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

Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina
sobre parâmetros de lesão muscular e de inflamação em ratos
treinados e submetidos a exercício intenso de natação

Vinicius Fernandes Cruzat

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2008

Vinicius Fernandes Cruzat

Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina
sobre parâmetros de lesão muscular e de inflamação em ratos
treinados e submetidos a exercício intenso de natação

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

Prof. Dra. Tânia Cristina Pithon-Curi
1º. examinador

Prof. Dr. Newton Nunes
2º. examinador

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008.

**"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se
e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda
que em vão, que sentar-se fazendo nada
até o final. Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em
conformidade viver ...".
Eu nasci para tentar.**

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

***D**edico esta obra a meus pais Rosa e Patrício e a minha querida avó Geny, que tornaram este sonho uma realidade. Também dedico este trabalho a todos meus amigos que me ajudaram e fizeram acreditar que ele era possível, aceitando se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais como profissional e como pessoa. Não cheguei até aqui sozinho, cheguei graças a vocês e com vocês.*

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, pelo apoio e por ter me dado a base de minha educação.

A Raquel Martins Santos, pelo essencial apoio nos diversos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Flávio de Souza Castro (UFRGS), grande amigo e incentivador desde a graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, pela oportunidade de ter mostrado meu trabalho e credibilidade no meu potencial.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica da Nutrição, em especial, aos amigos José Donato Júnior e Rogério Graça Pedrosa pelos ensinamentos e apoio desde início da pesquisa.

Ao amigo Valmir Machado, diretor da empresa Formula Medicinal, pelo fundamental apoio e doação do dipeptídeo a esta pesquisa.

Aos colaboradores e amigos José Maria de Souza, João Ezequiel de Oliveira, Suzana da Rocha Heller e Carlos Roberto Jorge Soares do Centro de Biologia Molecular, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela fundamental cooperação e boa vontade na utilização do HPLC.

A Margareth Braga e Érica Welise, da empresa Gênese Produtos Farmacêuticos e Diagnósticos Ltda. pela cooperação na utilização do ELISA.

Ao Prof. Dr. Antônio Marcos Levy pela excepcional contribuição e disposição na finalização deste trabalho.

A todo pessoal da Secretaria de Pós-Graduação e do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pelo trabalho de suma importância aos alunos, tais como eu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este projeto (Processo: 05/59003-2) e à Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todas as pessoas das quais por ventura eu tenha esquecido de aqui citar e, de alguma forma, me auxiliaram nesta pesquisa.

CRUZAT, V.F. Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina sobre parâmetros de lesão muscular e de inflamação em ratos treinados e submetidos a exercício intenso de natação [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2008. 141 p.

RESUMO

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e músculo, sendo utilizada em elevadas taxas por diversas células na manutenção e promoção de funções essenciais à homeostasia celular. Entretanto, em algumas situações catabólicas, entre as quais exercícios físicos intensos e prolongados ou exaustivos é observada a redução na concentração de glutamina, o que pode comprometer as funções celulares. A suplementação com dipeptídeos de glutamina, tais como a L-alanil-L-glutamina (DIP) pode representar um eficiente meio de fornecimento de glutamina por via oral para o organismo. Desta forma, ratos Wistar machos foram treinados e suplementados com o DIP ($1,49 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ou uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e L-alanina ($0,61 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) livres (GLN+ALA) ou água (CON), sendo sacrificados em dois tempos, antes (TR) e após (INT) um exercício intenso de natação. No plasma, a concentração de glutamina, glutamato, glicose, amônia, CK, LDH, TNF- α e PgE₂ foram avaliadas. No músculo sóleo e gastrocnêmio e no fígado foram determinadas as concentrações de glutamina, glutamato, GSH, GSSG e proteínas totais. Antes do exercício intenso, ambas as suplementações atenuaram a liberação de CK no plasma. O grupo DIP-TR apresentou maior concentração de glutamato, GSH e GSH/GSSG no sóleo e fígado. Maior concentração de glutamina, glutamato, GSH ou GSH/GSSG foi observada no

sóleo e fígado do grupo GLN+ALA-TR. Após o exercício intenso, ambas as suplementações atenuaram a liberação de amônia e TNF- α , e no grupo DIP-INT menor concentração de PgE₂ foi observada. Maior concentração de glutamina, glutamato e GSH/GSSG no sóleo e glutamato no gastrocnêmio foram encontrados nos grupos DIP-INT e GLN+ALA-INT. No fígado foi encontrada também maior concentração de GSH e GSH/GSSG, decorrentes das suplementações. Os nossos resultados levam à conclusão de que a suplementação oral com L-glutamina e L-alanina na forma livre ou como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, pode aumentar os estoques musculares e hepáticos de GSH e alterar o estado redox celular, atenuando lesão e a inflamação induzidas pelo exercício físico.

Palavras-Chave: Glutamina. Dipeptídeo. GSH. Lesão muscular. Inflamação.

CRUZAT, V.F. Effects of supplementation with L-Glutamine and L-alanyl-L-glutamine upon parameters of muscle damage and inflammation in trained rats and submitted to intense exercise of swim [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2008. 141 p.

ABSTRACT

Glutamine is the most abundant free amino acid found in plasma and muscle, and is utilized at high rates by many cells for maintenance and promotion of cell function. However, in some catabolic situations, like intense and prolonged or exhaustive physical exercise, a reduction in GLN availability is observed, fact that may impair the cell functions. Oral supplementation with dipeptides of glutamine, like L-alanyl-L-glutamine may serve as an interesting way to deliver glutamine to the organism. Male Wistar rats were trained and supplemented with DIP ($1,49 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) or mixture containing free L-glutamine ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and L-alanine ($0,61 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) or water (CON) and sacrificed in distinct times: before (TR) and immediately after (INT) intense exercise of swim. Plasma and serum concentrations of glucose, GLN, glutamate, ammonia, CK, LDH, $\text{TNF-}\alpha$ and PgE_2 were evaluated. In muscles (soleus and gastrocnemius) and liver GLN, glutamate, GSH, GSSG and total proteins also were evaluated. Low concentration of CK in plasma was observed in both supplemented groups before the exhaustive test. The DIP-TR presented more concentration of glutamate, GSH e GSH/GSSG in the soleus muscle and liver. Higher concentration of glutamine, glutamate and GSH/GSSG was seen in GLN+ALA-TR group. Both groups supplemented with DIP and GLN+ALA after the exhaustive test, exhibit decreases in ammonia and $\text{TNF-}\alpha$, and the group DIP-

INT, demonstrated decrease in PgE_2 . Glutamine, glutamate and GSH/GSSG increases in the soleus and glutamate in the gastrocnemius increases in groups DIP-INT and GLN+ALA-INT. Increases in GSH and GSH/GSSG in liver were found in the same groups, compared to CON-INT. Our results indicate that oral supplementation with free L-glutamine added to L-alanine or the dipeptide, L-alanyl-L-glutamine, may influence the muscle and liver stores of GSH and the cellular redox state, and this may attenuate damage and inflammation induced by severe physical exercise.

Key-words: Glutamine. Dipeptide. GSH. Muscle damage. Inflammation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Aspectos históricos da glutamina	16
3.2 Considerações bioquímicas da glutamina	19
3.3 Metabolismo da glutamina	20
3.4 Absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos	27
3.5 Exercícios físicos e glutamina	31
3.6 Lesão muscular induzida pelo exercício físico	36
3.7 Inflamação induzida pelo exercício físico	41
3.8 Estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e glutamina	47
3.9 Glutamina: efeitos da suplementação	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Condições Experimentais	60
4.1.1 Animais	60
4.1.2 Suplementação	60
4.1.3 Grupos Experimentais	61
4.1.4 Protocolo de treinamento	62
4.2 Coletas de sangue e determinações realizadas	64
4.2.1 Parâmetros plasmáticos e séricos	65
4.2.1.1 Glutamina	65
4.2.1.2 Glutamato	65
4.2.1.3 Amônia	66
4.2.1.4 Glicose	66
4.2.1.5 Creatina quinase	67
4.2.1.6 Lactato desidrogenase	67
4.2.1.7 Fator de necrose tumoral- α e Prostaglandina E ₂	67
4.2.1.8 Lactato	68
4.2.2 Parâmetros teciduais	69
4.2.2.1 Glutamina e glutamato muscular e hepático	69
4.2.2.2 GSH e GSSG muscular e hepática	69
4.2.2.3 Proteína muscular e hepática	70
4.3 Análise Estatística	71
5. RESULTADOS	72
5.1 Parâmetros Biométricos	72
5.1.1 Consumo de ração	72
5.1.2 Peso corporal	72
5.2 Parâmetros plasmáticos e séricos	73
5.2.1 Concentração de glutamina plasmática	73
5.2.2 Concentração de glutamato plasmático	74
5.2.3 Concentração de amônia plasmática	75
5.2.4 Concentração de glicose sérica	76
5.2.5 Concentração plasmática de creatina quinase	77
5.2.6 Concentração plasmática de lactato desidrogenase	78
5.2.7 Concentração plasmática do fator de necrose tumoral- α	79
5.2.8 Concentração plasmática de Prostaglandina E ₂	80
5.3 Parâmetros teciduais	81

5.3.1 Concentração de glutamina no músculo sóleo	81
5.3.2 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total do músculo sóleo	82
5.3.3 Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio	83
5.3.4 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total do músculo gastrocnêmio	84
5.3.5 Concentração de glutamina hepática	85
5.3.6 Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total	86
5.3.7 Concentração de glutamato no músculo sóleo	87
5.3.8 Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio	89
5.3.9 Concentração de glutamato hepático	90
5.3.10 Concentração de GSH no músculo sóleo	91
5.3.11 Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo	92
5.3.12 Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio	93
5.3.13 Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio	95
5.3.14 Concentração hepática de GSH	96
5.3.15 Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG	97
5.3.16 Concentração de proteína no músculo sóleo	98
5.3.17 Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio	98
5.3.18 Concentração de proteína hepática	99
 6. DISCUSSÃO	 100
 7. CONCLUSÕES	 123
 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 124
 9. ANEXOS	 149

1. INTRODUÇÃO

No atual universo esportivo, vem diminuindo a distância entre os resultados obtidos por atletas de elite em competições internacionais, o que leva estes indivíduos a treinarem cada vez mais, para assegurar o sucesso nas diferentes disputas. Além do mais, por razões estéticas, propagandas, de saúde e outras, mais pessoas têm se dedicado ao esporte, buscando melhorar sua atuação. Por representar uma alternativa lícita de melhorar o desempenho esportivo, aumentar a hipertrofia muscular ou a imunocompetência, o consumo de suplementos nutricionais por atletas ou mesmo indivíduos fisicamente ativos tem crescido em grande escala (GARLICK, 2004, MOREIRA *et al.*, 2007). Embora seja um fato conhecido em nutrição clínica, a utilização da glutamina como um suplemento nutricional para o esporte tem aumentado apenas recentemente (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003a, MOREIRA *et al.*, 2007).

Nutricionalmente, a glutamina é classificada como um aminoácido não essencial, pois pode ser sintetizada pelo organismo, de acordo com a necessidade. A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, sendo também encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros diversos tecidos corporais (ROWBOTTOM *et al.*, 1996). A proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune, o balanço ácido básico, o transporte da amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, entre outros, são somente algumas das funções em que a glutamina está envolvida (NEWSHOLME *et al.*, 2003a; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Recentemente, foi demonstrado que a glutamina pode participar da síntese de nucleotídeos e induzir a expressão

gênica de uma variedade de proteínas (CURI *et al.*, 2005a). O metabolismo da glutamina pode ser alterado em diversas situações catabólicas, tais como o jejum prolongado, cirurgias e exercícios físicos, principalmente aqueles realizados de forma exaustiva (FLARING *et al.*, 2003, SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007).

A prática de exercícios exaustivos ou de treinos muito intensos e prolongados pode levar a graves lesões musculares, também conhecidas como microtraumas teciduais, bem como à ativação de processos inflamatórios agudos e locais (TIDBALL, 2005; UCHIYAMA *et al.*, 2006). Estes eventos aumentam a utilização de glutamina pelas células, promovendo um desequilíbrio entre a síntese e degradação deste aminoácido (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007). A redução da concentração de ATP e glutamato, induzidas pelo exercício exaustivo também podem inibir a ação da enzima chave de síntese de glutamina, a glutamina sintetase. Tal efeito evita que a amônia produzida pelo exercício seja removida na forma de glutamina, o que pode ser tóxico às células e promover a apoptose celular (HOOD; TERJUNG, 1994, GRAHAM *et al.*, 1995).

A redução da concentração de glutamina e a inflamação induzida pelo exercício elevam a taxa de degradação protéica, o que pode reduzir a concentração de antioxidantes celulares e promover a imunossupressão do atleta (HISCOCK; PEDERSEN, 2002, LANG; FROST; VARY, 2007). Aproximadamente, 50 a 60% dos indivíduos envolvidos na prática de atividades físicas, em algum momento, já apresentaram lesão ou elevado estado inflamatório seguido de imunossupressão (NORTHOFF; WEINSTOCK; BERG, 1994, FULCHER; KIEFHABER; STERN, 1998).

A suplementação com L-glutamina antes, durante e após o exercício, seja ele de caráter exaustivo ou não, tem sido estudada com a intenção de atenuar os efeitos catabólicos associados à redução da concentração de glutamina tanto em humanos como em animais (CASTELL; NEWSHOLME, 1997, CASTELL; NEWSHOLME, 1998, HISCOCK *et al.*, 2003, ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006). Todavia, a efetividade desta intervenção nutricional por via oral tem sido questionada, devido ao fato de aproximadamente 50% da glutamina ser metabolizada por células da mucosa intestinal (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991, CASTELL, 2002). Uma alternativa para conseguir transpor a “barreira” das células intestinais tem sido a utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como a L-alanil-L-glutamina (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994, ADIBI, 2003, ROGERO *et al.*, 2006).

O presente estudo buscou avaliar o efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre e como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) sobre alguns aspectos relacionados à lesão muscular, processo inflamatório e sistema antioxidante celular de ratos treinados e submetidos a exercício intenso de natação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito da suplementação com solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre e com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre parâmetros de lesão muscular e inflamação e sobre o sistema antioxidante de ratos Wistar machos, treinados e submetidos a exercício intenso de natação.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação com solução contendo L-glutamina e L-alanina livres e com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre as concentrações plasmáticas indicadoras de lesão muscular: lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK).
- Avaliar o efeito da suplementação com solução contendo L-glutamina e L-alanina livres e com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre as concentrações plasmáticas de indicadores de inflamação: fator de necrose tumoral (TNF)- α e prostaglandina E_2 (PgE₂).
- Avaliar o efeito da suplementação com solução contendo L-glutamina e L-alanina livres e com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre as concentrações plasmáticas de glutamina, glutamato, glicose e amônia.
- Avaliar o efeito da suplementação com solução contendo L-glutamina e L-alanina livres e com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, sobre as concentrações musculares e hepáticas de glutamina, glutamato e glutathione, na forma reduzida e oxidada (GSH e GSSG, respectivamente).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos históricos da glutamina

Em 1873, Hlasiwetz e Habermann foram os primeiros a considerar a glutamina como sendo uma molécula com propriedades biologicamente importantes. Posteriormente, novas observações levaram os pesquisadores a pensar que a amônia encontrada em hidrolisados protéicos poderia ser o resultado da liberação de glutamina, bem como de asparagina (CURI, 2000, HISCOCK; PEDERSEN, 2002). Em 1883, os pesquisadores Schulze e Bosshard encontraram uma abundante concentração de glutamina livre em alguns tipos de plantas e, em 1932, Damodaran *et al.*, demonstraram a obtenção de glutamina e outros aminoácidos a partir de hidrolisados protéicos (LACEY; WILMORE, 1990). A capacidade de células sintetizar ou degradar glutamina foi descrita por Krebs, em 1935 (HISCOCK; PEDERSEN, 2002). Assim como em outras áreas, durante a segunda guerra mundial, pouco progresso foi visto no entendimento das funções da glutamina no metabolismo celular.

Estudos desenvolvidos por Eagle mostraram que a glutamina é importante para o crescimento e manutenção celular (EAGLE, 1955, EAGLE *et al.*, 1956). Em cultura, células utilizam glutamina em quantidades superiores a de qualquer outro aminoácido. Quando fibroblastos de camundongos foram isolados e cultivados em meios sem glutamina, foi verificada a degeneração da estrutura, seguida de morte das células (EAGLE *et al.*, 1956). Outros trabalhos com diferentes tipos de células, tais como linfócitos, macrófagos, enterócitos, células HeLa, mostraram que tanto o desenvolvimento celular pode ser

aumentado, quanto a manutenção das estruturas e funções celulares pode ser mantida, em meios de cultura contendo glutamina (EAGLE, 1959, ARDAWI; NEWSHOLME, 1982, ARDAWI; NEWSHOLME, 1983, ARDAWI; NEWSHOLME, 1985). Em todas as células, a glutamina pode ceder átomos de nitrogênio para a síntese de purinas, pirimidinas e aminoaçúcares (NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Tais resultados evidenciam a importância da glutamina para um grande número de vias metabólicas, e esses mecanismos, dependentes de glutamina, passaram a ser denominados como vias glutaminolíticas (LACEY; WILMORE, 1990).

O desenvolvimento de novas técnicas científicas possibilitou a observação de diversos efeitos e mecanismos moleculares em que a glutamina está envolvida (CURI *et al.*, 2005a). Em um experimento com células beta pancreáticas foi observado que a glutamina alterou a expressão gênica de proteínas ligadas a uma série de funções no metabolismo, tais como sinalização celular, regulação de fatores de crescimento, resposta inflamatória e imunológica (CORLESS *et al.* 2006). Além disso, a expressão de genes envolvidos com a regulação da secreção de insulina, incluindo enzimas, proteínas quinases e fosfatases, entre outras, podem ser influenciadas pelo metabolismo da glutamina (CURI *et al.*, 2005a, CORLESS *et al.* 2006).

Além da importância da glutamina no metabolismo e na promoção de funções celulares, outros trabalhos vêm demonstrando interesse em verificar os efeitos agudos e crônicos da suplementação com glutamina em situações catabólicas, tais como, câncer, HIV, dengues, cirurgias, exercícios físicos intensos, entre outros. Esta intervenção nutricional, no entanto, ainda produz

resultados controversos (CHRISTOPHE *et al.*, 1971, SHABERT *et al.*, 1999, KLASSEN *et al.*, 2000, JACKSON; CARROLL; RUSSEL-JONES, 2000, ROGERO *et al.*, 2006).

3.2 Considerações bioquímicas da glutamina

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, com peso molecular de aproximadamente 146,15 kilodaltons e pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo (CURI, 2000, NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Fazem parte de sua composição química nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%) (LACEY, WILMORE, 1990, CURI, 2000). É classificada de acordo com seu grupamento R como não-carregada, mas é polar, o que significa uma característica mais hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b).

Como o organismo pode sintetizar glutamina, esta é classificada como um aminoácido dispensável ou não essencial (LACEY; WILMORE, 1990). Esta classificação, entretanto, tem sido questionada, pois em situações críticas tais como: cirurgias, traumas e exercícios físicos intensos e prolongados, a síntese de glutamina não supre a demanda exigida pelo organismo (WRAY; MAMMEN; HASSELGREN, 2002, SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007).

3.3 Metabolismo da glutamina

Diversas são as enzimas envolvidas no metabolismo da glutamina, todavia, apenas duas são responsáveis pela sua síntese, a partir do glutamato ou por sua degradação, também em glutamato, a saber a glutamina sintetase (GS) e a glutaminase (GA), respectivamente (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996). Cabe ressaltar que o glutamato, por sua vez é sintetizado a partir do alfa-cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs e amônia (Figura 1) (ANTONIO; STREET, 1999).

Figura 1. Síntese de glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (Adaptado de ANTONIO; STREET, 1999).

Catalisando a conversão de glutamato em glutamina, utilizando amônia como fonte de nitrogênio e com gasto de trifosfato de adenosina (ATP), a GS é a enzima chave para a síntese da glutamina e para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio (Figura 2). A GS é uma amidotransferase com distribuição generalizada entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida de microorganismos e de animais (CURI, 2000, HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Diversos são os fatores que regulam a atividade da GS, tais como glicocorticóides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina. Diferentes funções são atribuídas às ações da GS (LABOW; SOUBA; CRUZAT, V. F.

ABCOUWER, 2001). No cérebro, é utilizada como um importante agente na redução da concentração de amônia, com conseqüente desintoxicação e síntese de glutamina para nova síntese de glutamato. No pulmão e no músculo esquelético, é responsável pela manutenção da concentração de glutamina plasmática, sendo essencial em situações patológicas ou de estresse (PINEL *et al.*, 2006). Nos rins, a GS é imprescindível para o controle do metabolismo do nitrogênio e manutenção do pH no organismo. Cabe lembrar que em todos estes órgão e tecidos, a GS é encontrada no citosol (CURI, 2000, LABOW *et al.*, 2001).

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

Diferentemente da GS, a glutaminase (GA) é a enzima que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio (Figura 3). Outras denominações para esta enzima são: glutaminase fosfato-dependente, glutaminase ativada por fosfato, glutaminase I ou glutaminase mitocondrial (NEU *et al.*, 1996). A hidrólise da glutamina representa o primeiro passo na sua utilização a partir da síntese do glutamato. Outras reações podem ocorrer principalmente na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996, RENNIE *et al.*, 2001).

A GA está envolvida em diversos processos metabólicos e pode ser encontrada em bactérias, plantas e animais. Em mamíferos, a GA pode ser

encontrada sob duas isoformas, uma (menos abundante) no fígado e outra nos demais tecidos, tais como rins, cérebro, leucócitos e trato gastrointestinal (CURI, 2000). Contudo, a sua forma mais ativa apresenta-se principalmente nas mitocôndrias (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996).

