

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

Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre parâmetros de lesão muscular, sistema antioxidante e expressão gênica de HSP-70 e HSF-1 em ratos submetidos a treinamento aeróbio intenso

Éder Ricardo Petry

Dissertação apresentada para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Éder Ricardo Petry

Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre parâmetros de lesão muscular, sistema antioxidante e expressão gênica de HSP-70 e HSF-1 em ratos submetidos a treinamento aeróbio intenso

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo
orientador/presidente

Prof.
1º. Examinador

Prof.
2º. Examinador

São Paulo, 26 de abril de 2010.

“...Abraçemos o caminho que o mestre nos aponta, embora, muitas vezes sentindo os ombros agoniados, sob a cruz das responsabilidades crescentes.

Não vacilemos, porém.

Associando paciência e ação, brandura e energia – e às vezes mais energia na brandura – sigamos à frente, convencidos de que o Senhor não nos desampara.

Recordemo-lo, sozinho e desfalecente, mas sereno e valoroso e prossigamos, de consciência erguida na paz do dever cumprido.”

Bezerra de Menezes – Espírito

Francisco Cândido Xavier - Médium

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra aos meus queridos pais Gisela e José Marlei e a minha irmã Liégi, que tornaram este sonho uma realidade.

Também dedico este trabalho a meus tios e todos meus amigos e colegas 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 profissionalmente e como pessoa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais (Gisela e José Marlei) pelo exemplo de dignidade, apoio e base familiar que me deram fato que foi fundamental para minha educação. Não tenho palavras para definir o quanto vocês são importantes para mim.

A minha irmã Liégi que, apesar de “todo ciúme” me ama tanto quanto eu a amo.

A todos os meus tios, tias, primos, primas, em especial aos meus queridos tios (João Alberto e Maria Carolina), primos (Márcio, Marli, Alexandre, Brenno, Marcos, Cinthia e Milena) e tia Marli Teserinha, pelo apoio e abrigo durante estes anos de mestrado. Obrigado! Vocês me ajudaram muito e são muito especiais para mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo, pela confiança depositada em minha pessoa, durante todo o transcorrer deste trabalho.

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

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr. (UFRGS) e sua família (Dona Miriam, Guilherme, Lucca e Laura), pelo auxílio na finalização deste trabalho, orientação e por tudo que aprendi durante a minha passagem por seu laboratório.

As empresas que contribuíram com a realização desta pesquisa, em especial a Ajinomoto do Brasil, na pessoa do Sr. Mauro Saito, pela doação dos aminoácidos

L-glutamina e L-alanina e ao Sr. Valmir Machado, diretor da empresa Fórmula Medicinal, pela doação do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina.

Aos colaboradores e amigos do Centro de Biologia Molecular, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela fundamental cooperação e boa vontade na utilização do HPLC.

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

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (USP), em especial ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação (Jorge e Elaine) e do Departamento (Edison, Mônica e Cléo) pelo trabalho de suma importância aos alunos, tais como eu.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este projeto (Processo: 07/58222-8) e a Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica da Nutrição (USP), em especial, aos amigos:

Vinícius Fernandes Cruzat pelos ensinamentos, apoio na elaboração do projeto e companheirismo desde início desta pesquisa.

Mariana Linderberg Alvarenga e Victor Gianpietro, pelo companheirismo durante o processo experimental; pelas horas, que pareciam intermináveis de passagem, consumo, e treinamento dos ratos, no biotério, quando o mesmo, parecia mais “a caverna do dragão”. Obrigado!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia Celular da UFRGS, Cinthia, Aline, Patrícia, Sofia, Gustavo, Najara, Isabela, Renan (Fresnos), “Tonho Hickmann”, Ana, Claudinha e Dona Ritinha, em especial, aos amigos:

Prof^a. Dra. Tatiana Gomes Rosa, pelo apoio e incentivo. Obrigado “Supervisora”!! Pelas palavras de conforto e otimismo, carinho e amizade. Tu és mais que uma amiga, és maravilhosa!

Prof. Ms. Thiago Gomes Heck, pelas dicas de *western blotting* e pelo companheirismo durante as intermináveis horas de homogeneização e experimentação na “sala escura”.

Aos Prof. Dr. Eber Oliveira e Ms. Cassius Urgate Sardilha, pelos conselhos, apoio e amizade durante a finalização deste trabalho.

Obrigado a todos aqui citados ou não, por fazerem parte dessa fase tão especial e importante da minha vida!

PETRY, É.R. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre parâmetros de lesão muscular, sistema antioxidante e expressão gênica de HSP-70 e HSF-1 em ratos submetidos a treinamento aeróbio intenso [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2010. 240 p.

RESUMO

Nutricionalmente classificada como aminoácido não essencial, a glutamina (GLN), tem demonstrado tornar-se condicionalmente essencial, sobretudo em situações catabólicas. Tal condição tem sido vinculada ao fato da GLN exercer proteção a células e tecidos, via modulação sobre funções fundamentais à manutenção da homeostasia celular, incluindo sistemas antioxidantes, representados pela glutatona (GSH) e vias de sinalização celular, antiapoptóticas, como a das proteínas de choque térmico (HSPs). Não obstante, sob condições de elevado estresse fisiológico, incluindo exercícios físicos intensos e prolongados, observa-se redução da concentração de GLN, fato que pode comprometer as funções celulares. Por estas razões, a suplementação com GLN, em especial com dipeptídeos contendo este aminoácido, como o L-alanil-L-glutamina (DIP) tem sido investigada, por representar uma maneira eficiente de fornecimento de GLN, por via oral, ao organismo. No presente estudo, ratos Wistar machos adultos, foram treinados em esteira rolante e suplementados com o DIP ($1,49 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, grupo DIP) e com uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina ($1 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) e L-alanina ($0,61 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) na forma livre (grupo GLN+ALA) ou água (CONTR). Os animais foram sacrificados 12 horas após a última sessão de exercício. No plasma, mensuramos as concentrações de GLN, glutamato, amônia, creatina quinase (CK), mioglobina (MIO) e malondialdeído (MDA). No fígado e músculos sóleo e gastrocnêmio, avaliamos as concentrações de GLN, glutamato, GSH, glutatona oxidada (GSSG) e a expressão

gênica da enzima glutamina sintetase (GS). Avaliamos, também, a expressão gênica, hepática e muscular (músculos sóleo e gastrocnêmio), citoplasmática e nuclear, de HSP-70, nas suas formas constitutiva (HSP-73) e induzível (HSP-72), bem como do fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1) fosforilado e não fosforilado. Ambas as suplementações atenuaram a liberação de CK, MIO, amônia e MDA no plasma, e elevaram as concentrações de GLN no plasma, fígado e músculos sóleo e gastrocnêmio. Ambas as suplementações, também elevaram as concentrações de glutamato, GSH e GSH/GSSG, bem como induziram aumento na expressão de GS, HSP-70, HSP-73, HSP-72 e HSF-1 fosforilado e não fosforilado, no fígado e músculos sóleo e gastrocnêmio. Conclui-se, a partir de nossos resultados, que a suplementação oral com L-glutamina e L-alanina tanto na forma livre quanto na de dipeptídeo, configura-se, numa intervenção nutricional eficiente em prover maior disponibilidade de GLN e glutamato ao organismo, fato que, influenciou os estoques musculares e hepáticos de GSH, alterando o estado redox celular e contribuindo, assim, para a atenuação da liberação de parâmetros indicativos de lesão muscular, induzida pelo exercício físico. Ademais, nossos resultados reforçam a hipótese de que um componente chave da proteção celular mediada pela GLN seja uma aumentada expressão de HSP-70, fato que evidencia, que a GLN não só representaria um importante combustível metabólico durante períodos de estresse fisiológico, mas também uma molécula sinalizadora, capaz de disparar sinais de estresse, via aumento da expressão de HSF-1, tanto no citoplasma, quanto no núcleo celular.

Palavras chave: Glutamina. Exercício intenso. Suplementação. Dipeptídeo. HSP-70, HSF-1. Lesão Muscular. GSH.

PETRY É.R. Effect of supplementation with L-alanyl-L-glutamine on parameters of muscle damage, antioxidant system and gene expression of HSP-70 and HSF-1 in rats subjected to intense aerobic training [Mastre's degree dissertation]. São Paulo - Faculty of Pharmaceutical Sciences, USP, 2010. p. 240.

ABSTRACT

Nutritionally classified as nonessential amino acid, glutamine (GLN) has been shown to become a conditionally essential amino acid, especially in catabolic situations. This condition has been linked to the fact that GLN can promote protection to cells and tissues, through modulating of key functions to the maintenance of cellular homeostasis, including antioxidant system, represented by glutathione (GSH) and cell signaling pathways related to an antiapoptotic process, such as the proteins heat shock (HSPs). However, under conditions of high physiological stress, including strenuous and prolonged exercise, a reduction of the concentration of GLN, which may compromise cell functions is observed. For these reasons, oral supplementation with GLN, especially with dipeptides of GLN, such as L-alanyl-L-glutamine (DIP) has been investigated. In this study, adult male Wistar rats were trained on a treadmill and supplemented with DIP (1.49 g.Kg^{-1} , group DIP) and a solution containing the amino acid L-glutamine (1 g.Kg^{-1}) and L-alanine (0.61 g.Kg^{-1}) in the free forms (group GLN +ALA) or water (CONTR). The animals were sacrificed 12 hours after the last exercise session. In plasma, we measured the concentrations of GLN, glutamate, ammonia, creatine kinase (CK), myoglobin (MIO) and malondialdehyde (MDA). In the liver and gastrocnemius and soleus muscles, we evaluated the concentrations of GLN, glutamate, GSH, oxidized glutathione (GSSG) and gene expression of the enzyme glutamine synthetase (GS). We also evaluated gene expression, in liver and

muscle (soleus and gastrocnemius), cytoplasmic and nuclear HSP-70 in its constitutive forms (HSP-73) and inducible (HSP-72) and transcriptional factor of heat shock-1 (HSF-1) phosphorylated and non-phosphorylated. Both supplementations attenuated the release of CK, MIO, ammonia and MDA in plasma and increased concentrations of GLN in plasma, liver and soleus and gastrocnemius. In the same groups also increased concentrations of glutamate, GSH and GSH / GSSG and induced an increase in the expression of GS, HSP-70, HSP 73, HSP-72 and HSF-1 phosphorylated and non-phosphorylated, liver and muscles soleus and gastrocnemius. It follows from our results that the oral supplementation with L-glutamine and L-alanine as both free form and in a dipeptide, is configured in a nutritional intervention effective in providing greater availability of GLN and glutamate to the body, fact that influenced the liver and muscle stores of GSH, altering the cellular redox state and thereby contributing to mitigate the release of parameters indicative of muscle damage induced by physical exercise. Moreover, our results support the hypothesis that a key component of cellular protection mediated by GLN is an increased expression of HSP-70, a fact that shows that the GLN would not only be an important metabolic fuel during periods of physiological stress, but also a signaling molecule that can trigger signs of stress, by increased expression of HSF-1 in both the cytoplasm and the nucleus.

Keywords: Glutamine. Intense exercise. Supplementation. Dipeptide. HSP-70, HSF-1.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Síntese e degradação de glutamina e enzimas envolvidas.....	36
Figura 2 – Síntese glutamina catalisada pela e enzima glutamina sintetase.....	37
Figura 3 – Hidrólise de glutamina à glutamato catalisada pela enzima glutaminase.....	38
Figura 4 – Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgãos do organismo.....	39
Figura 5 – Fases do processo de peroxidação lipídica.....	72
Figura 6 – Esquema representativo do mecanismo de transcrição, tradução e expressão de HSPs, por meio da ativação do HSF-1 e influência da glutamina neste mecanismo.....	86
Figura 7 - Concentração plasmática de glutamina.....	112
Figura 8 - Concentração plasmática de glutamato.....	113
Figura 9 - Concentração de amônia plasmática.....	114
Figura 10 - Concentração plasmática de creatina quinase.....	115
Figura 11 - Concentração plasmática de mioglobina.....	116
Figura 12 - Concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – malondialdeído aldeído.....	117
Figura 13 - Concentração de glutamina no músculo sóleo.....	118
Figura 14 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo sóleo.....	119
Figura 15 - Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio.....	120
Figura 16 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo gastrocnêmio.....	121
Figura 17 - Concentração hepática de glutamina.....	122
Figura 18 - Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total.....	123
Figura 19 - Concentração de glutamato no músculo sóleo.....	124
Figura 20 - Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio.....	125
Figura 21 - Concentração hepática de glutamato.....	126
Figura 22 - Concentração de GSH no músculo sóleo.....	127
Figura 23 - Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo.....	128
Figura 24 - Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio.....	129
Figura 25 - Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio.....	130
Figura 26 - Concentração hepática de GSH.....	131
Figura 27 - Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG.....	132
Figura 28 - Concentração de proteína no músculo sóleo.....	133
Figura 29 - Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio.....	134
Figura 30 - Concentração de proteína no Fígado.....	135

Figura 31 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo.....	136
Figura 32 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo.....	138
Figura 33 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo.....	139
Figura 34 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1 NF) no músculo sóleo.....	140
Figura 35 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F), no músculo sóleo.....	141
Figura 36 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo.....	143
Figura 37 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo.....	144
Figura 38 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo.....	146
Figura 39 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF) no músculo sóleo.....	147
Figura 40 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F) no músculo sóleo.....	148
Figura 41 - Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo sóleo.....	150
Figura 42 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no músculo gastrocnêmio.....	151
Figura 43 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72), no músculo gastrocnêmio.....	153
Figura 44 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no músculo gastrocnêmio.....	154
Figura 45 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio.....	156
Figura 46 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio	157
Figura 47 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio	158
Figura 48 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio.....	159
Figura 49 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio.....	160
Figura 50 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio.....	161
Figura 51 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio	163
Figura 52 - Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo gastrocnêmio.....	164
Figura 53 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73).....	166
Figura 54 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72).....	167

Figura 55 – Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70).....	168
Figura 56 – Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF).....	170
Figura 57 – Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F).....	171
Figura 58 – Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73).....	173
Figura 59 – Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72).....	174
Figura 60 – Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70).....	175
Figura 61 – Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF).....	176
Figura 62 – Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F).....	177
Figura 63 – Expressão hepática da enzima glutamina sintetase (GS).....	178

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Peso (g) dos animais após o período de 8 semanas.....	111
Tabela 2 - Consumo de ração (g/dia) durante o período de 8 semanas.....	111
Tabela 3 - Concentração de glutamina plasmática.....	112
Tabela 4 - Concentração de glutamato plasmático.....	113
Tabela 5 - Concentração de amônia plasmática.....	114
Tabela 6 - Concentração plasmática de creatina quinase.....	115
Tabela 7 - Concentração plasmática de mioglobina.....	116
Tabela 8 - Concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – malondialdeído aldeído.....	117
Tabela 9 - Concentração de glutamina no músculo sóleo.....	118
Tabela 10 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo sóleo.....	119
Tabela 11 - Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio.....	120
Tabela 12 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo gastrocnêmio.....	121
Tabela 13 - Concentração hepática de glutamina.....	122
Tabela 14 - Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total.....	123
Tabela 15 - Concentração de glutamato no músculo sóleo.....	124
Tabela 16 - Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio.....	125
Tabela 17 - Concentração hepática de glutamato.....	126
Tabela 18 - Concentração de GSH no músculo sóleo.....	127
Tabela 19 - Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo.....	128
Tabela 20 - Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio.....	129
Tabela 21 - Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio.....	130
Tabela 22 – Concentração hepática de GSH.....	131
Tabela 23 - Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG.....	132
Tabela 24 - Concentração de proteína no músculo sóleo.....	133
Tabela 25 - Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio.....	134
Tabela 26 - Concentração de proteína no músculo hepática.....	135
Tabela 27 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo.....	136
Tabela 28 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo.....	137
Tabela 29 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo.....	139
Tabela 30 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF), no músculo sóleo.....	140
Tabela 31 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F), no músculo sóleo.....	141

Tabela 32 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo.....	142
Tabela 33 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo.....	144
Tabela 34 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo.....	145
Tabela 35 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF) no músculo sóleo.....	147
Tabela 36 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F) no músculo sóleo.....	148
Tabela 37 – Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo sóleo.....	149
Tabela 38 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio.....	151
Tabela 39 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio.....	152
Tabela 40 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio.....	154
Tabela 41 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio.....	155
Tabela 42 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio.....	157
Tabela 43 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio.....	158
Tabela 44 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio.....	159
Tabela 45 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio.....	160
Tabela 46 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio.....	161
Tabela 47 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1F) no músculo gastrocnêmio.....	162
Tabela 48 – Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo gastrocnêmio.....	164
Tabela 49 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73)	165
Tabela 50 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72)	167
Tabela 51 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70)	168
Tabela 52 - Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF)	169
Tabela 53 - Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F).....	171
Tabela 54 - Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73).....	172

Tabela 55 - Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72)	173
Tabela 56 - Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70)	175
Tabela 57 - Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF)	176
Tabela 58 - Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F)	177
Tabela 59 – Expressão hepática da enzima glutamina sintetase (GS).....	178

LISTA DE ABRVIATURAS E SIGLAS

μmol/L	Micromol por litro
ACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALA	Aminoácido L-alanina
AMP	Adenosina monofosfato
APAF-1	Fator apoptótico ativador de proteases-1
ATP	Trifosfato de adenosina
CK	Creatina quinase
CO	Enzima citocromo oxidase
CON	Grupo controle, suplementados com água
CoQ	Coenzima Q
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
DIP	Dipeptídeo L-alanil-L-glutamina; ou grupo suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina
DNA	Ácido Desoxido Nucleico
ERK	Quinase reguladora de sinais extracelulares
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
g/Kg	Gramas por quilograma
GA	Enzima glutaminase
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GLN	Aminoácido L-glutamina
GLN+ALA	Grupo suplementado com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre
GR	Enzima glutathiona redutase
GS	Enzima glutamina sintetase
GSH	Glutathiona reduzida ou tripeptídeo γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina

