativa de consumo entre o grupo controle e os grupos suplementados, o que demonstra que o consumo de aminoácidos não interferiu na ingestão de ração (Tabela 1).

Em relação à ingestão hídrica no período de suplementação (tabela 1) observa-se um aumento estaticamente significativo na ingestão hídrica nos grupos suplementados quando comparado aos grupos controle treinado, entretanto sem refletir de forma significativa no ganho de peso e consumo de ração. Observou-se ainda, maior ingestão hídrica no grupo GLN+ALA quando comparado ao grupo que recebeu dipeptídeo ($p < 0,05$) (Tabela 1).

O grupo GLN +ALA ingeriu maior quantidade de aminoácidos, bem como de L-glutamina livre quando comparado ao grupo DIP ($p < 0,05$). Entretanto não apresentou correlação significativa entre a ingestão de aminoácidos e de L-glutamina e a concentração de glutamina nos tecidos: fígado, EDL, Tibial ($p < 0,87$ $r = 0,28$, $p < 0,285$ $R = 0,19$, $p < 0,501$ $R = 0,14$, respectivamente), demonstrando que a concentração de glutamina nos tecidos não é dependente da quantidade de suplementos ingerida (Tabela 1).

5.1.2- Peso corporal

De acordo com a tabela 2, o ganho de peso durante todo experimento foi maior no grupo sedentário em relação aos grupos treinados ($p < 0,005$). Também não houve diferença significativa no ganho de peso entre o grupo controle treinado e os grupos treinados e suplementados (ALA, GLN+ALA, e DIP) nos 21 dias de suplementação, demonstrando que consumo de energia proveniente dos suplementos não resultou em ganho de peso destes animais.

Tabela 2- Ganho de peso corporal durante o experimento e peso dos músculos

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Ganho total (g)	154,6±10,31	105,1±5,82*	94,46±3,81*	99,09±5,52*	93,02±3,01*
Ganho diário (g/dia)	2,76±0,18	1,87±0,11*	1,69±0,68*	1,77±0,10*	1,66±0,05*
Ganho antes o suplementação (g/dia)	3,74±0,23	2,76±0,17*	2,43± 0,11*	2,41±0,09*	2,28±0,09*
Ganho durante a suplementação (g/dia)	1,09±0,16	0,11±0,02*	0,12± 0,04*	0,18±0,03*	0,18±0,07*
Peso do músculo					
Tibial (mg de tecido fresco / mm de tibia)	17,13±0,80	18,59± 1,23	17,62±0,22	19,32±0,58	19,23±0,45
Peso do músculo					
EDL (mg de tecido fresco/ mm de tibia)	3,79±0,18	3,943±0,24	3,920±0,08	4,365±0,13	4,081±0,23

Ratos Wistar (n=10) submetidos a treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa comparada grupo SED (p<0,05 Test T Student)

Os pesos dos tecidos frescos foram corrigidos pelo comprimento da tibia, a fim de evitar falsos resultado devidos, uma vez que o peso tecido varia conforme o tamanho do animal e o protocolo de exercício causa alterações no peso dos animais. De acordo com a tabela 2, tanto no músculo Tibial quanto EDL não houve alterações significativas entre os grupos, porém o grupo CTRL apresentou um peso 8% aproximadamente maior quando comparado ao SED nos músculos Tibial e EDL.

5.1.3 Teste de Carga máxima

Figura 5- Carga máxima dos animais levantada durante os testes 1, 2 e 3(g)

Ratos Wistar (n=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média

Representa diferença estatística significativa quando comparado ao CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD)

φ Representa diferença estatística significativa quando comparado ao DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD)

Os testes de carga máxima foram realizados no primeiro dia de treinamento (teste1), no último treino antes de iniciar a suplementação (teste 2) e no final do experimento (teste 3).

Nota-se que todos os grupos aumentaram sua carga máxima tanto no segundo quando no terceiro teste, demonstrando que o protocolo de treinamento aumentou a força de todos os grupos treinados. Entretanto, O grupo DIP apresentou uma carga máxima maior tanto no segundo quanto no terceiro teste quando comparado ao CTRL, além disso, no terceiro teste o DIP apresentou uma Carga máxima maior que o grupo ALA.

5.2 Parâmetros sanguíneos

5.2.1 Concentração de Glutamina e glutamato plasmática

Tabela 3- Concentração de Glutamina, Glutamato e razão glutamina (GLN) glutamato (GLU) plasmáticos

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina (umol de gln/L)	1,03±0,08	1,08±0,07	1,41±0,03	1,58±0,21#	1,79±0,15#
Glutamato (umol de gln/L)	0,87±0,07	0,72±0,10	0,82±0,09	0,76±0,09	0,68±0,11
Razão GLN/GLU (umol de gln/L)	1,36±0,12	1,84±0,22	1,89±0,22	2,12±0,21#	2,43±0,32#

Ratos Wistar n=6 por grupo submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais Suplementados via em solução à 4%, durante 21 dias com dipeptídeo ou solução com L- glutamina L-alanina ambos na forma livre ou l- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média

Representa diferença estatística significativo comparado ao grupo CTRL (p<0,05 Tukey HSD)

Em relação à concentração plasmática de glutamina não foi observado redução significativa no grupo controle em relação ao grupo sedentário. Porém nota-se aumento significativo na concentração de glutamina nos grupos GLN+ALA e DIP quando comparados ao grupo controle. O mesmo foi observado na razão GLN/GLU (Tabela 3).

5.2.2 Lactato

Tabela 4- Concentração de lactato (mmol/L) em repouso a cada carga

	25%	50%	75%	100%
SED	1,80±0,15	1,54±0,16	1,46±0,20	2,07±0,16
CTRL	1,51±0,52	1,42±0,13	1,47±0,34	2,34±0,5

Ratos Wistar (n =5) por grupo submetidos à treinamento resistido intenso, exceto grupo SED. Resultados expressos em média e erro padrão da média. Teste T de *Student* ($p < 0,05$). Dados expressos em mmol/L

Neste experimento foi mensurada a concentração plasmática de lactato em repouso e logo após o exercício, a cada mudança de carga. De acordo com a tabela 4 não houve diferença estatística significativa na concentração de lactato em repouso entre os animais do grupo sedentário e treinados durante todo o experimento.

Figura 6- Delta de concentração de lactato a cada mudança de carga

Ratos Wistar (N=5) submetidos a treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

Legenda: Δ= delta lactato (pós treino - pré treino)

Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD)

Observa-se na figura 6 a alteração significativa no delta entre grupos GLN+ALA e DIP em relação ao CTRL tanto na carga de 50% quanto de 100%. Na carga de 100% observa-se concentração elevada de lactato em todos os grupos, demonstrando a alta intensidade do treinamento nesta fase. Cabe ressaltar que o início da suplementação ocorreu posteriormente ao teste de lactato realizado durante a carga de 50% do peso corporal. Entretanto na carga de maior intensidade (100%), no qual os animais foram suplementados cronicamente, houve redução significativa nas concentrações de lactato nos grupos GLN+ALA e DIP ($p<0,05$).

5.2.3 Parâmetros de Lesão

Tabela 5- Concentração plasmática de Creatina quinase e Mioglobina

Parâmetros	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Creatina					
Kinase	5.09±0.46	8,42±0,90*	6,53±0,70	5,21±0,45 [#]	5,20±0,70 [#]
(U/ml)					
Mioglobina					
	1.39± 0.17	2,28±0,18*	1,84±0,18	2,11±0,13	1,94±0,11
(Pg/ml)					

Ratos Wistar (n=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa se comparado SED com CTRL ($p<0,05$ Test T *Student*)

Representa diferença estatística significativa se comparado GLN+ALA ou DIP com CTRL ($p<0,05$ Tukey HSD)

Creatina quinase e mioglobina são considerados parâmetros que indicam lesão muscular (RAHMANI-NIA et al., 2014). De acordo com a tabela 5 observa-se um aumento na concentração tanto de creatina quinase quanto de mioglobina no grupo CTRL quando comparado ao grupo SED ($p<0,05$), comprovando que o protocolo de exercício gerou lesão muscular.

Entre os grupos suplementados, houve redução de creatina quinase nos grupos GLN+ALA e DIP ($p<0,05$). Embora sem significância estatística, observou-se tendência a redução das concentrações de mioglobina quando os animais foram suplementados com

L-glutamina (19% GLN+ALA e 16%DIP) indicando o efeito protetor destes suplementos sob as lesões causadas pelo exercício físico.