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

Indivíduos considerados saudáveis, pesando aproximadamente 70 Kg, apresentam cerca de 70-80 g de glutamina, distribuída por diversos tecidos corporais. No sangue, a concentração de glutamina é em torno de 500-700 $\mu\text{mol/L}$ (D'SOUZA; TUCK, 2004). Tanto a concentração tecidual, quanto a concentração sangüínea de glutamina podem ser influenciadas de acordo com a atividade da GS ou da GA. Alguns tipos de células, tais como células do sistema imune, rins e intestino, apresentam elevada atividade da GA, sendo assim considerados tecidos consumidores de glutamina (VAN DE POLL *et al.*, 2004). Por outro lado, os músculos esqueléticos, os pulmões, o fígado, o cérebro e, possivelmente, o tecido adiposo apresentam elevada atividade da enzima GS, sendo assim considerados tecidos sintetizadores de glutamina (Figura 4). Cabe salientar que em condições de estresse fisiológico, tais como reduzido aporte de carboidratos ou alteração no equilíbrio ácido básico, o fígado pode tornar-se um sitio consumidor de glutamina (WALSH *et al.* 1998b).

Figura 4. Predominância na produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo (Adaptado de Rowbottom *et al.*, 1996).

Quantitativamente, o principal tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina é o tecido muscular esquelético. Este apresenta elevada atividade das enzimas GS e aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) (WALSH *et al.* 1998b, VAN DE POLL *et al.*, 2004). Embora possa variar, a taxa de síntese de glutamina no músculo esquelético é de aproximadamente 50 mmol/h, sendo maior em relação a qualquer outro aminoácido (NEWSHOLME *et al.*, 2003a). Além disso, a elevada capacidade de síntese e liberação de glutamina, principalmente em situações em que há aumento na sua demanda por outros órgãos e tecidos, confere ao músculo esquelético um papel metabólico essencial na homeostasia corporal. Eventos cirúrgicos, queimaduras, HIV, câncer e

exercícios físicos intensos e prolongados são algumas situações em que se observa que o consumo de glutamina excede a capacidade de síntese corporal (DOHM *et al.*, 1981, PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989, SANTOS *et al.*, 2004).

A predominância do tipo de fibra muscular pode influenciar a síntese de glutamina (WALSH *et al.*, 1998a). De acordo com a tabela 1, fibras do tipo 1 podem apresentar cerca de três vezes mais estoques de glutamina em comparação a fibras do tipo 2 (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996, WALSH *et al.*, 1998b, CURI, 2000). Atribui-se este fato à maior atividade da GS e à maior disponibilidade de ATP para a síntese de glutamina. Dependendo do músculo estudado, quando a síntese *de novo* da glutamina é inibida, os estoques intramusculares podem ser depletados em aproximadamente 7 horas (RENNIE *et al.*, 2001).

Tabela 1. Concentração de glutamina e glutamato e o tipo de fibras predominantes em músculos esqueléticos no repouso (Modificado de Graham e MacLean, 1998).

	Vasto lateral (Humano)	Gastrocnêmio (Rato)	Sóleo (Rato)
	40-50% fibras tipo I 50-60% fibras tipo II	10-30% fibras tipo I 70-90% fibras tipo II	70-80% fibras tipo I 20-30% fibras tipo II
Glutamina	12,8 - 18,2	2,6 - 5,2	7,8 - 17,3
Glutamato	2,3 - 4,8	0,8 - 2,1	3,6 - 11,0

* Valores expressos em mM/Kg de tecido úmido.

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

glutamato, aspartato e asparagina (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000). Os esqueletos de carbono destes aminoácidos são utilizados para a síntese *de novo* de glutamina (HALL; WAGENMAKERS, 1998, MARQUEZI *et al.*, 2003).

Estudos em ratos demonstram que os ACR são transaminados, quase que exclusivamente com α -cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode fornecer seu grupo amino para formar piruvato, gerando alanina, ou incorporar amônia livre, dando origem a glutamina (HALL; WAGENMAKERS, 1998, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Entretanto, os ACR não são completamente metabolizados, porque a enzima chave de controle da sua taxa de oxidação (2-oxoisovalerato desidrogenase) apresenta-se quase totalmente na forma inativa no músculo esquelético. Conseqüentemente, no tecido muscular, os ACR captados inicialmente são utilizados como fornecedores de nitrogênio na formação de glutamina e alanina (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996, MEIJER, 2003).

Hormônios como a insulina e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) estimulam o transporte de glutamina para o meio intracelular, ao passo que glicocorticóides estimulam a liberação de glutamina para o meio extracelular (WINDMUELLER, 1982, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Considerando-se que o gradiente transmembrana através da célula muscular é elevado para a glutamina, sua difusão livre através da membrana celular é restrita (BODE, 2001, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Desta forma, a glutamina necessita ser transportada de forma ativa para o interior das células, por meio de um sistema dependente de sódio (Na^+), que resulta em gasto de ATP (WINDMUELLER, 1982, BODE, 2001). Cabe salientar que o transporte de

glutamina através da membrana da célula muscular é o mais veloz dentre todos os vinte aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003a).

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

A glutamina está envolvida em uma série de funções bioquímicas e celulares. Dentre as funções bioquímicas pode-se salientar a doação de nitrogênio para a formação de ácidos nucleicos, a essencial contribuição para o equilíbrio ácido-base e aminogênese, o fornecimento de substrato energético e o auxílio na síntese de proteínas intracelulares. Dentre as funções celulares pode-se destacar a participação na divisão de células do sistema imune, processos de recuperação de estresses fisiológicos, tais como cirurgias, ferimentos, jejum prolongado, entre outros (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991, JACKSON; CARROLL; RUSSEL-JONES, 2000, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003a).

Efeitos da glutamina também têm sido observados na expressão gênica de diversas proteínas relacionadas aos processos de apoptose celular, sinalização celular e secreção de insulina (ROPELESKI *et al.*, 2005, CORLESS *et al.*, 2006).

3.4 Absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos

Mediante a absorção de aminoácidos e pequenos peptídeos oriundos da dieta, animais, dentre os quais o homem, satisfazem suas necessidades nutricionais protéicas. O processo envolve a digestão de proteínas no lúmen intestinal, para gerar produtos menores que são absorvidos pelos enterócitos (ADIBI, 2003, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Os produtos finais da digestão das proteínas da dieta são uma mistura de aminoácidos livres (40%) e pequenos dipeptídeos e tripeptídeos (60%) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). A partir do lúmen intestinal, os enterócitos apresentam eficientes mecanismos de transporte para absorver estes dipeptídeos e tripeptídeos (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994, TEMPLE *et al.*, 1998).

Em humanos, estudos de perfusão jejunal demonstraram que a competição entre aminoácidos livres durante o processo de captação era evitada ou reduzida, quando os aminoácidos estavam na forma de dipeptídeos (GARDNER, 1975, TEMPLE *et al.*, 1998). Em outros estudos houve aumento da absorção de aminoácidos a partir de soluções de dipeptídeos comparada a soluções contendo aminoácidos livres de equivalente composição (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994, GRIMBLE, 1994, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b).

Os mecanismos de absorção de aminoácidos e dipeptídeos advindos da dieta podem ser divididos da seguinte forma:

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

b) dipeptídeos que permanecem após a digestão por peptidases luminais e ligados à membrana borda em escova, podem ser absorvidos intactos pelo intestino delgado de duas maneiras: 1) transportados como dipeptídeos intactos ou clivados por peptidases dentro do citoplasma das células da mucosa; 2) clivados em aminoácidos livres por hidrolases de peptídeos presentes na membrana borda em escova de enterócitos e posteriormente transportados para dentro do citoplasma das células intestinais como aminoácidos (CASPARY, 1992, ADIBI, 2003, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b).

A capacidade absorptiva de dipeptídeos é maior no intestino delgado proximal em relação ao intestino delgado distal. Observa-se, também, que peptidases citosólicas que atuam sobre dipeptídeos apresentam mais atividade no segmento proximal do intestino delgado, local onde a capacidade absorptiva de dipeptídeos é muito elevada. Por outro lado, a capacidade absorptiva de aminoácidos é maior no intestino delgado distal do que no intestino delgado proximal (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994, ADIBI, 2003).

De acordo com pesquisa realizada por Fei *et al.* (1994), a proteína transportadora de oligopeptídeos (PepT-1) possui uma ampla especificidade por substratos e transporta de forma ativa dipeptídeos e tripeptídeos pelo intestino de humanos e animais. O PepT-1 está localizado exclusivamente na membrana borda em escova intestinal, também conhecida como membrana apical e está ausente na membrana basolateral (THAMOTHARAN *et al.*, 1999, ADIBI, 2003). A presença do PepT-1 representa a principal via de absorção dos produtos finais da digestão de proteínas, permitindo que dipeptídeos sejam transportados da mucosa intestinal, que apresenta muito pouca ou nenhuma

atividade de hidrolases contra peptídeos (5% a 12% da atividade total), para o citosol, onde as peptidases apresentam uma elevada atividade (80% a 95% da atividade celular total) (FRENHANI; BURINI, 1999, YANG; DANTZIG; PIDGEON, 1999, ADIBI, 2003).

Os aminoácidos liberados pelas dipeptidases citossólicas no meio intracelular dos enterócitos podem ser utilizados pela própria célula ou liberados para a circulação portal, mediante transportadores de aminoácidos localizados na membrana basolateral. Cabe salientar que taxas acima de 50% do total de L-glutamina absorvida a partir do lúmen intestinal são subsequentelemente metabolizadas pelo intestino e fígado (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991, D'SOUZA; TUCK, 2004). Em situações em que não haja suficiente quantidade de glutamina a partir do lúmen intestinal, torna-se aumentada a utilização deste aminoácido, presente no sangue arterial, graças a transportadores específicos localizados na membrana basolateral (LEIBACH; GANAPATHY, 1996).

Quando dipeptídeos estão presentes em altas concentrações no lúmen intestinal após uma refeição, por exemplo, uma parte pode escapar da hidrólise intracelular e ser liberada diretamente para a circulação, mediante transportadores de peptídeos localizados também na membrana basolateral (FRENHANI; BURINI, 1999, ADIBI, 2003). Em alguns trabalhos, utilizando dipeptídeos de glutamina marcados radioativamente observa-se que cerca de 90% da radioatividade estava acumulada no citosol de forma intacta (ADIBI; SCHENKER; MORSE, 1996, ADIBI, 2003). Além disso, utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro*, Minami, Morse e Adibi (1992) verificaram que, especificamente, o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina no intestino delgado é preferivelmente

absorvido como dipeptídeo intacto do que quando hidrolisado na membrana luminal.

A membrana basolateral dos enterócitos também possui outros sistemas de transportes de aminoácidos, que são responsáveis pela saída destes para a circulação sangüínea. Estudos demonstram que existem ao menos cinco sistemas de transporte de aminoácidos na membrana basolateral, sendo dois deles dependentes de Na^+ e três independentes de Na^+ . Os sistemas dependentes de Na^+ apresentam papel importante no fornecimento de aminoácidos para as células do próprio intestino, enquanto os independentes de Na^+ são responsáveis pelo transporte de aminoácidos para a circulação sangüínea, fato que caracteriza absorção do tipo transcelular de aminoácidos a partir do lúmen intestinal (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994).

De acordo com modelo proposto por Yang, Dantzig e Pidgeon (1999) o gradiente e o potencial de membrana fornecem a força motriz para a captação de peptídeos pelas células epiteliais intestinais, mediante transportadores de peptídeos dependentes de prótons localizados na membrana apical. Os peptídeos que são resistentes à hidrólise por peptidases intracelulares são transportados através da membrana basolateral via transportadores de peptídeos (transporte facilitado). O processo de troca acoplada Na^+/H^+ gera e mantém o gradiente de prótons sobre a superfície luminal, enquanto a bomba Na^+/K^+ -ATPase, presente na membrana basolateral mantém baixa a concentração intracelular de Na^+ . Este mecanismo de co-transporte de prótons é denominado sistema de transporte “ativo terciário” ou co-transporte de peptídeos dependente de H^+ (YANG; DANTZIG; PIDGEON, 1999).

3.5 Exercícios físicos e glutamina

A realização de exercícios físicos pode promover alterações na concentração plasmática e tecidual de alguns aminoácidos, entre os quais estão a glutamina e os ACR (ROHDE *et al.*, 1996, ZANKER *et al.*, 1997, CASTELL, 2002, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b, SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007). Tais alterações são, na sua maioria, dependentes da duração e intensidade da realização do exercício (HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Inicialmente, o exercício promove uma acelerada liberação de glutamina, a partir da musculatura esquelética, o que aumenta a concentração plasmática de glutamina (BABIJ; MATTHEWS; RENNIE, 1983, ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). Este aumento é transitório e decorrente da elevada síntese de amônia provinda da desaminação de adenosina monofosfato (AMP) a inosina monofosfato (IMP). Este último processo é decorrente da demanda energética por ATP durante a contração muscular (HOOD; TERJUNG, 1994, ANTONIO; STREET, 1999). Uma subsequente redução da glutaminemia, contudo, pode ser observada quando o exercício é realizado por cerca de mais de 1 hora, sendo a magnitude e a duração desta redução fatores dependentes do tipo de esporte praticado (ZANKER *et al.*, 1997, SMITH; NORRIS, 2000, HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Castell *et al.* (1997) encontraram redução da concentração de glutamina entre 5 e 15 minutos após uma maratona, sendo que, as menores concentrações de glutamina foram observadas 1 hora após o término da atividade. Em outro estudo, Castell e Newsholme (1997) verificaram em atletas

de diferentes esportes, redução de aproximadamente 20% na concentração plasmática de glutamina, cerca de 2 horas após o término do exercício. Rohde *et al.* (1996) mostraram que, quando triatletas foram submetidos a uma competição composta por exercícios de natação, bicicleta e corrida, a concentração de glutamina tornou-se menor cerca de 2 horas após a realização da prova. Já Walsh *et al.* (1998a) observaram em atletas redução da glutaminemia cerca de 5 horas após a realização de uma sessão composta de exercícios de caráter intermitente e até a exaustão. Também em exercícios intermitentes, outro estudo com atletas demonstrou que o treinamento intenso durante 10 dias promoveu redução acentuada na glutaminemia, sendo a mesma restaurada após 6 dias com exercícios em intensidade moderada (KEAST *et al.*, 1995).

Keast *et al.* (1995) verificaram a influência da intensidade do exercício de corrida sobre a concentração de glutamina plasmática. Em indivíduos não atletas, a glutaminemia passou de $1244 \pm 121 \mu\text{mol/L}$ para $702 \pm 101 \mu\text{mol/L}$ imediatamente após o exercício a 90% do consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{máx}}$). Quando submetidos a uma intensidade mais elevada, 120% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$, os mesmos indivíduos apresentaram uma queda ainda maior, atingindo o valor de $560 \pm 79 \mu\text{mol/L}$. Em modelos experimentais também pôde ser observada redução na glutaminemia. Santos, Caperuto e Costa Rosa (2007), por exemplo, estudando ratos Wistar, verificaram que a realização de exercício em esteira rolante em intensidade moderada ou até a exaustão promoveu diminuição na concentração plasmática de glutamina, $818,3 \pm 28 \text{ nmol/mL}$ e $778,2 \pm 23,3 \text{ nmol/mL}$, se comparado aos valores do grupo sedentário $910,3 \pm 22,9 \text{ nmol/mL}$.

Como ocorre com outros aminoácidos, o metabolismo da glutamina no tecido muscular também pode ser alterado pelo exercício. Bergstrom *et al.* (1974) observaram que, quando indivíduos foram submetidos a exercício em intensidade de 70% do $VO_{2\text{máx}}$, a concentração de glutamina nos primeiros dez minutos aumentou de 18,9 mMol/L para 23,6 mMol/L. Com o prosseguimento do exercício a concentração de glutamina foi diminuindo. Em outro estudo com exercício de duração maior que 3 horas, a 50% do $VO_{2\text{máx}}$, foi demonstrado que a concentração de glutamina muscular diminuiu de 21,6 mMol/L para 14,3 mMol/L (RENNIE *et al.*, 1981).

Em ratos, Christophe *et al.* (1971) verificaram redução na concentração de glutamina no tecido muscular imediatamente após o exercício de natação com duração de 15 e 30 minutos. A maior redução, entretanto, foi encontrada no fígado (aproximadamente 50%) em relação ao grupo repouso do estudo (CHRISTOPHE *et al.*, 1971). Também em ratos, foi verificada redução na concentração de glutamina e glutamato no tecido muscular esquelético após exercício de corrida em esteira rolante, intensidade de 75-80% $VO_{2\text{máx}}$ e de natação, intensidade de 50-60% $VO_{2\text{máx}}$. Além disso, nos dois tipos de exercício foi encontrada redução na concentração de glutamina hepática (DOHM *et al.*, 1981).

Dentre os mecanismos que levam à diminuição das concentrações de glutamina plasmática e muscular, durante e após exercícios físicos prolongados, destaca-se o aumento da concentração do hormônio cortisol, que estimula tanto o efluxo de glutamina muscular, quanto a captação de glutamina pelo fígado (DOHM *et al.*, 1985). Deste modo, a maior oferta de glutamina no fígado, aliada à diminuição dos estoques de glicogênio hepático e ao aumento

da concentração de cortisol promovem maior estímulo da neoglicogênese hepática a partir do aminoácido glutamina (MACKINNON; HOOPER, 1996, ROGERO *et al.*, 2002, ROGERO *et al.*, 2006). Foi aventada a hipótese de que o aumento da captação de glutamina possa servir para o fígado sintetizar o principal antioxidante celular não enzimático, a glutathione (GSH), via liberação de glutamato (VALENCIA *et al.*, 2001c). O tecido hepático representa a principal fonte desse antioxidante e o exercício, ao aumentar a síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO), pode estimular mecanismos de síntese de antioxidantes (SEN, 1995, ROTH *et al.*, 2002).

Outro mecanismo implicado na diminuição da glutaminemia durante o exercício físico prolongado refere-se ao aumento da concentração de lactato sangüíneo, que altera o pH do sangue (acidose metabólica) e, conseqüentemente, conduz à maior captação de glutamina pelos rins (CURI, 2000). Quanto mais intenso for o exercício, maior é a produção de íons hidrogênio (H^+) e, conseqüentemente, a demanda dos rins, para tamponarem a acidose (NEWSHOLME *et al.*, 2003b). A eliminação de 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 (WALSH *et al.*, 1998a, GRAHAM; MACLEAN, 1998). A acidose decorrente do aumento da concentração de lactato no sangue pode tornar o rim o principal órgão de captação de glutamina (BROSNAN, 2000, VAN DE POLL *et al.*, 2004).

Além destes fatos, o aumento da captação de glutamina por células do sistema imune, tais como linfócitos, macrófagos e neutrófilos pode colaborar

para a diminuição da glutaminemia induzida pelo exercício físico, uma vez que estas células utilizam glutamina como principal substrato energético (MACKINNON; HOOPER, 1996). Apesar disso, as pesquisas ainda apresentam resultados contraditórios em relação a interferência da glutamina no metabolismo de células do sistema imune, provavelmente, porque outros mecanismos alternativos estejam envolvidos na atividade e desenvolvimento dessas células (ROBSON *et al.*, 1999, MOREIRA *et al.*, 2007, SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007).

3.6 Lesão muscular induzida pelo exercício físico

Durante a realização de exercícios físicos ocorrem microtraumas teciduais. A recuperação desses microtraumas depende principalmente de um programa de treinamento adequado, caracterizado por períodos de repouso suficientes. Os microtraumas podem ser induzidos por meio de diversos mecanismos. O movimento do tipo excêntrico, por exemplo, pode provocar trauma tecidual (GLEESON *et al.*, 1998, BEST *et al.*, 1999). Adicionalmente, exercícios com elevada demanda metabólica, tais como ciclismo realizado em alta intensidade, podem induzir lesões por meio da ocorrência do processo conhecido como “isquemia e reperfusão” tecidual (BLOOMER; GOLDFARB, 2004, HIROSE *et al.*, 2004). Treinamentos com quantidade elevada de repetições podem propiciar também o surgimento de microtraumas nas estruturas articulares envolvidas durante o movimento (MORGAN; ALLEN, 1999, BLOOMER; GOLDFARB, 2004).

Os microtraumas resultam em uma resposta inflamatória moderada, que tem como finalidade o processo de cicatrização, com conseqüente adaptação muscular ou óssea ou ainda, do tecido conectivo (REID; LI, 2001, MALM, 2001, NÓBREGA, 2005). Nesse sentido, os microtraumas são considerados uma reação comum a exercícios, promovendo, conseqüentemente, respostas inflamatórias agudas e locais (TOUMI; BEST, 2003, UCHIYAMA *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, esta resposta inflamatória local resulta em processos de recuperação, fato que é visto como um processo de adaptação do atleta, com inúmeros efeitos considerados positivos a saúde (NÓBREGA, 2005, PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Diversos estudos, porém, relatam que tal

recuperação não é alcançada por indivíduos que se submetem a exercícios intensos e prolongados ou a treinos exaustivos, ou ainda, que possuem uma frequência de treinamento muito elevada (PEDERSEN; ROHDE; OSTROWSKI, 1998, CASTELL, 2002, ROGERO *et al.*, 2005).

Os elementos passivos, tais como fibras musculares e tecidos ligamentares, são capazes de absorver impactos e lesões de forma constante. Entretanto, a freqüente realização de exercícios extenuantes e o não cumprimento dos tempos necessários para a recuperação comprometem o mecanismo de regeneração tecidual e alteram os processos metabólicos das células. Tal fato reduz a capacidade dos tecidos em resistir ao estresse ocasionado pelo exercício físico intenso (RADAK *et al.*, 2001, BLOOMER; GOLDFARB, 2004). Algumas repercussões destas ações são a maior frequência de lesões, o que impossibilita o indivíduo de manter um condicionamento físico elevado e a redução do volume de treinamentos, o que conseqüentemente, prejudica o rendimento. Além destes aspectos, a inflamação aguda ou crônica induzidas pelo exercício intenso e prolongado, posteriormente, podem evoluir para uma inflamação sistêmica e, principalmente, reduzir a massa muscular (TOUMI; BEST, 2003, OGONOVSKY *et al.*, 2005).