GSH/GSSG	Razão entre glutatona reduzida e glutatona oxidada
GSSG	Glutatona oxidada
H ⁺	Íon hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSEs	Elementos de choque térmico
HSF-1F	Fator transcricional de choque térmico-1, fosforilado
HSF-1NF	Fator transcricional de choque térmico-1, não fosforilado
HSP-25	Proteína de choque térmico de 25 kilodaltons
HSP-27	Proteína de choque térmico de 27 kilodaltons
HSP-70	Proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
HSP-72	Proteína de choque térmico de 72 kilodaltons; ou forma induzível da proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
HSP-73	Proteína de choque térmico de 73 kilodaltons; ou forma constitutiva da proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
HSP-90	Proteína de choque térmico de 90 kilodaltons
HSPs	Heat Shock Proteins – Proteínas de Choque Térmico
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
IL-2	Interleucina-2
IMP	Inosina monofosfato
ITRS	Infecções do trato respiratório superior
JNK	c-Jun quinase N-terminal
K ⁺	Potássio
kDa	Kilodaltons
Kg	Quilogramas
Km	Kilometros
m/min.	Metros por minuto
mA	Miliamperes
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MDA	Malondialdeído

mg/kg	Miligramas por quilograma
min.	Minutos
MIO	Mioglobina
mL	Mililitro
mM	Milimol
mmol/h	Milimol por hora
n=	Número de indivíduos ou animais integrantes do experimento
Na ⁺	Sódio
NADPH	Nicotidamina adenina di-fosfato
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NH ₃	Amônia
NH ₄	Íon amônio
nmol/L	Nanomol por litro
nmol/mL	Nanomol por mililitro
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
OH	Radical hidroxila
PepT-1	Proteína transportadora de oligopeptídeos
pH	
RNA _m	RNA mensageiro ou ácido desoxirribonucleico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SH	Grupamentos sulfidrilas
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UV	Radiação ultravioleta
VO ₂ máx.	Máximo volume de consumo de oxigênio

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1 Glutamina: considerações preliminares.....	34
3.2 Considerações metabólicas e bioquímicas da glutamina.....	35
3.3 Mecanismos de absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos.....	44
3.4 Especificidades da absorção de L-glutamina e L-alanil-L-glutamina.....	48
3.5 Glutamina e exercício físico.....	50
3.6 Glutamina, exercício físico e estresse oxidativo.....	56
3.7 Exercício físico, estresse oxidativo e lesão muscular.....	62
3.8 Exercício físico, estresse oxidativo e peroxidação lipídica.....	71
3.9 Exercício físico, estresse oxidativo e proteínas de choque térmico (HSPs).....	78
3.10 Glutamina, HSPs e proteção celular.....	84
3.11 Efeitos da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina.....	88
4. MATERIAL E MÉTODOS	94
4.1 Condições Experimentais.....	94
4.1.1 Animais.....	94
4.1.2 Dieta e Suplementação.....	94
4.1.3 Grupos Experimentais.....	95
4.1.4 Protocolo de treinamento.....	94
4.2 Métodos Laboratoriais.....	97
4.2.1 Parâmetros Plasmáticos e Séricos.....	97
4.2.1.1 Glutamina.....	97
4.2.1.2. Glutamato.....	97
4.2.1.3. Amônia.....	97
4.2.1.4. Creatina Quinase.....	97
4.2.1.5. Mioglobina.....	98
4.2.1.6. Peroxidação Lipídica.....	98
4.2.2 Parâmetros Teciduais.....	99
4.2.2.1. Glutamina e Glutamato Muscular e Hepático.....	99
4.2.2.2. Proteínas Totais.....	100
4.2.2.3. GSH e GSSG Muscular e Hepática.....	100
4.2.2.4. Expressão Gênica da Enzima Glutamina Sintetase.....	101

4.2.2.5. Expressão Gênica do Fator Transcricional de Choque Térmico-1 (HSF-1).....	102
4.2.2.6. Expressão Gênica das Proteínas de Choque Térmico-73 (HSP-73), 72 (HSP-72) e 70 (HSP-70).....	107
4.3. Análise Estatística.....	110
5. RESULTADOS.....	111
5.1 Parâmetros Biométricos.....	111
5.1.1 Peso Corporal.....	111
5.1.2 Consumo de Ração.....	112
5.2 Parâmetros Plasmáticos e Séricos.....	112
5.2.1 Concentração de glutamina plasmática.....	112
5.2.2 Concentração de glutamato plasmático.....	113
5.2.3 Concentração de amônia plasmática.....	114
5.2.4 Concentração plasmática de creatina quinase.....	115
5.2.5 Concentração plasmática de mioglobina.....	116
5.2.6 Concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – malondialdeído aldeído.....	117
5.3 Parâmetros Teciduais.....	118
5.3.1 Concentração de glutamina no músculo sóleo.....	118
5.3.2 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo sóleo.....	119
5.3.3 Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio.....	120
5.3.4 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo gastrocnêmio.....	121
5.3.5 Concentração hepática de glutamina.....	122
5.3.6 Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total.....	123
5.3.7 Concentração de glutamato no músculo sóleo.....	124
5.3.8 Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio.....	125
5.3.9 Concentração hepática de glutamato.....	126
5.3.10 Concentração de GSH no músculo sóleo.....	127
5.3.11 Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo.....	128
5.3.12 Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio.....	129
5.3.13 Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio.....	130
5.3.14 Concentração hepática de GSH.....	131
5.3.15 Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG.....	132
5.3.16 Concentração de proteína no músculo sóleo.....	133
5.3.17 Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio.....	134
5.3.18 Concentração de proteína hepática.....	135
5.3.19 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo.....	136
5.3.20 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo.....	137

5.3.21 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo.....	138
5.3.22 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo sóleo.....	140
5.3.23 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F), no músculo sóleo.....	141
5.3.24 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo.....	142
5.3.25 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo.....	144
5.3.26 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo.....	145
5.3.27 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo sóleo.....	147
5.3.28 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo sóleo.....	148
5.3.29 Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo sóleo....	149
5.3.30 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio.....	151
5.3.31 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio.....	152
5.3.32 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio.....	154
5.3.33 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio.....	155
5.3.34 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio.....	157
5.3.35 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio.....	158
5.3.36 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio.....	159
5.3.37 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio.....	160
5.3.38 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio.....	161
5.3.39 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio.....	162
5.3.40 Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo gastrocnêmio.....	164
5.3.41 Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73).....	165
5.3.42 Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72).....	167
5.3.43 Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70).....	168
5.3.44 Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF).....	169

5.3.45 Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F).....	171
5.3.46 Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73).....	172
5.3.47 Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72).....	173
5.3.48 Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70).....	175
5.3.49 Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF).....	176
5.3.50 Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F).....	177
5.3.51 Expressão hepática da enzima glutamina sintetase (GS).....	178
6. DISCUSSÃO	179
7. CONCLUSÕES	211
8. REFERÊNCIAS	213
9. ANEXOS	236

1. INTRODUÇÃO

No atual universo esportivo, sobretudo de alto rendimento, as altas exigências competitivas e a busca por resultados máximos, na maioria das competições disputadas, têm feito com que atletas se submetam a sobrecargas de trabalho físico, cada vez mais extenuantes. Tal situação tem ocasionado uma intensa procura por instrumentos, com relevância biológica, capazes de não só auxiliar no aumento do desempenho atlético, mas também na recuperação fisiológica do desportista. Assim, por representar uma alternativa lícita de melhorar o desempenho esportivo, a hipertrofia muscular e a imunocompetência, entre outros, o uso de suplementos nutricionais, seja por atletas ou por indivíduos fisicamente ativos, tem crescido consideravelmente nos dias atuais (GARLICK, 2004; MOREIRA *et al.* 2007). A utilização da glutamina como suplemento nutricional, embora comum, há alguns anos, no âmbito da nutrição clínica, no esporte, contudo, é bastante recente (MOREIRA *et al.*, 2007).

Nutricionalmente classificada como um aminoácido não essencial, uma vez que pode ser sintetizada pelo organismo, de acordo com sua necessidade (NEWSHOLME *et al.*, 2003b), a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular (RENNIE *et al.*, 2001). Dentre as funções em que a glutamina está envolvida na célula destacam-se: processos de proliferação celular, em especial de células do sistema imune, balanço ácido básico, transporte de amônia entre os tecidos, doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese e síntese de glutamato, entre outros (NEWSHOLME *et al.*, 2003a; CURI *et al.*, 2005; RUTTEN *et al.*, 2005). Recentemente, através da utilização de técnicas de biologia molecular, estudos demonstraram que a glutamina também pode influenciar diversas vias de sinalização celular, em especial aquelas relacionadas com processos

antiapoptóticos, como a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) (WISHMEYER, 2002; CURI *et al.*, 2005a; WISHMEYER, 2006). As HSPs, entre outras funções, contribuem para a manutenção da homeostasia da célula na presença de agentes estressores, tais como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e agentes infecciosos.

Evidências experimentais, também têm demonstrado que em situações catabólicas, tais como jejum prolongado, cirurgias, sepse e exercícios físicos, principalmente aqueles realizados de forma intensa, prolongada ou exaustiva a disponibilidade de glutamina torna-se reduzida (KLASSEN *et al.*, 2000, FLARING *et al.*, 2003, SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007). Tal fato tem sido correlacionado a uma maior suscetibilidade, em especial, por atletas de alto rendimento, a serem acometidos por lesões musculares e *overtraining*, fato que além de comprometer o desempenho atlético do indivíduo, por conta de uma redução do seu volume de treinamento, também compromete o seu estado geral de saúde (NIEMAN; PEDERSEN, 1999).

Exercícios físicos intensos e prolongados, além de aumentarem a utilização de glutamina pelas células, promovendo um desequilíbrio entre a síntese e a degradação deste aminoácido (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007), também promovem lesões celulares do tipo oxidativas, em razão da elevada síntese de ERO e ERN (BEJMA; JI, 1999; JI, 1999). Deste modo, sistemas antioxidantes, tais como a glutathiona (GSH) são essenciais na redução da interação entre ERO e ERN e as células, o que pode atenuar o estresse oxidativo induzido pelo exercício intenso. A GSH é o mais importante antioxidante celular não enzimático do organismo, sendo encontrada em elevadas concentrações nas células (RENNIE *et al.*, 2001; MEISTER; ANDERSON 1983). A resistência da

célula a lesões, estresses oxidativos, processos apoptóticos e de detoxificação de xenobióticos são algumas das funções em que a GSH está implicada (RENNIE *et al.*, 2001; LUO *et al.*, 1996, ROTH *et al.*, 2002). Entretanto, considerando o fato de que a síntese de GSH depende da concentração de cisteína, glicina e principalmente de glutamato (RUTTEN *et al.*, 2005; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002a), e que a concentração de glutamato, por sua vez, é influenciado pela disponibilidade e o transporte de glutamina para dentro da célula (LUO *et al.*, 1996, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b, RUTTEN *et al.*, 2005), uma menor disponibilidade de glutamina pode influenciar a síntese de GSH. Assim, diversos estudos têm indicado que a suplementação com L-glutamina pode representar uma eficiente alternativa de aumentar os estoques de GSH e atenuar o estresse oxidativo ocorrido em situações de elevado catabolismo muscular, tal como em exercícios intensos e prolongados (FLÄRING *et al.*, 2003; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002a).

A administração oral com L-glutamina na forma livre, no entanto, seja em humanos ou em animais saudáveis tem apresentado baixa eficácia (CASTELL *et al.*, 1997, ROHDE *et al.*, 1998, KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001a, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002b, ROGERO *et al.*, 2006). A utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como o L-alanil-L-glutamina (DIP) tem mostrado ser uma alternativa não invasiva de aumentar a concentração de glutamina corporal (KLASSEN *et al.*, 2000, ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006). A maior eficiência da suplementação com o L-alanil-L-glutamina tem sido creditada por este se apresentar na forma de um dipeptídeo, menos sujeita à hidrólise e utilização pelas células da mucosa intestinal (ADIBI, 2003). Na maioria dos estudos, contudo, não foi testada uma

solução contendo os mesmos aminoácidos, nas mesmas quantidades que o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da suplementação com o DIP e uma solução contendo L-glutamina e L-alanina na forma livre, sobre parâmetros plasmáticos indicativos de lesão muscular, sistema antioxidante, representado pela GSH, e na modulação da expressão gênica da expressão gênica da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70), nas suas formas constitutiva (proteína de choque térmico de 73 kDa - HSP-73) e induzível (proteína de choque térmico de 72 kDa - HSP-72), bem como do fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1) e da enzima glutamina sintetase (GS), no tecido muscular e hepático, de ratos submetidos a treinamento aeróbio intenso em esteira rolante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre sobre parâmetros plasmáticos indicativos de lesão muscular, sistema antioxidante representado pela GSH e na modulação da expressão gênica da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70), nas suas formas constitutiva (proteína de choque térmico de 73 kDa - HSP-73) e induzível (proteína de choque térmico de 72 kDa - HSP-72), bem como do fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1) e da enzima glutamina sintetase (GS), no tecido muscular e hepático. A amostra foi composta por ratos Wistar, machos adultos, treinados em um protocolo contínuo de exercício aeróbio intenso, em esteira rolante durante 8 semanas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina ou de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, sobre a concentração plasmática de indicadores de lesão muscular: creatina quinase (CK) e mioglobina (MIO).
- Avaliar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina ou de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, sobre a concentração plasmática de glutamina, glutamato, amônia e malondialdeído (MDA).
- Avaliar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina ou de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma

livre, sobre a concentração muscular e hepática de glutamina, glutamato, proteína total, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG).

- Avaliar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina ou de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, sobre a expressão gênica citoplasmática da enzima glutamina sintetase (GS) nos músculo sóleo e gastrocnêmio, assim como no fígado.

Avaliar o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina ou de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, sobre a expressão gênica citoplasmática e nuclear da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP-70), nas suas formas constitutiva (proteína de choque térmico de 73 kDa - HSP-73) e induzível (proteína de choque térmico de 72 kDa - HSP-72), e do fator de choque térmico-1 (HSF-1), nas suas formas fosforilada e não fosforilada, no tecido muscular esquelético e hepático.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Glutamina: considerações preliminares

A existência da glutamina e sua significância como uma molécula com propriedades biologicamente importantes foram consideradas pela primeira vez em 1873, por Hlasiwetz e Habermann, que, sugeriram à época que a amônia oriunda de hidrolizados protéicos resultava da liberação de glutamina e asparagina (CURI, 2000, HISCOCK; PEDERSEN, 2002). Krebs, posteriormente, em 1935 demonstrou em tecidos a presença de enzimas que possuíam tanto a capacidade de sintetizar, quanto de degradar glutamina (HISCOCK; PEDERSEN, 2002). A partir destes estudos, observou-se um considerável incremento nos conhecimentos dos aspectos relacionados à participação da glutamina no metabolismo celular.

Durante a Segunda Guerra Mundial, contudo, tais conhecimentos foram bastante prejudicados, vindo a ganhar novo impulso, somente na metade final da década de 1950, a partir dos trabalhos desenvolvidos por Eagle (1955). Este pesquisador demonstrou que células, em cultura, utilizam glutamina em quantidades superiores a qualquer outro aminoácido. Recentes trabalhos, com diferentes tipos de células, tais como linfócitos, macrófagos, enterócitos, células HeLa têm demonstrado que tanto a proliferação celular pode ser aumentada, quanto a manutenção de estruturas e funções celulares pode ser mantida em meios de cultura contendo glutamina (CURI *et al.*, 2005).

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 que a glutamina não apenas participa da síntese protéica, mas também desempenha papel importante, em um grande número de vias

metabólicas. Mediante tal evidência, esses mecanismos, dependentes de glutamina, passaram a ser denominados como vias glutaminolíticas (LACEY; WILMORE, 1990).

Recentemente, através da utilização de técnicas de biologia molecular, observou-se que a glutamina não apenas participa de múltiplas reações bioquímicas dentro da célula, mas também é importante para a manutenção de inúmeras funções celulares. Dentre estas, destacam-se a modulação de vias de sinalização celular, relacionadas, entre outras funções, com a expressão de genes envolvidos com a síntese e degradação de proteínas, regulação de fatores de crescimento, resposta inflamatória e imunológica, proliferação e apoptose celular (NEWSHOLME *et al.*, 2003b; CURI *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 2005; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007).

Em decorrência da importância da glutamina para o metabolismo e a manutenção da funcionalidade celular, atualmente, inúmeros trabalhos têm pautando seu interesse na investigação da implicação deste aminoácido, como suplemento nutricional, tanto na nutrição clínica quanto esportiva, como forma de atenuar os efeitos deletérios de situações catabólicas, como câncer, aids, dengues, sepse, traumas cirúrgicos e exercícios intensos e prolongados. No entanto, cabe ressaltar que esta intervenção nutricional, ainda produz resultados controversos (KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2006).

3.2 Considerações metabólicas e bioquímicas da glutamina

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, com peso molecular de 147,1 kilodaltons, que pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo (CURI, 2000, NEWSHOLME *et al.*, 2003b). Em sua composição química é encontrada nas seguintes quantidades: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%) (LACEY; WILMORE, 1990, CURI, 2000). A glutamina 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, 2003).

Como o organismo pode sintetizar glutamina, esta é classificada, nutricionalmente, como um aminoácido não essencial (LACEY; WILMORE, 1990). Contudo, em algumas situações catabólicas como traumas, sepse, câncer e no exercício intenso e prolongado, a concentração intracelular e plasmática de glutamina pode diminuir em até 50%, fato que leva a um desbalanço entre a síntese e a demanda deste aminoácido pelo organismo. Por esta razão, a classificação da glutamina como um aminoácido não essencial, tem sido bastante questionada, sendo que diversos autores sugerem a sua re-classificação como um aminoácido “condicionalmente essencial” (WRAY; MAMMEN; HASSELGREN, 2002; SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007).