5.2.4 Transaminases, Ureia e Creatinina

Tabela 6 - Concentração plasmática de ureia, creatinina, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT) e Gama-glutamyl transferase (GGT)

Parâmetro	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
ALT (U/L)	71,86±3,31	75,29±4,89	67,50±11,01	72,43±11,01	71,50±7,66
AST (U/L)	445,3±42,68	551±71,71	432,3±56,37	384,4±56,37	419,8±52,5
AST/ALT	5,63±0,22	6,61±0,81	4,91±0,29 [#]	5,20±0,40 [#]	5,32±0,45 [#]
GGT (u/L)	40,20±8,4	64,77±10,6	56,28±8,9	64,77±11,4	45,78±9,5
UREIA (u/L)	49,67±1,2	50,50±2,5	50,50±3,6	48,20±1,1	46,40± 5,7
Creatinina (Mg/dL)	0,58±0,01	0,62±0,03	0,59±0,02	0,60±0,02	0,67±0,03

Ratos Wistar (N=6) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média. # representa diferença significativa comparado ao grupo CTRL (p<0,05 Test Tukey)

As transaminases são parâmetros bioquímicos para avaliar o estado hepático. Não houve alterações significativas entre os grupos suplementados, o que indica que a suplementação não causou problemas hepáticos. Entretanto no CTRL houve aumento de 61% no GGT e 22% na relação AST/ALT quando comparado ao SED. Em relação a ureia e creatinina, não houve aumento significativo nos grupos treinados e suplementados demonstrando que a suplementação não causou alterações renais. (Tabela 6).

5.2.5 Concentração de Glutathiona oxidada e reduzida em eritrócitos

Tabela 7- Concentração eritrocitária de Glutathiona reduzida (GSH), Glutathiona oxidada (GSSG) e razão GSSG/GSH

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
GSH (mmol/L)	40,70± 2,89	29,71±1,74*	27,62± 2,32	41,76±2,65 [#]	41,62±3,69 [#]
GSSG (mmol/L)	10,94±1,40	14,93±0,61*	15,62±0,82	12,59± 1,22	13,65±0,46
GSSG/GSH (mmol/L)	0,33± 0,04	0,49± 0,03*	0,53± 0,07 ^φ	0,31±0,06 [#]	0,31± 0,03 [#]

Ratos Wistar (N=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa se comparado SED com CTRL ($p < 0,05$ Test T *Student*)

Representa diferença estatística significativa comparado com CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD)

φ Representa diferença estatística significativa comparado com DIP ($p < 0,05$ Tukey HSD)

No grupo CTRL, quando comparado ao grupo SED, houve redução na concentração de glutathiona na sua forma reduzida e aumento da forma oxidada, o que consequentemente aumentou a razão GSSG/GSH ($p < 0,005$), o que demonstra que o este protocolo de exercício provocou aumento do estresse oxidativo (tabela 7).

Entre os grupos suplementados houve aumento significativo na concentração de glutathiona reduzida e aumento na sua forma oxidada nos grupos GLN+ALA e DIP quando comparado com o grupo CTRL ($p < 0,005$). Também nota-se redução significativa na razão GSSH/GSH no grupo GLN+ALA e DIP quando comparado com CTRL e com ALA ($p < 0,005$) (tabela 7).

5.3 Parâmetros teciduais

5.3.1 Concentração de Glutamina e Glutamato hepática

Tabela 8 – Concentração de glutamina, glutamato e razão glutamina e glutamato (GLN/GLU) no fígado

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina (mmol de gln/g de ptn)	3,089±0,23	3,18±0,42	3,98±0,19	3,50±0,35	3,92±0,29
Glutamato (mmol de gln /g de ptn)	1,44±0,14	1,05±0,26	0,84±0,093	1,18±0,18	0,93±0,097
Razão GLN/GLU (mmol de gln /g de ptn)	1,82± 0,20	1,42±0,13	2,03±0,36	2,17±0,32	3,06±0,39 [#]

Ratos Wistar (n=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou l- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa se comparado SED com CTRL (p<0,05 Test T *Student*)

Representa diferença estatística significativa se comparado GLN+ALA ou DIP com CTRL (p<0,05 Tukey HSD)

De acordo com a tabela 8, a concentração de glutamina no fígado não apresentou redução significativa no grupo CTRL quando comparado ao grupo SED (p<0,005). Contudo, nos grupos suplementados a concentração de glutamina aumentou 25%, 10% e 24% nos grupos ALA, GLN+ALA e DIP, respectivamente, bem como, houve a melhora significativa na razão GLN/GLU no grupo DIP comparado ao CTRL.

5.3.2 Concentração de glutamina e glutamato muscular

Tabela 9- Concentração de glutamina, glutamato e razão glutamina e glutamato (GLN/GLU) no músculo Tibial

	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina (mmol de gln/mg de ptn)	20.19±3.0	9.31±1.2*	22.93±5,0	28.27±5.7#	29.61±3.4#
Glutamato (mmol de gln/mg de ptn)	10,74± 2,7	6,195±1,0	8,72± 1,94	11,01± 2,13	11,87±3,5
Razão GLN/GLU (mmol de gln/ mg de ptn)	1.82±0.16	2.04±0.16	2.26±0.10	2.59±0.21	3.00±0.42

Ratos Wistar (N=8) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa se comparado SED ($p<0,05$ Test *Student*)

Representa diferença estatística significativa se comparado com CTRL ($p<0,05$ Tukey HSD)

De acordo com a tabela 9, no musculo Tibial, que apresenta fibras mistas, a concentração de glutamina no músculo tibial reduziu no grupo CTRL quando comparado ao SED ($p<0,05$). As suplementações DIP e GLN+ALA aumentaram a contração de glutamina ($p<0,05$), demonstrando que estas suplementações foram eficazes em reverter a redução da glutamina muscular causada pelo exercício.

Tabela 10 - Concentração de glutamina, glutamato e razão glutamina e glutamato (GLN/GLU) no músculo EDL

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina (mmol de gln/ de ptn)	25,02± 4,9	8,57±0,7*	15,47±3,56	29,49±7,37 [#]	26,29±3,92 [#]
Glutamato (mmol de gln/ mg de ptn)	14,46±3,9	5,08±0,57	10,95±3,8	22,46±4,9	19,94±6,03
Razão					
GLN/GLU (mmol de gln/ de ptn)	1,33±0,05	1,34±0,12	1,60±0,13	1,63±0,09	1,73±0,12

Ratos Wistar (N=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo SED ($p < 0,05$ Test T *Student*)

Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD)

De acordo com a tabela 10, no músculo EDL, no qual a predominância de fibras é glicolíticas, a concentração de glutamina reduziu no grupo CTRL quando comparado ao SED ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de exercício reduziu a glutamina muscular. Já os grupos suplementados, GLN+ALA e DIP aumentaram a concentração de glutamina quando comparado ao CTRL ($p < 0,05$), assim as estas suplementações também foram eficazes em reverter a redução da glutamina muscular causada pelo exercício.

5.3.3 Concentração tecidual de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

De acordo com a tabela 11, tanto o fígado quanto os músculos apresentaram aumento significativo na concentração de TBARS no grupo CTRL se comparado ao SED ($p < 0,05$), demonstrando que o protocolo de exercício causou aumento da peroxidação lipídica nos tecidos.

Tabela 11- Concentração de Proteínas Reativas ao Ácido Tiobarbiturico (TBARS)

TECIDO	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Fígado (ng/mg de ptn)	0,06±0,01	0,11±0,008*	0,08±0,01	0,05±0,005 [#]	0,05±0,05 [#]
Tibial (ng/mg de ptn)	0.049± 0.08	0.12±0.01*	0.06±0.01 [#]	0.05±0.009 [#]	0.05± 0,004 [#]
EDI (ng/mg de ptn)	0,10±0,03	0,32±0,05*	0,08±0,03 [#]	0,09±0,03 [#]	0,05±0,01 [#]

Ratos Wistar (N=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução à 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa comparado SED com o grupo CTRL ($p<0,05$ Teste T Student)

[#]Representa diferença estatística significativa comparado CTRL com o grupo DIP ($p<0,05$ Tukey HSD)

Entre os grupos treinados e suplementados, houve redução de TBARS hepático nos grupos GLN+ALA e DIP ($p<0,05$), enquanto nos músculos Tibial e EDL houve redução em todos os grupos suplementados quando comparados ao CTRL ($p<0,05$), demonstrando que as suplementações são eficazes em atenuar a peroxidação causada pelo exercício.

5.3.4 Concentração de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada hepática

Em relação à concentração de GSH hepática houve decréscimo no grupo CTRL quando comparado ao SED ($p<0,005$). Já entre os grupos treinados e suplementados houve aumento na concentração de GSH nos grupos GLN+ALA e DIP quando comprado ao CTRL ($p<0,005$). No grupo DIP houve diminuição na razão GSSG/GSH quando comparado ao CTRL (tabela 12).