A redução na quantidade de massa muscular está associada a sintomas como cansaço, fadiga, *overtraining*, redução da mobilidade corporal e força muscular. Todos estes eventos aumentam a suscetibilidade a infecções e ao desenvolvimento de doenças (REID; LI, 2001, ROGERO *et al.*, 2005). Estudos demonstram que aproximadamente 60% dos indivíduos envolvidos na prática de atividades físicas, incluindo atletas, em algum momento, já apresentaram

lesão muscular ou elevado estado inflamatório seguido de imunossupressão (FULCHER; KIEFHABER; STERN, 1998, NORTHOFF; WEINSTOCK; BERG, 1994).

Na ocorrência de uma lesão tecidual ocasionada por choque, compostos químicos, bactérias, calor ou exercício físico, o rompimento das estruturas contráteis e dos componentes citoesqueléticos da musculatura esquelética, liberam para o sangue proteínas intracelulares, tais como: a mioglobina e as enzimas creatino quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), aldolase (ALD), entre outras (CLARKSON; SAYERS, 1999; MALM, 2001).

Nuviala *et al.* (1992) verificaram aumento na concentração de LDH, CK, AST e ALD em atletas imediatamente após uma maratona. Os valores de pico da CK e AST, entretanto, foram observados somente 24 horas após a prova. Santos *et al.* (2004) observaram também que atletas submetidos a uma corrida de 30 km apresentavam aumento na concentração de CK e LDH. Cerca de 24 horas após o exercício, estes mesmos parâmetros ainda estavam bem mais elevados, se comparados aos valores pré-exercício. Um outro estudo observou que, em corredores moderadamente treinados, submetidos a uma corrida montanhosa, a concentração de CK manteve-se elevada por até 48 horas após o evento (SIMPSON *et al.*, 2005). Bruunsgaard *et al.* (1997) verificaram que indivíduos submetidos somente a exercícios do tipo excêntricos, em ciclo ergômetro, também apresentaram aumento na concentração de CK, LDH e AST logo após a sessão. As concentrações de CK e AST mantiveram-se elevadas por até sete dias após o exercício, o que indica uma elevada

quantidade de lesões às células musculares induzida pelo exercício físico intenso (BRUUNSGAARD *et al.*, 1997).

Muitos trabalhos têm sido realizados com praticantes de exercícios físicos intensos e prolongados, para avaliar a atividade sérica de enzimas. Nesses estudos observa-se que a atividade da CK pode aumentar cerca de 10 a 20 vezes o seu valor normal, ao passo que outras enzimas como a ALD e LDH, elevam-se cerca de 2 a 8 vezes após o mesmo evento (LIJNEN; HESPEL; FAGARD, 1988, SOEDER; GOLF; GRAEF, 1989). Essa diferença de aumento pode ser explicada, em parte, pela localização intracelular de cada proteína ou enzima. Se a enzima estiver presente no sarcoplasma da célula muscular, sua concentração plasmática será maior, se comparada a outra enzima presente na mitocôndria, que terá de atravessar tanto a membrana mitocondrial, como a sarcoplasmática (NOAKES, 1987, MORGAN; ALLEN, 1999).

Embora o efluxo de enzimas citosólicas específicas para a circulação sangüínea indique a ocorrência de lesão muscular, a utilização combinada de técnicas histológicas ou avaliação ultra-estrutural por meio do uso de microscopia eletrônica ou análise histológica muscular pode nem sempre coincidir com mesmo resultado (JANSSEN *et al.*, 1989; VAN DER MEULEN KUIPERS; DRUKKER, 1991, MALM, 2001, TOFT *et al.*, 2002). As características morfológicas e ultra-estruturais da lesão induzida pelo exercício estão bem documentadas em modelos tanto animais quanto humanos. Lesões de pequenas áreas de fibras musculares podem ser observadas imediatamente após o exercício. A lesão torna-se normalmente maior durante as próximas 48-72 horas pós-exercício, com a observação histológica do músculo lesado

evidenciando rompimento miofibrilar, estrutura irregular das linhas Z, rompimento do sarcolema, localização irregular de organelas, aumento da densidade mitocondrial e do conteúdo de proteínas miofibrilas e do citoesqueleto (STUPKA *et al.*, 2000; PROSKE; MORGAN, 2001).

3.7 Inflamação induzida pelo exercício físico

Quando ocorre a lesão tecidual, o organismo responde para restaurar a integridade perdida. Essa resposta é denominada de inflamação (ABBAS; LITCHMAN, 2005). Uma das primeiras etapas da inflamação é o encapsular a área danificada, isolando-a dos demais tecidos. Os espaços teciduais e os vasos linfáticos são bloqueados por coágulos de fibrinogênio, de modo que o líquido pouco consegue fluir por estes locais. Desta forma, o processo de encapsulamento retarda a disseminação de bactérias e possíveis substâncias tóxicas para a regeneração tecidual (TOUMI; BEST, 2003, TIDBALL, 2005).

A ativação do mecanismo inflamatório tem início com a (a) síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras, como a Prostaglandina E₂ (PgE₂) e as citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a interleucina (IL)-1 β , que por sua vez induzem a (b) síntese de interleucina (IL)-6 (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004, PEDERSEN; GOETZ, 2000). A IL-6, primeiro sinalizador da reação de fase aguda, (c) estimula a formação de proteínas específicas, também de fase aguda, como a proteína C-reativa (CRP), fato que aumenta a (d) produção de citocinas antiinflamatórias e inibidores de citocinas (HELLSTEN *et al.*, 1997, MALM, 2001, PETERSEN; PEDERSEN, 2005). A IL-1, a IL-10, o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) os receptores de TNF (TNF-R), entre outros, que apresentam ação antiinflamatória (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004, PEDERSEN; GOETZ, 2000). Inicialmente neutrófilos e, posteriormente, monócitos e linfócitos são ativados, migrando para o local da lesão (e) por meio do sistema sangüíneo, onde inicia (f) a reparação da lesão tecidual com síntese de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies

reativas de nitrogênio (ERN) e radicais livres (RL) (Figura 5) (PEDERSEN *et al.*, 1998, MALM, 2001, MASTALLOUDIS *et al.*, 2004a).

Por meio da liberação de citocinas, moléculas sinalizadoras intercelulares, o processo inflamatório regula a resposta adaptativa celular. O equilíbrio entre a síntese de citocinas pro e antiinflamatórias pode aumentar a proteção das células a novos estresses (PEDERSEN *et al.*, 2000, PETERSEN; PEDERSEN, 2005, GLEESON, 2007).

A intensidade do processo inflamatório está relacionada ao grau de lesão tecidual. Desta forma, a elevada quantidade de lesões induzidas por exercícios físicos de caráter exaustivo promove uma resposta inflamatória intensa, aumentando principalmente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α (PHANEUF; LEEUWENBURGH, 2001, PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Esta citocina é primariamente sintetizada por macrófagos e outros tipos de células, incluindo células musculares (SILVEIRA *et al.*, 2007). Diversos podem ser seus efeitos no metabolismo celular, principalmente sobre células do sistema imunológico (GLEESON, 2007, SILVEIRA *et al.*, 2007). Em patologias, tais como a caquexia, HIV e câncer, os efeitos do TNF- α têm sido associados ao catabolismo muscular, à perda de funções celulares e à apoptose (PHANEUF; LEEUWENBURGH, 2001, DALE; DAVIS; FAUSTMAN, 2006).

Dois receptores específicos de membrana, TNF-R1 e TNF-R2, medeiam as respostas celulares de TNF- α (REID; LI, 2001). Embora a musculatura esquelética expresse ambos os receptores, experimentos indicam que TNF-R1 está mais relacionado às respostas catabólicas induzidas por TNF- α , uma vez que esta citocina regula a ativação de uma subunidade citosólica de transcrição

CRUZAT, V. F.

denominada fator- κ B nuclear (NF- κ B) (PEDERSEN; GOETZ, 2000, REID; LI, 2001). O potencial do estado redox celular, determinado pela taxa de GSH/GSSG, também regula a ativação do NF- κ B (ROTH *et al.*, 2002). NF- κ B está no citoplasma de células musculares na forma inativa, pois se encontra ligado a um dímero de ação inibitória, o I- κ B α . O TNF- α e o estresse oxidativo celular estimulam a ubiquitinação (ligação com resíduos de outras proteínas) e a fosforilação do I- κ B α e, posteriormente, sua degradação pelo proteossoma 26S (DALE; DAVIS; FAUSTMAN, 2006).

Na ausência de I- κ B α , NF- κ B se torna ativo e é translocado para o núcleo da célula. Uma vez no núcleo, em poucos minutos o NF- κ B se liga à região promotora do DNA e inicia o processo de transcrição de genes para diversas citocinas pró-inflamatórias e proteínas apoptóticas, o que aumenta a atividade inflamatória e a produção de ERO por células de adesão, tais como neutrófilos e macrófagos (MALM, 2001, REID; LI, 2001, SILVEIRA *et al.*, 2007). De acordo com Babenko *et al.*, (1999) e Simpson *et al.* (2005) o elevado estado inflamatório pode aumentar o edema no tecido muscular e a sensação de dor muscular tardia (DOMS – *delayed onset muscle soreness*), prejudicando o processo de reparação celular.

As prostaglandinas, principalmente as do grupo E, tais como a PgE₂, quando liberadas, apresentam elevada capacidade vasodilatadora (PEDERSEN; GOETZ, 2000, WIN; MARSHALL, 2005). Dependendo de seus receptores localizados tanto na superfície da membrana celular quanto na membrana do núcleo, as prostaglandinas podem ter funções pró e antiinflamatórias, promover hiperalgesia e alterar a expressão gênica celular (CANNON *et al.*, 1991, PEDERSEN *et al.*, 2000, WIN; MARSHALL, 2005).

Derivadas do ácido aracdônico, as prostaglandinas são parte de um grupo chamado eicosanóides (C 20:4), que, após ciclização pela enzima cicloxigenase (COX), formam um anel pentano que recebe várias insaturações (LANGBERG *et al.*, 2003).

Santos *et al.* (2004) verificaram que, logo após uma corrida de 30 km, atletas apresentaram aumento na concentração de PgE₂ e TNF- α . Cerca de 24 h após o exercício, estes mesmos parâmetros ainda estavam bem mais elevados, se comparados aos valores pré-exercício. Nieman *et al.* (2003) também observaram valores elevados de TNF- α e de outras citocinas em atletas treinados quando submetidos a uma corrida com duração de 3 h, a uma intensidade de 70 % do VO_{2Máx}. Nesta linha de pesquisa, outro estudo observou que, em corredores moderadamente treinados, submetidos a uma corrida montanhosa, a concentração de algumas interleucinas manteve-se elevada por até 48 h após o evento (SIMPSON *et al.*, 2005).

Uma variabilidade nos resultados de pesquisas, contudo, pode ser encontrada em relação à resposta inflamatória induzida pelo exercício físico. Dentre algumas variáveis podem-se citar o tipo de exercício físico, a duração, a intensidade e o tipo de contração muscular predominantemente envolvido na atividade (PEDERSEN; GOETZ, 2000, MALM, 2001, REID; LI, 2001). Estudos indicam que o exercício excêntrico, por exemplo, pode promover maior síntese e liberação de citocinas imediatamente após a atividade (TOFT *et al.*, 2002, HIROSE *et al.* 2004). O elevado estado inflamatório, de acordo com estudos, pode ainda ser observado alguns dias após uma sessão de exercício excêntrico (BRUUNSGAARD *et al.*, 1997). Outros autores sugerem que o impacto das extremidades do corpo com a superfície também pode ser um

fator importante no processo de lesão muscular e inflamação (HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Figura 5. Teoria dos processos fisiológicos promovidos pelo exercício físico. Adaptado de Pyne (1994).

Abreviaturas: ERON = Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; PL = Peroxidação lipídica; iCa^+ = Cálcio intracelular, PgE_2 = Prostaglandina E_2 , CK = Creatina quinase, TNF- α = Fator de necrose tumoral- α , IL-1 = Interleucina-1, IL-2 = Interleucina-2, IL-6 = Interleucina-6, C3a = Proteína C3a do sistema complemento; C5a = Proteína C5a do sistema complemento; Fe = Ferro; LTB4 = Leucotrieno B4.

3.8 Estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e glutatona

A elevação na demanda de energia durante a atividade física, principalmente em atividades do tipo aeróbias, é acompanhada de um aumento no fornecimento de oxigênio (O_2) para os tecidos (100-200 vezes a mais em comparação à verificada no repouso), fato que estimula o metabolismo oxidativo (OGONOVSKY *et al.*, 2005). O sistema aeróbio maximiza a utilização de substratos pelos tecidos, ao passo que, mantém baixo o acúmulo de lactato pelos músculos (SEN, 1995, FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). Estima-se que no metabolismo aeróbio de 2-5% do volume de oxigênio escape para formar radicais livres, ERO e ERN, que apresentam meia-vida curta (SEN, 1995, DRÖGE, 2002, JI, 2002, MASTALLOUDIS, 2004b).

Por definição, radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares, enquanto ERO e ERN são qualquer espécie oxidante altamente reativa formada por oxigênio ou nitrogênio, inclusive os RL de oxigênio ou nitrogênio. O radical superóxido ($\cdot O_2^-$), o radical hidroperoxil ($\cdot HO_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH^-$), são conhecidos exemplos de ERO (DRÖGE, 2002).

Cada um destes intermediários do O_2 é considerado altamente reativo, graças à sua configuração instável de elétrons, o que pode promover a atração de novos elétrons a partir de outras moléculas, resultando na formação de outro radical livre, o qual, por sua vez, pode reagir com outra células ou moléculas, sempre na tentativa de obter uma estrutura quimicamente mais estável (DRÖGE, 2002, JI, 2002). Tal reação se dá em cadeia e está

relacionada aos processos de peroxidação lipídica (PL), de lesão de DNA e de oxidação de proteínas (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006).

A síntese de ERO, entretanto, não está somente envolvida com efeitos considerados deletérios ou tóxicos às células. As ERO exercem diversas funções fundamentais, como atividades microbicidas, ação contra antígenos durante a fagocitose, auxílio na sinalização e biogênese celular, servindo como mensageiras e alterando o estado redox celular (RADAK *et al.*, 2000, ZMIJEWSKI *et al.*, 2007). Adicionalmente, as ERO também estão envolvidas na ativação de enzimas, destoxificação de drogas ou ainda podem influenciar a síntese *de novo* de glicogênio (RADAK *et al.*, 1999, RADAK *et al.*, 2001). Nesse contexto, as ERO fazem parte do metabolismo normal celular. Na maioria das vezes, o organismo está em equilíbrio entre a síntese e a degradação das ERO (DROGE, 2002, FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). Durante a realização de exercícios exaustivos, contudo, a produção de ERO pode suplantar a capacidade antioxidante corporal, situação conhecida como estresse oxidativo (JI, 1999, DRÖGE, 2002, JI, 2002, FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006).

Para neutralizar as ERO, produzidas pelo metabolismo e atenuar o estresse oxidativo, as células dispõem de um sistema antioxidante classificado como enzimático e não enzimático (JI, 1999, DRÖGE, 2002). O tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina (GSH) é o mais importante antioxidante celular não enzimático do organismo (MEISTER; ANDERSON, 1983). Composto por resíduos de cisteína, ácido glutâmico e glicina, a GSH é encontrada em elevadas concentrações nas células, podendo reagir diretamente com as ERO em reações não enzimáticas, bem como pode atuar como doadora de elétrons

na redução de peróxidos catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPx) (MEISTER; ANDERSON, 1983, SEN, 1995, CRUZAT *et al.*, 2007).

A atividade de diversas enzimas, incluindo a própria GPx, é determinada pela taxa de substratos, que são também modulados pela concentração de GSH e de sua forma oxidada (GSSG) (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001a). O estado redox das células é conseqüentemente relacionado com as concentrações de GSH, que, por sua vez, também são influenciadas pela disponibilidade de aminoácidos (BEST *et al.*, 1999, ROTH *et al.*, 2002). Por outro lado, a GSSG é enzimaticamente reconvertida a GSH pela enzima glutathione reductase, que utiliza NADPH como fonte de poder redutor. Em suma, mediante diversos mecanismos, a GSH protege a membrana das células, mantendo a concentração de muitas proteínas e seus grupamentos sulfidrilas (-SH) na forma reduzida, que são necessárias para o funcionamento normal das células (MEISTER; ANDERSON, 1983, BEUTLER, 1989, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001a, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c).

Quantitativamente, o fígado é o principal órgão de síntese *de novo* da GSH, sendo responsável pelo suprimento de 90% da GSH circulante em condições fisiológicas (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c). A elevada concentração de GSH hepática é devida, principalmente, à alta atividade da glutathione reductase nesse órgão (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c). Durante o exercício físico prolongado, o fígado exporta GSH para o plasma sob influência hormonal, em especial de glucagon, vasopressina e catecolaminas (JI 1999, BEST *et al.*, 1999, LIU *et al.*, 2000). O tecido muscular é responsável pela elevada captação de GSH do plasma (LEEUEWENBURGH, JI, 1995; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b).

A síntese de GSH, no entanto, depende da concentração de cisteína, glicina e principalmente do glutamato (JI, 1995; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002a, FLÄRING *et al.*, 2003).

O glutamato representa a primeira e provavelmente a mais importante etapa na síntese dos compostos integrantes da GSH, e este, por sua vez é dependente da disponibilidade e transporte de glutamina para dentro da célula (LUO *et al.*, 1996, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b, CRUZAT *et al.*, 2007). Quando calculadas as concentrações de glutathione e glutamato musculares, verifica-se alta correlação ($r = 0,88$) entre os compostos. Embora também importantes, outros compostos, tais como a cisteína, a glicina e a própria glutamina apresentam baixa correlação ($r \leq 0,36$) com a GSH (RUTTEN *et al.*, 2005).

Durante exercícios prolongados ou exaustivos, o dispêndio de energia supera o fornecimento, e a gliconeogênese hepática é estimulada para manter o balanço energético (BABIJ *et al.*, 1983). Este processo decompõe e utiliza aminoácidos advindos do catabolismo muscular (alanina, glutamina, cisteína, entre outros) para gerar energia, além de glicerol, provindos da lipólise dos estoque de gordura, lactato e piruvato secretados por outros tecidos (BABIJ *et al.*, 1983, HACK *et al.*, 1997, WILLIAMS; CHINKES; WOLFE, 1998). Uma menor concentração de glutamina e, conseqüentemente, de glutamato pode reduzir a síntese de GSH e promover maior estresse oxidativo celular (LUO *et al.*, 1996, HACK *et al.*, 1997, ROTH *et al.*, 2002, SCHROEDER *et al.*, 2005). Quando isso ocorre, as células apresentam alguns mecanismos de sinalização mais relacionados à sua resistência a lesão, desencadeados pela ativação da quinase reguladora de sinal extracelular (ERK), proteínas de choque térmico

(HSP) e sistema NF- κ B (REID; LI, 2001). Por outro lado, outros mecanismos mais relacionados à apoptose de células, tais como as musculares também são desencadeados por ERO, tais como a ativação da c-Jun quinase N-terminal (JNK) e de genes associados à capacidade de supressão de tumor, p53 e p38 (JI, 2002). Embora estes mecanismos devam ser mais bem estabelecidos, é importante salientar que estão associados ao aparecimento de doenças e a intensidade do processo inflamatório (NIEMAN; PEDERSEN, 1999, PEDERSEN *et al.*, 2000, FLÄRING *et al.*, 2003).

3.9 Glutamina: efeitos da suplementação

Estudos *in vitro* com diversos tipos de células, tais como células musculares, da mucosa intestinal, do sistema imune, neurônios específicos do Sistema Nervoso Central, hepatócitos, células β -pancreáticas, entre outras, têm demonstrado que a glutamina, quando adicionada a um meio de cultura, pode alterar uma variedade de funções celulares (NEWSHOLME *et al.*, 2003b, CURI *et al.*, 2005b, LAGRANHA *et al.*, 2005, CORLESS *et al.*, 2006).

Estudos *in vivo*, nos quais a glutamina foi administrada de forma parenteral, indicaram que a maior oferta deste aminoácido às células pode atenuar sua redução no plasma ou no meio intracelular ocorrido após eventos de estresse metabólico ou enfermidades, tais como dengue, câncer, HIV, queimaduras, cirurgias, entre outras (SHABERT *et al.*, 1999; KLASSEN *et al.*, 2000; D'SOUZA; TUCK, 2004). Nesses estudos, a utilização de glutamina tem sido correlacionada a uma melhora na recuperação dos pacientes (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002b, HISCOCK; PEDERSEN, 2002, FLÄRING *et al.* 2003, D'SOUZA; TUCK, 2004).

Déchelotte *et al.* (1991) verificaram que no estado pós abortivo a suplementação oral com glutamina em indivíduos saudáveis e sedentários, promoveu aumento na concentração de glutamina e glutamato plasmáticos. Em atletas no estado de repouso, Castell e Newsholme (1997) observaram que a concentração plasmática de glutamina aumentou cerca de 30 min após a ingestão oral de uma solução com glutamina (100 mg/kg peso corporal), podendo retornar aos valores basais no decorrer de aproximadamente 2 horas.