Presente em diversas proteínas, e encontrada em concentrações relativamente elevadas em diversos tecidos corporais, a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no organismo (ROWBOTTOM *et al.*, 1996). No plasma humano, em concentrações que variam entre 0,5 a 0,9 mM, a glutamina representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres, enquanto que no tecido muscular

esquelético, seu conteúdo intracelular corresponde a cerca de 50 a 60% do total de aminoácidos livres (NIEMAN; PEDERSEN, 1999; WALSH *et al.*, 1998).

O metabolismo da glutamina é influenciado por diversas enzimas intracelulares. Contudo, apenas duas enzimas guardam relação direta com este processo, sendo elas a enzima glutamina sintetase (GS), responsável pela síntese deste aminoácido, a partir do glutamato e a enzima glutaminase (GA), responsável pela degradação (hidrólise) de glutamina, também em glutamato, (ROWBOTTOM 1996) (figura 1). Cabe ressaltar que o glutamato, por sua vez é sintetizado a partir do α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs e amônia (NH_3) (LACEY 1990; NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996).

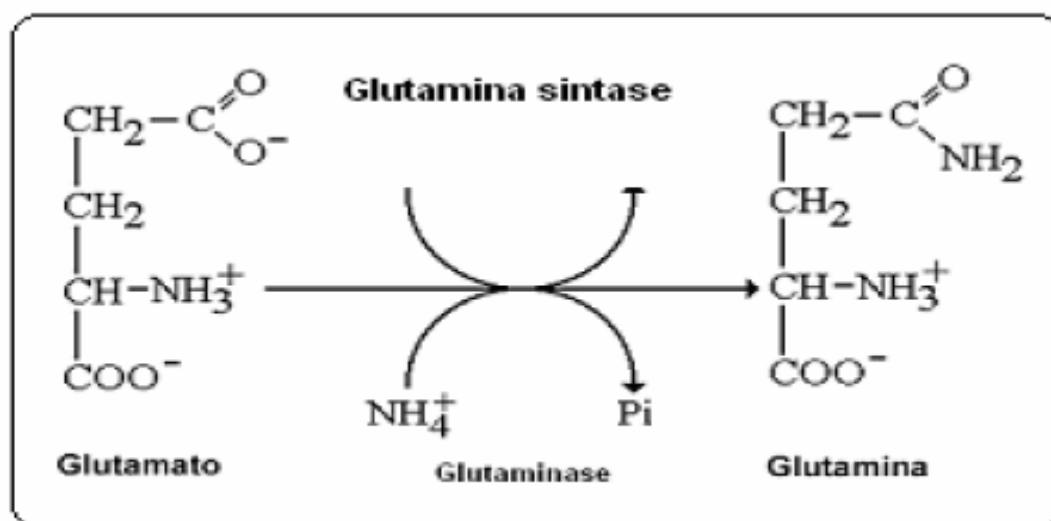


Figura 1 – Síntese e degradação de glutamina e enzimas envolvidas. (Adaptado de DI PASQUALE *et al.*, 1997).

Com distribuição generalizada entre os organismos vivos, a GS é uma aminotransferase cuja atividade é regulada por diversos fatores tais como glicocorticóides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina. Localizada, de forma intracelular no citosol (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001), a GS é responsável pela catálise da reação que converte glutamato em glutamina.

Para tanto a enzima utiliza amônia como fonte de nitrogênio num processo onde há gasto de trifosfato de adenosina (ATP) conforme demonstrado na figura 2. Por realizar tal tarefa, a GS, também é considerada uma enzima chave para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio, fato fundamental para a manutenção da vida de microrganismos, plantas e animais (CURI, 2000, HISCOCK; PEDERSEN, 2002).



Figura 2 – Síntese glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase. (Adpatado de NEWSHOLME *et al.*, 2003b).

Dependendo do tecido ou órgão, a GS desempenha diferentes funções (LABOW; SOUBA; 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 (CURI, 2000). 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 (CURI, 2000; LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001) .

Na contramão da GS, a glutaminase (GA) é a enzima que catalisa a hidrólise de glutamina em glutamato e íon amônio (Figura 3). Tal fato representa o primeiro passo na utilização de glutamina a partir da síntese do glutamato. A partir desta reação, outras reações podem ocorrer, principalmente, na via que permite o consumo de glutamina no ciclo do ácido tricarboxílico (RENNIE *et al.*, 2001), onde a reação catalisada pela GA limita o fluxo pela via glutaminolítica, de modo que há

uma correlação entre a presença de GA e a utilização de glutamina, por certo tipo celular (CURI, 2000).

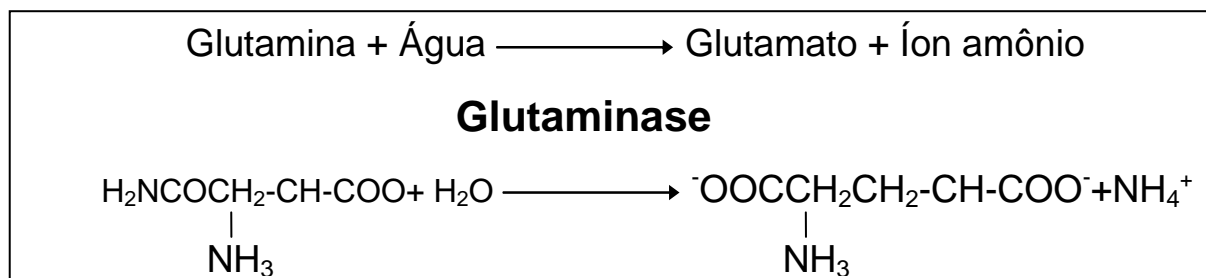


Figura 3 – Hidrólise de glutamina a glutamato catalisada pela enzima glutaminase. (Adaptado de CURI, 2000).

Encontrada em bactérias, plantas e animais, a GA atua em diversos processos metabólicos. Em mamíferos, a GA pode ser encontrada sob duas isoformas, uma (menos abundante) no fígado, conhecida como glutaminase hepática e, outra nos demais tecidos, tais como rins, cérebro, leucócitos e trato gastrointestinal, denominada glutaminase renal. Contudo, a sua forma mais ativa apresenta-se, sobretudo nas mitocôndrias (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001).

Para Neu; Shenoy; Chakrabarti (1996) tanto a localização da GS no citosol, quanto à localização da GA nas mitocôndrias estão compatíveis com suas respectivas, funções: a GA catalisando a hidrólise de glutamina como fonte de energia e a GS catalisando a reação de síntese de glutamina, o que contribui para uma maior síntese de proteínas citoplasmáticas e nucleotídeos.

Tanto a concentração tecidual, quanto a concentração sanguínea de glutamina, que num indivíduo de aproximadamente 70 Kg pode variar em torno de 500-700 $\mu\text{mol/L}$, (D'SOUZA; TUCK, 2004) 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 enzima GA, sendo assim considerados tecidos consumidores de glutamina (VAN DE POLL *et al.*, 2004). Por

outro lado, a musculatura esquelética, 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) (WALSH *et al.*, 1998b; ROWBOTTON *et al.*, 1996).

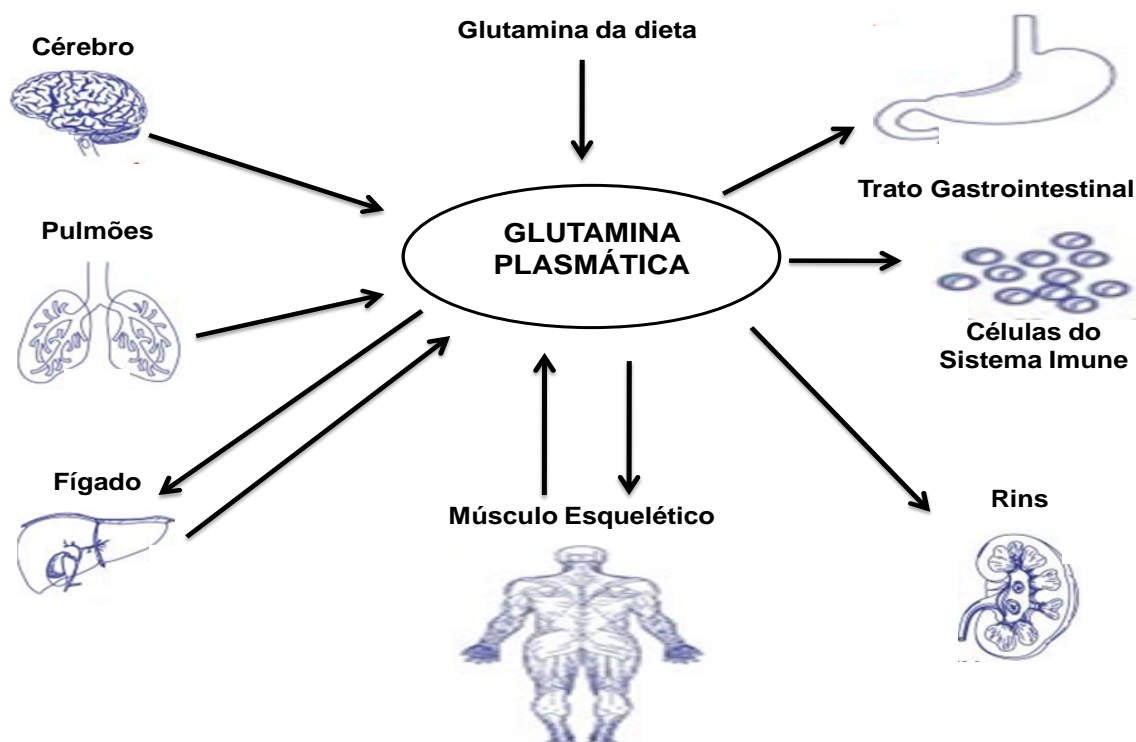


Figura 4 – Produção e utilização de glutamina por diversos tecidos e órgão do organismo. (Adaptado de ROWBOTTON *et al.*, 1996).

Representando, em média, cerca de 40% da massa corporal total, o tecido muscular esquelético, quantitativamente, configura-se no principal tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina. Tal capacidade está relacionada à alta atividade das enzimas aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) e GS apresentada por este tecido (VAN DE POLL *et al.*, 2004). Embora possa variar, a taxa de síntese de glutamina no músculo esquelético é de aproximadamente 50 mmol/h, a maior taxa encontrada entre todos os aminoácidos (NEWSHOLME *et al.*, 2003b).

Além disso, o músculo esquelético é capaz de elevar a taxa de síntese e liberação de glutamina, principalmente em resposta a situações em que há aumento de sua demanda por outros órgãos e tecidos, fato que confere a este tecido um papel metabólico essencial na homeostasia corporal. Diversos eventos catabólicos, tais como traumas, queimaduras, cirurgias, câncer, sepse e exercícios intensos e prolongados, levam a uma diminuição na concentração intramuscular de glutamina, em decorrência do consumo deste aminoácido, pelo organismo, exceder a sua capacidade de síntese (DOHM *et al.*, 1981; PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989; SANTOS *et al.*, 2004).

Do ponto de vista metabólico, as fibras musculares podem ser classificadas em tipo I (oxidativas - caracterizadas por um grande número de mitocôndrias e elevada atividade de enzimas da cadeia respiratória) e tipo II (glicolíticas - caracterizadas por serem pobres em mitocôndrias e contribuírem para a dotação energética, principalmente, por meio da via anaeróbia ou glicolítica). Tal classificação exerce influência direta sobre a capacidade de estoque e síntese intramuscular de glutamina (WALSH *et al.*, 1998a). Evidências experimentais apontam que fibras do tipo I podem apresentar cerca de três vezes mais estoques de glutamina em comparação a fibras do tipo II (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996; WALSH *et al.*, 1998b). Tal fato é atribuído, entre outros fatores, a uma maior disponibilidade de ATP e atividade da enzima GS neste tipo de fibra muscular. Dados experimentais apontam ainda que, dependendo do músculo estudado, quando a síntese *de novo* de glutamina é inibida, os estoques intramusculares deste aminoácido podem ser depletados em aproximadamente 7 horas (RENNIE *et al.*, 2001).

A síntese da glutamina no músculo esquelético, durante o estado pós-absortivo ocorre por meio da captação de glutamato, a partir da circulação

sangüínea. O glutamato é responsável por 40% da síntese de glutamina (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). Estudos em ratos demonstram que os ACR são transaminados, quase que exclusivamente como α -cetoglutarato para formar glutamato, o qual pode fornecer seu grupo amino para formar piruvato, gerando alanina, ou incorporar amônia livre, dando origem à 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 que totalmente na forma inativa no músculo esquelético. Conseqüentemente, no tecido muscular, os aminoácidos de cadeia ramificada captados inicialmente são utilizados como fornecedores de nitrogênio na formação de glutamina e alanina (MEIJER, 2003).

A glutamina apresenta um gradiente transmembrana através da célula muscular elevado, o que torna sua difusão livre através da membrana celular restrita (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^+), fato que resulta em gasto de ATP (WINDMUELLER, 1982). 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) e que a estabilidade da concentração deste aminoácido no fluido intracelular e o gradiente de concentração através da membrana representam um efeito combinado de diversos fatores, como: afinidade do sistema de transporte, influência

da competição entre aminoácidos por moléculas carreadoras, razão intracelular de síntese e degradação, taxa de fornecimento extracelular, taxa de fluxo através da membrana celular, quantidades intra e extracelulares de Na⁺.

A entrada de glutamina na célula muscular é estimulada pela ação de hormônios como a insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs); os hormônios contrarreguladores como os glicocorticóides, por outro lado, em virtude de um estímulo do aumento da atividade da enzima GS, sobretudo durante estados de intenso catabolismo, conduzem a um efluxo máximo de glutamina para o meio extracelular, mesmo em situações onde as concentrações intracelulares deste aminoácido encontrem-se reduzidas. Tal fato leva a uma diminuição dos estoques intracelulares de glutamina e a alterações no transporte cinético deste aminoácido (WINDMUELLER, 1982, ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b).

Alguns estudos apontam que a glutamina, ao ser transportada para o ambiente intracelular, promove, concomitantemente, a absorção de água e a liberação de potássio (K⁺), fato que aumenta o estado de hidratação e influencia o volume celular (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 diversas funções bioquímicas na célula. Dentre estas se destacam: regulação do equilíbrio ácido base, sendo precursor de amônia na urina; principal carreador de nitrogênio entre os tecidos; precursor de ácidos nucleicos, purinas e pirimidinas; principal intermediário na síntese de glutamato e do ácido γ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor cerebral, com

atividade tanto inibitória quanto excitatória; principal doador de esqueletos de carbono para a gliconeogênese hepática; regulador da síntese de glicogênio; participação na composição de peptídeos, na divisão de células do sistema imune e em processos de recuperação de estresses fisiológicos, tais como cirurgias, ferimentos e jejum prolongado (LANCEY; WILMORE, 1990; NEWSHOLME *et al.*, 2003a; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Além disso, recentemente, foi demonstrado que a glutamina pode participar da síntese de nucleotídeos e inibir a ativação de importantes vias de sinalização intracelular pró-apoptóticas, como as vias da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF-kB), durante situações de elevado estresse fisiológico (NEWSHOLME *et al.*, 2003b, CURI *et al.*, 2005a, SINGLETON *et al.*, 2005; SINGLETON e WISCHMEYER, 2007). Tal ação da glutamina é creditada, entre outros fatores, à capacidade deste aminoácido de induzir a expressão gênica de uma variedade de proteínas envolvidas com respostas anti-apoptóticas, tais como as proteínas de estresse ou de choque térmico (*heat shock proteins* - HSPs) (GABAI e SHERMAN, 2002). Tais funções retratam o papel relevante da glutamina tanto em condições fisiológicas, quanto fisiopatológicas (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; JACKSON; CARROLL; RUSSEL-JONES, 2000).

3.3 Mecanismos de absorção de aminoácidos livres e dipeptídeos

Sob condições fisiológicas normais, as necessidades nutricionais protéicas de seres humanos e animais são plenamente supridas pela absorção de aminoácidos e pequenos peptídeos oriundos da dieta. Deste modo, o processo que envolve a digestão e os mecanismos de absorção de aminoácidos livres, dipeptídios e tripeptídios possuem implicações diretas sobre a nutrição humana.

O processo de digestão de proteínas é iniciado na boca, embora nesse sítio não sofram nenhuma modificação química, sendo apenas reduzidas a partículas menores. Já no estômago, pela ação do ácido clorídrico e da pepsina, proteínas e polipeptídios são desnaturados e hidrolisados. Contudo, a digestão estomacal, representa somente de 10 a 20% da digestão protéica total. Com efeito, a maior parte da digestão protéica ocorre no lúmen do duodeno e jejuno, finalizando-se, quase que completamente no íleo terminal. Posteriormente, no intestino delgado, sob a ação da enteropeptidase, que em pH neutro ativa o tripsinogênio e a tripsina, ocorre a hidrólise luminal de proteínas e polipeptídios, fato que leva à síntese de aminoácidos livres e pequenos peptídeos, que são hidrolisados a aminoácidos, dipeptídios e tripeptídios, por peptidases presentes na membrana borda em escova (FRENHANI; BURINI, 1999).

O intestino delgado dispõe de grande capacidade de absorver dipeptídeos. Variações regionais nesta capacidade, contudo, são observadas. Estudos demonstram que a capacidade absorptiva de dipeptídios é maior na fração proximal do intestino delgado em relação à fração distal. Tal fato está relacionado a uma maior presença e atividade de peptidases citossólicas que atuam sobre dipeptídeos, no segmento proximal deste órgão. Por outro lado a capacidade absorptiva de

aminoácidos livres é maior na fração distal do intestino delgado, quando comparada à fração proximal (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994; ADIBI, 2003).