Tabela 12- Concentração de Glutathiona reduzida (GSH), Glutathiona Oxidada (GSSG) e razão GSSH/GSH no fígado

	Grupos experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
GSH (mmol/g de tecido fresco)	2,95±0,33	1,73±0,19*	2,18±0,22	2,85±0,34 [#]	2,93±0,23 [#]
GSSG (mmol/g de tecido fresco)	0,36±0,02	0,49±0,06	0,38±0,04	0,34±0,04	0,30±0,03
GSSG/GSH (mmol/g de tecido fresco)	0,19± 0,03	0,25±0,02	0,21±0,02	0,19± 0,03 [#]	0,17±0,03 [#]

Ratos Wistar (n=10) submetidos a treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo SED (p<0,05 Teste T *Student*)

[#]Representa diferença estatística significativa comparado grupo CTRL (p<0,05 Tukey HSD)

5.3.5 Concentração de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada muscular

De acordo com a tabela 13, no músculo Tibial a concentração de glutathiona reduzida foi 8,57% menor no grupo CTRL quando comparado ao SED. Isto refletiu em um aumento da razão GSSH/GSG no grupo CTRL comparado ao SED (p<0,05). Nos grupos treinados e suplementados somente houve aumento estaticamente significativo no grupo GLN+ALA, porém os grupos ALA e DIP obtiveram aumento de 12,5 % e 18,75% respetivamente. Melhora da razão GSSG/GSH foi observado nos grupos GLN+ALA e DIP quando comparados ao CTRL (p<0,05).

Tabela 13 Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) e razão GSSG/GSH no músculo Tibial

	Grupos Experimentais				
	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
GSH (mmol/g de tecido fresco)	0,35±0,03	0,32± 0,03	0,36±0,03	0,48±0,04 [#]	0,38±0,02
GSSG (mmol/g de tecido fresco)	0,016±0,002	0,020±0,002	0,019±0,002	0,014±0,002	0,015±0,003
GSSG/GSH (mmol/g de tecido fresco)	0,034±0,005	0,057±0,008*	0,048±0,005	0,024±0,008 [#]	0,023±0,006 [#]

Ratos Wistar (N=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou l- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa quando comparado SED ($p < 0,05$ Teste T *Student*)

[#]Representa diferença estatística significativa quando comparado CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD)

No músculo EDL do grupo CTRL a concentração de GSH reduziu 18% e a concentração de GSSG e a razão GSSG/ GSH aumentaram quando comparados ao SED ($p < 0,05$), o que demonstra que o protocolo de exercício gerou estresse oxidativo elevado nos animais.

A concentração de GSH aumentou nos grupos GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$). A concentração de GSSG e razão GSSG/GSH foram reduzidas nos grupos ALA, GLN+ALA e DIP.

Tabela 14- Concentração de Glutathiona oxidada (GSSG) e Reduzida(GSH) e razão GSSG/GSH no músculo EDL

	SED	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
GSH (mmol/g de tecido fresco)	0,39±0,02	0,32±0,03	0,47±0,05	0,50±0,03 [#]	0,52±0,04 [#]
GSSG (mmol/g de tecido fresco)	0,019±0,001	0,030±0,003 [*]	0,021±0,002 [#]	0,018±0,001 [#]	0,020±0,001 [#]
GSSG/GSH (mmol/g de tecido fresco)	0,052±0,004	0,091±0,01 [*]	0,054±0,008 [#]	0,038±0,003 [#]	0,039±0,004 [#]

Ratos Wistar (N=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina e L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo SED ($p < 0,05$ Teste T *Student*)

#Representa diferença estatística significativa comparado ao grupo CTRL ($p < 0,05$ Tukey HSD)

5.2.6 Conteúdo de proteína muscular

Figura 7- Conteúdo de proteína no músculo Tibial

Ratos Wistar (n=10) submetidos a treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

* Representa diferença estatística significativa se comparado SED ($p < 0,05$ Teste T *Student*)

No musculo Tibial foi evidenciado um aumento do conteúdo proteico no grupo controle treinado quando comparado ao sedentário ($p < 0,05$). A suplementação com

aminoácidos não aumentou significativamente o conteúdo proteico nos grupos ALA, GLN+ALA e DIP (figura 7).

Figura 8 - Conteúdo de proteína no músculo EDL

Ratos Wistar (n=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

Não houve alterações significativas no conteúdo proteico do músculo EDL. Entretanto, o grupo CTRL apresentou um conteúdo proteico 80% maior quando comparado ao grupo SED. Entre os grupos treinados no grupo DIP houve um aumento de 25% no conteúdo proteico quando comparado ao CTRL.

5.3.7 Expressão de glutamina sintetase

Figura 9- Expressão de glutamina sintetase no músculo tibial

Ratos Wistar (N=10) submetidos à treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média. Legenda : GS- glutamina sintetase

Em relação à expressão da glutamina sintetase no músculo Tibial não houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos. Porém, o grupo CTRL apresentou expressão 33 % menor quando comparado ao SED (figura 9).

5.3.8 Expressão de HSP-27

Figura 10- Expressão proteica de HSP 27 no músculo tibial

Ratos Wistar (n=10) submetidos a treinamento resistido, exceto grupo SED. Animais suplementados via oral, durante 21 dias com solução a 4%, contendo dipeptídeo ou L- glutamina L-alanina ambas na forma livre ou L- alanina. SED e CTRL receberam água filtrada. Resultados expressos em média e erro padrão da média.

De acordo com figura 10, a expressão de HSP 27 no músculo Tibial não aumentou no grupo CTRL ($p < 0,05$). Entre os grupos treinados houve aumento na expressão proteica de HSP 27 nos grupos GLN+ALA e DIP ($p < 0,05$).

5. 4 Resumo dos resultados encontrados

5.4.1 Sangue (plasma e papa de hemácias)

	Em relação ao exercício *	Em relação ao efeito suplementação **		
PARÂMETRO	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina	=	=	↑	↑
Glutamato	=	=	=	=
Creatina quinase	↑	=	↓	↓
Mioglobina	↑	=	=	=
ALT	=	=	=	=
AST	=	=	=	=
AST/ALT	=	↓	↓	↓
Ureia	=	=	=	=
Creatinina	=	=	=	=
GSH em hemácia	↓	=	↑	↑
GSSG em hemácias	=	=	=	=
GSSG/GSH Hemácias	↑	↓	↓	↓

Figura 11- Quadro com o resumo dos resultados encontrados no sangue

*Diferença estatística comparado com o grupo SED

** Diferença estatística comparado com o grupo CTRL

Legenda:

= - Sem diferença estaticamente significativa

↑ - aumento estatisticamente significativa

↓ -diminuição estatisticamente significativa

5.4.2 Fígado

	<i>Em relação ao exercício *</i>	<i>Em relação ao efeito suplementação **</i>		
PARÂMETRO	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina	=	=	=	=
Glutamato	=	=	=	=
GLN/GLU	=	=	=	↑
GSH	↓	=	↑	↑
GSSG	=	=	=	=
GSSG/GSH	=	=	=	↓
TBARS	↑	=	↓	↓

Figura 12- Quadro com resultados encontrados no fígado

* Diferença estatística comparado com o grupo SED

** Diferença estatística comparado com o grupo CTRL

Legenda :

= -Sem diferença estaticamente significativa

↑ - aumento estatisticamente significativa

↓ -diminuição estatisticamente significativa

5.4.3 Músculo Tibial

	<i>Em relação ao exercício *</i>	<i>Em relação ao efeito suplementação **</i>		
PARÂMETRO	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina	↓	=	↑	↑
Glutamato	=	=	=	=
GLN/GLU	=	=	=	=
GSH	=	=	↑	=
GSSG	=	=	=	=
GSSG/GSH	↑	=	↓	↓
TBARS	↑	↓	↓	↓
Peso do tecido fresco	=	=	=	=
Conteúdo de proteína	↑	=	=	=
Expressão de glutamina Sintetase	=	=	=	=
Expressão de HSP 27	=	=	↑	↑

Figura 13- Resumo dos resultados encontrados no músculo Tibial

* Diferença estatística comparado com o grupo SED

** Diferença estatística comparado com o grupo CTRL

Legenda :

= -Sem diferença estaticamente significativa

↑ - aumento estatisticamente significativa

↓ -diminuição estatisticamente significativa

5.4.4 Músculo EDL

	<i>Em relação ao exercício *</i>	<i>Em relação ao efeito suplementação **</i>		
PARÂMETRO	CTRL	ALA	GLN+ALA	DIP
Glutamina	↓	=	↑	↑
Glutamato	=	=	=	=
GLN/GLU	=	=	=	=
GSH	=	=	↑	↑
GSSG	↑	↓	↓	↓
GSSG/GSH	↑	↓	↓	↓
TBARS	↑	↓	↓	↓
Peso do tecido fresco	=	=	=	=
Conteúdo de proteína	=	=	=	=

Figura 14- Quadro com os resultados encontrados no músculo EDL

* Diferença estatística comparado com o grupo SED

** Diferença estatística comparado com o grupo CTRL

Legenda :

= -Sem diferença estaticamente significativa

↑ - Aumento estatisticamente significativa

↓ -Diminuição estatisticamente significativa

6.DISSCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que a suplementação com L-glutamina e L-alanina livres ou como dipeptídeo são eficazes em restaurar a glutamina corporal, beneficiando o sistema antioxidante mediado pela GSH e HSP27 em ratos submetidos ao exercício resistido. Ainda são escassos na literatura estudos evidenciam concentração de glutamina corporal após o exercício resistido, além disso, os poucos estudos existentes são com protocolos de exercício agudo (BLOMSTRAND *et al.* 2009; RAHMANI-NIA *et al.* 2014) . Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o modelo experimental no qual simula o exercício resistido reduz glutamina muscular.