Em indivíduos fisicamente ativos, Bowtell *et al.* (1999) verificaram o efeito da suplementação oral com glutamina sobre a glutaminemia e os estoques de glicogênio muscular, após sessão de exercício intenso. A suplementação (8 g de glutamina em 330 mL de água) aumentou a concentração plasmática de glutamina durante o período de recuperação em 46%, o que permite inferir que uma substancial proporção de glutamina administrada oralmente escapou da utilização por parte das células da mucosa intestinal e da captação pelo rim e fígado. Em outro estudo, Castell *et al.* (1997) investigaram o efeito da suplementação com glutamina (5 g em 330 mL de água) logo após a realização de uma maratona. A concentração de glutamina, alanina e ACR mantiveram-se diminuídas por até 1 h após a realização da maratona, retornando aos valores pré-exercício somente 16-h mais tarde. A concentração plasmática de IL-1 não foi alterada pelo exercício, enquanto a de IL-2 e TNF- α tiveram aumento significativo até 16-h após a prova, fato que demonstra um marcante estado inflamatório induzido pelo exercício. Entretanto, não foi encontrada diferença da suplementação com glutamina em nenhum dos parâmetros analisados. A diferença entre os resultados talvez seja causada pela intensidade em que o exercício foi realizado.

Uma vez que células do sistema imune necessitam de glutamina para a manutenção de suas funções, e o exercício físico induz o aumento da atividade dessas células, a correlação entre glutamina e sistema imune tem sido estudada (HISCOCK; PEDERSEN, 2002, MOREIRA *et al.*, 2007). Especula-se que a redução da disponibilidade de glutamina, ocorrida após exercícios intensos e prolongados, possa de alguma forma, estar envolvida no desenvolvimento de doenças, em especial, as infecções do trato respiratório

superior (ITRS) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000). A suplementação com glutamina tem sido estudada como alternativa de atenuar ou mesmo de reverter tais eventos induzidos pelo exercício físico (Tabela 2) (CASTELL; NEWSHOLME, 1998, ANTONIO; STREET, 1999, MOREIRA *et al.*, 2007).

Estudos relacionando glutamina com o volume celular demonstram que o transporte da glutamina para o meio intracelular promove uma elevação na captação de sódio, que altera o volume da célula (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994, YANG; DANTZIG; PIDGEON, 1999). O aumento no volume celular pode ser considerado um sinal anabólico, uma vez que altera favoravelmente o “turnover” protéico, promovendo a síntese protéica e aumentando a disponibilidade de substratos para os diversos sistemas envolvidos no processo de recuperação e reparação tecidual (VOM DAHL; HAUSINGER, 1996, ANTONIO; STREET, 1999, KLASSEN *et al.*, 2000). Varnier *et al.* (1995) observaram que após exercício de alta intensidade, a administração parenteral de glutamina promoveu o aumento dos estoques de glicogênio muscular, fato que pode beneficiar a recuperação da lesão induzida pelo exercício exaustivo.

Tabela 2. Estudos com a suplementação enteral de glutamina e sua relação com os sistemas imune e antioxidante. Modificado de Moreira *et al.* (2007).

Referência	Amostra e exercício	Suplementação	Parâmetros avaliados	Resultados
Castell; Newsholme (1996)	151 corredores de maratonas e ultra maratonas	5 g de glutamina em 330 ml de água imediatamente após e 2 h após o exercício	Questionários de relatos de ITRS	Grupo suplementado obteve menor percentual de ITRS, se comparado ao grupo placebo
Castell <i>et al.</i> (1997)	18 corredores: Maratona de Bruxelas	5 g de glutamina em 330 ml de água 1 h após o exercício	Contagem de células, IL-1 α , IL-2, IL-6, glutamina, alanina, BCAA plasmáticos e norepinefrina	Nenhum efeito
Rohde <i>et al.</i> (1998)	16 corredores: Maratona de Copenhagen	100 mg/kg peso corporal de glutamina diluída em suco de limão, administrada 0, 30, 60, 90 min. após o exercício	Linfócitos (CD4, CD8, CD16), Neutrófilos, resposta proliferativa a PHA, atividade de células LAK	Nenhum efeito da intervenção, somente efeito do exercício sobre o sistema imune. Nenhuma relação entre a redução da glutaminemia com a atividade de LAK
Walsh <i>et al.</i> (2000)	7 atletas submetidos a 2 treinos separados, em intensidade de 60% VO_{2max}	Após 90 minutos de exercício, 1,2% (w/v) de glutamina diluída em 250 ml de suco de limão sem açúcar foi administrada em intervalos de 15 min. durante e até 2 h após o fim da atividade	Cortisol, degranulação e atividade de neutrófilos	A suplementação atenuou a redução na concentração de glutamina após o exercício, mas nenhum efeito sobre a leucocitose e a degranulação de neutrófilos foi encontrada

Abreviaturas: BMNC = Células mononucleares sanguíneas; LAK = Célula (linfócito) natural killer ativada; ITRS = Infecções do Trato Respiratório Superior; IL = Interleucinas; GSH = Glutathione; PHA = fitohemaglutinina A; IgA = imunoglobulina A; BCAA = Aminoácidos de cadeia ramificada.

Tabela 2. Continuação

Referência	Amostra e exercício	Suplementação	Parâmetros avaliados	Resultados
Krzywkowski <i>et al.</i> (2001a)	11 atletas submetidos 3 treinos separados de 2 h em cicloergômetro a 75% do $VO_{2\text{máx}}$	Grupo glutamina (3,5 g de glutamina em 500 ml), grupo proteína (13,7 g de proteínas com caseínas, sendo 1,23 g de glutamina em 375 ml de água) administrados durante e até 2 h após o exercício	Secreção de IgA salivar	Nenhum efeito
Krzywkowski <i>et al.</i> (2001b)	10 atletas submetidos 2 treinos separados de 2 h em cicloergômetro a 75% do $VO_{2\text{máx}}$	3,5 g de glutamina em 500 ml de água administrados: 60 minutos após início da atividade e 4 vezes após o término da mesma com intervalos de 45 min. entre as doses	Contagem de células, resposta proliferativa a PHA de BMNC e atividade de células NK	Nenhum efeito
Hiscock <i>et al.</i> (2003)	8 atletas submetidos a 3 treinos separados de 2 h de em cicloergômetro a 75% do $VO_{2\text{máx}}$	3,5 g de glutamina em 500 ml de água administrados: 60 min. após início da atividade e 4 vezes após o término da mesma com intervalos entre as doses de 45 min.	Concentração de IL-6 e glutamina plasmática	Concentração de IL-6 aumentou 11 vezes no grupo placebo, 14 vezes no grupo proteína e 18 vezes no grupo glutamina. A redução na concentração de glutamina foi atenuada no grupo glutamina e proteína
Valencia, Marin, Hardy (2002)	3 indivíduos sedentários	0,3 g/Kg/dia por 10 dias	Concentração de glutamina, glutamato e GSH no plasma durante 24 h	Aumentou a concentração de glutamina e glutamato e reduziu a GSH no plasma

Abreviaturas: BMNC = Células mononucleares sanguíneas; LAK = Célula (linfócito) natural killer ativada; ITRS = Infecções do Trato Respiratório Superior; IL = Interleucinas; GSH = Glutathione; PHA = fitohemaglutulina A; IgA = Imunoglobulina A; BCAA = Aminoácidos de

O aumento do volume celular, contudo, não é o único mecanismo pelo qual a glutamina pode influenciar outros sistemas envolvidos na homeostasia celular, tais como o sistema antioxidante. No meio intracelular, a glutamina, pode sofrer hidrólise e elevar a disponibilidade de glutamato, que é essencial para a síntese do principal antioxidante celular, a GSH (CRUZAT *et al.*, 2007). Em um estudo, humanos, após serem submetidos a eventos de estresse metabólico, isto é, cirurgias na região abdominal, foram suplementados, de forma parenteral, durante três dias com L-glutamina. Os resultados mostraram que a intervenção com L-glutamina atenuou a depleção muscular de GSH, o que beneficiou a recuperação dos pacientes. Adicionalmente, a concentração de glutamina plasmática foi maior após a cirurgia no grupo suplementado, se comparado ao controle (FLÄRING *et al.*, 2003). Inversamente ao estudo supracitado, Valencia, Marin e Hardy (2002b), ao investigar os efeitos da suplementação oral com L-glutamina em humanos sedentários, não observaram aumento na concentração de GSH plasmática, embora os valores de glutamina e glutamato plasmáticos tenham se elevado em comparação ao grupo controle do estudo. Uma provável explicação para estes dados contraditórios pode estar na diferença entre a administração oral e parenteral da L-glutamina.

A utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como a L-alanil-L-glutamina, tem representado uma alternativa não invasiva de aumentar as concentrações de glutamina aos tecidos, principalmente o muscular (KLASSEN *et al.*, 2000, ROGERO *et al.*, 2002, ROGERO *et al.*, 2006). Inicialmente, estudos realizados em nosso laboratório verificaram o efeito da suplementação aguda oral com L-glutamina na forma livre ou conjugada (dipeptídeo L-alanil-L-

glutamina) sobre a resposta cinética da concentração plasmática de glutamina. A análise da concentração plasmática de glutamina em ratos foi realizada aos 0, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos após a suplementação aguda (ROGERO *et al.*, 2002). A suplementação oral aguda com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo aumentaram a concentração plasmática de glutamina em relação aos valores basais. Observa-se que, a concentração plasmática de glutamina aos 30 minutos pós-suplementação e a área sob a curva do grupo suplementado agudamente com o dipeptídeo foram superiores às do grupo suplementado com apenas L-glutamina livre (ROGERO *et al.*, 2002).

Uma vez que a resposta cinética da concentração plasmática de glutamina a partir da suplementação com o dipeptídeo foi superior àquela com glutamina livre, avaliou-se também o efeito da suplementação crônica oral com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo sobre as concentrações plasmática, muscular e hepática de glutamina em ratos sedentários (ROGERO *et al.*, 2004). A suplementação crônica com L-glutamina livre ou o dipeptídeo não alterou a glutaminemia; o grupo suplementado com o dipeptídeo, contudo, apresentou maior concentração de glutamina muscular e hepática. Assim nossos estudos em animais sedentários permitiram inferir que a suplementação aguda com L-alanil-L-glutamina promove maior aumento da glutaminemia, enquanto a suplementação crônica promove aumento dos estoques musculares e hepáticos de glutamina (ROGERO *et al.*, 2004).

Posteriormente, nosso laboratório se propôs a avaliar o efeito da suplementação crônica com L-glutamina na forma livre ou conjugada em animais treinados em natação e submetidos a teste de exaustão (ROGERO *et*

al., 2006). Nesse estudo, constatamos que os animais suplementados cronicamente com o dipeptídeo apresentaram maior concentração de glutamina nos músculos sóleo e gastrocnêmio imediatamente após o teste de exaustão em relação aos grupos controle e suplementado com L-glutamina livre.

Desse modo, a partir dos resultados obtidos em nosso laboratório com animais sedentários e treinados, ambos suplementados com o dipeptídeo, evidenciamos que essa intervenção nutricional é eficiente para o fornecimento de glutamina por via oral para o organismo, tanto em situações de repouso quanto em situações de estresse metabólico, como o exercício exaustivo (ROGERO *et al.*, 2006).

Os estudos anteriores aqui observados creditam maior eficiência da suplementação com L-alanil-L-glutamina por esta se apresentar na forma de um dipeptídeo, forma esta menos sujeita à hidrólise e utilização pelas células da mucosa intestinal. Este trabalho, pretendeu investigar se efeitos similares poderiam ser obtidos com a utilização de uma mistura de L-glutamina livre e L-alanina, também livre oferecidas por via oral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições Experimentais

4.1.1 Animais

O presente estudo foi realizado em ratos albinos Wistar, adultos, machos, com peso médio de 229 ± 16 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 CEEA n° 67). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais por sete semanas, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C, umidade relativa do ar de 60% e obedecendo a um ciclo invertido de 12 horas claro e 12 horas escuro (luz acesa às 19:00). Os animais foram pesados 3 vezes por semana e o peso final foi determinado imediatamente antes do sacrifício. O método de sacrifício utilizado foi a decapitação. Durante todo o experimento o consumo de ração foi calculado também três vezes na semana.

Todos os animais foram alimentados de forma *ad libitum* com ração elaborada segundo American Institute of Nutrition (AIN-93) (REEVES *et al.*, 1993) para ratos adultos (Anexo 1 e 2). O período total de experimento incluindo a uma semana de adaptação ao gaioleiro foi de sete semanas.

4.1.2 Suplementação

Os animais dos grupos suplementados receberam o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (1,49 g/Kg de peso/dia), fabricado por Cláris – Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda., fornecido pela empresa Fórmula Medicinal –

Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil, ou os aminoácidos L-glutamina (1 g/Kg de peso/dia) e L-alanina (0,67 g/Kg de peso/dia) na forma livre, ambos cedidos pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. do Brasil. No período de vinte e um dias seguidos, ou seja, nas últimas três semanas do protocolo, os animais receberam as suplementações por meio de sonda gástrica (gavagem). A quantidade do dipeptídeo administrada foi calculada, para que o total de glutamina fosse o mesmo administrado na sua forma livre, ou seja, 1 g de glutamina/kg de peso corporal/dia, dose usual em nutrição clínica (D'SOUZA; TUCK, 2004). O grupo controle recebeu o mesmo volume de água por meio de gavagem. A divisão dos animais em grupos foi feita no meio do protocolo de treinamento, um dia antes do primeiro dia de intervenção nutricional. O peso corporal foi utilizado como parâmetro de divisão, não havendo diferença entre os grupos.

4.1.3 Grupos Experimentais

- **CON-TR:** animais treinados, submetidos a gavagem com água e sacrificados antes do teste de exercício intenso (n = 8).
- **GLN+ALA-TR:** animais treinados, suplementados por meio de gavagem com L-glutamina e L-alanina e sacrificados antes do teste de exercício intenso (n = 8).
- **DIP-TR:** animais treinados, suplementados por meio de gavagem com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e sacrificados antes do teste de exercício intenso (n = 8).

- **CON-INT:** animais treinados, submetidos a gavagem com água e sacrificados imediatamente após o teste de exercício intenso (n = 8).
- **GLN+ALA-INT:** animais treinados, suplementados por meio de gavagem com L-glutamina e L-alanina e sacrificados imediatamente após o teste de exercício intenso (n = 8).
- **DIP-INT:** animais treinados, suplementados por meio de gavagem com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e sacrificados imediatamente após o teste de exercício intenso (n = 8).

4.1.4 Protocolo de treinamento

O treinamento dos animais foi realizado em um sistema de natação desenvolvido para esse fim (VIEIRA *et al.*, 1988), composto de doze tanques individuais de PVC, através dos quais circulava água aquecida por um sistema central de resistência elétrica a uma temperatura de $30 \pm 2^\circ \text{C}$. O período de treinamento foi de seis semanas, cinco dias por semana, com duração diária e sobrecargas descritas na tabela 3.

Durante a primeira semana (semana 1, tabela 3), os animais iniciaram o treinamento progressivo visando sua adaptação ao meio líquido. No primeiro dia da segunda semana de treinamento, foi realizado um protocolo de teste progressivo para determinação do limiar anaeróbio metabólico e sobrecarga de treinamento, sendo semanalmente corrigido pelo peso corporal, como preconizado por Marquezi *et al.*, (2003).

O protocolo do teste de lactato consistiu de exercício agudo de natação com sobrecarga progressiva, sob a forma de pesos atados à cauda do animal,

correspondendo a 4, 5, 6, 7 e 8 % do seu peso corporal, durante períodos de 3 minutos de natação intercalados com 1 minuto de repouso. Visando minimizar qualquer tipo de estresse decorrente da manipulação dos animais e da mudança de ambiente, foi realizado um período de aquecimento com duração de 20 minutos sem sobrecarga.

As coletas de sangue a partir da veia caudal ocorreram aos 10 e 20 minutos do período de aquecimento e nos períodos de sobrecarga. O sangue foi coletado por meio de capilares heparinizados e, posteriormente, foi realizada a dosagem de lactato. O limiar anaeróbio metabólico foi determinado a partir da inflexão da curva de concentração de lactato sanguíneo pela sobrecarga utilizada. O ponto de inflexão da curva corresponde à sobrecarga considerada como carga do limiar anaeróbio metabólico (GRASSI *et al.*, 1999).

Os animais foram treinados durante quatro semanas com sobrecargas correspondentes ao seu limiar anaeróbio metabólico. Dois dias após o último dia de treinamento, os animais foram submetidos a teste de exercício intenso, que teve duração de 2 horas, o dobro do tempo máximo de treinamento. A hora de início do teste foi igual a dos treinamentos e a carga utilizada foi a mesma da última sessão de exercício. Concomitante ao sacrifício de cada animal submetido ao teste foi realizado o sacrifício de um animal do respectivo grupo em situação de repouso. Para que não houvesse influência da variável alimentação, todos os animais que não foram submetidos ao teste tiveram suas rações retiradas 2 horas antes do sacrifício.

Tabela 3. Protocolo de treinamento modificado de Marquezi *et al.* (2003).

Semana 1 (sem sobrecarga)		Semana 2 (sem sobrecarga)		Semana 3 (sobrecarga limiar)	
Dias	Tempo	Dias	Tempo	Dias	Tempo
Segunda	20 min	Segunda	Teste lactato	Segunda	40 min
Terça	20 min	Terça	30 min	Terça	50 min
Quarta	30 min	Quarta	40 min	Quarta	50 min
Quinta	30 min	Quinta	40 min	Quinta	60 min
Sexta	60 min	Sexta	60 min	Sexta	60 min

Semana 4 (sobrecarga limiar)		Semana 5 (sobrecarga limiar)		Semana 6 (sobrecarga limiar)	
Dias	Tempo	Dias	Tempo	Dias	Tempo
Segunda	60 min	Segunda	60 min	Segunda	60 min
Terça	60 min	Terça	60 min	Terça	60 min
Quarta	60 min	Quarta	60 min	Quarta	60 min
Quinta	60 min	Quinta	60 min	Quinta	60 min
Sexta	60 min	Sexta	60 min	Sexta	60 min

4.2 Coletas de sangue e determinações realizadas

Todos os animais foram sacrificados entre 10:40 e 14:40. O sangue foi coletado para a determinação de glutamina, glutamato, amônia, glicose, CK, LDH, TNF- α e PgE₂. O fígado e os músculos gastrocnêmio e sóleo foram removidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior determinação da concentração de glutamina, glutamato, proteína, GSH e GSSG.

4.2.1 Parâmetros plasmáticos e séricos

4.2.1.1 Glutamina

A determinação de glutamina plasmática foi realizada por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), que recomenda a metodologia descrita por Lund (1985). A primeira reação consiste na desaminação da L-glutamina para L-glutamato, por meio da enzima GA. Posteriormente é feita a desidrogenação do L-glutamato para α -cetoglutarato em conjunto com a redução de NAD^+ para NADH. A conversão de NAD^+ para NADH foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UVmini – 1240, Tóquio, Japão) com comprimento de onda de 340 nm. Esta conversão é proporcional à quantidade de glutamina inicial.

4.2.1.2 Glutamato

A determinação de glutamato plasmático foi realizada por meio do kit comercial para glutamina/glutamato (Sigma-Aldrich Diagnostics Inc., Saint Louis, Missouri, EUA), que prescreve a metodologia descrita por Lund (1985). A determinação de glutamato foi baseada na desidrogenação do mesmo para α -cetoglutarato acompanhada pela redução do NAD^+ para NADH. A conversão de NAD^+ para NADH foi medida em um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UVmini – 1240, Tóquio, Japão) com comprimento de onda de 340 nm. Esta conversão é proporcional à quantidade de glutamato na amostra.

4.2.1.3 Amônia

A determinação da amônia plasmática foi realizada por meio do kit comercial para determinação de amônia (Raichem Diagnostics, San Diego, Califórnia, EUA), que prescreve a metodologia descrita por Neeley e Phillipson (1988). A amônia reage com o 2-oxoglutarato e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para formar glutamato e NADP, na reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase. A quantidade de NADPH oxidada é igual ao conteúdo de amônia da amostra em absorbância de 340 nm. A diminuição na quantidade de densidade óptica é proporcional à concentração da amônia plasmática.

4.2.1.4 Glicose

A determinação de glicose plasmática foi realizada por meio do kit comercial para determinação de Glicose PAP (Labtest, Brasil), que segue metodologia descrita por Bergmeyer (1974). O H_2O_2 formado com a adição da enzima glicose oxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio da reação oxidativa de acoplamento formando um antipirilquinonimina vermelha. A intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. A leitura foi feita a 505 nm no mesmo espectrofotômetro Shimadzu, citado acima.

4.2.1.5 Creatina quinase

A atividade de CK total foi determinada utilizando o kit comercial CK-NAC (Labtest, Brasil), que obedece à metodologia descrita por Schumann *et al.* (2002). A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir ATP, que reage com a glicose na presença da hexoquinase, formando glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato, na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase é oxidada a 6-fosfogluconato e reduz o NAD a NADH. A velocidade de aumento na absorbância de 340 nm, medida em um espectrofotômetro termostatizado, à temperatura de 37°C (Hitachi, modelo U-3410, Tóquio, Japão) é proporcional à atividade da CK na amostra.

4.2.1.6 Lactato desidrogenase

A atividade da lactato desidrogenase foi determinada utilizando o kit comercial LDH Liquiform (Labtest, Brasil), que obedece à metodologia descrita por Bergmeyer (1983). A LDH catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância (340 nm) devido a oxidação do NADH, medido em um espectrofotômetro termostatizado (Hitachi, modelo U-3410, Tóquio, Japão), à temperatura de 37°C é proporcional à atividade da LDH na amostra.

4.2.1.7 Fator de necrose tumoral- α e Prostaglandina E₂

Para determinação da concentração do fator de necrose tumoral- α foi utilizado o kit comercial para TNF- α de ratos (ELISA KIT, Assay Designs, Ann

Arbor, Miami, EUA). Para determinação da concentração de prostaglandina E_2 foi utilizado o kit comercial para PgE_2 de alta sensibilidade (ELISA KIT, Assay Designs, Ann Arbor, Miami, EUA).