Os produtos finais da digestão protéica consistem de uma mistura de 40% de aminoácidos livres e de 60% de pequenos dipeptídeos e tripeptídeos (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b). Apesar disto, até o início da década de 50 acreditava-se que os produtos finais da digestão protéica consistiam única e exclusivamente de aminoácidos livres, para os quais havia diversos mecanismos de transporte. Contudo, a partir de estudos de absorção de aminoácidos, observou-se que os enterócitos, a partir do lúmen intestinal, dispõem de eficientes mecanismos de transporte e absorção de dipeptídeos e tripeptídeos (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994; TEMPLE *et al.*, 1998). De forma geral, estes mecanismos são controlados por um sistema específico de absorção de aminoácidos e dipeptídeos através da membrana borda em escova. Este sistema pode ser dividido da seguinte forma:

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

b) dipeptídeos que permanecem após a digestão por peptidases luminiais e ligados à membrana borda em escova, que podem ser absorvidos de forma intacta pelo intestino delgado de duas maneiras: 1) transportados como dipeptídeos intactos ou clivados por peptidases dentro do citoplasma das células da mucosa intestinal; 2) clivados em aminoácidos livres por hidrolases de peptídeos presente na membrana borda em escova e posteriormente transportados para dentro do citoplasma das células intestinais como aminoácidos, pela proteína transportadora de

oligopeptídeos (PepT-1) (CASPARY, 1992; ADIBI, 2003; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b).

Localizada exclusivamente na membrana borda em escova do epitélio intestinal, a PepT-1 possui ampla especificidade por substratos e transporta ativamente dipeptídeos e tripeptídeos, tanto no intestino de humanos como de animais. Deste modo, a PepT-1 é considerada a principal via de absorção dos produtos finais da digestão protéica. A atividade desta proteína permite que dipeptídeos transitem da mucosa intestinal, que apresenta reduzida atividade de hidrolases, para o citossol e conseqüentemente sejam utilizados pela própria célula ou, liberados diretamente na circulação portal, através dos transportadores de aminoácidos localizados na membrana basolateral (ADIBI, 2003).

A membrana basolateral dos enterócitos também possui ao menos outros cinco sistemas de transporte de aminoácidos, sendo dois destes dependentes de sódio (Na^+) e três independentes. Estudos demonstram que os sistemas dependentes de Na^+ apresentam importante papel no fornecimento de aminoácidos para as células do próprio intestino, enquanto que os sistemas independentes de Na^+ são responsáveis pelo transporte de aminoácidos para a circulação sanguínea. Tanto os transportadores de aminoácidos presentes na membrana borda em escova (PepT-1), quanto na membrana basolateral têm sua funcionalidade distinguida mediante seus mecanismos de transporte e por sua afinidade por substratos. Tais diferenças são responsáveis pela eficiência do fluxo transcelular, ou seja, pela absorção intestinal de peptídeos.

Frenhani e Burini (1999) relatam que aminoácidos livres, dipeptídeos e tripeptídeos ao serem transportados, atravessam as membranas borda em escova e basolateral mediante mecanismos de transferência passiva, por difusão simples ou

facilitada, ou, ainda por meio de um sistema ativo, através de cotransportadores dependentes de hidrogênio (H^+) ou Na^+ . Aminoácidos livres são transportados, tanto por meio do sistema passivo quanto pelo ativo, enquanto que dipeptídeos e tripeptídeos são transportados, quase que preferencialmente, por meio do sistema ativo dependente de H^+ . Cabe salientar que o sistema ativo dependente de Na^+ ocorre principalmente na membrana borda em escova, enquanto que o transporte por difusão simples se dá na membrana basolateral, sendo que ambas as membranas apresentam o transporte passivo facilitado (FRENHANI; BURINI, 1999).

A utilização destes dois sistemas, dependente de Na^+ e H^+ , para a absorção ativa de aminoácidos e dipeptídeos, respectivamente, é vantajosa para o organismo, uma vez que auxilia a manter adequada a nutrição protéica. Tal fato está relacionado à ausência de competição entre aminoácidos e dipeptídeos pelo gradiente energético que permite que estes sejam absorvidos. Deste modo a absorção de aminoácidos e dipeptídeos pode ocorrer paralelamente (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994).

Estudos por meio de perfusão jejunal, inclusive com humanos, demonstraram que a competição entre aminoácidos livres durante o processo de captação é evitada ou reduzida, quando estes se apresentam sob a forma de dipeptídeos ou tripeptídeos (TEMPLE *et al.*, 1998). Outros estudos observaram maior e mais rápida absorção de aminoácidos a partir de soluções com dipeptídeos, quando comparado a soluções com aminoácidos livres de igual composição. Tal fato foi creditado, entre outros fatores, à capacidade demonstrada por estes dipeptídeos, de chegarem intactos ao intestino delgado (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003b).

3.4 Especificidades da absorção de L-glutamina e L-alanil-L-glutamina

Cerca de 50% da glutamina presente no lúmen intestinal que atravessa a membrana borda em escova dos enterócitos, advinda do estado pós-prandial, é utilizada ou consumida pelo trato gastrointestinal. Cabe salientar que em situações em que não haja suficiente aporte de glutamina a partir do lúmen intestinal, o trato gastrointestinal também pode obter glutamina a partir da circulação sanguínea, graças a transportadores específicos presentes na membrana basolateral (LEIBACH; GANAPATHY, 1996; ROGERO e TIRAPEGUI, 2000). Estudos demonstram que a presença de glutamina no lúmen intestinal diminui em até 40% a taxa de captação e utilização de glutamina, pelo enterócito, a partir da circulação sanguínea (WINDMUELLER, 1982).

A glutamina na forma livre dispõe de um transportador Na^+ dependente na superfície da membrana borda em escova. Este aminoácido é absorvido *em vivo*, pelo jejuno, sendo posteriormente, metabolizada, pelo intestino e pelo fígado (D'SOUZA; TUCK, 2004). Estudos com animais experimentais demonstram que a taxa de utilização de glutamina pelas células epiteliais jejunais é semelhante tanto para a glutamina advinda da circulação sanguínea, quanto para a advinda do lúmen intestinal (MINAMI; MORSE; ADIBI, 1992).

A mucosa intestinal pode obter glutamina ainda, a partir de dipeptídeos presentes no lúmen intestinal, mediante a hidrólise extracelular de peptídeos contendo este aminoácido, seguido de sua respectiva absorção, ou pela absorção de peptídeos de glutamina seguida pela hidrólise intracelular dos mesmos. Contudo, ainda é desconhecido se o desaparecimento luminal de dipeptídeos contendo glutamina na mucosa intestinal ocorra, predominantemente, por transporte na forma intacta destes dipeptídeos, ou, então, por hidrólise dos mesmos, via peptidases

presentes na membrana borda em escova. Minami; Morse e Adibi (1992) verificaram que, especificamente, o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, no intestino delgado, é preferivelmente absorvido como dipeptídeo intacto, e subseqüentemente hidrolisado a glutamina livre no enterócito, ao invés de ser previamente hidrolisado na membrana luminal. Estudos *in vitro*, onde dipeptídeos de glutamina foram marcados radioativamente, demonstram que mais de 90% da radioatividade ficou acumulada no citossol e de forma intacta (FRENHANI; BURINI, 1999).

Em um estudo de resposta cinética de absorção, Klassen *et al.* (2000), observaram aumento significativo na concentração plasmática de glutamina quando indivíduos foram submetidos á ingestão oral de 20g de L-alanil-L-glutamina em uma única dose ou de maneira intermitente. Outros estudos observaram que todas as frações celulares apresentam atividade hidrolítica para o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, demonstrando assim, ser, o uso deste dipeptídeo uma estratégia nutricional eficiente para ofertar glutamina às células, tanto *in vitro* como *in vivo* (ADIBI; SCHENKER; MORSE, 1996; ADIBI, 2003; MINAMI; MORSE; ADIBI, 1992).

3.5 Glutamina e exercício físico

Embora durante o exercício a oxidação de aminoácidos não corresponda à principal fonte de ATP, sua utilização pela musculatura esquelética é muito importante para manter o fluxo de substratos para o ciclo de Krebs, sobretudo durante atividades intensas e de longa duração. Diversos estudos têm indicado que em exercícios ou treinos, principalmente prolongados e de elevada intensidade, alterações nas concentrações plasmáticas de alguns aminoácidos, entre eles a glutamina e os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) podem ser observadas (ROHDE *et al.*, 1996; ZANKER *et al.*, 1997; CASTELL, 2002; HISCOCK; PEDERSEN, 2002; ROGERO; TIRAPÉGUI, 2003b; SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007).

Inicialmente, o exercício intenso e prolongado promove acelerada liberação de glutamina, a partir do músculo esquelético (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996). Tal fato tem sido correlacionado de forma linear e direta à intensidade do exercício e a aumentos proporcionais a esta intensidade, na concentração plasmática deste aminoácido. Em um estudo *in vivo*, com humanos, que foram submetidos a uma sessão de exercício com duração de 75 minutos, a uma intensidade de 75% do máximo volume de consumo de oxigênio (VO_2 máx.) observou-se que a concentração plasmática de glutamina, que em repouso era de 0,618 nmol/L, elevou-se para 0,767 nmol/L, ao término do exercício (SAHLIN; KATZ; BROBERG, 1990). Resultado semelhante foi observado por Babij; Matthews e Rennie (1983), que aplicando exercício em cicloergômetro, com intensidade de 100% do VO_2 máx., verificaram um aumento na concentração plasmática de glutamina (0,734 nmol/L) após o exercício, em comparação ao repouso (0,575 nmol/L).

A elevação da síntese de amônia advinda da desaminação de adenosina monofosfato (AMP) à inosina monofosfato (IMP), em decorrência da elevada demanda por ATP durante a contração muscular (HOOD; TERJUNG, 1994; ANTONIO; STREET, 1999) é apontada como a principal causa metabólica para o aumento da concentração plasmática de glutamina durante o exercício. Este aumento, contudo, é transitório, de modo que uma subsequente redução da glutaminemia (oxidação parcial da cadeia carbônica da glutamina) é observada, sobretudo quando a duração do exercício excede 1 hora (ZANKER *et al.*, 1997). A magnitude e a duração da redução da glutaminemia variam consideravelmente com o tipo de exercício estudado, com o estado nutricional do indivíduo e com a intensidade da sessão de treinamento. Fatores como uma maior taxa de captação e utilização de glutamina por diversos órgãos como rins, fígado e células de rápida divisão (células do sistema imune) têm sido apontados como a principal causa da redução na glutaminemia observada, sobretudo, no período que sucede a realização do exercício (período de recuperação) (PARRY-BILLINGS, *et al.*, 1989).

Uma redução da glutaminemia também é tida como a causa metabólica da imunossupressão observada logo após exercícios exaustivos e prolongados (ROGERO *et al.*, 2002). Tal fato tem sido relacionado ao aumento da incidência de infecções do trato respiratório superior e a ocorrência de episódios de *overtraining* em atletas, com concomitante redução e prejuízos na *performance* atlética (ROWBOTTON *et al.* 1996; CASTELL; NEWSHOLME, 1997). Parry-Billings, *et al.* (1992) observaram redução da concentração plasmática de glutamina (0,592 $\mu\text{mol/L}$ para 0,495 $\mu\text{mol/L}$) em maratonistas, logo após estes completarem uma prova. Lehmann *et al.* (1995) verificaram que atletas de ultratriatlon apresentavam a concentração plasmática de glutamina, significativamente reduzida, 30 minutos após

o final da prova (468 $\mu\text{mol/L}$ para 318 $\mu\text{mol/L}$). Já Castell *et al.* (1997) encontraram redução da concentração de glutamina no plasma entre 5 e 15 minutos após uma maratona, sendo que menores concentrações foram observadas 1 hora após o término da prova. Em outro estudo, Castell e Newsholme (1997) verificaram redução de aproximadamente 20% na concentração plasmática de glutamina, em atletas de diferentes esportes, cerca de 2 horas após o término do exercício. Keast *et al.* (1995), ao avaliarem a influência da intensidade do exercício de corrida sobre a concentração de glutamina no plasma, verificaram que 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 uma sessão de exercício com intensidade de 90% do VO_2 máx.. Ainda neste estudo, foi observado que a queda na glutaminemia foi mais significativa quanto maior foi à intensidade do exercício ao qual os indivíduos foram submetidos.

Uma redução na glutaminemia, também tem sido observada em modelos experimentais submetidos a exercício físico, sobretudo de forma intensa e prolongada. Santos; Caperuto e Costa Rosa (2007) verificaram que a realização de exercício de natação em intensidade moderada ou até a exaustão promoveu uma redução na concentração plasmática de glutamina de $818,3 \pm 28 \text{ nmol/mL}$ e $778,2 \pm 23,3 \text{ nmol/mL}$, respectivamente, quando comparado aos valores do grupo sedentário $910 \pm 22,9 \text{ nmol/mL}$.

A concentração plasmática de glutamina em exercícios de caráter intermitente, ou seja, exercícios onde a intensidade e a duração são variáveis, como futebol, tênis, basquetebol, ciclismo, triatlão entre outros, também tem sido avaliada. Walsh *et al.* (1998a) observaram uma redução na concentração plasmática de glutamina por até 5 horas após a realização de um protocolo de ciclismo até a exaustão. Em outro estudo, Rhode *et al.* (1996) verificaram uma redução na

concentração plasmática de glutamina em triatletas 2 horas após a realização de uma prova. Também em exercício intermitente, Keast *et al.* (1995) observaram que o treinamento intenso durante 10 dias promoveu acentuada redução da glutaminemia, que só retornou ao normal após 6 dias. Neste período, os atletas foram submetidos somente a exercícios de intensidade moderada.

Além de reduzir a concentração plasmática de glutamina, o exercício intenso e prolongado também leva a uma redução da concentração intramuscular deste aminoácido. Num estudo *in vivo*, com humanos, Bergström *et al.* (1974) observaram que nos primeiros 10 minutos de exercício a uma intensidade de 70% do VO_2 máx., a concentração intramuscular de glutamina elevou-se de 18,9 mmol/L para 23,6 mmol/L. Contudo, com o prosseguimento do exercício, esta concentração veio, logo em seguida, a reduzir-se. Em outro estudo, Rennie *et al.* (1981) observaram uma redução de 34% na concentração intramuscular de glutamina, em humanos, imediatamente após uma sessão de exercício com duração de 225 minutos a 50% do VO_2 máx.. Já Christophe *et al.* (1971) observaram uma redução na concentração muscular de glutamina, em ratos, imediatamente após duas sessões de exercício de natação com duração de 15 e 30 minutos, respectivamente. A maior redução das concentrações de glutamina, neste estudo, foi observada no fígado, onde houve uma redução de aproximadamente 50%, quando comparada ao grupo que permaneceu em repouso, durante o estudo. Também em ratos, Dohm *et al.* (1981) observaram redução de 19% na concentração intramuscular de glutamina e glutamato, no músculo gastrocnêmio, duas horas após uma sessão de corrida em esteira rolante, em uma intensidade que variou entre 75% a 80% do VO_2 máx.. No mesmo estudo, só que em exercício de natação, os autores verificaram redução de 15% na concentração intramuscular de glutamina no mesmo grupamento muscular.

Além disso, nos dois tipos de exercício, a concentração hepática de glutamina, também se mostrou reduzida (DOHM *et al.*, 1981).

Segundo Wagenmakers (1998), entre os mecanismos que acarretam a diminuição das concentrações plasmática e muscular de glutamina, durante e após exercícios físicos prolongados e intensos, uma alteração no transporte cinético deste aminoácido no músculo esquelético tem considerável destaque. A glutamina é transportada por um mecanismo saturável, que é responsável pela alta capacidade de transporte deste aminoácido, sendo este sistema dependente de Na^+ . O aumento das concentrações intracelulares de Na^+ leva a um aumento do efluxo de glutamina a partir do músculo. Fato semelhante, também ocorre quando há uma elevação da concentração de hormônios contra reguladores, tais como o cortisol. O cortisol estimula tanto o efluxo de glutamina a partir do músculo esquelético, quanto à captação de glutamina pelo fígado (DOHM *et al.*, 1985). Uma maior oferta de glutamina no fígado, associada à diminuição dos estoques hepáticos de glicogênio e ao aumento da concentração de cortisol promovem maior estímulo a gliconeogênese hepática a partir da utilização de glutamina como substrato (MACKINNON; HOOPER, 1996; ROGERO *et al.*, 2002; ROGERO *et al.*, 2006). Outra hipótese que justificaria a queda de glutaminemia durante e após exercícios prolongados, está vinculada a um aumento da captação de glutamina pelo fígado, a fim de servir, como substrato para a síntese do principal antioxidante celular não enzimático, a glutathiona (GSH), por meio da liberação de glutamato (VALENCIA *et al.*, 2001c).

Outro mecanismo implicado na diminuição da glutaminemia durante o exercício físico prolongado e intenso refere-se a uma alteração no pH sangüíneo por conta de uma aumentada produção de íons H^+ , fato que ocasiona acidose metabólica e conduz a um aumento da captação de glutamina pelos rins (CURI,

2000). Tal fato decorre da necessidade deste órgão de tamponar a aumentada produção de íons H^+ e assim, fazer frente à elevada concentração de lactato sanguíneo desencadeada pelo exercício. Cabe ressaltar que quanto mais intenso for o exercício, maior é a produção de íons H^+ e, conseqüentemente, maior a demanda de glutamina pelos rins. Deste modo, os rins tornam-se o principal órgão de captação de glutamina durante períodos de acidose metabólica (CURI, 2000; NEWSHOLME *et al.* 2003b; BROSNAN, 2000; VAN DE POLL, *et al.*, 2004). A eliminação de íons H^+ pelos rins auxilia na manutenção do equilíbrio ácido-base, uma vez que envolve o fornecimento de amônia oriunda da glutamina. Neste processo, a amônia escapa das células do túbulo renal por um processo de difusão passiva, e se une a prótons H^+ formando íons amônio (NH_4) (WALSH *et al.*, 1998a; GRAHAM; MACLEAN, 1998).