O músculo esquelético é quantitativamente o principal local de síntese, estoque e liberação de glutamina e de fundamental importância para a manutenção da glutaminemia (ROGERO *et al.*, 2006). Deste modo, o estresse causado pelo exercício pode ter aumentado a espoliação de glutamina para o plasma a fim de manter a glutaminemia (WILLIAMS; CHINKES; WOLFE, 1998; ROGERO *et al.*, 2006).

Estudos em animais submetidos a exercício de natação intenso ou a exercício de esteira evidenciaram que a suplementação com L- glutamina livre ou em solução com L-alanina e na forma de dipeptídeo são eficientes em restaurar a glutamina corporal (ROGERO *et al.*, 2006, CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009, PETRY *et al.*, 2014a/b) A partir destes estudos levou-se ao questionamento se a presença de L-alanina em ambas soluções nutricionais melhoraria a disponibilidade de L-glutamina ao organismo. Assim, neste trabalho foi acrescentado o grupo experimental com L-alanina livre.

Os animais submetidos ao exercício resistido e suplementados com glutamina na forma livre ou como dipeptídeo apresentaram aumento da glutamina plasmática, muscular e hepática, corroborando com os resultados encontrados em outros estudos que utilizaram outros modelos experimentais que reduzem a glutamina corporal (CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009, CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010; CRUZAT , *et al.*, 2014b/c; PETRY *et al.*, 2014a/b). Além disso, a suplementação com L-alanina aumentou a concentração de glutamina em 30,5% no plasma, 25% no fígado, 111% e 108% nos músculo Tibial e EDL, respectivamente. Durante o exercício o grupo amino advindo da oxidação de L-alanina, pode ser doado ao glutamato para a formação de glutamina (BATTEZZATI *et al.*, 1999). Entretanto, a expressão proteica da enzima glutamina

sintetase, responsável pela conversão de glutamato a glutamina, não apresentou aumento significativo no grupo suplementado com L-alanina. Provavelmente a presença do aminoácido L-alanina tanto no dipeptídeo quanto na solução com glutamina pode atuar de forma sinérgica juntamente com L-glutamina. Uma vez que a L-alanina é considerada um aminoácido gliconeogênico e, durante exercícios extremos, cerca de 10% deste aminoácido é oxidado para formação de energia, a L-alanina pode atuar tanto na doação de grupo amino para a incorporação ao glutamato e síntese de glutamina, como o aumento da disponibilidade de outros aminoácidos como a L-glutamina, visto que a oxidação de L-alanina é preferencial (KLEIN; NYHAN; KERN, 2009)

A suplementação com aminoácidos na água de beber tem sido bastante utilizada (PRADA *et al.*, 2007; JOBGEN *et al.*, 2009). Prada *et al.* (2007) avaliaram o efeito da suplementação de glutamina sobre a resistência a insulina em ratos obesos, onde a suplementação foi administrada em solução a 4% de L-glutamina ou L-alanina, e obteve aumento de 53% na concentração plasmática de glutamina nos animais suplementados com L-glutamina, porém não obteve aumento na concentração de glutamina plasmática nos animais suplementados com L-alanina. Entretanto, neste trabalho, os animais suplementados com L-alanina apresentaram aumento na concentração de glutamina plasmática de 30,5%.

Estudo com ratos obesos suplementados com L-arginina ou L-alanina na água de beber também demonstraram que a suplementação com L-alanina aumenta a concentração plasmática de glutamina nos animais que receberam dieta 'high-fat' (JOBGEN *et al.*, 2009). Cabe salientar que Jobgen *et al.* (2009) realizaram um estudo prévio sobre a suplementação de L-alanina em ratos magros, no qual observaram que a suplementação de 2,55% em água de beber durante 12 semanas não afetou o peso corporal, gordura corporal e peso do músculo em comparação com os ratos que não receberam suplementação. No presente trabalho as suplementações não afetaram o ganho de peso corporal e o consumo de ração nos animais treinados

A alta ingestão proteica, bem como o exercício físico intenso podem alterar as concentrações plasmáticas das transaminases, enzimas responsáveis por catalisar as reações de um grupo amino de um aminoácido para um alfacetoácido. Estas são encontradas principalmente no fígado e em menor concentração no músculo esquelético, miocárdio, rins, pâncreas, intestino e sangue (MATHUR *et al.*, 2014).

O aumento das transaminases no plasma indica lesão hepática, contudo quando correlacionado com aumento CK também pode indicar dano muscular (MATHUR *et al.*, 2014). O grupo CTRL apresentou aumento de 20% na concentração de AST, 5% no ALT, 17,5% na relação AST/ALT e 61% no GGT, quando comparado ao SED, demonstrando que houve dano muscular ou hepático. Entretanto, os grupos suplementados apresentaram concentrações menores das transaminases, em relação ao CTRL, o que indica que a elevada ingestão aminoácidos durante a suplementação não inferiu em sobrecarga hepática, nestes grupos.

A ureia, produto final do catabolismo das purinas, metabolizada no fígado e excretada pelo rim, não se alterou significativamente tanto no grupo CTRL quanto nos grupos suplementados. O mesmo ocorreu com a creatinina um indicador de lesão renal. Desta forma, tanto a suplementação quanto o exercício não alteraram a função hepática e renal (RESENDE *et al.*, 2011).

Durante o exercício resistido a alta demanda energética e diminuição do fluxo sanguíneo durante contração muscular, aumentam o metabolismo anaeróbio, e como resultado há maior síntese de lactato pelo músculo, e consequentemente maior concentração de lactato sanguíneo (WIRTZ *et al.*, 2014) O grupo CTRL na carga de 100%, de maior intensidade, apresentou uma lactacidemia elevada, fato que indica que o metabolismo predominantemente é anaeróbio.

Cabe ressaltar, que um dos fatores para o aumento da peroxidação lipídica no grupo CTRL é que, os íons H^+ formados durante a produção do lactato aceleram a taxa de conversão de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , os quais podem reagir com Fe^{2+} gerando $OH^{\cdot}$. A acidose causada pelo aumento do lactato leva a conversão de $O_2^{\cdot-}$ para hidroperóxido (HO_2), considerado o radical mais reativo principalmente com lipídio, (MORALES-ALAMO; CALBET, 2013). O mesmo não ocorreu nos grupos suplementados com glutamina livre ou como dipeptídeo, visto que, os mesmos apresentaram menores concentrações no lactato sanguíneo. A glutamina atua no controle ácido-básico, por fornecer seu grupamento amônia para a excreção dos íons H^+ pela urina (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996).

Durante o exercício ocorre uma elevada síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no músculo e em outros tecidos. ERON tem um papel fundamental nas adaptações do músculo esquelético (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2010; MASON; WADLEY,

2014). Entretanto, o excesso ROS pode reagir com lipídios de membrana, modificando o estado redox celular e alterando funções celulares (MASON; WADLEY, 2014).

O estado redox celular é dado principalmente pela razão [GSSG/GSH]. O fígado é o principal órgão sintetizador de novo GSH. Em exercícios intensos e/ou prolongados o declínio na concentração de GSH, ocorre por inúmeros fatores, como o aumento do efluxo de GSH para o plasma estimulado pelo aumento de glucagon e catecolaminas, pela glutathione peroxidase, que utiliza GSH com substrato para neutralizar hidroperóxidos e transformando GSH em GSSG, a qual depende da disponibilidade de ATP e cisteína (LEEUEWENBURGH; JI, 1998, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002).