O ensaio é baseado na competição do fator de necrose tumoral- α e da prostaglandina E_2 da amostra pela quantidade da citocina ou prostaglandina E_2 ligada à enzima marcada. O resultado desta ligação se fixa ao anticorpo imobilizado no fundo dos poços da microplaca. A concentração de TNF- α e da PgE_2 das amostras foi determinada em relação entre a uma curva padrão com concentrações conhecidas e os valores obtidos na leitura. As leituras foram feitas a 405 nm para o TNF- α (conjugado com fosfatase alcalina) e a 450 nm para PgE_2 (conjugada com peroxidase) em um leitor automático de microplacas ELISA (Stat Fax 303 Plus).

4.2.1.8 Lactato

Para a quantificação do lactato no teste durante o treinamento foram coletados 25 μ L de sangue em capilares heparinizados. A dosagem de lactato foi realizada por técnica eletroquímica (Lactímetro, Yellow Springs Instruments, modelo 1500 Sport, EUA) após a estabilização da amostra com fluoreto de sódio a 2%.

4.2.2 Parâmetros teciduais

4.2.2.1 Glutamina e glutamato muscular e hepático

A extração de glutamina e glutamato tecidual foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sahlin *et al.* (1990). As amostras congeladas de músculos (gastrocnêmio e sóleo) e fígado foram pulverizadas em placas de alumínio sob adição constante de nitrogênio líquido, pesadas e imediatamente homogeneizadas em ácido perclórico (0,5 M) gelado. As amostras foram posteriormente centrifugadas (Centrífuga Juan, modelo BR4I, França) a 3000 rpm a 4° C durante 15 minutos. O sobrenadante foi neutralizado com KHCO_3 e, posteriormente, determinada a concentração de glutamina segundo Lund (1985). Os valores médios foram expressos em micromoles de glutamina por grama de tecido e por miligrama de proteína no tecido.

4.2.2.2 GSH e GSSG muscular e hepática

A determinação das concentrações de glutathiona reduzida e oxidada no músculo esquelético e fígado foram realizadas segundo metodologia descrita por Nogueira *et al.* (2005). Em duas placas de alumínio, mantidas constantemente em nitrogênio líquido os tecidos foram macerados e imediatamente homogeneizados a 10% (100 mg/mL) em tampão Tris 37,5 mM e KCL 112 mM, pH 7,4. Após a homogeneização, as amostras foram desproteinizadas com metade do volume de ácido perclórico a 10% e 2 mM de EDTA sob agitação durante 15 minutos. Foram centrifugadas a 9.000 g por 15 minutos, separando-se 0,375 mL do sobrenadante e foram, então, adicionados

0,37 mL de solução fresca de ácido iodoacético (20 mg/mL), 0,337 mL de KOH 2M e KHCO_3 2,4 M. A mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Transcorrido este tempo, foram adicionados 0,75 mL de solução de 2,4 dinitrofluorbenzeno a 0,1% em metanol. A mistura foi incubada por 24 h no escuro a 4°C, centrifugada a 2.400 g por 5 minutos e filtrada em filtro Millex® 0,45 µm (Millipore, Brasil), sendo aplicado 1,0 mL em uma coluna de HPLC Shim-Pack CLC-NH₂ (6,0 X 150), fabricada pela Shimadzu Corp., Japão. O sistema utilizado foi fabricado pela Shimadzu (Tóquio, Japão), composto de duas bombas, forno de colunas, injetor manual e leitor diodearray e programa classe VP. Os tampões utilizados foram: Tampão A, composto de Metanol e água (4:1) e Tampão B, composto de 200 mL de solução 1 (272 g de acetato de sódio tri-hidratado, 122 mL de água e 378 mL de ácido acético glacial) e 800 mL de Tampão A. Para cada amostra a corrida totalizava 30 min.

Curvas com os padrões GSH e GSSG foram realizadas no sistema com a finalidade de determinar o tempo de retenção de cada composto e possibilitar a quantificação na amostras pelo “software”.

4.2.2.3 Proteína muscular e hepática

A determinação da concentração de proteína muscular e hepática foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951) para os homogeneizados de tecidos, sendo os seus valores comparados à curva padrão de albumina. O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares com posterior adição do reagente colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A leitura foi realizada a 660 nm.

4.3 Análise Estatística

As análises serão apresentadas segundo os objetivos citados na presente pesquisa. As médias dos resultados foram primeiramente submetidas a análise de ANOVA multivariada (MANOVA); tal procedimento permite a redução do número de testes simultâneos e, conseqüentemente diminui a chance de erros tipo 1 (HAIR *et al.*, 2005). Para verificar a validade das suposições das MANOVAs e ANOVAs, uma série de controles foi adotada para cada variável dependente. Os resultados foram escaneados por dados discrepantes com técnicas estatísticas assim como por inspeção visual da distribuição dos resultados. O teste de Levene foi utilizado para detectar desvios de homocedasticidade entre os grupos do estudo.

Após a verificação das significâncias das ANOVAs (*two way*), foram realizadas comparações por tratamento e por variável independente. Para cada um dos dois momentos de medição foi executada uma ANOVA (*one way*), sendo a interação nutricional tratada como nível de variável independente.

Quando uma ANOVA resultou em um valor de p menor do que 0,05, diferenças estatisticamente significativas foram identificadas pelo procedimento para comparação múltipla de Tukey (Tukey HSD, de *Honestly Significant Difference*). Já as comparações entre os momentos de medição, para cada interação nutricional foram realizados com testes-*t*, com ajustamento para possível heterocedasticidade. Todos os testes foram realizados com o pacote de software estatístico SAS, versão 9.1.3.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros Biométricos

5.1.1 Consumo de ração

Tabela 4 - Consumo de ração (g/dia) durante o período de seis semanas.

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	21,0 ± 1,4 ^a	20,5 ± 2,1 ^a	20,8 ± 1,4 ^a	0,865
INT	20,5 ± 1,1 ^a	21,1 ± 1,0 ^a	20,9 ± 1,2 ^a	0,573
Δ %	-2,3	2,7	0,4	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação ao consumo de ração durante o período de seis semanas.

5.1.2 Peso corporal

Tabela 5 - Peso (g) dos animais após o período de seis semanas.

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	315,1 ± 29,1 ^a	306,1 ± 19,8 ^a	305,0 ± 16,8 ^a	0,628
INT	304,1 ± 21,4 ^a	307,1 ± 15,0 ^a	309,2 ± 21,7 ^a	0,872
Δ %	-3,5	0,3	1,4	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação ao peso corporal durante o período de seis semanas.

5.2 Parâmetros plasmáticos e séricos

5.2.1 Concentração de glutamina plasmática

Tabela 6 - Concentração de glutamina plasmática (mmol/L).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	0,43 ± 0,18 ^a	0,65 ± 0,23 ^a	0,60 ± 0,25 ^a	0,154
INT	0,76 ± 0,49 ^a	0,64 ± 0,40 ^a	0,77 ± 0,36 ^a	0,809
Δ %	76,1	-0,2	28,0	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 6. Concentração de glutamina plasmática (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação à concentração de glutamina plasmática após o período de seis semanas.

5.2.2 Concentração de glutamato plasmático

Tabela 7 - Concentração de glutamato plasmático (mmol/L).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	0,30 ± 0,08 ^a	0,33 ± 0,14 ^a	0,26 ± 0,08 ^a	0,398
INT	0,33 ± 0,12 ^a	0,22 ± 0,07 ^a	0,27 ± 0,09 ^a	0,117
Δ %	9,0	-34,0	5,4	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 7. Concentração de glutamato plasmático (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação à concentração de glutamato plasmático após o período de seis semanas.

5.2.3 Concentração de amônia plasmática

Tabela 8 - Concentração de amônia plasmática ($\mu\text{mol/mL}$).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	6,14 $\pm$ 2,10 ^a	6,18 $\pm$ 2,61 ^a	4,94 $\pm$ 1,46 ^a	0,163
INT	11,91 $\pm$ 2,22 ^a	6,30 $\pm$ 1,84 ^b	7,43 $\pm$ 1,76 ^b	0,005
Δ %	93,9 **	2,0	50,3	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 8. Concentração de amônia plasmática (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 8 e a figura 8, a concentração de amônia plasmática após o teste de exercício intenso foi 47,1% e 37,6% maior no grupo CON-INT em relação aos grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT, respectivamente. O grupo CON-INT apresentou aumento significativo de 93,9% na concentração de amônia plasmática, em relação ao grupo CON-TR.

5.2.4 Concentração de glicose sérica

Tabela 9 - Concentração de glicose sérica (mg/dL).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	96,4 ± 12,7 ^a	95,7 ± 9,4 ^a	91,3 ± 15,1 ^a	0,778
INT	103,8 ± 4,7 ^a	79,6 ± 14,2 ^a	89,4 ± 11,5 ^a	0,115
Δ %	7,6	-16,8	-2,1	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 9. Concentração sérica de glicose (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo na concentração glicose plasmática.

5.2.5 Concentração plasmática de creatina quinase

Tabela 10 - Concentração plasmática de creatina quinase (U/mL).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	17,9 ± 7,9 ^a	7,3 ± 4,5 ^b	7,5 ± 6,0 ^b	0,004
INT	12,7 ± 8,2 ^a	12,0 ± 3,7 ^a	13,8 ± 6,9 ^a	0,782
Δ %	-28,7	106,2 **	84,7	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 10. Concentração plasmática de creatina quinase (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Os grupos GLN+ALA-TR e DIP-TR apresentaram redução de 59,1% e 58,1% na concentração de CK no plasma em relação ao grupo CON-TR. Após o teste de exercício intenso foi observado aumento de 106,2% na concentração de CK do grupo GLN+ALA-INT, se comparado ao grupo GLN+ALA-TR.

5.2.6 Concentração plasmática de lactato desidrogenase

Tabela 11 - Concentração plasmática de lactato desidrogenase (U/mL).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	216,3 ± 41,8 ^a	253,6 ± 28,5 ^a	223,8 ± 35,4 ^a	0,111
INT	236,3 ± 29,2 ^a	200,1 ± 49,3 ^a	229,8 ± 19,0 ^a	0,111
Δ %	9,2	-21,1 *	2,7	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 11. Concentração plasmática de lactato desidrogenase (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 11 e a figura 11, a concentração de LDH foi 21,1% menor após o teste de exercício intenso no grupo GLN+ALA-INT, quando comparado ao grupo GLN+ALA-TR.

5.2.7 Concentração plasmática do fator de necrose tumoral- α

Tabela 12 - Concentração de TNF- α (pg/mL).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	33,6 $\pm$ 11,8 ^a	32,2 $\pm$ 9,1 ^a	34,3 $\pm$ 6,8 ^a	0,902
INT	43,2 $\pm$ 14,8 ^a	18,8 $\pm$ 6,2 ^b	25,8 $\pm$ 11,0 ^b	0,001
Δ %	28,6	-41,5 **	-24,7	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 12. Concentração plasmática de TNF- α (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 12 e a figura 12, a concentração plasmática de TNF- α foi 56,4% e 40,3% menor após o teste de exercício intenso nos grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT, se comparado ao grupo CON-INT.

5.2.8 Concentração plasmática de Prostaglandina E₂

Tabela 13 - Concentração de PgE₂ (pg/mL).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	4.096,5 ± 1.585 ^a	3.743,9 ± 1.579 ^a	3.529,7 ± 1.702 ^a	0,781
INT	5.018,8 ± 2.427 ^a	3.344,5 ± 1.053 ^{ab}	2.586,0 ± 939 ^b	0,020
Δ %	22,5	-10,7	-26,7	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 13. Concentração plasmática de Prostaglandina E₂ (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 13 e a figura 13, a concentração de PgE₂ foi 48,5% menor no grupo DIP-INT em comparação ao grupo CON-INT.

5.3 Parâmetros teciduais

5.3.1 Concentração de glutamina no músculo sóleo

Tabela 14 - Concentração de glutamina no músculo sóleo (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$4,66 \pm 1,47^b$	$8,18 \pm 2,25^a$	$6,12 \pm 1,35^{ab}$	0,002
INT	$4,29 \pm 1,84^b$	$7,50 \pm 2,56^a$	$8,05 \pm 3,90^a$	0,035
$\Delta \%$	-7,9	-8,3	31,6	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 14. Concentração de glutamina no músculo sóleo (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 14 e a figura 14, a suplementação com L-glutamina na forma livre promoveu aumento na concentração de glutamina no músculo sóleo da ordem de 75,7%, se comparado ao grupo CON-TR. Após o teste de exercício intenso, a concentração de glutamina no grupo GLN+ALA-

INT e DIP-INT foi 74,9% e 87,6% superior, se comparado ao grupo CON-INT, respectivamente.

5.3.2 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total do músculo sóleo

Tabela 15 - Razão entre as concentrações musculares de glutamina e proteína total (nmol de glutamina/mg de proteína).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	30,8 ± 16,0 ^b	52,1 ± 16,8 ^a	40,6 ± 11,7 ^{ab}	0,034
INT	28,1 ± 11,1 ^b	45,2 ± 16,8 ^a	46,4 ± 24,8 ^a	0,021
Δ %	-8,7	-13,1	14,2	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 15. Razão entre a concentração de glutamina e proteína total do músculo sóleo (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 15 e a figura 15 o grupo GLN+ALA-TR apresentou aumento de 68,8% na razão entre glutamina/proteína total no músculo sóleo. Após o teste de exercício intenso os grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT apresentaram concentração superior de glutamina/proteína total no músculo sóleo, valores da ordem de 60,7% e 64,8%, em relação ao grupo CON-INT.

5.3.3 Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio

Tabela 16 - Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	2,39 $\pm$ 2,35 ^a	2,67 $\pm$ 1,74 ^a	3,17 $\pm$ 1,44 ^a	0,708
INT	2,47 $\pm$ 1,25 ^a	2,77 $\pm$ 1,76 ^a	3,33 $\pm$ 2,47 ^a	0,654
Δ %	3,1	3,5	5,1	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 16. Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo em relação a concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio.

5.3.4 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total do músculo gastrocnêmio

Tabela 17 - Razão entre as concentrações musculares de glutamina e proteína total (nmol de glutamina/mg de proteína).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	16,1 ± 15,6 ^a	16,9 ± 12,4 ^a	17,4 ± 8,4 ^a	0,981
INT	16,8 ± 10,2 ^a	22,2 ± 11,9 ^a	20,8 ± 16,3 ^a	0,696
Δ %	4,1	31,4	19,6	

Dados expressos em média e desvio padrão; *n* = 8 por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * *p* < 0,05; ** *p* < 0,005 (*teste t*).

Figura 17. Razão entre a concentração de glutamina e proteína total do músculo gastrocnêmio (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo no cálculo da razão de glutamina/proteína total do músculo gastrocnêmio.

5.3.5 Concentração de glutamina hepática

Tabela 18 - Concentração de glutamina hepática (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$2,88 \pm 1,48^a$	$3,04 \pm 0,92^a$	$3,11 \pm 1,15^a$	0,923
INT	$2,20 \pm 0,91^a$	$2,17 \pm 0,73^a$	$3,13 \pm 1,24^a$	0,108
$\Delta \%$	-23,4	-28,7	0,8	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 18. Concentração hepática de glutamina (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo em relação a concentração de glutamina hepática.

5.3.6 Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total

Tabela 19 - Razão entre as concentrações hepáticas de glutamina e proteína total (nmol de glutamina/mg de proteína).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	17,7 ± 11,0 ^a	18,7 ± 7,3 ^a	19,3 ± 8,7 ^a	0,943
INT	12,6 ± 6,4 ^a	12,2 ± 4,7 ^a	16,4 ± 8,1 ^a	0,386
Δ %	-28,8	-34,8	-15,1	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 19. Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo no cálculo da razão de glutamina hepática/proteína hepática total.

5.3.7 Concentração de glutamato no músculo sóleo

Tabela 20 - Concentração de glutamato no músculo sóleo (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$1,40 \pm 0,22^b$	$2,69 \pm 0,45^a$	$2,64 \pm 0,64^a$	0,005
INT	$0,98 \pm 0,26^b$	$2,32 \pm 0,45^a$	$2,41 \pm 0,87^a$	0,005
$\Delta \%$	-30,0 **	-13,7	-8,8	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 20. Concentração de glutamato no músculo sóleo (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre, no grupo GLN+ALA-TR, quanto com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, no grupo

DIP-TR promoveram aumento na concentração de glutamato no músculo sóleo de 92,5% e 88,9% em relação ao grupo CON-TR, respectivamente. Após o teste de exercício intenso, os grupos suplementados, GLN+ALA-INT e DIP-INT apresentaram concentração superior de glutamato da ordem de 137,3% e 146,1% em relação ao grupo CON-INT, respectivamente. O efeito do exercício intenso sobre a concentração de glutamato ocorreu somente no grupo CON-INT, onde uma redução de 30,0% foi observada, em relação ao grupo CON-TR.

5.3.8 Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio

Tabela 21 - Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$0,53 \pm 0,12^b$	$0,49 \pm 0,11^b$	$0,74 \pm 0,09^a$	0,005
INT	$0,38 \pm 0,09^b$	$0,57 \pm 0,06^a$	$0,56 \pm 0,06^a$	0,005
$\Delta \%$	-27,5 *	16,3	-24,5 **	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 21. Concentração glutamato no músculo gastrocnêmio (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 21 e a figura 21, o grupo DIP-TR apresentou um aumento de 39,8% e de 50,1% na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, quando comparado aos grupos CON-TR e GLN+ALA-TR, respectivamente. Após o teste de exercício intenso, o grupo CON-INT apresentou diminuição de 50,0% e 45,6% na concentração de glutamato no

músculo gastrocnêmio em relação aos grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT, respectivamente. Verificou-se também que o exercício intenso promoveu uma diminuição de 27,5% e 24,5% na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio dos grupos CON-INT e DIP-INT, quando comparado aos seus respectivos grupos não submetidos ao teste, CON-TR e DIP-TR.

5.3.9 Concentração de glutamato hepático

Tabela 22 - Concentração de glutamato hepático (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	1,36 $\pm$ 0,47 ^b	1,49 $\pm$ 0,55 ^b	2,18 $\pm$ 0,37 ^a	0,005
INT	1,72 $\pm$ 0,28 ^a	1,85 $\pm$ 0,19 ^a	1,91 $\pm$ 0,15 ^a	0,212
Δ %	26,5	24,3	-12,2	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 22. Concentração de glutamato hepático (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

Em relação à concentração de glutamato hepático, o grupo DIP-TR apresentou aumento de 60,1% e 46,4%, quando comparado aos grupos CON-TR e GLN+ALA-TR, respectivamente.

5.3.10 Concentração de GSH no músculo sóleo

Tabela 23 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no músculo sóleo ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$0,27 \pm 0,08^b$	$0,31 \pm 0,10^{ab}$	$0,45 \pm 0,16^a$	0,018
INT	$0,32 \pm 0,16^a$	$0,48 \pm 0,19^a$	$0,54 \pm 0,25^a$	0,108
$\Delta \%$	21,8	53,5	21,3	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 23. Concentração de GSH no músculo sóleo (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 23 e a figura 23, a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina aumentou em 68,5% a concentração de GSH no músculo sóleo do grupo DIP-TR, se comparado ao grupo CON-TR.

5.3.11 Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo

Tabela 24 - Razão entre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no músculo sóleo ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$6,36 \pm 1,14^b$	$9,75 \pm 1,26^a$	$10,53 \pm 2,36^a$	0,001
INT	$6,68 \pm 1,48^b$	$9,41 \pm 2,16^a$	$10,29 \pm 2,42^a$	0,006
$\Delta \%$	4,9	-3,4	-2,3	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 24. Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 24 e a figura 24, o cálculo da razão entre GSH/GSSG no músculo sóleo demonstra aumento de 53,1% e 65,5% nos grupos GLN+ALA-TR e DIP-TR, em relação ao grupo CON-TR. Após o teste de exercício intenso, os grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT apresentaram 40,8% e 54,0% maior razão de GSH/GSSG, em relação ao grupo CON-INT.

5.3.12 Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio

Tabela 25 - Concentração de glutatona reduzida (GSH) no músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$0,24 \pm 0,01^a$	$0,28 \pm 0,05^a$	$0,39 \pm 0,21^a$	0,300
INT	$0,18 \pm 0,04^a$	$0,22 \pm 0,02^{ab}$	$0,31 \pm 0,10^b$	0,054
$\Delta \%$	-24,3 *	-20,2	-20,8	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 25. Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 25 e a figura 25, a concentração de GSH no músculo gastrocnêmio do grupo DIP-INT foi 65,5% superior se comparado ao grupo CON-INT. A realização do exercício intenso no grupo controle (CON-INT) promoveu redução de 24,3% na concentração de GSH do músculo gastrocnêmio, se comparado ao grupo CON-TR.

5.3.13 Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio

Tabela 26 - Razão entre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$6,18 \pm 0,40^{ab}$	$5,08 \pm 1,29^a$	$8,65 \pm 1,78^b$	0,010
INT	$5,57 \pm 1,26^a$	$6,20 \pm 1,45^a$	$6,44 \pm 1,65^a$	0,698
$\Delta \%$	-9,8	22,1	-25,6	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 26. Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 26 e a figura 26, o cálculo da razão entre GSH/GSSG no músculo gastrocnêmio demonstra aumento de 70,3% no grupo DIP-TR, em relação ao grupo GLN+ALA-TR.

5.3.14 Concentração hepática de GSH

Tabela 27 - Concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$0,65 \pm 0,15^b$	$0,90 \pm 0,16^a$	$0,89 \pm 0,17^a$	0,022
INT	$0,55 \pm 0,20^b$	$0,86 \pm 0,11^a$	$0,93 \pm 0,14^a$	0,005
$\Delta \%$	-16,3 *	-4,4	4,5	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 27. Concentração hepática de GSH (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 27 e a figura 27, a concentração hepática de GSH foi 37,2% e 37,4% superior nos grupos GLN+ALA-TR e DIP-TR, em relação ao grupo CON-TR. Após o teste de exercício intenso, os grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT apresentaram 58,4% e 69,3% mais GSH no fígado, se comparado ao grupo CON-INT, respectivamente. O grupo CON-INT

apresentou redução de 17,8% na concentração de GSH hepática, quando comparado ao grupo CON-TR.