Além destes fatos, o aumento da captação de glutamina por células de rápida divisão, tais como células do sistema imune (linfócitos, macrófagos e neutrófilos), também tem sido correlacionado como fator colaborador para a redução da glutaminemia induzida pelo exercício físico. Células do sistema imune utilizam glutamina como o principal substrato energético e para sua proliferação (MACKINNON; HOOPER, 1996). Deste modo, a diminuição da concentração plasmática de glutamina tem sido relatada por diversos autores como fator limitante da funcionalidade destas células. Fatores associados à atividade proliferativa das células do sistema imune têm sido apontados como fatores chaves para os resultados contraditórios em relação à interferência da glutamina no metabolismo destas células (ROBSON *et al.*, 1999; MOREIRA *et al.*, 2007; SANTOS, CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007).

3.6 Glutamina, exercício físico e estresse oxidativo

Durante o processo evolutivo, um dos principais avanços dos seres vivos foi à capacidade de utilização do oxigênio (O_2) no processo de síntese de energia intracelular. Tal fato permitiu que a quantidade de energia sintetizada por estes seres aumentasse em mais de dez vezes, corroborando, desta forma, para que tais organismos evoluíssem e atingissem o estágio em que nos encontramos atualmente (HALLIWELL; GUTTERIDGE,1999). Entretanto, ao mesmo tempo em que a utilização do O_2 se tornou fundamental no desenvolvimento de organismos mais complexos, tal situação trouxe consigo, um efeito indesejável denominado paradoxo do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE,1999). A molécula de O_2 além de agir como um aceptor universal de elétrons permitindo que organismos aeróbios catabolizem de forma oxidativa substratos como carboidratos, lipídios e proteínas, também pode desencadear ações prejudiciais às células, representadas pela síntese de diversas substâncias com propriedades tóxicas, que compreendem os radicais livres (RL), as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (BEJMA; JI, 1999; JI, 1999).

Do ponto de vista molecular, o O_2 é uma molécula com dois elétrons desemparelhados e de *spins* iguais, na sua última camada de valência. Deste modo, para ser reduzido o O_2 necessita receber seus elétrons um a um, fato que ocorre através de uma reação de oxiredução unieletrônica, catalisada pela enzima citocromo oxidase (CO). Durante esta reação, a CO catalisa a transferência simultânea de quatro elétrons produzindo água (H_2O) como produto final (HALLIWELL; GUTTERIDGE,1999). Estima-se que este processo redutor, que ocorre no interior das mitocôndrias, mais especificamente, na cadeia respiratória mitocondrial (CRM), sob condições fisiológicas normais, contribua para o consumo

de cerca de 85% a 90% do O₂ inspirado (FRIDOVICH, 1998). Entretanto apesar da CO possuir alta afinidade com o O₂, uma pequena fração do O₂ consumido, cerca de 2% a 5%, pode sofrer desvios, no interior da CRM, principalmente ao entrar em contato com a coenzima Q (CoQ). Tal desvio faz com que este percentual do fluxo total de elétrons do O₂ consumido, seja reduzido de forma univalente, fato que corrobora para a síntese de ERO, ERN e de um amplo espectro de espécies radicalares, como o ânion radical superóxido (O₂^{•-}) e o radical hidroxila (OH[•]), e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (JENKINS; GOLDFARB, 1993).

Considerando-se o fato da mitocôndria ser o local de consumo de O₂ nos organismos aeróbios, este compartimento intracelular, sobretudo a CRM é apontada como o principal sítio de síntese de ERO e ERN nestes organismos, ao passo que a CoQ é apontada como a enzima chave da síntese intramitocondrial destes compostos (JI, 1999). Assim, há um consenso de que apesar de ser essencial para a síntese de energia, o metabolismo oxidativo também pode desencadear ações prejudiciais às células, sobretudo quando altamente estimulado. Deste modo, atividades como exercícios físicos aeróbios de alta intensidade e longa duração tais como maratonas, ultramaratonas, triatlão, entre outros passaram a ser objeto de estudo (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Tais atividades são caracterizadas por uma exacerbada estimulação do metabolismo oxidativo, fato evidenciado por um aumento no consumo de O₂ numa proporção de cerca de 20% no organismo como um todo e de 200% ao nível da fibra muscular isolada, quando comparado ao estado de repouso (OGONOVSKY *et al.*, 2005). Embora importante para suprir a elevada demanda energética durante tais atividades, evidências experimentais têm apontado que esta elevação no consumo de O₂ tem se correlacionado de forma direta com a uma maior suscetibilidade, em particular por atletas de alto rendimento, a lesões,

fadiga crônica e *overtraining*, parcialmente em razão de uma elevada síntese ERO e ERN durante a prática destas atividades (CRUZAT *et al.*, 2007).

Cabe salientar que ERO e ERN também fazem parte do metabolismo celular normal (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006), uma vez que exercem funções fundamentais para a vida e para a regulação do estado redox da célula, como atividades microbicidas, de sinalização e de biogênese celular (DRÖGE, 2002). Entretanto, por possuírem uma configuração eletrônica instável, mesmo tendo meia-vida curta, as ERO são altamente reativas, o que as tornam capazes de reagir com outras moléculas ou metais a partir de reações em cadeia, na tentativa de obter uma estrutura eletrônica mais estável. Tal fato tem sido apontado como principal fator indutor de danos à estrutura e funcionalidade da célula, como a peroxidação dos fosfolipídios da bicamada lipídica que compõem as membranas celulares e subcelulares, lesões ao DNA e a oxidação de proteínas celulares (DRÖGE, 2002; FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006; DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

Por definição ERO ou ERN é qualquer espécie oxidante altamente reativa formada por oxigênio ou nitrogênio, respectivamente, incluindo os radicais livres, que são átomos ou moléculas que apresentam elétrons não pareados na sua última camada de valência, de seus orbitais atômicos ou moleculares (BEJMA; JI, 1999; JI, 1999).

Sob condições fisiológicas normais, o organismo encontra-se em equilíbrio entre a síntese e a degradação de ERO (DRÖGE, 2002; FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). Contudo, durante exercícios de caráter extenuante, a síntese de ERO supera a capacidade endógena antioxidante, instalando-se um processo conhecido como estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio pró-síntese em relação à degradação de ERO (JI, 1999; DRÖGE, 2002; FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006).

Quando ocorrido cronicamente, o estresse oxidativo pode reduzir a massa e a força muscular, bem como, aumentar a gravidade de lesões às células, resultando em menor capacidade de recuperação, fadiga crônica, depressão do sistema imune, fraqueza muscular e *overtraining* (JI, 1999).

No intuito de neutralizar a aumentada síntese de ERO desencadeada pela elevada estimulação do metabolismo oxidativo, e assim atenuar o estresse oxidativo celular durante e após o exercício intenso e prolongado, as células dispõem de um sistema antioxidante classificado como enzimático e não enzimático (JI, 1999; DRÖGE, 2002). Dentro do sistema antioxidante não enzimático, o tripeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, comumente conhecido como glutathiona (GSH), corresponde ao principal antioxidante celular não enzimático do organismo (MEISTER; ANDERSON, 1983). Composta por resíduos de cisteína, ácido glutâmico e glicina (MEISTER; ANDERSON, 1983), a GSH é encontrada em elevadas concentrações nas células. Sua ação contra os efeitos deletérios das ERO pode se dar de maneira direta, mediante reações não enzimáticas, onde esta, a fim de reduzir a interação das ERO com as células passa de sua forma reduzida para sua forma oxidada (GSSG), ou ainda através de uma ação como doadora de elétrons na redução de peróxidos catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) (SEN, 1995; JI, 1999).

A atividade de diversas enzimas, incluindo a própria GPx, é determinada pela disponibilidade de substratos, que também são modulados pela concentração de GSH e GSSG (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c). 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 glutationa redutase (GR), que utiliza NADPH como fonte de poder redutor. Em resumo, mediante diversos mecanismos, a GSH protege a membrana das células mantendo a concentração de muitas proteínas e de seus grupamentos sulfidrilas (SH) na forma reduzida, os quais são necessários para o funcionamento normal das células (MEISTER; ANDERSON, 1983; BEUTLER, 1989; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001a; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c).

A GSH é sintetizada em diversos tecidos, sobretudo no fígado, o qual apresenta elevada atividade da enzima GR. Em condições fisiológicas o fígado é capaz de suprir cerca de 90% da GSH circulante (JI, 1999; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002). A realização de exercícios físicos, sobretudo intensos e prolongados, pode modular tanto durante, quanto após o exercício à ação do sistema de defesa antioxidante, principalmente o sistema GSH. Sob tais condições fisiológicas é verificada uma elevação da concentração plasmática de catecolaminas, glucagon e vasopresina. Tal fato leva a um aumento do efluxo hepático de GSH para o plasma e outros tecidos, sendo este captado, principalmente, pelo tecido muscular esquelético (JI, 1999; BEST *et al.*, 1999; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b).

A síntese de GSH apresenta uma considerada dependência da concentração de cisteína, glicina e principalmente de glutamato (JI, 1999; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002; FLÄRING *et al.*, 2003). Evidências experimentais apontam que as concentrações musculares destes aminoácidos apresentam significativas correlacionadas com as concentrações de GSH (RUTTEN *et al.*, 2005). O glutamato representa a primeira e provavelmente a mais importante etapa na síntese dos compostos integrantes da GSH (ANTONIO; STREET, 1999; JI, 1999; FLÄRING *et al.*, 2003). Considerando-se o fato que o glutamato é dependente da disponibilidade

de glutamina, o transporte deste aminoácido para dentro das células mantém a concentração de glutamato e, conseqüentemente, de GSH. Deste modo uma diminuição do fornecimento de glutamina às células, durante e após o exercício intenso e prolongado, também tem sido associada à maior suscetibilidade a lesões oxidativas por promover ou exacerbar um quadro de estresse oxidativo celular (BABIJ *et al.*, 1983). Concomitante a isto uma redução da resistência imunológica também tem sido observada, situação esta que tem sido relacionada a específicas respostas imunoestimulatórias, como a migração de neutrófilos e macrófagos. Tal fato resulta em maior síntese de ERO, inibição da síntese da enzima GS e aumento do consumo de glutamina pelo trato gastrointestinal (ROWBOTTOM; KEAST; MORTON, 1996), além de representar um dos principais estímulos a ativação de vias de sinalização celular pró-apoptóticas como a da c-Jun quinase N-terminal (JNK), do fator nuclear Kappa B (NF-kB) e de genes relacionados a supressão tumoral como o p53 e o p38 (JI, 2002). Por outro lado, uma maior síntese de ERO, também tem sido relacionada, a ativação de vias de sinalização celular associados à resistência da célula a lesões (vias anti-apoptóticas). Dentre estas vias, destacam-se a via da quinase reguladora de sinais extracelulares (ERK) e a via das proteínas de choque térmico (HSPs) (REID; LI, 2001). Deste modo, a magnitude das ações deletérias produzidas pelas ERO e ERN está diretamente relacionada ao grau de adaptação do sistema de defesa antioxidante.

3.7 Exercício físico, estresse oxidativo e lesão muscular

Ao mesmo tempo em que promove um desequilíbrio entre a síntese de ERO e ERN e a capacidade antioxidante corporal, situação conhecida como estresse oxidativo (BEJMA; JI, 1999; JI, 1999), a prática frequente de exercícios físicos intensos e prolongados, também induz a um elevado catabolismo muscular, com consequentes alterações na estrutura da célula muscular (McBRIDE *et al.*, 1998). Tal situação é conhecida como estresse muscular (HORTOBÁGYI *et al.*, 1998; WILLOUGHBY *et al.*, 2003).

De maneira geral, a realização de exercícios físicos intensos e prolongados, sobretudo aqueles caracterizados por um elevado índice de impacto, tais como corridas de meio-fundo, fundo, maratonas e ultramaratonas, expõe a célula muscular, a elevados níveis de estresse. Tal fato tem sido relacionado a uma maior incidência de microtraumatismos na musculatura esquelética, em decorrência do desencadeamento de uma série de respostas mecânicas e bioquímicas, que culminam no rompimento do aparato contrátil da membrana da célula, ou da integridade estrutural e funcional das fibras musculares ativas, em virtude de aumentos no metabolismo e recrutamento da musculatura esquelética (HORTOBÁGYI *et al.*, 1998; WILLOUGHBY *et al.*, 2003).

A ocorrência de microtraumatismos no tecido muscular pode ser induzida durante todo o ciclo de contração muscular, ou seja, tanto na fase concêntrica, quanto na fase excêntrica de contração (REID; LI, 2001; MALM, 2001; NOBREGA, 2005). Diferentes grupos de pesquisa apontam que movimentos do tipo excêntrico, por induzirem maior tensão sobre as fibras musculares, configuram-se como o principal fator indutor da ocorrência destes microtraumatismos, uma vez que elevam a incidência de microrupturas no sarcolema e na lamina basal do músculo,

principalmente, ao nível da região das linhas “Z” (GLEESON *et al.*, 1998; Best *et al.*, 1999; WILLOUGHBY *et al.*, 2003). Diversos outros mecanismos, como o processo de isquemia e reperfusão tecidual ou a realização de treinamentos com quantidade elevadas de repetições, também são apontados como fatores indutores da ocorrência de microtraumas na musculatura esquelética (BLOOMER; GOLDFARB, 2004).

Geralmente, a ocorrência de microtraumatismos no tecido muscular é acompanhada por uma resposta inflamatória moderada, que é caracterizada por ocorrer de forma aguda e local, tendo por finalidade a realização do processo de cicatrização e recuperação destes microtraumatismos (REID; LI, 2001; MALM, 2001; NOBREGA, 2005). Cabe salientar, que a ocorrência de microtraumatismos na musculatura esquelética representa uma resposta adaptativa comum, deste tecido, ao exercício físico, inclusive com inúmeros benefícios a saúde do indivíduo (NOBREGA, 2005). Contudo, diversos estudos, têm relatado que a frequente realização de exercícios intensos e prolongados ou de treinos exaustivos, associados a períodos inadequados de recuperação, leva a uma exacerbação da ocorrência destes microtraumatismos, bem como a um comprometimento da capacidade dos tecidos, em especial do tecido muscular esquelético, de resistirem ao estresse gerado pelo exercício físico. Tal fato tem sido associado de forma direta, a uma maior incidência de lesões musculares e da impossibilidade do indivíduo atleta, de manter o seu nível de *performance* atlética, em virtude de constantes interrupções na sua seqüência de treinamento (RÁDAK *et al.*, 2001; BLOOMER; GOLDFARB, 2004). Diversos estudos, também têm apontam que a inflamação aguda ou crônica induzida pelo exercício físico prolongado e intenso, posteriormente, pode evoluir para um quadro de inflamação sistêmica. Tal situação,

geralmente é acompanhada por uma série de outras situações prejudiciais, como, por exemplo, a redução da massa e força muscular, sintomas de cansaço, fadiga crônica, redução da mobilidade corporal e *overtraining* (TOUMI; BEST, 2003; OGONOVSKY *et al.*, 2005). Todos estes eventos aumentam a suscetibilidade a infecções e ao desenvolvimento de doenças, comprometendo não só o desempenho atlético do indivíduo, mas também o seu estado geral de saúde (REID; LI, 2001, ROGERO *et al.*, 2006).

Lesões musculares desencadeados pelo exercício físico podem variar desde uma lesão ultra-estrutural dos elementos passivos (fibras musculares e tecidos ligamentares), em decorrência do rompimento do aparato contrátil das membranas celulares, em especial dos tecidos conectivos ligados às miofibrilas adjacentes, da própria célula muscular, da lâmina basal adjacente à membrana plasmática, da membrana plasmática da célula muscular, do sarcômero, do retículo sarcoplasmático, ou ainda de uma combinação desses componentes, até traumas envolvendo a completa ruptura do músculo. Tal situação é caracterizada por um quadro de dor, que apresenta um pico entre 24 a 48 horas pós exercício (CRUZAT *et al.*, 2007).

As características morfológicas e ultra estruturais da lesão induzida pelo exercício estão bem documentadas em modelos animais e humanos. Do ponto de vista histológico, o músculo lesado pode ser caracterizado pelo rompimento miofibrilar, estrutura irregular das linhas “Z”, rompimento do sarcolema, localização irregular de organelas, aumento da densidade mitocondrial e do conteúdo de proteínas miofibrilares e do citoesqueleto (CRUZAT *et al.*, 2007). O aumento da concentração de proteínas citosólicas na circulação sanguínea após o exercício, também reflete um quadro de lesão muscular. Desta forma, as lesões às fibras

musculares podem ser avaliadas de duas formas: 1) de maneira direta pela avaliação ultra estrutural através do emprego de técnicas histológicas ou de microscopia eletrônica; ou 2) de maneira indireta por meio da mensuração de marcadores bioquímicos de lesão tecidual, via determinação do efluxo de enzimas e proteínas citosólicas específicas, para a circulação sanguínea. Ambas as técnicas, visam à observação e avaliação dos efeitos locais da lesão as fibras musculares (GLEESON *et al.*, 1998; HORTOBÁGYI *et al.*, 1998; WILLOUGHBY *et al.*, 2003).

Clarkson e Sayers, (1999) assim como Malm, (2001) verificaram que a ocorrência de lesões teciduais, sejam elas ocasionadas por choques, compostos químicos, bactérias, calor ou pelo exercício físico, levam ao rompimento das estruturas contráteis ou dos compostos citoesqueléticos da musculatura esquelética. Tal fato leva ao extravasamento ou aumento da liberação, para o ambiente extracelular e, posteriormente, para a corrente sanguínea de proteínas e enzimas intracelulares. Normalmente, estas proteínas e enzimas citosólicas são incapazes de atravessar a membrana plasmática, sendo, pois, baixos os seus níveis séricos. Deste modo, a presença destas proteínas e enzimas na circulação sanguínea reflete significativa alteração na estrutura e permeabilidade da membrana miofibrilar.