Cerca de 10% do total de GSH é sintetizada nas hemácias, constituindo o grupo thiol mais abundante nestas células, o que faz a mesma exercer um papel fundamental na manutenção do estado redox das mesmas. Uma vez que as hemácias circulam em todos os tecidos corporais, estas podem ser utilizadas para avaliar o estado redox geral do organismo (SILVEIRA *et al.*, 2007). Os animais CTRL apresentaram redução significativa na concentração de GSH e aumento na razão [GSSG/GSH] nas hemácias, consequentemente um estado redox geral do organismo prejudicado.

O aumento da disponibilidade de glutamina ao organismo através da suplementação dos grupos DIP e GLN+ALA melhorou a disponibilidade de GSH e consequentemente diminuiu a [GSSG/GSH] no músculo esquelético, fígado e hemácias. A síntese de *novo* GSH depende da disponibilidade de glutamato no organismo, sendo a glutamina um precursor deste aminoácido (RUTTEN *et al.*, 2005). Além disso, a glutamina tem um papel importante na biossíntese de NADPH, um cofator essencial para reciclagem de GSSG para GSH, reação que é catalisada por meio da glutathione reductase (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014).

Em situações catabólicas, a fim de manter o estado redox celular, a glutamina mitocondrial pode ser desviada para o citosol, a fim de fornecer substrato para síntese de GSH, dependentes da enzima responsável por converter glutamina a glutamato a glutaminase (GLS), demonstrando a importância deste aminoácido para a manutenção do estado redox (CRUZAT *et al.*, 2014b).

A suplementação com L-alanina aumentou a concentração de glutamina e GSH no fígado (26%), músculo EDL (12,5%) Isso sugere um possível papel da L-alanina em doar glutamato para a síntese de GSH (NEWSHOLME *et al.*, 2014). A suplementação com L-

alanina aumentou a concentração de glutamina e de GSH no músculo EDL, no músculo Tibial e fígado o aumento foi de 12,5 e 26% respectivamente.

Além de atuar na síntese de GSH, a glutamina também aumenta a disponibilidade de HSPs (KIM; WISCHMEYER, 2013). A HSP 27 tem um papel importante em manutenção de proteínas miofibrilares do citoesqueleto, incluindo titina, actinina, actina, e miosina, protegendo-as contra desnaturação em situação de elevado estresse oxidativo (LARKINS; MURPHY; LAMB, 2012).

Durante o exercício excêntrico de alta intensidade a HSP 27 se transloca do núcleo e se acumula em áreas onde há lesão miofibrilar nas estruturas do sarcolema, preferencialmente nos discos Z (PAULSEN *et al.*, 2009). Entretanto, neste estudo, a expressão de HSP 27 nos animais CTRL não aumentou significativamente. O fato pode ser explicado, a adaptação do exercício crônico as HSPs podem se autorregular, e não mais se elevar significativamente. Outro fato é que atletas com síndrome de fadiga crônica também podem apresentar níveis atenuados de fator de choque térmico 1 (HSF-1), por consequência menor síntese de HSPs (JAMMES, STEINBERG; DELLIAUX, 2012).

A glutamina é um modulador da expressão de HSP através das vias das glucosaminas (HBP) e do sensor energético Sirtuina- 1 (SIRT-1) (NEWSHOLME *et al.*, 2014) Este processo ocorre induzido pela ativação HBP e da SIRT1/HUR (LAFONTAINE-LACASSE, DORE E PICARD, 2011). O antígeno humano R (HUR) pode promover a estabilidade de numerosos mRNAs alvo, incluindo a codificação de SIRT1, via associação HUR para a região 3' não traduzida do RNAm da SirT1, que promove a sua estabilidade e, portanto, um aumento da expressão SirT1 (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014). Por sua vez, SirT1 aumenta síntese de HSF-1. O HSF1 estimula o elemento de choque térmico (HSES) nos núcleos, resultando em maior expressão de HSPs. (CRUZAT *et al.* 2015). Ao melhorar a disponibilidade de glutamina ao músculo, a expressão da proteína HSP 27 no músculo Tibial foram aumentadas nos grupos GLN+ALA e DIP, garantindo uma melhor resposta ao estresse causado pelo exercício.

Ao mesmo tempo, as HSPs apresentam um papel muito relevante na inflamação, obtendo uma ação anti-inflamatória, uma vez que as HSPs bloqueiam a via de ativação NFkb, o qual promove a transcrição de genes pró-inflamatórios, e este poderiam comprometer a integridade celular (NEWSHOLME; DE BITTENCOURT, 2014; CRUZAT *et al.* 2015).

A suplementação com L-alanina não aumentou significativamente a expressão de HSP 27. Demonstrando que o efeito do aumento da expressão desta proteína nos grupos GLN+ALA e DIP advém da presença da glutamina nestes suplementos.

O efeito da glutamina no estado redox celular e atenuação do estresse oxidativo, consequentemente atenuou a lesão ocasionada pelo exercício intenso. Este efeito protetor foi evidenciado pela redução nas concentrações dos biomarcadores de lesão, como TBARS e CK, no fígado e músculos esqueléticos dos grupos que receberam glutamina (KANDA *et al.*, 2014).

Cabe salientar que as concentrações plasmáticas de enzimas, tais como creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e mioglobina, consideradas marcadores de lesão, são variáveis. A variabilidade é decorrente da intensidade e duração do exercício, da fase de treinamento, do tempo de coleta da amostra e resposta de cada indivíduo ao estímulo provocado pelo exercício (PEAKE *et al.*, 2005). Os grupos suplementados não apresentaram redução significativa concentrações de Mioglobina, ALT e AST quando comparados ao grupo CTRL.

A dor tardia é caracterizada pela dor relacionada com o movimento após o exercício, e por consequência, estas dores musculares podem afetar a amplitude de movimento (KANDA *et al.*, 2014). A lesão causada pelo exercício é associada a dor tardia, visto que o processo inflamatório do músculo lesado afeta a excitabilidade dos neurônios motores alfa e gama, causando dor. Estudo em humanos com suplementação de glutamina livre em atletas submetidos a exercício excêntrico, não apresentaram redução de CK e dor tardia nos grupos suplementados (RAHMANI-NIA *et al.*, 2014). Contradizendo este trabalho, os animais suplementados com glutamina apresentaram redução significativa de CK.

Apesar de a glutamina ser um limitante para via de ativação do complexo mTOR complexo 1 (mTORC1), regulador do crescimento celular e massa tecidual, nos grupos GLN+ALA e DIP, não houve aumento significativo no peso do músculos e na proteína total neste tecido (NICKLIN *et al.*, 2009).

Portanto o exercício resistido praticado de forma intensa reduz a glutamina muscular, e eleva o estresse oxidativo. A suplementação de forma *ad libitum* com L-glutamina e L-alanina livres ou como dipeptídeo melhorou a glutamina corporal e atenuou o estresse oxidativo causado pelo exercício, uma vez que o estado redox foi aumentado,

através do aumento da síntese de GSH e a citoproteção foi aumentada com o aumento da expressão da HSP27. Além disso, a suplementação com L-alanina por si só não restaurou significativamente as concentrações de glutamina corporal, entretanto nota-se uma melhora na mesma, bem como na síntese de GSH. Entretanto, os mecanismos da resposta orgânica da suplementação tanto com L-alanina livre ou com solução com glutamina e alanina ainda precisam ser bem elucidados, principalmente quanto à absorção. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram que a presença de L-alanina nos suplementos dipeptídeo e solução com L- glutamina e L-alanina atua de forma sinérgica à glutamina, melhorando assim a disponibilidade de glutamina.