5.3.15 Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG

Tabela 28 - Razão entre a concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	$6,41 \pm 0,98^b$	$7,42 \pm 1,84^{ab}$	$9,28 \pm 1,57^a$	0,004
INT	$6,47 \pm 1,42^b$	$8,98 \pm 2,06^a$	$9,17 \pm 1,31^a$	0,005
$\Delta \%$	0,9	20,9	-1,2	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); $\Delta\%$ percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Figura 28. Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG (médias e erro padrão). Letras diferentes em cada momento indicam diferença estatisticamente significativa entre as suplementações (*Tukey HSD*). Colchetes indicam diferença estatisticamente significativa entre os momentos (*teste t*).

De acordo com a tabela 28 e a figura 28, o cálculo da razão entre GSH/GSSG demonstra aumento de 44,7% no grupo DIP-TR, em relação ao CRUZAT, V. F.

grupo CON-TR. Após o teste de exercício intenso, na mesma razão é observada elevação de 38,8% e 41,7% nos grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT, em relação ao grupo CON-INT.

5.3.16 Concentração de proteína no músculo sóleo

Tabela 28 - Concentração de proteína no músculo sóleo (mg/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	16,3 ± 3,5 ^a	16,3 ± 2,6 ^a	16,0 ± 3,3 ^a	0,978
INT	15,3 ± 1,7 ^a	17,1 ± 1,7 ^a	16,3 ± 1,5 ^a	0,109
Δ %	-6,3	5,1	1,4	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo na concentração de proteína total do músculo sóleo.

5.3.17 Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio

Tabela 29 - Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio (mg/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	17,4 ± 2,8 ^a	19,1 ± 4,4 ^a	20,3 ± 2,7 ^a	0,261
INT	18,6 ± 4,8 ^a	18,3 ± 4,6 ^a	18,9 ± 4,0 ^a	0,965
Δ %	7,0	-4,4	-6,8	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo na concentração de proteína total do músculo gastrocnêmio.

5.3.18 Concentração de proteína hepática

Tabela 30 - Concentração de proteína hepática (mg/g de tecido fresco).

	CON	GLN+ALA	DIP	P
TR	19,2 ± 3,2 ^a	18,6 ± 3,2 ^a	18,3 ± 3,2 ^a	0,854
INT	20,2 ± 3,7 ^a	21,1 ± 3,5 ^a	21,6 ± 3,9 ^a	0,749
Δ %	5,4	13,8	18,1	

Dados expressos em média e desvio padrão; $n = 8$ por grupo. Letras diferentes indicam diferença estatística entre as suplementações (*Tukey HSD*); Δ% percentual de diferença entre treinados (TR) e submetidos a exercício intenso (INT); * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (*teste t*).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo na concentração de proteína total hepática.

6. DISCUSSÃO

Desde os estudos de Eagle, em 1955, o metabolismo da glutamina vem sendo pesquisado. Os recentes avanços da tecnologia permitiram evidenciar a importante participação e influência da glutamina não só no metabolismo de vários tipos celulares, mas também na expressão gênica de proteínas, fatores de transcrição e sinalização celular (BRENNAN *et al.*, 2003, CURI *et al.*, 2005a, CORLESS *et al.*, 2006).

A manutenção das funções de órgãos e tecidos, tais como rins, fígado, intestino, coração, neurônios, células do sistema imunológico, entre outras, está relacionada, de alguma forma, com a concentração e disponibilidade de glutamina corporal (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002, LAGRANHA *et al.*, 2005, CORLESS *et al.*, 2006). De acordo com Newsholme *et al.* (2003a) e Newsholme *et al.* (2003b), a glutamina (assim como a glicose) é um nutriente indispensável para as células participando de processos que envolvem tanto a manutenção quanto o crescimento celular. A síntese de proteínas e nucleotídeos, o equilíbrio ácido-básico, a via da gliconeogênese, entre outros, são alguns exemplos da participação da glutamina no metabolismo (CURI, 2000). Embora não seja o único, o tecido muscular exerce importante influência sobre a concentração de glutamina corporal, pois o tecido muscular é, quantitativamente, o mais relevante sítio de síntese, estoque e liberação de glutamina (CURI *et al.*, 2005a).

Tanto o senso comum quanto diversas pesquisas científicas apontam que a freqüente realização de exercícios físicos em intensidades moderadas não só traz benefícios para a saúde, mas também reduz o risco de doenças

(RADAK *et al.*, 2001, NOBREGA, 2005, PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Outros estudos, no entanto, salientam que a realização de exercícios físicos intensos e prolongados ou treinos exaustivos, ou ainda, esportes que possuem uma frequência de treinamento muito elevada podem promover efeitos adversos à saúde (LIJNEN; HESPEL; FAGARD, 1988, RADAK *et al.*, 2001). Exercícios intensos são geralmente praticados por atletas bem treinados, porém, mesmo assim, estes indivíduos estão sujeitos a efeitos, tais como cansaço e fadiga crônica, maior quantidade e gravidade de lesões, inflamação crônica, queda de rendimento, *overtraining*, redução da resistência a bactérias e vírus e, conseqüentemente, aumento do risco de infecções, principalmente as ITRS, redução da mobilidade corporal, entre outros (KEAST *et al.*, 1995, CASTELL; POORTMANS; NEWSHOLME, 1996, HOOGEVEEN; ZONDERLAND, 1996, CASTELL; NEWSHOLME, 1997). Pesquisas demonstraram que tais efeitos podem ser decorrentes da redução na disponibilidade de glutamina, que ocorre pelo desequilíbrio entre sua síntese e degradação durante e após exercícios intensos e prolongados (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989, CASTELL; POORTMANS; NEWSHOLME, 1996, ROHDE *et al.*, 1998, KOYAMA *et al.*, 1998, SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007). Considerando tais premissas, alternativas nutricionais, tais como a suplementação com L-glutamina têm sido investigadas com o objetivo de atenuar os efeitos promovidos por exercícios intensos, prolongados ou de caráter exaustivo.

São diversos os trabalhos que, ao investigarem os efeitos da suplementação oral com L-glutamina tanto em humanos quanto em animais saudáveis envolvidos com exercícios físicos, demonstraram baixa eficácia

desta intervenção nutricional (CASTELL *et al.*, 1997, ROHDE *et al.*, 1998, KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001a, KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001b, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002b). Uma vez que a glutamina está envolvida na proliferação celular, e uma das células que mais a utilizam são os enterócitos, menores quantidades desse aminoácido são repassadas para outros tecidos e células do corpo (GARDNER, 1975, ADIBI, 2003, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Uma taxa entre 50% e 80% do total de L-glutamina na forma livre, administrada por via oral pode ficar retida pelos enterócitos (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991, D'SOUZA; TUCK, 2004). Além disso, uma parte da glutamina que escapou dos enterócitos pode, ainda, ser utilizada pelo fígado. Desta forma, uma reduzida quantidade de glutamina estaria disponível para outras células e tecidos, tais como as células do sistema imune e músculos esqueléticos.

Estudos realizados por Minami, Morse e Adibi (1992) sugerem que a utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como a L-alanil-L-glutamina pode representar uma eficiente intervenção nutricional para o fornecimento de glutamina por via oral ao organismo, quando comparada a utilização de L-glutamina na forma livre. Esses efeitos foram observados tanto em situações de repouso, quanto em situações de estresse metabólico, como exercícios de caráter exaustivo (ROGERO *et al.*, 2002, ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006). O presente trabalho, entretanto, buscou comparar não somente os efeitos da suplementação oral com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, mas também de uma solução com L-glutamina associada à L-alanina (grupo GLN+ALA-TR e GLN+ALA-INT), ambas na forma de aminoácidos livres. Cabe salientar que estes grupos receberam a mesma quantidade de nitrogênio e calorias advindas dos mesmos aminoácidos que os grupos suplementados com

o dipeptídeo. Não há conhecimento de estudos que investigaram os efeitos da suplementação por via oral de uma solução com fórmula igual ao dipeptídeo, mas com os aminoácidos dispostos na forma livre.

Em relação ao peso corporal e ao consumo de ração, durante o presente estudo não foram observadas alterações decorrentes das intervenções nutricionais, bem como do treinamento de natação. Estes resultados estão de acordo com outras pesquisas onde não se constatarem alterações nesses parâmetros em animais submetidos a exercícios físicos e à suplementação por via oral com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo (YU *et al.*, 1996, KOYAMA *et al.*, 1998, ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, as intervenções nutricionais, bem como o teste de exercício intenso não promoveram alterações estatisticamente significativas na concentração plasmática de glicose e dos aminoácidos glutamina e glutamato. Em alguns trabalhos com humanos e animais, a análise da cinética da glutamina revelou que, imediatamente após administração oral com L-glutamina, na forma livre ou como dipeptídeo, um aumento na glutaminemia foi observado (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991, ROGERO *et al.*, 2002). Os valores máximos deste aumento tendem a ser encontrados aproximadamente após 30 minutos da suplementação com L-glutamina na forma livre (CASTELL; NEWSHOLME, 1997, BOZA *et al.*, 2000) e entre 40 e 60 minutos da suplementação com L-glutamina na forma de dipeptídeo (KLASSEN *et al.*, 2000, ROGERO *et al.*, 2004). Contudo, ao transcorrer de 180 minutos, a concentração plasmática de glutamina retornou aos valores próximos aos basais, seja na forma livre ou como dipeptídeo (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991,

CASTELL; NEWSHOLME, 1997, BOZA *et al.*, 2000, KLASSEN *et al.*, 2000, ROGERO *et al.*, 2004).

Os efeitos da suplementação oral crônica com L-glutamina, seja na forma livre ou como dipeptídeo, sobre a concentração plasmática de glutamina e glutamato, tanto em humanos, como em animais, ainda é controversa (FLARING *et al.*, 2003, ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006, WALSH *et al.*, 2000). Elevadas concentrações de glutamina e glutamato no sóleo e glutamato no gastrocnêmio e fígado foram observadas nos grupos GLN+ALA-TR e DIP-TR, respectivamente. Isto indica que, após ambas suplementações, um aumento transitório na glutaminemia ocorreu, fato que estimulou a captação de glutamina pelos tecidos. Segundo outros autores (PARRY-BILLINGS; NEWSHOLME, 1991, HISCOCK; PEDERSEN, 2002), é provável que o aumento muscular, que é regulado por mecanismos de retroalimentação negativa, tenha diminuído a liberação de glutamina para o plasma.

Algumas pesquisas mostraram que, imediatamente após a realização de exercícios considerados como exaustivos, a glutaminemia nem sempre é alterada (DOHM *et al.*, 1981, ROHDE *et al.*, 1996, WALSH *et al.*, 1998a, HISCOCK *et al.*, 2003). Com maior frequência, uma redução na concentração de glutamina é observada algumas horas (cerca de 2 horas ou mais) após o termino do exercício. É provável que esta redução ocorra principalmente em função da elevada utilização de glutamina por células do sistema imune, tais como linfócitos, neutrófilos e macrófagos (KEAST *et al.*, 1995, ROHDE *et al.*, 1996, WALSH *et al.*, 1998a, CURI, 2000, HISCOCK *et al.*, 2003).

Tanto em humanos quanto em animais a exaustão pode ser caracterizada pela desistência ou total impossibilidade de continuação do

exercício. O teste de exercício intenso utilizado em nosso estudo teve duração fixa de 2 horas, ou seja, o dobro do tempo em que os animais estavam acostumados a treinar. Isso foi feito para que não houvesse diferença no tempo até a exaustão de cada animal. A média de sobrecarga de trabalho no dia do teste foi de 6% do peso corporal de cada animal, intensidade próxima ao limiar anaeróbio metabólico. Uma vez que estudos anteriores encontraram menor concentração de glutamina, imediatamente após um teste exaustivo similar (ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006), não é afastada a hipótese de que, no presente trabalho, o teste não tenha sido intenso ou prolongado o suficiente para alterar a glutaminemia dos animais. Outrossim, de acordo com Hiscock e Pedersen (2002) e Hammarqvist *et al.* (2005), mesmo em condições de elevado catabolismo muscular, a concentração de aminoácidos no plasma pode não ser alterada, não refletindo necessariamente alterações em tecidos, especialmente o muscular.

Poucas alterações foram encontradas em relação à concentração glutamato plasmático, mesmo em condições de elevado catabolismo muscular, tais como sepse, cirurgias e exercícios prolongados, onde células necessitam de elevada disponibilidade deste aminoácido para a síntese de outros compostos. De acordo com Rutten *et al.* (2005), este fato pode ser creditado ao transportador de glutamato (denominado X_{ag}^-), que está localizado na membrana celular. X_{ag}^- apresenta uma alta afinidade para o glutamato, contudo seu K_m é muito elevado ($\pm 1000 \mu\text{mol/L}$) em relação à concentração plasmática de glutamato ($\pm 64 \mu\text{mol/L}$). Desta forma, o transporte de glutamato para o interior das células é limitado.

Entre os fatores estressantes promovidos pelo treinamento prolongado está a produção de amônia plasmática, efeito combinado da desaminação das purinas e catabolismo de aminoácidos dentro das miofibrilas (GRAHAM *et al.*, 1995, NIBO *et al.*, 2005). A suplementação com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo na quantidade equivalente a 1 g de glutamina/Kg/dia não é considerada uma dose baixa e usual (D'SOUZA; TUCK, 2004, GARLICK, 2004). No presente estudo, entretanto, esta concentração não resultou em hiperamonemia, e até animais do grupo DIP-TR tiveram a concentração de amônia diminuída, embora não de modo significativo.

De maneira diferente, os animais do grupo controle, submetidos ao teste de exercício intenso (CON-INT) apresentaram, como era de se esperar, uma hiperamonemia que chegou a 93,9% em comparação à concentração apresentada pelo grupo CON-TR. Em compensação, as suplementações reduziram os níveis de amônia para valores próximos ou pouco acima daqueles verificados antes do teste de exercício intenso.

Seja antes ou após a realização do exercício intenso, uma maior concentração de glutamina e glutamato no músculo sóleo dos grupos suplementados foi encontrada. Este dado permite inferir que a amônia produzida pelo exercício intenso serviu de substrato para a síntese de glutamina por meio da ação da GS. O efeito de ambas as suplementações não só atenuou a acidose metabólica, normalmente induzida por exercícios de caráter exaustivo, mas também aumentou a disponibilidade de glutamina, que, de acordo com Hood e Terjung (1994) e Newsholme *et al.* (2003b) poderia ser transportada para fora da célula muscular e servir de substrato para outros órgãos e células do corpo.

Em nosso estudo, a concentração de amônia plasmática no grupo controle aumentou 93,9% após o teste de exercício intenso. Tal efeito promovido pelo exercício está possivelmente relacionado à diminuição da concentração intramuscular de ATP e, principalmente, de glutamato, o que foi observado nos músculos gastrocnêmico e sóleo dos grupos controle. Hood e Terjung (1994) e Graham *et al.* (1995) verificaram que esta diminuição inibe a atividade da enzima glutamina sintetase, evitando, conseqüentemente, que a amônia, produzida pelo exercício seja removida na forma de glutamina.

Por outro lado, as intervenções nutricionais com L-glutamina, associada à L-alanina, ambas na forma livre, ou com L-glutamina na forma de dipeptídeo promoveram alterações distintas na concentração de glutamina e glutamato musculares.

A suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre resultou em uma maior (75,7%) concentração de glutamina no músculo sóleo, em relação ao grupo controle do mesmo momento (CON-TR). Já, após o teste de exercício intenso, ambas as intervenções nutricionais aumentaram em mais de 70% a concentração de glutamina no músculo sóleo se comparado ao grupo CON-INT. Tais resultados foram obtidos também quando as concentrações de glutamina são expressas em função do conteúdo protéico total (concentração de glutamina/proteína total).

Rogero *et al.* (2006) encontraram, após um teste até a exaustão, maiores valores de glutamina no músculo sóleo de animais suplementados com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina o que foi atribuído à elevada concentração de glutamato naquele músculo, parte característica do ciclo glutamina-glutamato. Deve ser observado que, na reação catalisada pela

enzima GS e com gasto de ATP, o glutamato reage com a amônia, formando glutamina (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996). Nossos resultados estão de acordo com esta teoria, pois no músculo sóleo a intervenção nutricional promoveu uma maior concentração de glutamato que, em conjunto com a amônia produzida pelo exercício pode ter estimulado a síntese de glutamina. Cabe salientar que em nosso estudo, contudo, tal efeito somente foi encontrado no músculo sóleo, estando ausente no gastrocnêmio.

Em animais não submetidos ao teste de exercício intenso, as intervenções nutricionais com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo aumentaram em 92,5% e 88,9% respectivamente, a concentração de glutamato no músculo sóleo. Em animais submetidos ao teste de exercício intenso, um efeito ainda mais pronunciado das suplementações foi encontrado. Enquanto que no grupo controle a realização do teste promoveu redução na concentração de glutamato, a administração com L-glutamina na forma livre aumentou em 1,37 vezes e na forma de dipeptídeo em 1,46 vezes a concentração de glutamato no músculo sóleo. Desse modo, os resultados indicam, claramente que ambas as suplementações com L-glutamina, seja na forma livre ou como dipeptídeo foram eficazes em atenuar a redução na concentração de glutamato no músculo sóleo tanto antes quanto após um teste de exercício intenso de natação.

Uma vez que, no presente estudo, o exercício utilizado teve, na maior parte das sessões, duração de uma hora e de forma contínua, este é caracterizado como predominantemente aeróbio. Pelos dados da literatura (STARON *et al.*, 1984, GRAHAM; MACLEAN, 1998) é fato conhecido que nestes tipos de exercícios a solicitação de fibras do tipo do tipo 1 (mais CRUZAT, V. F.

oxidativas) é superior, se comparada à de fibras do tipo 2 (mais glicolíticas). Embora possa haver uma variação, de acordo com fatores genéticos ou adaptativos ao treinamento, em geral, o músculo sóleo é predominantemente ($\geq 80\%$) composto por fibras do tipo 1 (STARON *et al.*, 1984, LEARY *et al.*, 2003).

Sob observação microscópica verifica-se que fibras do tipo 1, apresentam maior quantidade de mitocôndrias em relação a fibras do tipo 2 (LEARY *et al.*, 2003). Vários estudos indicam que as mitocôndrias representam um dos principais sítios de síntese de ERO do organismo (JI, 1995, SERVAIS *et al.*, 2003, MASTALLOUDIS *et al.*, 2004a, FINAUD; FILAIRE, 2006). É possível que uma redução na concentração de compostos envolvidos com a síntese de antioxidantes possa tornar as células mais suscetíveis aos efeitos oxidativos promovidos pelas ERO, que incluem a PL, lesão ao DNA e oxidação de proteínas essenciais à homeostasia celular (DRÖGE, 2002, MASTALLOUDIS *et al.*, 2004a, MASTALLOUDIS *et al.*, 2004b).

A síntese de GSH, principal antioxidante celular não enzimático do organismo, depende da disponibilidade de cisteína, glicina e glutamato (JI, 1995; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002a, FLÄRING *et al.*, 2003). O glutamato representa a primeira e provavelmente a mais importante etapa na síntese dos compostos integrantes da GSH (LUO *et al.*, 1996, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b). A determinação da concentração deste antioxidante no músculo sóleo permitiu que fosse testada a hipótese de uma maior disponibilidade de glutamato muscular, que é, por sua vez, dependente da disponibilidade e transporte de glutamina para dentro da célula, elevar a quantidade de GSH intracelular. Uma vez que a GSH reage com as ERO, tais como o H_2O_2 , há

uma redução da interação desses compostos reativos com outras proteínas e íons metálicos, ou ainda, com membranas celulares, o que pode resultar em menor estresse oxidativo (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001a).

Os resultados da determinação de GSH no músculo sóleo dos grupos suplementados com L-glutamina na forma livre demonstraram que, embora tenha ocorrido aumento na concentração de glutamina e glutamato musculares, estes aminoácidos não influenciaram, de forma significativa, a concentração de GSH, quer antes quer após o teste de exercício intenso de natação. A suplementação com o dipeptídeo, no grupo DIP-TR, entretanto, demonstra que a maior concentração de glutamato no músculo sóleo aumentou a sua concentração de GSH, que foi 68,5% superior, quando comparada ao grupo CON-TR. Sob este aspecto, a suplementação com L-glutamina na forma de dipeptídeo parece ser mais vantajosa em relação a sua utilização na forma livre.

O cálculo da razão entre GSH/GSSG (importante índice do estado redox celular) sugere outro efeito no músculo sóleo, tanto nos grupos suplementados com L-glutamina livre, como naqueles que receberam o dipeptídeo. Antes e após o teste de exercício intenso, os animais dos grupos GLN+ALA-TR e GLN+ALA-INT demonstraram aumento de 53,1% e 65,5% na razão de GSH/GSSG, em relação aos respectivos grupos controle. Da mesma forma, os grupos suplementados com o dipeptídeo apresentaram aumento de 40,8% e 54,0% na razão GSH/GSSG, antes e após o teste de exercício intenso. Estes valores nos permitem inferir que tanto a mistura de aminoácidos livres quanto o dipeptídeo de glutamina influenciaram os estoques intracelulares de GSH,

possivelmente por meio da redução de sua taxa de utilização ou degradação concordando com as observações de Humbert *et al.* (2007).