Segundo York (2003), a mensuração da atividade enzimática e de proteínas no plasma e soro sanguíneo baseia-se na premissa de que alterações nesta atividade refletem modificações em algum órgão ou sistema específico. Evidências experimentais apontam que na eminência da ocorrência de alterações na permeabilidade da membrana, sobretudo durante a atividade muscular intensa, há uma tendência ao aumento em torno de 2 a 10 vezes acima dos valores basais, nos níveis séricos e plasmáticos de enzimas e proteínas citosólicas (LIJNEN; HESPEL; FAGARD, 1988; SOEDER; GOLF; GRAEF, 1989). Ainda, de acordo com York

(2003), enzimas e proteínas citosólicas de menor peso molecular tendem a aparecer primeiro no soro e no plasma sanguíneo, em relação a enzimas e proteínas mitocondriais, que antes de chegarem ao sangue têm de atravessar tanto a membrana mitocondrial quanto a sarcoplasmática. A presença de enzimas e proteínas mitocondriais ou citoplasmáticas no sangue guarda uma estreita relação com o nível de extensão do tecido lesado, uma vez que quanto maior a extensão da lesão tecidual, maior é a concentração destas enzimas e proteínas citosólicas no plasma e no soro sanguíneo (WILMORE; COSTILL, 2001).

Dentre as enzimas e proteínas citosólicas avaliadas frequentemente, como marcadores bioquímicos de lesão muscular, induzida pelo exercício físico, as atividades séricas da enzima creatina quinase (CK) e da proteína mioglobina (MIO) têm sido bastante utilizadas. Nuviala *et al.* (1992) verificaram aumento na concentração de CK em atletas imediatamente após uma maratona, sendo que valores pico desta enzima, no plasma, foram observados 24 horas após a prova. Em outro estudo, onde atletas participaram de uma corrida de 30 km, Santos *et al.* (2004) também observaram aumento na concentração de CK. Os autores observaram que cerca de 24 horas após o exercício, a concentração de CK ainda se encontrava significativamente elevada, em comparação aos valores pré exercício. Já Simpson *et al.*, (2005) observaram que corredores moderadamente treinados, submetidos a uma corrida montanhosa, ou seja, um exercício onde há um componente excêntrico bastante acentuado, apresentaram elevada concentração de CK, fato que persistiu, por até 48 horas após o evento. Resultado semelhante, também foi observado por Bruunsgaard *et al.* (1997) que verificaram que indivíduos submetidos a exercícios do tipo excêntrico, em cicloergômetro, além de apresentarem aumento na concentração de CK, imediatamente após o exercício,

mantiveram esta concentração elevada por até 7 dias após a sessão de exercício. Segundo os autores, tal fato indica uma elevada quantidade de lesão às células musculares, induzida pelo exercício físico intenso.

Embora possa ocorrer um aumento detectável na atividade de CK imediatamente após o exercício, o pico de efluxo muscular desta enzima, só é alcançado entre 24 e 72 horas pós exercício, sendo este pico dependente do tipo, intensidade e duração do exercício realizado (STUPKA *et al.*, 2000; STUPKA *et al.*, 2001). Deste modo a resposta de CK ao exercício ocorre em uma taxa mais lenta. Assim, segundo Sorichter *et al.* (1998), a mensuração da concentração sérica de MIO representa um dos parâmetros mais úteis para a detecção da lesão ao tecido muscular, induzida pelo exercício físico. Tal relação, de acordo com os autores está vinculado ao fato da resposta da MIO, ao exercício, ser significativamente mais rápida, em comparação a CK.

A MIO é uma proteína citoplasmática, de baixo peso molecular, com um grupo heme encontrada tanto na musculatura esquelética quanto cardíaca. Em virtude de agir como uma proteína ligadora de oxigênio, a MIO possui fácil movimentação no citosol, tanto em células musculares, quanto cardíacas. Deste modo, qualquer processo associado a lesões, necrose ou lise destes tecidos, leva a um aumento da concentração desta proteína na corrente sanguínea. Este aumento, geralmente, é proporcional à extensão da lesão e ocorre de forma rápida (1 a 4 horas), vindo a alcançar seu valor máximo 6 a 7 horas após o evento. Contudo, evidências experimentais têm apontado que a concentração plasmática de MIO só retorna aos níveis basais, dentro de 24 horas após o evento lesivo (SORICHTER *et al.*, 1998; KINGSLEY *et al.*, 2005).

Em recente estudo, a fim de investigar parâmetros de lesão muscular em triatletas, Neubauer; Köning; Wagner (2008) acompanharam 42 triatletas bem treinados durante 19 dias, após uma prova de *iron-man*. Amostras de sangue destes indivíduos foram coletadas 2 dias antes, imediatamente após, 1, 5 e 19 dias após a prova. Ao final do estudo, os autores observaram significativo aumento na concentração plasmática de CK e MIO, imediatamente após a prova, em relação aos valores pré-exercício. Os autores observaram também que a concentração de CK permaneceu significativamente elevada por até 5 dias após o exercício, em comparação aos valores anteriores à prova, sendo que seu pico máximo foi observado 1 dia após a prova. Já em relação à concentração de MIO, os autores verificaram que seu pico máximo se deu instantaneamente após a prova, fato que persistiu, por até um dia após o exercício. Neubauer; Köning e Wagner (2008) destacam ainda, que embora tenha sofrido uma redução entre o quinto e o décimo nono dia de estudo, a concentração de MIO, pós exercício, contudo, permaneceu maior que os valores pré prova, até o final do estudo. Em outro estudo, foram observados significativos aumentos nos níveis plasmáticos de CK e MIO, em indivíduos fisicamente ativos submetidos a uma única sessão de exercício excêntrico, em esteira rolante (corrida com grau de inclinação de 16%, a uma intensidade de 70% do VO_2 máx.) (SORICHTER *et al.*, 1998). Neste mesmo estudo, os autores verificaram que a concentração de MO apresentou seu pico máximo 30 minutos após o exercício, enquanto que a concentração de CK só alcançou seu pico máximo, 2 horas após a corrida. Os autores destacam ainda que a concentração de MIO retornou aos valores basais dentro de 24 horas após o exercício, fato que não se repetiu em relação a concentração de CK, a qual permaneceu elevada por até 48 horas após a corrida.

Resultados semelhantes aos de Sorichter *et al.* (1998) foram observados por Baker *et al.* (2004), que verificaram um significativo aumento na concentração plasmática de CK e MIO, imediatamente após o exercício, em universitários, saudáveis e fisicamente ativos, submetidos a uma única sessão de 30 segundos de exercício excêntrico, em cicloergômetro. No mesmo estudo, os autores constaram também que as concentrações de CK e MIO, só retornaram aos valores basais 24 horas após o exercício. Em outro estudo, Sorichter *et al.* (1997) analisaram as concentrações plasmáticas de CK e MIO em 61 professores de educação física, fisicamente ativos, submetidos a exercícios concêntricos e excêntricos. Ao final do estudo, os autores observaram que exercícios predominantemente excêntricos, tais como uma corrida em esteira rolante com inclinação de 16%, ou o exercício de “leg press” em uma inclinação de 45°, promoveram maior elevação nos níveis de CK e MIO, imediatamente após o exercício, em relação a exercícios predominantemente concêntricos, como uma corrida em esteira rolante sem inclinação ou o exercício de *leg press* em aparelho isocinético.

As concentrações de CK e MIO também foram avaliadas em exercícios onde predominava a alternância de intensidade (exercício intermitente). Kingsley *et al.* (2005) investigaram os níveis séricos de CK e MIO em futebolistas, logo após estes serem submetidos a uma corrida intermitente, de alta intensidade, até a exaustão. Amostras de sangue foram coletadas em repouso, 15 minutos, 24 e 48 horas após o exercício. Os autores observaram que em todos os tempos analisados, as concentrações de CK e MIO apresentaram-se acima dos níveis pré exercício. Kingsley *et al.* (2005) verificaram também que a concentração de CK atingiu seu pico máximo, 24 horas após o exercício, enquanto que a concentração de MIO teve seu pico máximo, imediatamente após o exercício, retornando ao nível basal

24horas após o término da corrida. Em recente estudo, também com futebolistas, Ascensão *et al.* (2008) observaram significativo aumento na concentração de MIO 30 minutos após o término de uma partida, em relação aos valores basais. No mesmo estudo, os autores observaram ainda, um significativo aumento na concentração de CK, quando comparada aos níveis anteriores ao jogo, fato que persistiu por até 72 horas após a partida.

3.8 Exercício físico, estresse oxidativo e peroxidação lipídica

Evidências experimentais apontam que em virtude da elevada reatividade e instabilidade eletrônica, a interação de ERO e ERN com as células configura-se como o principal fator indutor de danos oxidativos a diversos componentes celulares. Dentre estes componentes destacam-se o DNA, compostos tióis, co-fatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e fosfolipídios de membrana (JENKINS, 1988; BEJMA; JI, 1999; JI, 1999; HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999; DRÖGE, 2002; DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

Embora a ação lesiva de ERO e ERN possa incidir sobre todos os componentes da célula, membranas celulares e subcelulares são mais propensas a sofrerem danos oxidativos. Formadas por uma bicamada fosfolipídica, as membranas celulares e subcelulares, são ricas em ácidos graxos poliinsaturados. Esta constituição tornam-nas mais suscetíveis a interagir com ERO e ERN, mediante uma cascata de reações bioquímicas, conhecida como peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999).

O processo de peroxidação lipídica leva a uma degeneração dos fosfolipídios de membrana, o que culmina em transtornos da permeabilidade das mesmas e conseqüentes alterações do fluxo iônico e de outras substâncias importantes a célula. Ao mesmo tempo, também há uma perda da seletividade para a entrada ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, além do comprometimento dos componentes da matriz extracelular, tais como: proteoglicanos, colágeno e elastina (VACA; WILHEM; HARMS-RINGDAHL, 1988; BABER; HARRIS, 1994). Desta forma a peroxidação lipídica representa um evento citotóxico primário, que desencadeia uma série de danos lesivos à célula como a destruição da estrutura membranar, a

falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, a apoptose ou morte celular (BENZIE, 1996).

Bioquimicamente, a peroxidação lipídica pode ocorrer de forma enzimática e não enzimática (AL MEHDI *et al.*, 1993). Pela maneira enzimática, tal processo decorre da ação das ciclooxygenases e lipooxygenases, que realizam a oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados, que formam a bicamada fosfolipídica que compõem as membranas da célula. Pela forma não enzimática, a peroxidação lipídica ocorre a partir da interação de ERO, ERN e outros agentes radicalares, como íons metais de transição, mediante um evento bioquímico conhecido como ataque radicalar com os fosfolipídios de membrana (AL MEHDI *et al.*, 1993; PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

A série de reações em cascata que compõem o processo de peroxidação lipídica pode ser dividida em três etapas, bem definidas: iniciação, propagação e terminação, conforme representado na figura 5.

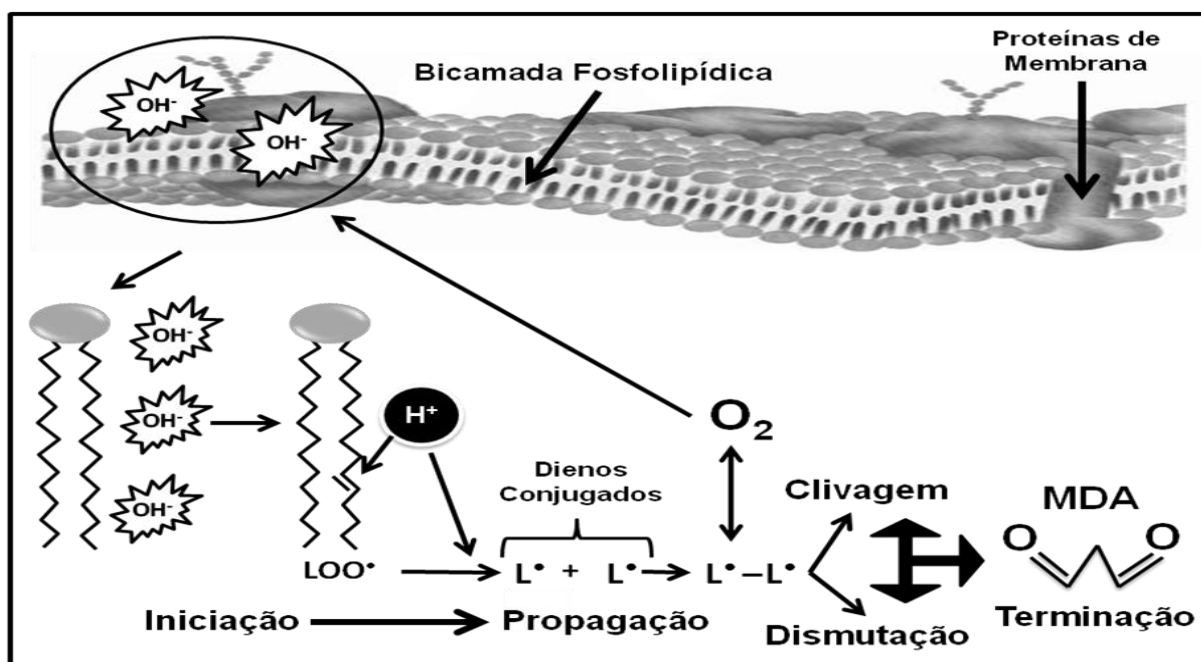


Figura 5 – Fases do processo de peroxidação lipídica. OH^\bullet – radical hidroxila; LOO^\bullet - radical lipídico; H^+ - íon hidrogênio; $\text{L}^\bullet + \text{L}^\bullet$ - dieno conjugado; O_2 – oxigênio; MDA – malondialdeído. Fonte: PETRY *et al.*, 2010.

A etapa de iniciação representa a fase onde os ácidos graxos poliinsaturados de membrana são atacados por um oxidante forte. Geralmente, este ataque radicalar é realizado pelo radical OH^\cdot e tem como objetivo abstrair um íon H^+ dos carbonos metilenos dos ácidos graxos, a fim de que estabilizar esse radical. Desse modo, os fosfolipídios de membrana passam a apresentar um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, fato que origina um radical lipídico, também conhecido como radical de carbono (SEVANIAN; HOCHSTEIN, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Uma vez formado, este radical lipídico rearranja-se, molecularmente, em dienos conjugados, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples, a fim de se estabilizar (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Contudo, a partir deste evento, os fosfolipídios de membrana ganham um alto potencial reativo, fato que os tornam mais suscetíveis a reagir, por exemplo, com o O_2 . Vale ressaltar que as membranas celulares, além de serem ricas em ácidos graxos poliinsaturados também apresentam uma elevada concentração de O_2 na região hidrofóbica medial. Nesta região, totalmente apolar, o O_2 apresenta elevado potencial reativo, uma vez que este gás é de 7 a 8 vezes mais solúvel em meio apolar que em meio polar (McBride, 1998).

Estudos indicam que o radical lipídico formado a partir da interação de um ácido graxo de membrana com um agente radicalar pode originar uma série de outros agentes radicalares, todos com alta reatividade, como os radicais alquila e peroxila. Assim, de acordo com Bindoli (1988), o radical que inicia o processo de peroxidação também origina todo um processo autocatalítico que, em última instância, converterá a maioria dos ácidos graxos das membranas celulares e subcelulares a hidroperóxidos lipídicos. Gaté *et al.* (1999) corroboram as colocações de Bindoli (1988) destacando que o radical peroxila é capaz de se combinar com

outros radicais semelhantes, alterando, por exemplo, a estrutura de diversas proteínas de membrana. Deste modo, em virtude destes radicais serem potentes oxidantes, esta sucessiva formação de espécies radicalares dá seqüência ao processo de abstração de outros íons H^+ , dos demais ácidos graxos de membrana. Tal processo correspondente à segunda etapa da cascata de peroxidação lipídica, ou fase de propagação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Na terceira e última etapa da reação de peroxidação lipídica, fase de terminação, os radicais peroxila e alcoxila formados nas etapas anteriores sofrem dismutação ou clivagem, dando origem a produtos finais deste evento bioquímico. Estes produtos podem ser classificados em primários (hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos); e em secundários (aldeídos de baixo peso molecular) (GARDNER, 1989; HSIEH; KINSELLA, 1989; SPITELLER; SPITELLER, 1998; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

A concentração tecidual ou plasmática destes produtos finais da peroxidação lipídica pode ser mensurada por um grande número de métodos analíticos. Contudo, atualmente, o teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma das técnicas mais utilizadas para tal avaliação. Neste teste, o malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações, é mensurado como um biomarcador geral de dano oxidativo, sobretudo em sistemas biológicos (tecidos e plasma) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O teste das TBARS baseia-se no fato do MDA poder ser mensurado livre, a partir da sua condensação com o ácido tiobarbitúrico. Tal fato origina a formação de um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja determinação se dá pela absorvância ou fluorescência em espectrofotômetro.

Diversos estudos, tanto em animais quanto em humanos, têm apontado que períodos de sobrecarga de treinamento ou de trabalho físico extenuante, ao mesmo tempo em que elevam o sinal indutor para síntese de ERO e ERN, também elevam o risco de danos oxidativos, a importantes estruturas celulares, por meio do processo de peroxidação lipídica. Lovlin *et al.* (1987) observaram significativo aumento, em comparação aos níveis pré exercício, nos níveis plasmáticos de MDA (de 2,26 mmol/L⁻¹ para 2,88 mmol/L⁻¹), em indivíduos fisicamente ativos, submetidos a um teste máximo, em cicloergômetro, até a exaustão. Kanter *et al.* (1988) verificaram significativo aumento na concentração plasmática de MDA, em corredores, logo após uma corrida de 80Km. Em outro estudo, Child *et al.* (1998) observaram que a concentração plasmática de MDA, em corredores de elite, submetidos a uma meia maratona, simulada em esteira rolante, foi significativamente maior em relação aos valores basais (de 1,48 ± 0,39 mmol/L⁻¹ para 1,65 ± 0,32 mmol/L⁻¹), ao término do exercício. Já Machefer *et al.* (2004) observaram significativo aumento no nível plasmático de MDA, em corredores de aventura, por até 72 horas após o exercício.