7. CONCLUSÃO

A suplementação com L- glutamina e L-alanina, nas formas livre ou como dipeptídeo restauram a glutamina no plasma e tecidos, fato que aumenta a síntese de GSH e HSP27, beneficiando o estado redox celular e atenuando lesões causadas pelo exercício resistido intenso. Além disso, a presença de L-alanina nos suplementos L-alanil-L-glutamina e solução com L-glutamina e L-alanina livres pode agir de forma sinérgica para restaurar a glutamina corporal. Contudo, os mecanismos envolvidos ainda precisam ser melhores investigados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, F; BIOLO, G. Effect of physical activity on glutamine metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care*.v.13,p.58-64, 2010.
- AKERFELT, M; VIHERRAARA, A; LAIHO, A; CONTER, A; CHRISTIANS, E.S; SISTONEN, L. Heat shock transcription factor 1 localizes to sex chromatin during meiotic repression. *The Journal of Biological Chemistry*.v.285,p.34469-76, 2010.
- BARROS, CLM; AGOSTINI, G.G; GARCIA, E.S; BALDISSERA, V. Limiar de lactato em exercício resistido. *Motrix*. v.10 p.316, 2004.
- BATTEZZATI, A; HAISCH, M; BRILLON, D.J; MATTHEWS, D.E. Splanchnic utilization of enteral alanine in humans. *Metabolism: Clinical and Experimental*.v.48, p.915-21, 1999.
- BENJAMIN, I.J;CHRISTIANS,E. Exercise, estrogen, and ischemic cardioprotection by heat shock protein 70. *Circulation Research*. v.90,p.833-5, 2002.
- BIER, D.M. Intrinsically difficult problems: the kinetics of body proteins and amino acids in man. *Diabetes Metabolism Review*. v.5, p.111-32, 1989.
- BLOMSTRAND, E; ESSEN-GUSTAVSSON ,B. Changes in amino acid concentration in plasma and type I and type II fibres during resistance exercise and recovery in human subjects. *Amino Acids*.v.37, p.629-36, 2009.
- BLOOMER, R.J; GOLDFARB, A.H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquee*. v.29,p.245-63, 2004.
- BLOOMER, R.J; GOLDFARB, A.H; WIDEMAN, L; MCKENZIE, M.J; CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*.v.19, p.276-85, 2005.
- BODAMER, OA; HALLIDAY, D; LEONARD, JV. The effects of l-alanine supplementation in late-onset glycogen storage disease type II. *Neurology*. V.55,p.710-2, 2000.
- BORGES, MC; ROGERO, MM; TIRAPGUI ,J. Suplementação enteral e parenteral com glutamina em neonatos pré-termo e com baixo peso ao nascer. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.44, p.13-23, 2008.
- BOWTELL, J.L; SUMNERS, D.P; DYER, A; FOX, P; MILEVA, K.N. Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. *Medicine Science Sports Exercise*. v.43,p.1544-51, 2011.

BRENNAN, L; SHINE, A; HEWAGE, C; MALTHOUSE, J.P; BRINDLE, K.M; MCCLENAGHAN, N. A nuclear magnetic resonance-based demonstration of substantial oxidative L-alanine metabolism and L-alanine-enhanced glucose metabolism in a clonal pancreatic beta-cell line: metabolism of L-alanine is important to the regulation of insulin secretion. *Diabetes*. v.51, p.1714-21, 2002.

BRENTANO, M.A; MARTINS KRUEL, L.F. A review on strength exercise-induced muscle damage: applications, adaptation mechanisms and limitations. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. v.51, p.1-10, 2011.

BROER, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiology Review*. V.88, p.249-86, 2008.

BUNPO, P; MURRAY, B; CUNDIFF, J; BRIZIUS, E; ALDRICH, C.J; ANTHONY, T.G. Alanyl-glutamine consumption modifies the suppressive effect of L-asparaginase on lymphocyte populations in mice. *The Journal of Nutrition*. v.138, p.338-43, 2008.

CARVALHO-PEIXOTO, J; ALVES, RC; CAMERON, L.C. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*.v.32,p.1186-90, 2007.

CASTELL, L.M; NEWSHOLME, E.A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. *Nutrition*. v.13,p.738-42, 1997.

CHEN, Y; DONG, L; WENG, D; LIU, F; SONG, L; LI, C. 1,3-beta-glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. *Molecular Medicine Reports*. v.8, p.708-12, 2013.

CHIASSEON, J.L; LILJENQUIST, J.E; SINCLAIR-SMITH, B.C; LACY, W.W. Gluconeogenesis from alanine in normal postabsorptive man. Intrahepatic stimulatory effect of glucagon. *Diabetes*.v.24,p.574-84, 1975.

CRUZAT ,VF; KEANE, KN; SCHEINPFLUG, AL; CORDEIRO, R; SOARES, M; NEWSHOLME, P. Alanyl-Glutamine improves pancreatic beta-cell function following ex vivo inflammatory challenge. *The Journal of Endocrinology*. v.224, p.261-271, 2015.

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

CRUZAT ,VF; BITTENCOURT, A; SCOMAZZON, SP; LEITE ,JS; DE BITTENCOURT PI; JR., TIRAPEGUI J. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. *Nutrition*.v.30, p.602-11, 2014a.

CRUZAT, V.F; PANTALEAO, L.C; DONATO, J. JR.; DE BITTENCOURT, P.I. JR.; TIRAPEGUI, J. Oral supplementations with free and dipeptide forms of L-glutamine in endotoxemic mice: effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. v.25, p.345-52,2014b.

CRUZAT, VF. Efeito da suplementação com L- glutamina livre e na forma de dipeptídeo sobre o eixo glutamina-glutathione, sistema imune, sistema inflamatório e vias de sinalização proteica em camundongos submetidos à endotoxemia: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2013.

CRUZAT, V.F; ALVARENGA, M.L; TIRAPEGUI, J. Metabolismo e suplementação com glutamina no esporte. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*. v.4, p.242-53, 2010.

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 Biochemistry and Function*.v.28, p.24-30, 2010.

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,p;428-35, 2009.

CRUZAT,V.F. Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-alanina sobre parâmetros de lesão muscular e de inflamação em ratos treinados e submetidos a exercício intenso de natação. Universidade de São Paulo, 2008.

DOHM, G.L; TAPSCOTT, E.B; KASPEREK, G.J. Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Medicine Science Sports Exercise*. v.19, p.S166-71,1987.

DONG, J; CHEN, P; LIU, Q; WANG, R; XIAO, W; ZHANG, Y. Reverse effects of DPI administration combined with glutamine supplementation on function of rat neutrophils induced by overtraining. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. v.23, p.137-49, 2013.

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

D'SOUZA, R; POWELL-TUCK ,J. Glutamine supplements in the critically ill. *Journal of the Royal Society of Medicine*. v.97,p.425-7, 2004.

ERIKSSON, LS; BROBERG, S; BJORKMAN, O; WAHREN J. Ammonia metabolism during exercise in man. *Clinical Physiology*. v.5, p.325-36, 1985.

FELIG, P; WAHREN J. Amino acid metabolism in exercising man. *Journal Clinical Investigation*. v.50, p.2703-14, 1971.

FINAUD, J; LAC, G; FILAIRE E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Medicine*. v.36, p.327-58, 2006.

FINSTERER, J. Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musculoskeletal Disorders*.v.13, p.218, 2012.

FITTIPALDI,S; DIMAURO, I; MERCATELLI, N; CAPOROSSI, D. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of Heat Shock Protein response. *Free radical research*. v.48, p.52-70, 2014.

FOLKESSON, M; MACKEY, A.L; LANGBERG, H; OSKARSSON, E; PIEHL-AULIN, K; HENRIKSSON,J; KADI, F. The expression of heat shock protein in human skeletal muscle: effects of muscle fibre phenotype and training background. *Acta Physiologica*. v.209, p.26-33, 2013.

GARCIA-RUIZ, C; MORALES, A; BALLESTA, A; RODES, J KAPLOWITZ, N; FERNANDEZ-CHECA, J.C. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Journal Clinical Investigation*. v.94, p.193-201, 1994.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. *Journal Applied Physiology*. v.103, p.693-9, 2007.

GOLDFARB, A.H; GARTEN, R.S; CHEE, P.D; CHO, C; REEVES, G.V, HOLLANDER, D.B. Resistance exercise effects on blood glutathione status and plasma protein carbonyls: influence of partial vascular occlusion. *European Journal of Applied Physiology*. v.104, p.813-9, 2008.

GOLDFARB, A.H; MCKENZIE, M.J; BLOOMER, R.J. Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: influence of antioxidant supplementation. *Applied Physiology Nutrition Metabolism*.v.32, p.1124-31, 2007.

GOLDSTEIN,L; NEWSHOLME, E.A. The formation of alanine from amino acids in diaphragm muscle of the rat. *Biochemical Journal*.v.154, p.555-8, 1976.

GOMES, E.C; SILVA, N.A; DE OLIVEIRA, M.R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, artigo ID 756132, 2012.

GOMEZ-CABRERA, M.C; BORRAS, C; PALLARDO, F.V; SASTRE, J; JI, L.L; VINA, J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *Journal Physiology*. v.567, p.:113-20, 2005.

GOMEZ-CABRERA, M.C; CLOSE, G.L; KAYANI, A; MCARDLE, A; VINA, J; JACKSON, M.J. Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle

force generation.. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. v. 298, p.R2-8, 2010.

GRIFFITH, O.W; MEISTER, A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.82, p.4668-72, 1985.

HOFFMAN, J.R; RATAMESS, N.A; KANG, J; RASHTI, S.L; KELLY, N; GONZALEZ, A.M. Examination of the efficacy of acute L-alanyl-L-glutamine ingestion during hydration stress in endurance exercise. Journal of the International Society of Sports Nutrition.v7, p.8, 2010.

HOFFMAN, JR; WILLIAMS, DR; EMERSON, NS; HOFFMAN, MW; WELLS, AJ; MCVEIGH, DM. L-alanyl-L-glutamine ingestion maintains performance during a competitive basketball game. Journal of the International Society of Sports Nutrition. v.9, p.4, 2012.