Em um estudo conduzido por Valencia, Marin e Hardy (2002b) foram investigados os efeitos da suplementação oral com L-glutamina na forma livre em humanos sedentários. Não foi observado aumento na concentração de GSH no plasma, o que indica que o fígado não aumentou a síntese da enzima em decorrência da intervenção nutricional (HAMMARQVIST *et al.*, 2005). Apesar disso, a concentração de glutamina e glutamato plasmáticos foram superiores em relação ao grupo controle do estudo. Por outro lado, Flaring *et al.* (2003) suplementaram, de forma parenteral, durante três dias com glutamina homens após serem submetidos a eventos de estresse metabólico (cirurgias na região abdominal). Os resultados mostraram que a intervenção com glutamina atenuou a depleção muscular de GSH, fato que beneficiou a recuperação dos pacientes. Adicionalmente, a concentração de glutamina plasmática foi maior após a cirurgia no grupo suplementado, quando comparado ao grupo controle. A forma de suplementação utilizada nos diferentes estudos possivelmente interfere nos resultados das pesquisas.

Administrada por via oral, a L-glutamina na forma livre é em grande parte retida pelos enterócitos, o que leva à sua menor liberação a partir do lúmen intestinal para a membrana basolateral e, conseqüentemente, menor disponibilidade no sangue para outras células e tecidos do corpo (BOZA *et al.*, 2000, ADIBI, 2003). Estudos demonstraram que utilização do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina representa uma alternativa eficaz no fornecimento de glutamina para o organismo por via oral (ADIBI; SCHENKER; MORSE, 1996, KLASSEN *et al.*, 2000, ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006).

Os resultados do presente estudo confirmam que a utilização de L-glutamina por via oral na forma de dipeptídeo é eficaz em atenuar a redução de aminoácidos no músculo sóleo, tais como a glutamina e o glutamato, ou ainda, a concentração de antioxidantes, tais com a GSH e seu estado redox. De forma geral, contudo, efeitos similares também podem ser parcialmente obtidos com a administração de L-glutamina e L-alanina, na forma livre, em quantidades iguais a do dipeptídeo, ou seja, 1,49 g/Kg/dia.

No músculo gastrocnêmio, as intervenções nutricionais bem como o teste de exercício intenso não influenciaram a concentração de glutamina. Verifica-se, porém, que ocorreram alterações na concentração de glutamato deste tecido. Os resultados mostraram que a suplementação com o dipeptídeo, no grupo DIP-TR promoveu aumento de 39,8% na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, quando comparado ao grupo CON-TR. Efeito ainda maior foi encontrado após o teste de exercício intenso, onde o grupo DIP-INT exibiu aumento de 45,6% em relação ao grupo CON-INT. Após o teste de exercício intenso, o grupo suplementado com L-glutamina na forma livre também apresentou aumento (50,0%) na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, em relação ao grupo CON-INT.

De acordo com Klassen *et al.* (2000), a suplementação com L-alanil-L-glutamina promove aumento estequiométrico dos aminoácidos glutamina e alanina no plasma. É provável que em nosso estudo este aumento tenha ocorrido não somente nos grupos suplementados com o dipeptídeo, mas também nos grupos que receberam os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre. A elevada concentração plasmática destes aminoácidos pode estimular sua captação pelas células e aumentar sua disponibilidade no meio

intracelular (WILLIAMS; CHINKES; WOLFE, 1996). Assim, pode-se pensar que a maior concentração de alanina deslocaria o glutamato da reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase para a reação de síntese de glutamina pela enzima GS, promovendo uma maior concentração de glutamina tecidual, observada no músculo sóleo do grupo GLN-ALA-TR e DIP-INT. No músculo gastrocnêmio, porém, a maior concentração de glutamato não alterou a concentração de glutamina.

A predominância do tipo de fibra muscular também influencia a concentração de aminoácidos livres no tecido (GRAHAM; MACLEAN, 1998). Sendo o músculo gastrocnêmio composto predominantemente por fibras do tipo 2, este apresenta menor concentração de glutamina e glutamato em relação às musculaturas com predominância de fibras do tipo 1, mais oxidativas, tais como o músculo sóleo (GRAHAM; MACLEAN, 1998, CURI, 2000). Estudos sugerem que a menor concentração de glutamina e glutamato no gastrocnêmio se devem à menor atividade de enzimas tais como a GS e a glutamato desidrogenase, ou ainda, a menor disponibilidade de ATP para a síntese de aminoácidos (GRAHAM; MACLEAN, 1998, CURI, 2000). Em nosso estudo e em outros similares (CHRISTOPHE *et al.*, 1971, ROGERO *et al.*, 2006), a comparação entre os valores de glutamina e glutamato no músculo sóleo e no músculo gastrocnêmio demonstra esta diferença.

O teste de exercício intenso, realizado no grupo controle (CON-INT) promoveu redução de 27,5% na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, quando comparado ao grupo controle não submetido ao teste (CON-TR). Podemos inferir que a redução na disponibilidade de glutamato influenciou a concentração de GSH do músculo gastrocnêmio, uma vez que foi

encontrada diminuição (24,3%) deste antioxidante, após o teste de exercício intenso no grupo CON-INT.

Independentemente da concentração de glutamato no gastrocnêmio, que foi superior no grupo GLN+ALA-INT, a suplementação prévia com L-glutamina na forma livre não influenciou a concentração GSH, bem como da razão GSH/GSSG, seja antes ou após o teste de exercício intenso. A administração do dipeptídeo no grupo DIP-TR, no entanto, aumentou o conteúdo de glutamato no gastrocnêmio, o que também não influenciou estatisticamente a quantidade de GSH, mas provavelmente atenuou sua utilização ou degradação (JI, 1999, HUMBERT *et al.*, 2007), observada pela maior razão entre GSH/GSSG. Outro efeito da suplementação com o dipeptídeo foi observado após o teste de exercício intenso, onde a concentração de GSH foi atenuada. A razão GSH/GSSG, contudo, não apresentou aumento estatisticamente significativo no grupo DIP-INT, o que indica que no gastrocnêmio o *turnover* de conversão de GSSG para GSH estava menor, e a maior disponibilidade de GSH pode ter sido apenas o resultado de um aumento no seu transporte do plasma para o interior da célula muscular.

O estudo do metabolismo da glutamina bem como da GSH está diretamente ligado ao tecido hepático. O fígado é quantitativamente o principal órgão de síntese *de novo* da GSH, sendo responsável pelo suprimento de 90% da GSH circulante em condições fisiológicas (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c). A elevada concentração de GSH hepática é devida principalmente à alta atividade da glutathione redutase nesse tecido (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c). Durante exercícios físicos de caráter exaustivo, o fígado

exporta GSH para o plasma sob influência hormonal, em especial de glucagon, vasopressina e catecolaminas (JI, 1999, BEST *et al.*, 1999, LIU *et al.*, 2000). Por outro lado, o tecido muscular é responsável pela elevada captação de GSH do plasma (LEEUEWENBURGH, JI, 1995, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b).

Assim como em outros estudos (por exemplo, ROGERO *et al.*, 2006), nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada na concentração de glutamina hepática, quer em razão das intervenções nutricionais, quer em razão do teste de exercício intenso. A suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina em animais não submetidos ao teste de exercício intenso (DIP-TR), todavia, aumentou a concentração de glutamato hepático, que promoveu aumento na concentração de GSH, bem como na razão GSH/GSSG, também hepática. A maior oferta de glutamato intracelular, entretanto, não é o único mecanismo a influenciar a concentração de GSH (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c, YANG *et al.*, 2007).

Após o teste de exercício intenso, o grupo DIP-INT apresentou maior concentração de GSH e maior razão GSH/GSSG no fígado, sem que houvesse maior oferta de glutamato hepático. De acordo com Parry-Billings *et al.* (1991), o aumento na disponibilidade de aminoácidos influencia o volume celular. Desta forma, é provável que a suplementação no grupo DIP-INT tenha, ao menos, atenuado a redução no estado de hidratação celular, normalmente induzido pelo exercício físico, o que possivelmente mantém a concentração de componentes diversos, envolvidos no *turnover* da GSH. Em um estudo a suplementação com L-glutamina estimulou o aumento nos estoques de glicogênio muscular, que influencia o volume celular e beneficiou a recuperação da lesão induzida pelo exercício exaustivo (VARNIER *et al.*,

1995). Uma outra alternativa pode estar relacionada à restauração dos níveis de ATP hepáticos, que no trabalho de Yang *et al.* (2007) reduziu a apoptose celular.

Nos grupos suplementados com L-glutamina na forma livre, tanto submetidos como não submetidos ao teste de exercício intenso a concentração de GSH hepática aumentou, e este efeito, contudo, também não teve relação com a disponibilidade de glutamato no mesmo tecido. Somente após o teste de exercício intenso, um efeito foi visto no estado redox celular hepático, decorrente da suplementação com L-glutamina livre. Esta observação é baseada no cálculo da razão hepática entre GSH/GSSG, que foi 38,8% superior, em relação ao grupo CON-INT. De acordo com estes resultados, podemos inferir que a intervenção nutricional com L-glutamina livre, assim como o dipeptídeo, é eficaz em promover menor ativação do estado redox celular do principal órgão de síntese *de novo* da GSH.

Em alguns estudos com modelos de lesão hepática em ratos, a administração de L-alanil-L-glutamina ou L-glutamina livre promoveram aumento na concentração de GSH hepática, o que elevou a sobrevivência destas células (HONG *et al.*, 1992, YU *et al.*, 1996). Nestes estudos foi também verificado aumento na concentração de GSH no plasma. Se transportada para fora dos hepatócitos, a concentração de GSH no plasma pode elevar-se, o que permite que esta seja utilizada por outros tecidos e células, atenuando a interação das ERO com membranas lipídicas, DNA e outras proteínas essenciais à homeostasia celular (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002a).

A hipótese de que a suplementação com L-glutamina possa resultar em efeitos fisiológicos favoráveis às células, e, conseqüentemente à maior

recuperação de traumas ou condições de elevado catabolismo muscular vem sendo alvo de muitos estudos (CASTELL; NEWSHOLME, 1996, WALSH *et al.*, 2000, VALENCIA; MARIN; HARDY 2002b, HISCOCK *et al.*, 2003, YANG *et al.*, 2007). Especula-se que a redução da concentração de glutamina tecidual, especialmente nos músculos esqueléticos e fígado, induzida pela realização de exercícios de caráter exaustivo, possa contribuir para um maior desenvolvimento do trauma ou lesão, ou ainda, não favorecer a recuperação.

No presente trabalho, analisaram-se os efeitos da maior disponibilidade de glutamina e, conseqüentemente, de glutamato sobre parâmetros indicativos de lesão muscular, e de inflamação.

Imediatamente após o teste de exercício intenso, não foi encontrado efeito das intervenções nutricionais sobre a liberação de fatores indicadores de lesão muscular, CK e LDH. O teste de exercício intenso, ao contrário de alguns estudos (NUVIALA *et al.*, 1992, BRUUNSGAARD *et al.*, 1997), não promoveu elevação estatisticamente significativa na concentração dessas enzimas, exceto no grupo GLN+ALA-INT, que apresentou maior valor de CK, quando comparado ao grupo GLN+ALA-TR. Cabe salientar que a mensuração da LDH, não correspondeu às expectativas, baseadas em outros estudos com exercícios físicos (LIJNEN *et al.*, 1988, SANTOS *et al.*, 2004). Outros parâmetros plasmáticos indicativos de lesão muscular, tal como a mioglobina, devem ser incluídos em estudos posteriores para o diagnóstico de lesão muscular.

De forma surpreendente, um efeito da suplementação com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo, sobre a concentração de CK foi observado em animais não submetidos ao teste de exercício intenso. Pode-se inferir que

tal efeito tenha ocorrido em momento onde estudos também demonstram haver uma elevada liberação de enzimas intracelulares, em média, acima de 24 horas após uma sessão de exercícios, dependendo do esporte ou atividade praticada (LIJNEN *et al.*, 1988, JANSSEN *et al.*, 1989, SANTOS *et al.*, 2004). Em alguns trabalhos, verifica-se elevada liberação de parâmetros indicativos de lesão muscular por mais de 4 dias após exercícios ou eventos esportivos (GLEESON *et al.*, 1998, STUPKA *et al.*, 2000, PROSKE; MORGAN, 2001, SIMPSON *et al.*, 2005).

Na ocorrência de uma lesão tecidual, a liberação de enzimas intracelulares para o plasma pode ocorrer por mecanismos distintos. Normalmente, logo após a realização de uma sessão de exercícios, diferentes fatores como o movimento excêntrico, o processo de isquemia e reperfusão, o impacto das extremidades do corpo com a superfície e a elevada quantidade de repetições podem propiciar o surgimento dos microtraumas teciduais (HELLSTEN *et al.*, 1997, BLOOMER; GOLDFARB, 2004, HIROSE *et al.*, 2004, MASTALOUDIS *et al.*, 2004a). A prolongada liberação de enzimas intracelulares, contudo, é também resultado da síntese excessiva de ERO e citotoxinas por células do sistema imune, tais como neutrófilos e macrófagos no tecido muscular, o que torna a lesão normalmente mais extensiva (TOUMI; BEST, 2003, TIDBALL, 2005, UCHIYAMA *et al.*, 2006).

De acordo com nossos resultados, o aumento no fígado da disponibilidade GSH e na razão GSH/GSSG, observados nos grupos GLN+ALA-TR e DIP-TR, pode ter elevado a concentração de GSH no plasma. Isso pode ter contribuído para atenuar a quantidade de lesões, principalmente do tipo oxidativas, promovidas pelas ERO, observadas nos grupos GLN+ALA-

TR e DIP-TR. A mensuração de glutathiona, bem como de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma, não mensurados em nosso estudo, poderia demonstrar este efeito da suplementação com L-glutamina livre ou como dipeptídeo.

A intensidade do processo inflamatório está relacionada ao grau de lesão tecidual (PEDERSEN; GOETZ, 2000). A elevada quantidade de lesões induzidas por exercícios físicos intensos, prolongados ou exaustivos promove uma resposta inflamatória intensa, aumentando principalmente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α (PHANEUF; LEEUWENBURGH, 2001, PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Em patologias, tais como a caquexia, HIV e câncer, elevadas concentrações de TNF- α têm sido associados ao catabolismo muscular, a perda de funções celulares e à apoptose (PHANEUF; LEEUWENBURGH, 2001, DALE; DAVIS; FAUSTMAN, 2006).

Nossos resultados, entretanto, não demonstraram que a liberação de fatores indicadores de lesão muscular coincida com um aumento na resposta inflamatória, seja esta resposta analisada antes ou depois do teste de exercício intenso. É provável que a concentração de TNF- α observada antes do teste de exercício intenso seja devida principalmente à sua liberação por células do sistema imune, tais como macrófagos e neutrófilos (TOUMI; BEST, 2003). Por outro lado, a concentração de TNF- α verificada após o teste de exercício intenso pode ser o resultado de sua liberação a principalmente a partir de células musculares (REID; LI, 2001). A suplementação com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo foi eficaz em atenuar a liberação de TNF- α imediatamente após o teste de exercício intenso (GLN+ALA-INT e DIP-INT, respectivamente), quando comparada ao grupo controle (CON-INT).

CRUZAT, V. F.

A síntese de varias citocinas e moléculas de adesão, entre as quais o TNF- α , depende da ativação de fatores de transcrição nucleares, tais como o NF- κ B. O NF- κ B é ativado de acordo com o potencial estado redox celular, determinado pela taxa de GSH/GSSG (ROTH *et al.*, 2002). No citoplasma de células musculares, NF- κ B está na forma inativa, pois se encontra ligado a um dímero de ação inibitória, I- κ B α . Regulado por quinases, também sensíveis ao estado redox celular, I- κ B α pode ser fosforilado, ubiquitinado e posteriormente degradado pelo proteossoma 26S (DALE; DAVIS; FAUSTMAN, 2006).

O TNF- α e a IL-6, por exemplo, estimulam a ubiquitinação e a fosforilação do I- κ B α (HISCOCK *et al.*, 2003, DALE; DAVIS; FAUSTMAN, 2006). Na ausência do I- κ B α , o NF- κ B se torna ativo e é translocado para o núcleo da célula. Uma vez no núcleo, em poucos minutos o NF- κ B se liga à região promotora de DNA e inicia o processo de transcrição de genes para diversas citocinas pró-inflamatórias e proteínas apoptóticas, o que aumenta a atividade inflamatória (MALM, 2001, REID; LI, 2001, SILVEIRA *et al.*, 2007).

Em nosso experimento verificamos que os grupos GLN+ALA-INT e DIP-INT apresentaram maior razão GSH/GSSG, tanto no músculo sóleo como no fígado. Uma vez que estes mesmos grupos apresentaram menor concentração de TNF- α uma relação pode ser estabelecida. É possível que a suplementação com L-glutamina livre ou como dipeptídeo, por meio do aumento na concentração de GSH, mas principalmente na razão entre GSH/GSSG tenha reduzido a atividade de quinases sensíveis ao estado redox celular, que inibem a ativação do NF- κ B. Esta menor ativação do NF- κ B pode ter resultado na

menor síntese e liberação de $\text{TNF-}\alpha$, induzida pelo exercício intenso e observada no grupo CON-INT.

O aumento na concentração de PgE_2 , em alguns estudos tem coincidido com o aumento no relato de dores musculares, após algumas horas da realização de exercícios, o que sugere uma possível relação (PEDERSEN *et al.*, 1998b, MALM, 2001). O aumento na liberação de citocinas, em especial da IL-6, imediatamente após exercícios exaustivos, precede a agregação de neutrófilos e macrófagos no tecido muscular, que aumentam tanto a síntese de PgE_2 quanto a liberação de enzimas intracelulares, tais como a CK (TOFT *et al.*, 2002, HISCOCK *et al.*, 2003). Desta forma, a síntese de PgE_2 pode ser o resultado da elevada liberação por macrófagos, que são predominantemente ativados em menos de 24 h após exercícios (PEDERSEN *et al.*, 1998b). Cabe destacar que a liberação de outras citocinas, as quais incluem principalmente a IL-1 α , IL-1 β e o $\text{TNF-}\alpha$, geralmente aumentam a síntese de prostaglandinas em células endoteliais e músculos esqueléticos (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

No presente trabalho, não foi observada nenhuma diferença na concentração de PgE_2 entre os grupos não submetidos ao teste de exercício intenso. Após o teste, contudo, verificou-se uma menor concentração de PgE_2 no plasma dos animais suplementados com o L-alanil-Lglutamina. Analisados em conjunto, a menor concentração de $\text{TNF-}\alpha$ e PgE_2 no grupo DIP-INT, demonstra que a intervenção nutricional com o dipeptídeo foi eficiente em atenuar a inflamação induzida pelo exercício intenso. A administração de L-glutamina na forma livre também pode promover efeitos similares, uma vez que também promoveu menor liberação $\text{TNF-}\alpha$ e PgE_2 após o teste de exercício

intenso. Sobre a concentração de PgE_2 , contudo, o efeito não foi estatisticamente significativo.

7. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados permitem concluir que a suplementação prévia por via oral com L-glutamina na forma do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina representa uma maneira eficiente de fornecimento de glutamina e glutamato para o organismo. A maior disponibilidade destes aminoácidos pode atenuar a redução dos estoques muscular e hepático de GSH ou seu estado redox celular. Verificou-se também que a suplementação com o dipeptídeo pôde atenuar a liberação de fatores indicadores de lesão muscular e inflamação, induzidos pelo exercício físico. A utilização dos aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre também promoveu efeitos similares tanto sobre a concentração de glutamina, glutamato, GSH, GSH/GSSG musculares e hepáticos, quanto sobre a liberação de parâmetros indicativos de lesão muscular e inflamação. Desta forma, a utilização de uma combinação de L-glutamina e L-alanina livre, em quantidades iguais às do dipeptídeo (1,49 g/Kg/dia) também representou uma alternativa vantajosa de suplementação. Outros estudos com este modelo de suplementação devem ser realizados em indivíduos envolvidos com esportes ou exercícios intensos ou exaustivos, no intuito de atenuar seus efeitos indesejados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580p

ADIBI, S.A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.285, p.G779-G88, 2003.

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

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

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochemistry Journal**, v.208, p.743-748, 1982.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemistry Journal**, v.212, p.835-842, 1983.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Fuel utilization in colonocytes of the rat **Biochemistry Journal**, v.231, p.713-719, 1985.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CRUZAT, V. F.

BABENKO, V.; NIELSEN, G.T.; SVENSSON, P.; DREWES, A.M.; JENSEN, T.S.; NIELSEN, A.L. Experimental human muscle pain and muscular hyperalgesia induced by combinations of serotonin and bradykinin. **Pain**, v.82, p.1-8, 1999.

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

BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim, New York: Verlag Chemie, Academic Press, 1983. 1064p.

BERGMEYER, H.U. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In **Methods of enzymatic analysis**. 2.ed. Weinheim, New York: Verlag Chemie, Academic Press, 1974. p.1205-1212.

BERGSTROM, J.; FURST, P.; NOREE, L.O.; VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **Journal of Applied Physiology**, v.36, p.693-700, 1974.

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

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

BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.29, p.245-263, 2004.

BODE, B.P. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2475S-2485S, 2001.

CRUZAT, V. F.

BOZA, J.J.; MAIRE, J.; BOVETTO, L.; BALLEVRE, O. Plasma glutamine response to enteral administration of glutamine in human volunteers (free glutamine versus protein-bound glutamine). **Nutrition**, v.16, p.1037-1042, 2000.

BOWTELL, J.L.; GELLY, K.; JACKMAN, M.L.; PATEL, A.; SIMEONI, M.; RENNIE, M.J. Effect of oral glutamine on whole body carbohydrate storage during recovery from exhaustive exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.86, p.1770-1777, 1999.

BRENNAN, L.; CORLESS, M.; HEWAGE, C.; MALTHOUSE, J.P.; MCCLENAGHAN, N.H.; FLATT, P.R.; NEWSHOLME, P. ¹³C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and gamma-glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic beta-cell line. **Diabetologia**, v.46, p.1512-1521, 2003.

BROSNAN, J.T. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. **Journal of Nutrition**, v.130, p.988-990, 2000.

BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T.L.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **Journal of Physiology**, v.499, p.833-841, 1997.

CANNON, J.G.; MEYDANI, S.N.; FIELDING, R.A.; FIATARONE, M.A.; MEYDANI, M.; FARHANGMEHR, M.; ORENCOLE, S.F.; BLUMBERG, J.B.; EVANS, W.J. Acute phase response in exercise. II. Associations between vitamin E, cytokines, and muscle proteolysis. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.260, p.1235-1240, 1991.

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

CRUZAT, V. F.

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

CASTELL, L.M.; POORTMANS, J.R.; NEWSHOLME, E.A. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? **European Journal of Applied Physiology Occupation Physiology**, v.73, p.488-490, 1996.

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

CASTELL, L.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine and the effects of exhaustive exercise upon the immune response. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.76, p.524-532, 1998.

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

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Review**, v.84, p.209-238, 2004.

CHRISTOPHE, J.; WINAND, J.; KUTZNER, R.; HEBBELINCK, M. Amino acid levels in plasma, liver, muscle, and kidney during and after exercise in fasted and fed rats. **American Journal of Physiology**, v.221, p.453-457, 1971.

CLARKSON, P.M.; SAYERS, S.P. Etiology of exercise-induced muscle damage. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.24, p.234-248, 1999.

CRUZAT, V. F.

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

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

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

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

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.Q.; SELLITTI, D.F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T.C. Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity. **Cell Biochemistry and Function**, v.23, p.77-84, 2005b.

DALE, E.; DAVIS, M.; FAUSTMAN, D.L. A role for transcription factor NF- κ B in autoimmunity: possible interactions of genes, sex, and the immune response. **Advances in Physiology Education**, v.30, p.152-158, 2006.

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

DOHM, G.L.; BEECHER, G.R.; WARREN, Q.; WILLIAMS, R.T. Influence of exercise on free amino acid concentration in rat tissues. **Journal of Applied Physiology**, v.50, p.41-44, 1981.

CRUZAT, V. F.

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

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of the cell function. **Physiological Review**, v.82, p.47-95, 2002.

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

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v.130, p.432-437, 1959.

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

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M.; HORTON, C.L.; FLEISCHMAN, R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-Glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v.218, p.607-616, 1956.

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

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

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

CRUZAT, V. F.

FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de ação e controle da digestão de proteínas e peptídeos em humanos. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.36, p.139-147, 1999.

FULCHER, S.M.; KIEFHABER, T.R.; STERN, P.J. Upper-extremity tendinitis and overuse syndromes in the athlete. **Clinics in Sports Medicine**, v.17, p.433-448, 1998.

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

GARDNER, M.L.G. Absorption of amino acids and peptides from a complex mixture in the isolated small intestine of the rat. **Journal of Physiology**, v.253, p.233-256, 1975.

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

GLEESON, M.; WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; COOK, L.; DONNELLY, A.E.; DAY, S.H. The effect of severe eccentric exercise-induced muscle damage on plasma elastase, glutamine and zinc concentrations. **European Journal of Applied Physiology**, v.77, p.543-546, 1998.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.103, p.693-699, 2007.

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

CRUZAT, V. F.

GRAHAM, T.E.; TURCOTTE, L.P.; KIENS, B.; RICHTER, E.A. Training and muscle ammonia and amino acid metabolism in humans during prolonged exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.78, p.725-735, 1995.

GRASSI, B.; QUARESIMA, V.; MACONI, C.; FERRARI, M.; CERRETELLI, P. Blood lactate accumulation and muscle deoxygenation during incremental exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.87, p.348-355, 1999.

GRIMBLE, G.K. The significance of peptides in clinical nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v.14, p.419-447, 1994.

HACK, V.; WEISS, C.; FRIEDMAN, B.; SUTTNER, C.; SCHYKOWSKI, M.; ERBE, N.; BENNER, A.; BARTSCH, P.; DRÖGE, W. Decreased plasma glutamine level and CD4+ T cell number in response to 8 wk of anaerobic training. **American Journal of Physiology**, v.272, p.E788-E795, 1997.

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

HAMMARQVIST, F.; ANDERSSON, K.; LUO, J.; WERNERMANB, J. Free amino acid and glutathione concentrations in muscle during short-term starvation and refeeding. **Clinical Nutrition**, v.24, p.236-243, 2005.

HAIR JUNIOR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados**. São Paulo: Artmed, 2006. 600p

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

CRUZAT, V. F.

HELLSTEN, Y.; FRANDSEN, U.; ORTHENBLAD, N.; SJODIN, B.; RICHTER, E.A. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. **Journal of Physiology**, v.498, p.239-248, 1997.

HIROSE, L.; NOSAKA, K.; NEWTON, M.; LAVEDER, A.; KANO, M.; PEAKE, J.; SUZUKI, K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exercise Immunology Review**, v.10, p.75-90, 2004.

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

HISCOCK, N.; PETERSEN, E.W.; KRZYWKOWSKI, K.; BOZA, J.; KRISTENSEN, J.H.; PEDERSEN, B.K. Glutamine supplementation further enhances exercise-induced plasma IL-6. **Journal of Applied Physiology**, v.95, p.145-148, 2003.

HONG, R.W.; ROUNDS, J.D.; HELTON, W.S.; ROBINSON, M.K.; WILMORE, D.W. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. **Annual Surgery**, v.215, p. 114-119, 1992.

HOOD, D.A.; TERJUNG, R.L. Endurance training alters alanine and glutamine release from muscle during contractions. **FEBS Letters**, v.340, p.287-290, 1994.

HOOGEVEEN, A.R.; ZONDERLAND, M.L. Relationships between testosterone, cortisol, and performance in professional cyclists. **International Journal of Sports Medicine**, v.17, p.423-428, 1996.

HUMBERT, B.; NGUYEN, P.; MARTIN, L.; DUMON, H.; VALLETTE, G.; MAUGERE, P.; DARMAUN, D. Effect of glutamine on glutathione kinetics in vivo in dogs. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.18, p.10-16, 2007.

CRUZAT, V. F.

JACKSON, N.C.; CARROLL, P.V.; RUSSEL-JONES, D.L. Effect of glutamine supplementation, GH, and IGF-I on glutamine metabolism in critically ill patients. **American Journal of Physiology**, v.278, p.E226-E233, 2000.

JANSSEN, G.M.E.; KUIPERS, H.; WILLEMS, G.M.; DOES, R.J.M.M.; JANSSEN, M.P.E.; GEURTEN, P. Plasma activity of muscle enzymes: quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables. **International Journal of Sports Medicine**, v.10, p.S160-S168, 1989.

JI, L.L. Oxidative stress during exercise: implications of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, p.1079-1086, 1995.

JI, L.L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.283-292, 1999.

JI, L.L. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.959, p.82-92, 2002.

KEAST, D.; ARSTEIN, D.; HARPER, W.; FRY, R.W.; MORTON, A.R. Depression of plasma glutamine concentration after exercise stress and its possible influence on the immune system. **Medical Journal of Australia**, v.162, p.15-18, 1995.

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

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

CRUZAT, V. F.

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

KOYAMA, K.; KAYA, M.; TSUJITA, J.; HORI, S. Effects of decreased plasma glutamine concentration on peripheral lymphocyte proliferation in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v.77, p.25-31, 1998.

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

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

LAGRANHA, C.J.; 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.101-107, 2005.

LANG, C.H.; FROST, R.A.; VARY, T.C. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. E453-E459, 2007.

LANGBERG, H.; BOUSHEL, R.; SKOVGAARD, D.; RISUM, N.; KJAER, M. Cyclo-oxygenase-2 mediated prostaglandin release regulates blood flow in connective tissue during mechanical loading in humans. **Journal of Physiology**, v.551, p.683–689, 2003.

LEEUEWENBURGH, C.; JI, L.L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.316, p.941-949, 1995.

CRUZAT, V. F.

LEARY, S.C.; LYONS, C.N.; ROSENBERGER, A.G.; BALLANTYNE, J.S.; STILLMAN, J.; MOYES, C.D. Fiber-type differences in muscle mitochondrial profiles. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.285, p.R817-R826, 2003.

LEIBACH, F.H.; GANAPATHY, V. Peptide transporters in the intestine and kidney. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.99-119, 1996.

LIJNEN, P.; HESPEL, P.; FAGARD, R. Indicators of cell breakdown in plasma of men during and after a marathon race. **International Journal of Sports Medicine**, v.9, p.108-113, 1988.

LIU, J.; YEO, C.H.; DOUKI, E.O.; HAGEN, T.; DONIGER, S.J.; CHU, D.W.; BROOKS, G.A.; AMES, B.N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Applied Physiology**, v.89, p.21-28, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBRUOGH, N.J.; FARR, A.L. RANDALL, R.J. Proteins measurements with Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUND, P. Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H.U., ed. **Methods of enzymatic analysis**, London: Academic Press, 1985. p.357-363.

LUO, J.-L.; HAMMARQVIST, F.; ANDERSON, K.; WERNERMAN, J. Skeletal muscle glutathione after surgical trauma. **Annals of Surgery**, v.233, p.420-427, 1996.

MACKINNON, L.T.; HOOPER, S.L. Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.28, p.285-290, 1996.

CRUZAT, V. F.

MALM, C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? **Acta Physiologica Scandinavica**, v.171, p.233-239, 2001.

MARQUEZI, M.L.; ROSCHEL, H.A.; COSTA, A.S.; SAWADA, L.A.; LANCHA JÚNIOR, A.H. Effect of aspartate and asparagine supplementation on fatigue determinants in intense exercise. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.13, p.65-75, 2003.

MASTALOUDIS, A.; YU, T.W.; O'DONNELL, R.P.; FREI, B.; DASHWOOD, R.H.; TRABER, M.G. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, p.966-975, 2004a.

MASTALOUDIS, A.; MORROW, J.D.; HOPKINS, D.W.; DEVARAJ, S.; TRABER, M.G. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, p.1329-1341, 2004b.

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

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

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

MOREIRA, A.; KEKKONEN, R.A.; DELGADO, L.; FONSECA, J.; KORPELA, R.; HAAHTELA, T. Nutritional modulation of exercise-induced immunodepression in athletes: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.61, p.443-460, 2007.

CRUZAT, V. F.

MORGAN, D.L.; ALLEN, D.G. Early events in stretch-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v.87, p.2007-2015, 1999.

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

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

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

NIEMAN, D.C.; DAVIS, J.M.; HENSON, D.A.; WALBERG-RANKIN, J.; SHUTE, M.; DUMKE, C.L.; UTTER, A.C.; VINCI, D.M.; CARSON, J.A.; BROWN, A.; LEE, W.J.; MCANULTY, S.R.; MCANULTY, L.S. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. **Journal of Applied Physiology**, v.94, p.1917-1925, 2003.

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

NOAKES, T.D. Effect of exercise on serum enzyme activities in human. **Sports Medicine**, v.4, p.41-44, 1987.

NÓBREGA, A.C.L. The sub-acute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.33, p.84-87, 2005.

CRUZAT, V. F.

NOGUEIRA, F.N.; CARVALHO, A.M.; YAMAGUTIA, P.M.; NICOLAU, J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**, v.353, p.133-139, 2005.

NORTHOFF, H.; WEINSTOCK, C.; BERG, A. The cytokine response to strenuous exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v.15, p.S167-S171, 1994.

NUVIALA, R.J.; RODA, L.; LAPIEZA, M.G.; BONED, B.; GINER, A. Serum enzymes activities at rest and after a marathon race. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.32, p.180-186, 1992.

NYBO, L.; DALSGAARD, M.K; STEENSBERG, A.; MOLLER, K.; SECHER, N.H. Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. **Journal of Physiology**, v.563, p.285-290, 2005.

OGONOVSKY, H.; SASVÁRI, M.; DOSEK, A.; BERKES, I.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; GOTO, S.; RADÁK, Z. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v.30, p.186-195, 2005.

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

PARRY-BILLINGS, M.; LEIGHTON, B.; DIMITRIADIS, G.; VASCONCELOS, P.R.L.; NEWSHOLME, E.A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. **International Journal of Biochemistry**, v.21, p.419-423, 1989.

CRUZAT, V. F.

PARRY-BILLINGS, M.; NEWSHOLME, E.A. The possible role of glutamine substrate cycle in skeletal muscle. **Biochemical Journal**, v.279, p.327-328, 1991.

PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; OSTROWSKI, K.; KRABBE, K.; HANSEN, H.; KRZYWKOWSKI, K.; TOFT, A.; SONDERGAARD, S.R.; PETERSEN, E.W.; IBFELT, T.; SCHJERLING, P. Cytokines in aging and exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v.21, p.S4–S9, 2000.

PEDERSEN, B.K.; GOETZ, L.H. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, v.80, p.1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K.; OSTROWSKI, K.; ROHDE, T. Recovery of the immune system after exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.162, p.325-332, 1998a.

PEDERSEN, B.K.; OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; BRUUNSGAARD, H. The cytokine response to strenuous exercise. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.76, p.505-511, 1998b.

PETERSEN, A.M.W.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.98, p.1154-1162, 2005.

PHANEUF, S.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.33, p.393-396, 2001.

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

CRUZAT, V. F.

PROSKE, U.; MORGAN, D.L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. **Journal of Physiology**, v.537, p.333-345, 2001.

PYNE, D.B. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. **Australian Journal of Science and Medicine in Sport**, v.26, p.49-58, 1994.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; OHNO, H.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, p.69-74, 1999.

RADAK, Z.; SASVARI, M.; NYAKAS, C.; PUCSOK, J.; NAKAMOTO, H.; GOTO, S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.376, p.248-251, 2000.

RADAK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exercise Immunology Review**, v.7, p.90-107, 2001.

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

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

RENNIE, M.J.; EDWARDS, R.H.; KRYWAWYCH, S.; DAVIES, C.T.; HALLIDAY, D.; WATERLOW, J.C.; MILLWARD, D.J. Effect of exercise on protein turnover in man. **Clinical Science**, v.61, p.627-639, 1981.

CRUZAT, V. F.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JUNIOR., G.C. Ain-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition “ad hoc” writing committee on the formulation of the ain-76a rodent diets. **Journal of Nutrition**, v.123, p.1939-1951, 1993.

REID, M.B.; LI, Y.-P. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.171, p.225-232, 2001.

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. **International Journal of Sports Medicine**, v.20, p.128-135, 1999.

ROGERO, M.M.; MENDES, R.R.; TIRAPEGUI, J.O. Aspectos neuroendócrinos e nutricionais em atletas com overtraining. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.49, p.359-368, 2005.

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

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O. Aspectos nutricionais sobre glutamina e atividade física. **Nutrire**, v.25, p.87-112, 2003a.

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

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

CRUZAT, V. F.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J.O.; PEDROSA, R.G.; CASTRO, I.A.; PIRES, I.S.O.; OLIVEIRA, A.A.M.; SALGADO, M.M.; PINTO, A.R.; UEDA, M. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.487-497, 2002.

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

ROHDE, T.; ASP, S.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Competitive sustained exercise in humans, lymphokine activated killer cell activity, and glutamine--an intervention study. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v.78, p.448-453, 1998.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; HARTKOOP, A.; PEDERSEN, B.K. The immune system and serum glutamine during a triathlon. **European Journal of Applied Physiology**, v.74, p.428-434, 1996.

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

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

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.

CRUZAT, V. F.

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.

SAHLIN, K.; KATZ, A.; BROBERG, S. Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise. **American Journal of Physiology**, v.259, p.C834-C841, 1990.

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

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

SCHROEDER, J.; ALTEHELD, B.; STEHLE, P.; CAYEUX, M.-C.; CHIOLÉRO, R.L.; BERGER, M.M. Safety and intestinal tolerance of high-dose enteral antioxidants and glutamine peptides after upper gastrointestinal surgery. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.300-310, 2005.

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

SERVAIS, S.; COUTURIER, K.; KOUBI, H.; ROUANET, J.L.; DESPLANCHES, D.; SORNAY-MAYET, M.H.; SEMPORE, B.; LAVOIE, J.M.; FAVIER, R. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v.35, p.24-32, 2003.

SHABERT, J.K.; WINSLOW, C.; LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Glutamine-antioxidant supplementation increases body cell mass in aids patients with weight loss: a randomized, double-blind controlled trial. **Nutrition**, v.15, p.860-864, 1999.

CRUZAT, V. F.

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

SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F.; CLERC-RENAUD, P.; FERRERO, C.A.; FERARD, G.; FRANCK, P.F.; GELLA, F.J.; HOELZEL, W.; JORGENSEN, P.J.; KANNO, T.; KESSNE, A.; KLAUKER, R.; KRISTIANSEN, N.; LESSINGER, J.M.; LINSINGER, T.P.; MISAKI, H.; PANTEGHINI, M.; PAUWELS, J.; SCHIMMEL, H.G.; VIALLE, A.; WEIDEMANN, G.; SIEKMANN, L. 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.635-642, 2002.

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

SMITH, D.J.; NORRIS, S.R. Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.32, p.684-689, 2000.

SOEDER, G.; GOLF, S.W.; GRAEF, V. Enzyme catalytic concentrations in human plasma after a marathon. **Clinical Biochemistry**, v.22, p.155-159, 1989.

STARON, R.S.; HIKIDA, R.S.; HAGERMAN, F.C.; DUDLEY, G.A.; MURRAY, T.F. Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.32, p.146-152, 1984.

CRUZAT, V. F.

STUPKA, N.; LOWTHER, S.; CHORNEYKO, K.; BOURGEOIS, J.M.; HOGBEN, C.; TARNOPOLSKY, M.A. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. **Journal Applied of Physiology**, v.89, p.2325-2332, 2000.

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

THAMOTHARAN, M.; BAWANI, S.Z.; ZHOU, X.; ADIBI, S.A. Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (pept-1) after a brief fast. **Metabolism**, v.48, p.681-684, 1999.

TIDBALL, J.G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.288, p.R345-R353, 2005.

TOFT, A.D.; JENSEN, L.B.; BRUUNSGAARD, H.; IBFELT, T.; KRISTENSEN, J.H.; FEBBRAIO, M.; PEDERSEN, B.K. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.283, p.C289–C295, 2002.

TOUMI, H.; BEST, T.M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? **Journal of Sports Medicine**, v.37, p.284-286, 2003.

UCHIYAMA, S.; TSUKAMOTO, H.; YOSHIMURA, S.; TAMAKI, T. Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. **European Journal of Applied Physiology**, v.452, p.109-116, 2006.

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

CRUZAT, V. F.

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Glutathione: nutritional and pharmacological viewpoints: Part III. **Nutrition**, v.17, p.696-697, 2001b.

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

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

VALENCIA, E.; MARIN, A.; HARDY, G. Impact of l-glutamine on glutathione, glutamine, and glutamate blood levels in volunteers. **Nutrition**, v.18, p.367-370, 2002b.

VAN DE POLL, M.C.G.; SOETERS, P.B.; DEUTZ, N.E.P.; FEARON, K.C.H.; DEJONG, C.H.C. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.185–197, 2004.

VAN DER MEULEN, J.H.; KUIPERS, H.; DRUKKER, J. Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. **Journal of Applied Physiology**, v.71, p.999-1004, 1991.

VARNIER, M.; LEESE, G.P.; THOMPSON, J.; RENNIE, M.J. Stimulatory effect of glutamine on glycogen accumulation in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.269, p.E309-E315, 1995.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, E.; HELL, N.S.; CURI, R. Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.31, p.387-394, 1988.

CRUZAT, V. F.

VOM DAHL, S.; HÄUSSINGER, D. Nutritional state and the swelling-induced inhibition of proteolysis in perfused rat liver. **Journal of Nutrition**, v.126, p.395-402, 1996.

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 organics acids. **European Journal of Applied Physiology**, v.77, p.434-438, 1998a.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanism. **Spots Medicine**, v.26, p.177-191, 1998b.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. Effect of oral glutamine supplementation on human neutrophil lipopolysaccharide-stimulated degranulation following prolonged exercise. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v.10, p.39-50, 2000.

WILLIAMS, B.D.; CHINKES, D.L.; WOLFE, R.R. Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, p.1053-1058, 1998.

WIN, T.S.; MARSHALL, J.M. Contribution of prostaglandins to the dilation that follows isometric forearm contraction in human subjects: effects of aspirin and hyperoxia. **Journal of Applied Physiology**, v.99, p.45-52, 2005.

WINDMUELLER, H.G. Glutamine utilization by the small intestine. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.53, p.201-237, 1982.

WRAY, C.J.; MAMMEN, J.M.V.; HASSELGREN, P. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, v.18, p.971-977, 2002.

CRUZAT, V. F.

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

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

YU, J.C.; JIANG, Z.M.; LI, D.M.; YANG, N.F.; M-X, B. Alanyl-glutamine preserves hepatic glutathione stores after 5-FU treatment. **Clinical Nutrition**, v.15, p.261-265, 1996.

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.543-548, 1997.

ZMIJEWSKI, J.W.; ZHAO, X.; XU, Z.; ABRAHAM, E. Exposure to hydrogen peroxide diminishes NF-kB activation, I κ B- α degradation, and proteasome activity in neutrophils. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.293, p.C255-C266, 2007.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Formulação da dieta AIN-93-M para manutenção de roedores adultos.

Ingredientes	g/kg de dieta
Amido de milho	465,692
Caseína (≥ 85% de proteína)	140,000
Amido dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos)	155,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja (sem aditivos)	40,000
Fibra	50,000
Mistura de Minerais (AIN-93M-mix)	35,000
Mistura de Vitaminas (AIN-93M-mix)	10,000
L-cistina	1,800
Bitartarato de colina (41,1 % colina)	2,500
Tert-butilhistidina	0,008

Anexo 2 – Estimativa mínima da composição dos nutrientes da AIN-93M.

Nutriente	(unidade/kg dieta)
Energia total (kcal)	3601,0
% Proteína	14,1
%Carboidrato	75,9
%Gordura	10,0
Umidade (g)	68,0
Cinzas (g)	38,9