A realização de exercícios excêntricos, também tem sido apontada como um fator indutor de peroxidação lipídica durante o exercício físico. Baker *et al.* (2004) verificaram significativo aumento dos níveis plasmáticos de MDA em universitários fisicamente ativos imediatamente após uma única sessão de exercício excêntrico, com duração máxima de 30 segundos, em cicloergômetro. Os autores observaram também, que tal concentração só retornou aos níveis pré exercício, 24 horas após o término do exercício. Nikolaidis *et al.* (2006), ao submeterem homens fisicamente ativos a dois protocolos de exercício exaustivo, em esteira rolante, sendo um de longa e outro de curta duração, verificaram que ambos os protocolos de exercício induziram significativo aumento na concentração plasmática de MDA, avaliada pelo

teste das TBARS. Steinberg; Delliaux e Jammes (2006) além de verificarem um significativo aumento na concentração de MDA, logo após um protocolo incremental de exercício aeróbio em cicloergômetro, também observaram que tal concentração atingiu seu pico máximo, 5 minutos após o término do exercício, fato que, segundo os autores, atesta o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico exaustivo. Em outro estudo, indivíduos sedentários, também submetidos a um protocolo incremental de exercício aeróbio em cicloergômetro, apresentaram significativa elevação na concentração plasmática de MDA, aos 5, 10 e 20 minutos após o término da sessão de exercício (STEINBERG *et al.* 2007).

A exemplo da concentração plasmática de CK e MIO, o nível plasmático de MDA também tem sido avaliado em exercícios de caráter intermitente. Kingsley *et al.* (2005) verificaram aumento significativo na concentração plasmática de MDA, em futebolistas, logo após estes serem submetidos a uma corrida intermitente, de alta intensidade, até a exaustão. Em outro estudo, Ascensão *et al.* (2008) observaram significativo aumento na concentração de plasmática de MDA, em futebolistas, por até 72 horas após o término de uma partida, quando comparado aos valores anteriores ao jogo.

Modelos animais também têm sido utilizados em estudos com o intuito de se avaliar os níveis de peroxidação lipídica durante e após a realização de exercícios físicos. Alessio, Goldfarb e Cutler (1988) observaram aumento na peroxidação lipídica, mensurada pelos níveis de MDA, no músculo vasto lateral de ratos sedentários, submetidos a uma seção moderada (20 min. a 20m/min.) de corrida em esteira rolante. No mesmo estudo, os autores verificaram ainda aumentos muito mais acentuados na peroxidação lipídica, quando ratos, nas mesmas condições do experimento anterior, foram submetidos a uma única seção de exercício intenso (1

min. a 45m/min.), também em esteira rolante. Em outro estudo, onde ratos foram treinados em natação, em uma intensidade correspondente ao seu limiar anaeróbio, Prada *et al.* (2004) observaram significativo aumento nos níveis de peroxidação lipídica, avaliada pela concentração plasmática de MDA, no grupo de animais treinados, em relação ao grupo controle sedentário. Venditti e Di Meo (1996), ao submeterem ratos treinados e sedentários a exercício em natação até a exaustão, verificaram elevação dos níveis de MDA, no músculo, de ambos os grupos de animais. Já Liu *et al.* (2000) observaram que tanto ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira rolante, por 8 semanas, quanto aqueles submetidos a uma única sessão de corrida demonstraram aumentos nos níveis de MDA em vários órgãos como cérebro, fígado, coração, rins e músculo esquelético.

3.9 Exercício físico, estresse oxidativo e proteínas de choque térmico (HSPs)

Durante situações de estresse metabólico tais como exercícios físicos intensos e prolongados, a célula é exposta a inúmeras ocorrências desagregadoras, como, por exemplo, a interação com ERO e ERN (JI, 1999; GABAI; SHERMAN, 2002; ATALAY *et al.*, 2004). Tal fato culmina em alterações na homeostasia celular. Deste modo, com o objetivo de se proteger de uma possível lesão, a célula desencadeia uma série de eventos intracelulares, comumente conhecidos como "resposta de estresse" (FINKEL; HOLBROOK, 2000; GABAI; SHERMAN, 2002). De maneira geral, esta resposta é caracterizada pela indução da expressão e subsequente transcrição de uma variedade de genes. Dentre estes genes, incluem-se os de uma família de proteínas, altamente conservadas, conhecidas como proteínas de choque térmico (*heat shock proteins* - HSPs) (GABAI; SHERMAN, 2002; ATALAY *et al.*, 2004; WISCHMEYER, 2006).

As proteínas de choque térmico (HSPs), também denominadas "proteínas de estresse", foram inicialmente descritas por Ritossa, em 1962. Este pesquisador, ao expor células da glândula salivar de moscas da espécie *Drosophila melanogaster* a elevadas temperaturas, verificou um aumento do volume dos cromossomos destas células. Posteriormente, o mesmo pesquisador observou que tal fato, na verdade, representava a indução transcricional de genes codificantes das HSPs (LINDQUIST; CRAIG 1988; PARSELL; LINDQUIST, 1993).

As HSPs compõem uma família de polipeptídeos caracterizada por grande homologia estrutural, evidenciada pela conservação da sequência de DNA e proteína ao longo da evolução (LINDQUIST, 1986). Além disso, estas proteínas são agrupadas em 6 subfamílias, classificadas de acordo com sua sequência de aminoácidos e peso molecular, em quilodaltons (kDa) (MORIMOTO, 1993). Dentre

as famílias de HSPs mais estudadas e conhecidas estão: as das grandes HSPs (100 a 110 kDa); família das HSPs de 90, 70, 60 e 40 kDa; além da família das pequenas HSPs (18 a 30 kDa) (LINDQUIST; CRAIG 1988). Em cada família de HSPs há diferentes proteínas, por exemplo, HSP de 72 kDa (HSP-72) e HSP de 73 kDa (HSP-73), na família das HSPs de 70 kDa (HSP-70), as quais constituem-se, respectivamente, na forma induzível (HSP-72) e constitutiva (HSP-73) da HSP-70. Evidências experimentais apontam que mesmo tendo massa molecular similar, os padrões de indução e expressão destas inúmeras proteínas, dentro de uma mesma família, são distintos (LINDQUIST; CRAIG 1988; PARSELL; LINDQUIST, 1993; MORIMOTO, 1993). Deste modo, diferentes tipos de estresse podem levar ao aumento da expressão de uma ou de outra HSP, dentro de uma mesma família. Por outro lado, um único estímulo de estresse pode desencadear o aumento da expressão de múltiplas HSPs, de distintas famílias (LINDQUIST; CRAIG 1988).

Embora as HSPs tenham recebido esta denominação em virtude da sua descoberta ter se dado sob condições de elevada temperatura, estas proteínas, mesmo em pequenas concentrações, também se fazem presentes em diferentes compartimentos dentro das células, sob condições fisiológicas normais (NEUPERT; HARTL; CRAIG, 1990; GETHING; SAMBROOK, 1992; CRAIG, 1985; MORIMOTO, 1993; STUART; CYR; NEUPERT, 1994; TERLECKY, 1994). Contudo, quando a célula é exposta a algum tipo de estresse, incluindo infecções, exercício físico, radiação ultravioleta (UV), calor, tratamento com hormônios esteróides, metais pesados, entre outros, sua síntese é significativamente aumentada. Dentre os fatores que contribuem para tal aumento, destacam-se a ativação de mecanismos de transcrição e translocação preferenciais (FEHRENBACH *et al.*, 2000a e 2000b). Mediante a ativação de tais mecanismos há uma redução transitória da síntese de

proteínas consideradas não vitais, ao mesmo tempo em que ocorre um aumento na transcrição, tradução e expressão dos genes das HSPs, fato que resulta na elevação da concentração destas proteínas de estresse (WISCHMEYER, 2002).

De acordo com Gabai e Sherman (2002), a ativação das HSPs corresponde a uma das principais vias de sinalização que contribuem para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a eventos lesivos e, assim, manter a sua integridade estrutural e funcional. Segundo Feige e Polla (1994), o principal mecanismo de ação das HSPs, mediante o qual estas conferem proteção à célula, está vinculado ao fato destas proteínas apresentarem atividade ATP dependente, o que as possibilita agir como "proteínas chaperonas", em nível molecular. Burg, Ferraris e Dmitrieva, (2007); Javid, MacAry, e Lehner, (2007) destacam que agindo como proteínas chaperonas, as HSPs atuam na regulação de processos como o remodelamento, identificação, segregação e degradação de uma variedade de proteínas danificadas durante períodos de estresse. Além disso, as HSPs auxiliam na síntese de novas proteínas, bem como na ressolubilização de agregados protéicos, que são nocivos a célula (BURG; FERRARIS; DMITRIEVA, 2007; JAVID; MACARY; LEHNER, 2007). Cabe enfatizar que a palavra "chaperona", embora inexistente em português designa substâncias que sem fazer parte da estrutura final de uma proteína, evitam interações incorretas entre estas e auxiliam na montagem final das mesmas, bem como em sua síntese, enovelamento e degradação (FEIGE; POLLA, 1994). Deste modo, segundo Gabai; Sherman (2002), o principal fator indutor da expressão das HSPs é o acúmulo de proteínas desnaturadas no meio intracelular.

Diversos estudos apontam que as HSPs configuram-se em proteínas essenciais no processo de recuperação celular. Tal afirmação baseia-se no fato

destas proteínas também possuem destacado papel na proteção contra processos de apoptose celular (BURG; FERRARIS; DMITRIEVA, 2007; JAVID; MACARY; LEHNER, 2007). De acordo com Gabai e Sherman (2002); Ropeleski *et al.* (2005) o elemento chave desta proteção seria a ação inibitória realizada por algumas HSPs, tais como a HSP-72, junto à cascata de proteases essenciais a apoptose celular, as caspases. De acordo com os autores, por meio de sua ligação direta junto à caspases como a caspase-9 e o fator apoptótico ativador de proteases-1 (APAF-1), as HSPs, em especial a HSP-72, atenuariam a ativação destas caspases e, por conseguinte, reduziriam o processo de apoptose celular. Especificamente em relação à HSP-72, Kukreja *et al.* (1994); Finkel; Holbrook (2000); Pirkkala; Nykanen; Sistonen (2001); Gabai; Sherman (2002); Ropeleski *et al.* (2005) apontam que esta HSP possui uma ação isolada capaz de reduzir a agregação de proteínas nucleares, fato considerado como uma ação citoprotetora desta HSP. Outras pesquisas têm defendido e apontado que as HSPs, sobretudo a HSP-72, além de possuir efeitos imunomodulatórios, também agem como uma proteção antioxidante complementar, quando os demais sistemas de defesa antioxidante, não conseguem se contrapor de forma eficiente, as ações deletérias de ERO e ERN (WELCH, 1992; SMOLKA *et al.*, 2000; ANTUNES NETO *et al.*, 2006; JOHNSON; FLESHNER, 2006).

Como salientado anteriormente, a realização de exercícios físicos intensos e prolongados modula a ação do sistema de defesa antioxidante, sobretudo as concentrações de GSH (JI, 1999). Ao mesmo tempo, evidências experimentais têm apontado que a eficiência da ação de mecanismos antioxidantes tais como o da GSH, na atenuação do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, está vinculada à manutenção da integridade estrutural das proteínas dentro das células. Deste modo, diversas pesquisas têm demonstrado que durante e após exercícios de

elevada intensidade e longa duração, como maratonas, ultramaratonas, ciclismo de resistência e triátlon, a síntese e a expressão de HSPs encontra-se elevada, em todas as células do organismo (FEHRENBACH *et al.*, 2000 a; SMOLKA *et al.*, 2000; ANTUNES NETO *et al.*, 2006).

Em um estudo, Smolka *et al.* (2000) verificaram o efeito do exercício exaustivo aeróbio em ratos treinados e não treinados sobre a expressão da HSP-72. Ao final do experimento, os autores observaram que o grupo de animais não treinado apresentou aumento na expressão da HSP-72, sobretudo no músculo sóleo, tecido predominantemente composto por fibras oxidativas, quando comparado ao grupo de animais treinado. Resultado semelhante foi verificado por Hernando e Manso (1997), que observaram aumentos significativos na expressão da HSP-72, no músculo sóleo, de ratos sedentários submetidos a exercício intenso em esteira rolante. Cabe ressaltar, que dentre todas as subfamílias de HSPs, os membros da subfamília da HSP-70, dentre eles a HSP-72, encontram-se na subfamília de HSPs mais abundante nas células eucariotas. Diversas pesquisas também têm indicado que a HSP-72 constitui-se como a HSP de maior expressão no tecido muscular esquelético durante e após exercícios físicos (WELCH, 1993; SMOLKA *et al.*, 2000; ANTUNES NETO *et al.*, 2006).

Em outro estudo, Febbraio *et al.* (2002) examinaram a expressão do RNA mensageiro (RNAm) da HSP-72, no músculo esquelético de 5 indivíduos saudáveis que pedalarão até a exaustão, numa carga de trabalho que correspondia a 63% do pico do VO_2 máx.. Amostras de tecido do músculo vasto lateral destes indivíduos foram colhidas aos 10 minutos de exercício, aos 40 minutos antes da fadiga e em fadiga. Os autores observaram que a expressão do RNAm e da HSP-72 aumentou progressivamente no músculo esquelético destes indivíduos, e que este aumento se

correlacionou com processos capazes de induzir uma resposta de estresse, como a indução de lesões musculares. Já Locke, Noble e Atkinson (1990) observaram que a síntese de HSP-72 e de outras HSPs tais como a HSP-90, foi significativamente aumentada no músculo sóleo, no baço e em linfócitos de ratos submetidos uma sessão de exercício em esteira rolante, até a exaustão.

3.10 Glutamina, HSPs e proteção celular

Diversos estudos têm demonstrado que a glutamina pode influenciar uma variedade de funções e vias de sinalização celular (CURI *et al.*, 2005). A modulação da expressão de genes relacionados com a síntese e degradação de proteínas, proliferação celular e a ativação de vias envolvidas com a apoptose celular estão entre os papéis exercidos pela glutamina mais estudados (NEWSHOLME *et al.*, 2003b; CURI *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 2005; CORLESS *et al.*, 2006; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007).

De acordo com WISCHMEYER (2006), a glutamina configura-se num dos principais reguladores farmacológicos, capazes de modular a ativação de proteínas relacionadas a respostas celulares anti-apoptóticas. Dentre estas proteínas incluem-se as HSPs. Sandres e Kon (1991) destacam que aumentos na disponibilidade de glutamina às células, além de aumentar a expressão das HSPs, contribuem para o fortalecimento da capacidade da célula de resistir a lesões. Diversos outros estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, confirmam o papel exercido pela glutamina na expressão das HSPs, em especial da HSP-70, sobretudo na sua forma induzível HSP-72 (CHOW; ZHANG, 1998; WISCHMEYER *et al.*, 2003; ROPELESKI *et al.*, 2005; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007).

Wischmeyer *et al.* (1997) observaram que a adição de glutamina em meio de cultura (2 a 10 mmol/L) foi eficaz no aumento da proteção de células intestinais de ratos submetidas a lesões do tipo oxidativas. Neste mesmo estudo também foi observado um aumento na concentração tanto do RNA mensageiro (RNAm) quanto da expressão da HSP-72. Em outros dois estudos, Wischmeyer *et al.* (2001a e 2001b) observaram aumento na expressão de outras HSPs, tais como a HSP de 25 kDa (HSP-25) e a de 27 kDa (HSP-27). Tal resultado foi verificado em diversos

tecidos de animais que não foram expostos a qualquer tipo de estresse e que receberam glutamina (0,15 a 0,75 g/Kg de peso corporal) de forma parenteral. A administração de glutamina, principalmente na quantidade de 0,75 g/Kg de peso corporal reduziu a mortalidade de animais expostos a endotoxemia, através do aumento na expressão da HSP-27 e HSP-72 (WISCHMEYER *et al.* 2001a e 2001b).

Embora os resultados destes estudos evidenciem a importância fisiológica da glutamina na expressão das HSPs, bem como sua relevância para o aumento da proteção da integridade celular, os mecanismos intracelulares e extracelulares que modulam a expressão destas proteínas, ainda necessitam ser mais bem investigados (BURG; FERRARIS; DMITRIEVA, 2007). Contudo, diversas pesquisas apontam que a expressão do fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1) corresponde a um dos principais mecanismos reguladores da capacidade da célula de ativar as HSPs, em resposta a vários tipos de estresse (ATALAY *et al.* 2004; GABAI; SHERMAN, 2002).

O HSF-1 é um fator transcricional encontrado na sua forma inativa, ou seja, não ligado ao DNA. A ativação do HSF-1 se dá por meio de uma variedade de estímulos de estresse que desencadeiam a fosforilação de monômeros latentes inativos, deste fator transcricional, encontrados no citoplasma da célula. Quando fosforilados, estes monômeros se combinam, convertendo-se em um oligômero denominado homotrímero (AHN; THIELE, 2003). Os homotrímeros do HSF-1, ao serem ativados se translocam para o núcleo da célula, onde se ligam em locais específicos da região promotora dos genes das HSPs, denominados elementos de choque térmico (HSEs) (ATALAY *et al.*, 2004). Este mecanismo permite que sinais específicos iniciem o processo de síntese, transcrição e tradução do RNAm das HSPs (SCHETT *et al.*, 1998; AHN; THIELE, 2003), conforme descrito na figura 6.