HOFFMAN-GOETZ, L; SPAGNUOLO, P.A. Effect of repeated exercise stress on caspase 3, Bcl-2, HSP 70 and CuZn-SOD protein expression in mouse intestinal lymphocytes. Journal of Neuroimmunology. v.187, p.94-101, 2007.

HORNBERGER ,T.A JR.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquee.v.29,p.16-31, 2004.

HWANG, C; SINSKEY, A.J; LODISH, H.F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science. v.257, p.1496-502, 1992.

JACKSON, M.J. Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? Free Radical Biology & Medicine. v.44, p.132-41, 2008.

JAMMES, Y; STEINBERG, J.G; DELLIAUX, S. Chronic fatigue syndrome: acute infection and history of physical activity affect resting levels and response to exercise of plasma oxidant/antioxidant status and heat shock proteins. Journal of Internal Medicine. v.272, p.74-84, 2012.

JI L.L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. Free Radical Biology & Medicine. v.18, p.1079-86,1995.

JOBGEN, W; MEININGER, C.J; JOBGEN, S.C; LI, P; LEE, MJ; SMITH, S.B. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. The Journal of Nutrition. v.139, p.230-7, 2009.

KANDA, K; SUGAMA, K; SAKUMA, J; KAWAKAMI, Y; SUZUKI, K. Evaluation of serum leaking enzymes and investigation into new biomarkers for exercise-induced muscle damage. *Exercise Immunology Review*. v.20, p39-54, 2014.

KIELY, A; MCCLENAGHAN, N.H; FLATT, P.R; NEWSHOLME, P. Pro-inflammatory cytokines increase glucose, alanine and triacylglycerol utilization but inhibit insulin secretion in a clonal pancreatic beta-cell line. *The Journal of Endocrinology*. v.195, p.113-23, 2007.

KIM, M; WISCHMEYER, PE. Glutamine. *World review of nutrition and dietetics*. v.105, p.90-6, 2013.

KLASSEN, P; MAZARIEGOS, M; SOLOMONS, N.W; FURST P. The pharmacokinetic responses of humans to 20 g of alanyl-glutamine dipeptide differ with the dosing protocol but not with gastric acidity or in patients with acute Dengue fever. *The Journal of Nutrition*.v.130, p.177-82, 2000.

KLEIN J; NYHAN WL; KERN M. The effects of alanine ingestion on metabolic responses to exercise in cyclists. *Amino Acids*.v.37, p.673-80, 2009.

KORACH-ANDRE, M; BURELLE, Y; PERONNET, F; MASSICOTTE, D; LAVOIE, C; HILLAIRES-MARCEL, C. Differential metabolic fate of the carbon skeleton and amino-N of [13C]alanine and [15N]alanine ingested during prolonged exercise. *Journal Applied Physiology*. v.93, p.499-504, 2002.

KRZYWKOWSKI, K; PETERSEN, E.W; OSTROWSKI, K; KRISTENSEN,J.H; BOZA,J; PEDERSEN,B.K. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. v.281, p.C1259-65, 2001a.

KRZYWKOWSKI, K; PETERSEN, E.W; OSTROWSKI, K; LINK-AMSTER, H; BOZA, J; HALKJAER-KRISTENSEN, J. Effect of glutamine and protein supplementation on exercise-induced decreases in salivary IgA. *Journal of Applied Physiology*. v.91, p.832-8, 2001b.

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

LAEMMLI, UK; BEGUIN, F; GUJER-KELLENBERGER,G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of Molecular Biology*. v.47, p.69-85, 1970.

LAFONTAINE-LACASSE, M; DORE, G; PICARD, F. Hexosamines stimulate apoptosis by altering SIRT1 action and levels in rodent pancreatic beta-cells. *The Journal of Endocrinology*. v.208, p.41-9, 2011.

- LAGRANHA, C.J; DE LIMA, T.M; SENNA, S.M; DOI, S.Q; CURI, R; PITHON-CURI, T.C. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochemistry and Function*.v.23, p.101-7, 2005.
- LAMB,G.D; WESTERBLAD, H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *Journal Physiology*.v.589, p.2119-27, 2011.
- LARKINS, N.T; MURPHY, R.M; LAMB, G.D. Absolute amounts and diffusibility of HSP72, HSP25, and alphaB-crystallin in fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers of rat. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. v.302, p.C228-39, 2012.
- LEEUWENBURGH, C; JI, L.L. Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. *The Journal of Nutrition*. v.128, p.2420-6, 1998.
- LIU, Y; LORMES, W; BAUR, C; OPITZ-GRESS, A; ALTENBURG, D; LEHMANN, M. Human skeletal muscle HSP70 response to physical training depends on exercise intensity. *International Journal of Sports Medicine*. v.21, p.351-5, 2000.
- LIU, Y; MAYR ,S; OPITZ-GRESS, A; ZELLER,C; LORMES, W; BAUR ,S. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. *Journal of Applied Physiology*. v.86,p.101-4, 1999.
- LUND,P. Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. . *Methods of Enzymatic Analysis*.p.357-63, 1985.
- MARIN, D.P; BOLIN, A.P; CAMPOIO, T.R; GUERRA, B.A; OTTON,R. Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: Implications for sport training monitoring. *International Immunopharmacology*.v.17, p.462-70, 2013.
- MASON, S; WADLEY, G.D. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. v.19, p.97-106, 2014.
- MATHUR, T; MANADAN, A.M; THIAGARAJAN, S; HOTA, B; BLOCK, J.A. The utility of serum aldolase in normal creatine kinase dermatomyositis. *Journal of clinical rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*. v.20, p.47-8, 2014.
- MEIJER, AJ. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *The Journal of Nutrition*.v.133, p.2057S-62S, 2003.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry*. v.263, p.17205-8, 1988.

- MILNE, K.J; NOBLE, E.G. Response of the myocardium to exercise: sex-specific regulation of hsp70. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. v.40, p.655-63, 2008.
- MORALES-ALAMO, D; CALBET, J.A. Free radicals and sprint exercise in humans. *Free Radical Research*. v.48, p.30-42, 2014.
- MOUNIER, N; ARRIGO, A.P. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress & Chaperones*.v.7, p.167-76, 2002.
- MURPHY, R.M; DUTKA, T.L; LAMB, G.D. Hydroxyl radical and glutathione interactions alter calcium sensitivity and maximum force of the contractile apparatus in rat skeletal muscle fibres. *Journal Physiology*.v.586, p.2203-16,2008.
- NEWSHOLME, P; CRUZAT, V; ARFUSO, F; KEANE K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. *The Journal of Endocrinology*.v. 221, p.R105-20, 2014a.
- NEWSHOLME, P; DE BITTENCOURT,P.I, JR. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. v.17, p.295-305, 2014b.
- NEWSHOLME, P; LIMA, M.M; PROCOPIO, J; PITHON-CURI, T.C; DOI ,S.Q; BAZOTTE, R.B. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v.36, p.153-63, 2003.
- NEWSHOLME, P; PROCOPIO, J; LIMA, M.M; PITHON-CURI, T.C; CURI R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function* v.21, p.1-9, 2003.
- NOBLE, E.G; SHEN, G.X. Impact of exercise and metabolic disorders on heat shock proteins and vascular inflammation. *Autoimmune Diseases*. v.83, p.65-19, 2012.
- PARRY-BILLINGS, M; LEIGHTON, B; DIMITRIADIS, G; DE VASCONCELOS, PR; NEWSHOLME, EA. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. *Internacional Journal Biochemical*.v.21, p.419-23, 1989.
- PAULSEN, G; LAURITZEN, F; BAYER, M.L; KALHOVDE, J.M; UGELSTAD, I; OWE, S.G. Subcellular movement and expression of HSP27, alphaB-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*. v.107, p.570-82, 2009.
- PAULSEN, G; VISSING, K; KALHOVDE, J.M; UGELSTAD, I; BAYER, M.L; KADI F. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology* v.293, p.R844-53, 2007.

- PEAKE, J.M; SUZUKI, K; HORDERN, M; WILSON, G; NOSAKA, K; COOMBES, J.S. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *European Journal of Applied Physiology*. v.95, p.514-21, 2009.
- PEDERSEN, B.K; ROHDE, T; ZACHO M. Immunity in athletes. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. v.36, p.236-45, 1996.
- PEDERSEN, B.K; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *British Journal of Sports Medicine*. v.34, p.246-51, 2000.
- PETRY, E.R; CRUZAT, V.F; HECK, T.G; LEITE, J.S; HOMEM DE BITTENCOURT, P.I, JR.; TIRAPEGUI, J. Alanyl-glutamine and glutamine plus alanine supplements improve skeletal redox status in trained rats: involvement of heat shock protein pathways. *Life Sciences*.v.94, p.130-6, 2014a.
- PETRY, E.R; CRUZAT, V.F; HECK, T.G; HOMEM DE BITTENCOURT, P.I JR.; TIRAPEGUI, J. L-Glutamine supplementations enhance liver glutamine-glutathione axis and heat shock factor-1 expression in endurance-exercise trained rats. *International Journal of sport nutrition and exercise metabolism*. (no prelo, 2014b).
- POWERS, S.K; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiology Review*. v.88, p.1243-76, 2008.
- PRADA, P.O; HIRABARA, S.M; DE SOUZA, C.T; SCHENKA, A.A; ZECCHIN, H.G; VASSALLO, 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.1949-59, 2007.
- RAHIMI R. Creatine supplementation decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*. v.25, p.3448-55, 2011.
- RAHMANI-NIA, F; FARZANEH, E; DAMIRCHI, A; MAJLAN, AS; TADIBI, V. Surface Electromyography Assessments of the Vastus medialis and Rectus femoris Muscles and Creatine Kinase after Eccentric Contraction Following Glutamine Supplementation. *Asian Journal of Sports Medicine*.v.5, p.54-62, 2014.
- RAHMANI-NIA, F; FARZANEH, E; DAMIRCHI, A; SHAMSI- MAJLAN, A. Effect of L- glutamine supplementation on electromyographic activity of the quadriceps muscle injured by eccentric exercise. *Iran Journal Basic Medicine Science*.v.16, p.808-12, 2013.
- RENNIE, M.J; EDWARDS, R.H; KRYWAWYCH, S; DAVIES, C.T; HALLIDAY, D; WATERLOW, JC. Effect of exercise on protein turnover in man. *Clinical Science* v.61, p.627-39, 1981.

RESENDE, N.M; DE MAGALHAES NETO, A.M; BACHINI, F; DE CASTRO, L.E, BASSINI, A; CAMERON, L.C. Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. *Omics: A Journal of Integrative Biology*.v.15, p.695-704, 2011.

ROBSON, P,J; BLANNIN, A.K; WALSH, N.P; CASTELL, L.M; GLEESON M. Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *Internacional Journal Sports Medicine* v.20, p.128-35, 1999.

ROGERO, M.M; TIRAPEGUI J.O. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação de glutamina em atletas: controvérsias e aspectos atuais. *Revista do Metabolismo e Nutrição* v.7 p.106-17, 2003.

ROGERO, M.M; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 36, p.202-12, 2000.

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

ROHDE, T; MACLEAN, D.A; HARTKOPP, A; PEDERSEN, B.K. The immune system and serum glutamine during a triathlon. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. v.74, p.428-34, 1996.

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

RUTTEN, E.P; ENGELEN, M.P; CASTRO, C.L; WOUTERS, E.F; SCHOLS, A.M; DEUTZ, N.E. Decreased whole-body and splanchnic glutamate metabolism in healthy elderly men and patients with chronic obstructive pulmonary disease in the postabsorptive state and in response to feeding. *The Journal of Nutrition*. v.135, p.2166-70, 2005.

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

SALINTHONE, S; TYAGI, M; GERTHOFFER, W.T. Small heat shock proteins in smooth muscle. *Pharmacology & Therapeutics*.v.119, p.44-54, 2008.

SALVUCCI, M; NEUFELD, Z; NEWSHOLME, P. Mathematical model of metabolism and electrophysiology of amino acid and glucose stimulated insulin secretion: in vitro validation using a beta-cell line. *Plos One*.v.8, p.e52611, 2013.

SASAKI, E; UMEDA, T; TAKAHASHI, I; ARATA, K; YAMAMOTO, Y; TANABE M. Effect of glutamine supplementation on neutrophil function in male judoists. *Luminescence : The Journal of Biological and Chemical Luminescence*. v.28 p.442-9, 2013.

SCHEFFER, D.L; SILVA, L.A; TROMM, C.B; DA ROSA, G.L; SILVEIRA, P.C; DE SOUZA, CT. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Applied Physiology Nutrition Metabolism*. v.37, p.1239-46, 2012.

SCHOENFELD, B.J. Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. *Sports Medicine*. v.43, p.179-94, 2013.

SCHUMANN, G; BONORA, R; CERIOTTI, F; CLERC-RENAUD, P; FERRERO, C.A; FERARD, G. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. v.40, p.635-42, 2002.

SIES, H; AKERBOOM, T.P. Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods in Enzymology*. v.105, p.445-51, 1984.

SIGRIST-NELSON, K; MURER, H; HOPFER, U. Active alanine transport in isolated brush border membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. v.250, p.5674-80, 1975.

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

SIMPSON, R.J; WILSON, M.R; BLACK, J.R; ROSS, J.A; WHYTE, G.P; GUY, K. Immune alterations, lipid peroxidation, and muscle damage following a hill race. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquee* v.30, p.196-211, 2005.

SOUSA, T; LONGUI, C.A, ROCHA, M.N; FARIA, C.D; MELO, M.R; FARIA, T.G. Prolonged physical training decreases mRNA levels of glucocorticoid receptor and inflammatory genes. *Hormone Research in Paediatrics*. v.74, p.6-14, 2010.

STUMVOLL, M; PERRIELLO, G; MEYER, C; GERICH, J. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International*. V;55, p.778-92, 1999.

TUPLING, A.R; BOMBARDIER, E; STEWART, R.D; VIGNA, C; AQUÍ, A.E. Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise. *Journal of Applied Physiology*. v.103, p.2105-11, 2007.

UENO, P.M; ORIA, R.B; MAIER, E.A; GUEDES, M; DE AZEVEDO, O.G; WU D. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. v.301, p.G612-22, 2011.

- VALENCIA, E; MARIN, A; HARDY, G. Impact of oral L-glutamine on glutathione, glutamine, and glutamate blood levels in volunteers. *Nutrition*. v.18, p.367-70, 2002.
- VALENCIA, E; MARIN, A; HARDY, G. Glutathione-nutritional and pharmacologic viewpoints: part I. *Nutrition*. v.17, p.428-9, 2001.
- VAN DE POLL, MC; SOETERS, PB; DEUTZ, NE; FEARON, KC; DEJONG, CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v.79, p.185-97, 2004.
- VARNIER, M; LEESE, G.P; THOMPSON, J; RENNIE, M.J. Stimulatory effect of glutamine on glycogen accumulation in human skeletal muscle. *American Journal Physiology*. v.269, v.E309-15, 1995.
- WAGENMAKERS, A.J; BECKERS, E.J; BROUNS, F; KUIPERS, H; SOETERS, P.B, VAN DER VUSSE, G.J. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *American Journal Physiology*. v.260, p.E883-90, 1991.
- WALSH, N.P; BLANNIN, A.K; CLARK, A.M; COOK, L; ROBSON, P.J; GLEESON M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. v.77, p.434-8, 1998.
- WILLIAMS, B.D; CHINKES, D.L; WOLFE, R.R. Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. *Medicine Science Sports Exercise*. v.30, p.1053-8, 1998.
- WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v.53, p.201-37, 1982.
- WIRTZ, N; WAHL, P; KLEINODER, H; MESTER, J. Lactate Kinetics during Multiple Set Resistance Exercise. *Journal of Sports Science & Medicine*. v.13, p.73-7, 2014.
- WISCHMEYER, PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition*. v.18, p.225-8, 2002.
- WRAY, C.J; MAMMEN, J.M. Hasselgren, P.O. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. *Nutrition*. v.18. p.971-7, 2002.
- WYTTEBACH, A; SAUVAGEOT, O; CARMICHAEL, J; DIAZ-LATOUD, C; ARRIGO, A.P; RUBINSZTEIN, D.C. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Human Molecular Genetics*. v.11, p.1137-51, 2002.
- ZANKER, C.L; SWAINE, I.L; CASTELL, L.M; NEWSHOLME, E.A. Responses of plasma glutamine, free tryptophan and branched-chain amino acids to prolonged exercise after a

regime designed to reduce muscle glycogen. European Journal of Applied Physiology.v.75, p.543-8, 1997.

9. ANEXO

9.1 Carta de aprovação do projeto pelo comitê de ética no uso de animais - CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 872013

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 com L-glutamina e L-alanina livres ou como dipeptídeo sobre parâmetros de lesão e inflamação em ratos submetidos a exercício resistido”** (Protocolo CEUA/FCF/374), submetido pelo(a) **Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo**, foi APROVADO em reunião de 03 de setembro de 2012, por estar de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Certifica, também, que, em 09 de setembro de 2013, foi aprovada a inclusão do(a) aluno(a) **Jaqueline Santos Moreira Leite** como pesquisador(a) responsável.

São Paulo, 8 de outubro de 2013.

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