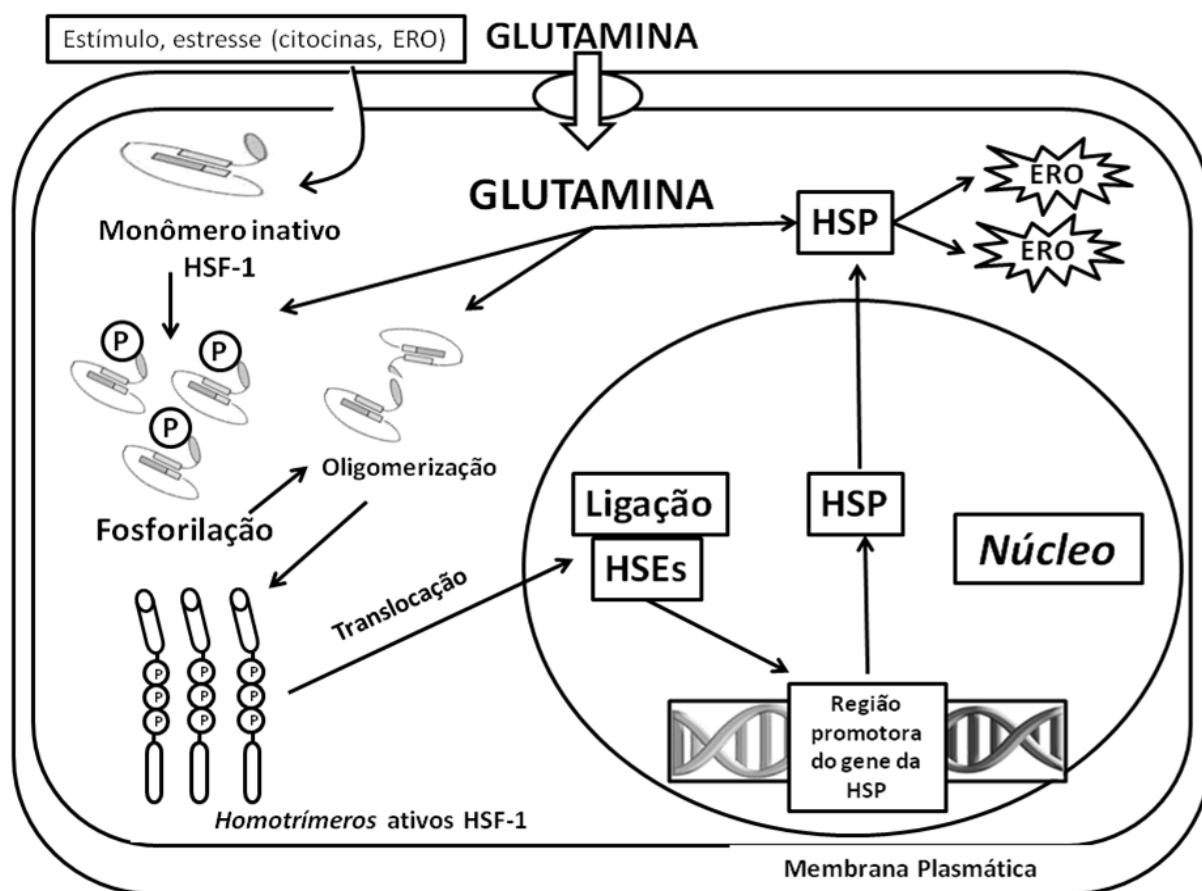


Figura 6 – Esquema representativo do mecanismo de transcrição, tradução e expressão de HSPs, por meio da ativação do HSF-1 e influência da glutamina neste mecanismo.

Abreviaturas: HSP = Proteína de choque térmico; HSF-1 = Fator de choque térmico-1; HSEs = Elementos de choque térmico; ERO = Espécies reativas de Oxigênio.

Fonte: CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, (2008).

Morrison *et. al.* (2006) verificaram que a administração de glutamina pode modular o processo de tradução e expressão tanto do HSF-1 quanto das HSPs. Neste estudo foi observado que por meio do aumento na concentração de glutamina foi possível estimular tanto o número de ligações dos homotrimeros do HSF-1 aos HSEs, quanto à ligação destes HSEs à região promotora dos genes das HSPs. Em outro estudo, Peng *et al.* (2006) observaram que, quando adicionada a células fibroblásticas embrionárias de rato, a glutamina foi capaz de induzir a um aumento na expressão do HSF-1, fato que contribuiu para a manutenção da integridade da membrana celular. Chow e Zhang (1998); Singleton e Wischmeyer (2007) destacam

que o efeito da glutamina no aumento da expressão das HSPs, se dá de maneira dose dependente. Segundo os autores, maiores concentrações de glutamina são necessárias de acordo com a intensidade do processo, fato que provavelmente está relacionado à necessidade da célula de aumentar sua proteção e, conseqüentemente, sobreviver em condições de estresse.

A inibição de vias de sinalização intracelular, tais como a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF-kB) também tem sido indicada como uma ação protetora, antiapoptótica, desempenhada pela glutamina. Diversas pesquisas indicam que tal ação da glutamina está fortemente ligada ao efeito modulatório exercido por este aminoácido sobre a expressão das HSPs (YOO *et al.*, 2000; LIBONI *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 2005). Singleton e Wischmeyer (2007) verificaram que a administração de glutamina promoveu aumento de maneira dose dependente na expressão da HSP-70 em animais submetidos a estado de sepse. Tal fato, contribuiu para a inibição da ativação do NF-kB e das proteínas quinases que compõem a via da MAPK, sobretudo a c-JUN NH₂ - terminal quinase (JNK).

Wernerman e Hammarqvist (1999) destacam, que os mecanismos de ativação tanto do NF-kB quanto da MAPK também são dependentes do estado redox celular, o qual pode ser alterado de acordo com a concentração intracelular de GSH. Cabe ressaltar uma vez mais, que as concentrações de GSH são influenciadas pela disponibilidade de glutamina e glutamato intracelular (CRUZAT; TIRAPGUI, 2008). Desta maneira, a ativação do NF-kB e da MAPK pode ser modulada, de forma direta pela glutamina (LIBONI *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 2005; WISCHMEYER, 2006).

3.11 Efeitos da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina

Estudos nos quais a L-glutamina foi administrada de forma parenteral demonstraram 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 dengues (KLASSEN *et al.*, 2000), câncer (ZIEGLER, 2001), HIV (SHABERT *et al.*, 1999), queimaduras, cirurgias (ZIEGLER, 2001; FLÄRING *et al.*, 2003), entre outras. Nesses estudos, a utilização de glutamina tem sido correlacionada a uma melhora na recuperação de indivíduos enfermos (HISCOCK; PEDERSEN, 2002; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002b; FLÄRING *et al.*, 2003).

Déchelotte *et al.* (1991) verificaram que, no estado pós absortivo, 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 minutos após a ingestão oral de uma solução com L-glutamina (100 mg/kg peso corporal), retornando aos valores basais no decorrer de aproximadamente 2 horas. Em outro estudo, Bowtell *et al.* (1999) investigaram o efeito da suplementação oral com L-glutamina sobre a glutaminemia e os estoques de glicogênio muscular, após uma sessão de exercício intenso de corrida, em indivíduos fisicamente ativos. Ao final do estudo, os autores verificaram que a suplementação (8 g de glutamina em 330 mL de água) aumentou em 46% a concentração plasmática de glutamina, durante o período de recuperação. Tal fato, segundo Bowtell *et al.* (1999), permite inferir que uma substancial proporção de glutamina administrada oralmente, escapou da utilização por parte das células da mucosa intestinal, assim como e da captação pelo rim e fígado. Rohde *et al.* (1998)

observaram que a suplementação com glutamina (100 mg/Kg de peso corporal), logo após uma maratona, foi eficaz em manter a concentração plasmática deste aminoácido, próxima aos valores pré exercício. Em outro estudo, Castell *et al.* (1996) verificaram o efeito da suplementação oral com glutamina (5 g de glutamina em 330 mL de água) sobre a incidência de infecções em maratonistas, ultramaratonista, fundistas e remadores. Como instrumento de investigação, os atletas receberam questionários, onde os mesmos deviam reportar a ocorrência de qualquer tipo de infecção, durante um período de 7 dias após o término de suas respectivas provas. Ao final do estudo, os autores observaram que no grupo de atletas suplementados com glutamina (n=72), apenas 19% do total de atletas relataram terem sido acometidos por algum tipo de infecção, durante o período de estudo. Por outro lado, 51% dos atletas que participaram do estudo (n=79), mas que não receberam suplementação com glutamina, apresentaram algum tipo de infecção, no decorrer de 7 dias após o término de suas provas.

O efeito da suplementação com glutamina também tem sido investigada em animais experimentais. Moriguchi, Miwa e Kishino (1995) verificaram o efeito da suplementação crônica com glutamina, administrada por meio da ração, sobre a glutaminemia de ratos submetidos a exercício em esteira rolante (60 min. a 20m/min.). Ao final do experimento, os autores observaram que a concentração plasmática de glutamina apresentou-se significativamente diminuída no grupo de animais treinado, que não recebeu suplementação. Por outro lado, o grupo de animais treinado que receberam suplementação com glutamina, apresentaram manutenção da glutaminemia, durante o mesmo período.

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 logo após exercícios intensos e prolongados, possa de alguma forma, estar envolvida no desenvolvimento de doenças, em especial, infecções do trato respiratório superior (ITRS) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2000). A suplementação com L-glutamina tem sido estudada como alternativa de atenuar ou mesmo reverter tais eventos, induzidos pelo exercício físico. Castell *et al.* (1997) investigaram o efeito da suplementação com L-glutamina (5 g em 330 mL de água) logo após a realização de uma maratona. As concentrações de glutamina, alanina e aminoácidos de cadeia ramificada mantiveram-se diminuídas por até 1 hora após a realização da maratona, retornando aos valores pré exercício somente 16 horas mais tarde. Algumas citocinas, tais como a Interleucina-2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) tiveram suas concentrações plasmáticas aumentadas por várias horas após o exercício, o que denota um marcante estado inflamatório induzido pelo exercício. A suplementação com L-glutamina, contudo, não alterou nenhum dos parâmetros analisados.

Estudos relacionando glutamina com o volume celular demonstram que o transporte de glutamina para o meio intracelular promove uma elevação na captação de sódio, alterando o volume da célula (GANAPATHY; BRANDSCH; LEIBACH, 1994). 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 (Yang; Dantzig; Pidgeon, 1999; KLASSEN *et al.*, 2000). Varnier *et al.* (1995) observaram que a administração parenteral de glutamina, após exercício de alta intensidade promoveu o aumento

dos estoques de glicogênio muscular, fato que pôde beneficiar a recuperação da lesão induzida pelo exercício exaustivo.

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 e TIRAPEGUI, 2009). Indivíduos após serem submetidos a eventos de estresse metabólico tais como 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 (FLÄRING *et al.*, 2003).

Estudos indicam que a forma de administração pode influenciar o metabolismo da glutamina, bem como a síntese de GSH. De fato, Valencia, Marin e Hardy (2002b), quando investigaram os efeitos da suplementação com L-glutamina, porém por via oral, em humanos sedentários, não observaram aumento na concentração de GSH plasmática. Os valores de glutamina e glutamato plasmáticos, contudo, se elevaram em comparação ao grupo controle do estudo. Uma provável explicação para estes resultados contraditórios pode estar na diferença entre a administração parenteral e oral da glutamina.

A utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como o L-alanil-L-glutamina por via oral, representa uma alternativa não invasiva de aumentar a disponibilidade de glutamina às células (KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2002; ROGERO *et al.*, 2006). Em um estudo realizado em nosso laboratório com animais sedentários suplementados, aguda e cronicamente, por via oral, com L-glutamina ou com o

dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina), verificou-se que tal suplementação foi eficaz em aumentar a concentração plasmática de glutamina em relação aos valores basais. Entretanto, a concentração plasmática de glutamina, 30 minutos pós suplementação e a área sobre a curva do grupo suplementado agudamente com o dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) foram superiores a do grupo suplementado com L-glutamina na sua forma isolada (ROGERO *et al.*, 2002). Em um outro estudo, também realizado em nosso laboratório, foi avaliado o efeito da suplementação oral crônica com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina), sobre as concentrações plasmática, muscular e hepática de glutamina em ratos sedentários (ROGERO *et al.*, 2004). Os resultados do respectivo estudo demonstraram que a suplementação crônica com L-glutamina na forma livre ou o dipeptídeo não alteraram a glutaminemia; o grupo suplementado com o dipeptídeo, contudo, apresentou maior concentração de glutamina muscular e hepática.

Em animais exercitados e submetidos a teste de exaustão, Rogero *et al.* (2006) observaram que a suplementação crônica com o dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) promoveu 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 na forma livre. Em recente estudo, Cruzat e Tirapegui (2009) investigaram o efeito da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e de uma solução contendo L-glutamina e L-alanina, ambas na forma livre, sobre a concentração plasmática e tecidual de glutamina, glutamato e glutatona (GSH), em ratos treinados e submetidos a exercício exaustivo de natação. Ao final do estudo, os autores observaram elevada concentração de glutamina, no plasma, tanto no grupo de animais treinados e suplementados com o dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) quanto com a solução contendo L-glutamina e L-alanina na forma

livre. Em relação às concentrações muscular e hepática de glutamina, glutamato e razão GSH/GSSG, os autores verificaram que os animais de ambos os grupos apresentaram maior concentração de glutamina, glutamato e razão GSH/GSSG no músculo sóleo, ao passo que no fígado, dos mesmos grupos, maior concentração de GSH e razão GSH/GSSG foram observadas.

Assim, com base nestes estudos *in vivo* realizados em nosso laboratório evidenciamos que a utilização de glutamina na forma livre ou como dipeptídeo (L-alanil-L-glutamina) configura-se como uma interessante alternativa de intervenção nutricional para o fornecimento de glutamina por via oral ao organismo, tanto em situações de repouso quanto em situações de estresse metabólico, como em exercícios físicos intensos e prolongados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições Experimentais

4.1.1 Animais

O presente estudo foi realizado com 24 ratos Wistar, machos, adultos, com peso médio de 204 ± 86 g cedidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo CEEA nº 154). O período total de experimento, incluindo uma semana de adaptação dos animais ao gaioleiro, foi de 9 semanas. Durante todo este período, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições de luz obedecendo a um ciclo invertido de 12 horas claro, 12 horas escuro (luz acesa às 4:00hrs). A temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e a umidade relativa do ar (60%) também foram controladas durante este período. A pesagem, bem como o cálculo do consumo de ração pelos animais, foi realizada 3 vezes por semana durante todo o período experimental. O método adotado para o sacrifício dos animais foi o de decapitação. Tal procedimento foi realizado 12 horas após a última sessão de exercício.

4.1.2 Dieta e Suplementação

Durante todo o experimento, os animais foram alimentados de forma ad libitum com ração elaborada segundo o American Institute of Nutrition (AIN-93M) (REEVES et al. 1993), para ratos adultos (anexos 1 e 2). Nos últimos 21 dias do protocolo experimental, ou seja, durante as últimas 3 semanas de treinamento, os animais dos grupos suplementados receberam por meio de sonda gástrica (gavagem), respectivamente, os aminoácidos L-glutamina (1 g/Kg de peso) e L-alanina (0,61 g/Kg de peso), na forma isolada, ambos cedidos pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. do Brasil, ou o dipeptídeo L-alanil-L-

glutamina (1,49 g/Kg de peso), fornecido pela empresa Fórmula Medicinal-Suporte Nutricional e Manipulação Ltda., São Paulo, Brasil. A quantidade do dipeptídeo administrada foi calculada para que o total de glutamina fosse a mesma administrada na sua forma isolada, ou seja, 1 g de glutamina/kg de massa corporal/dia (D'SOUZA; TUCK, 2004). O grupo controle, também recebeu o mesmo volume em água por meio de sonda gástrica (gavagem).

4.1.3 Grupos Experimentais

A divisão dos animais em grupos foi realizada no final da quinta semana de experimento, 2 dias antes do primeiro dia de intervenção nutricional. Para tanto, o peso corporal dos animais foi utilizado como parâmetro de divisão, sendo que não houve diferença entre os grupos. Desta maneira, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

CONTR: animais treinados, sem suplementação, ou seja, submetidos à gavagem com água e sacrificados no último dia de treinamento (n = 8).

DIP: animais treinados, suplementados com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e sacrificados no último dia de treinamento (n = 8).

GLN+ALA: animais treinados, suplementados com L-glutamina e L-alanina, na forma isolada, e sacrificados no último dia de treinamento (n = 8).

4.1.4 Protocolo de treinamento

O treinamento dos animais foi realizado em esteira rolante desenvolvida para este fim, seguindo o protocolo experimental proposto por Smolka et al. (2000). As sessões de exercício foram realizadas cinco vezes por semana, por um período total de oito semanas, com intensidade e durações progressivas. Durante a primeira semana (período de adaptação), as sessões de exercício foram de 20 minutos, à uma velocidade de 15 m/min. Na segunda e terceira semanas, as sessões foram de

30 e 45 minutos de duração, com velocidades de 20 m/min. e 22,5 m/min., respectivamente. Da quarta até a oitava semana de treinamento, as sessões foram de 60 minutos, com velocidade de 25 m/min.

4.2 Métodos Laboratoriais

4.2.1 Parâmetros Plasmáticos e Séricos

4.2.1.1 Glutamina

A determinação de glutamina plasmática foi realizada segundo a metodologia descrita por Lund (1985). O princípio do método se assenta 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, na amostra.

4.2.1.2. Glutamato

A determinação de glutamato plasmático foi realizada segundo a metodologia descrita por Lund (1985). Nesta reação, a desidrogenação do L-glutamato para α -cetoglutarato, em conjunto com a redução de NAD⁺ para NADH é proporcional à quantidade de glutamato na amostra. A conversão de NAD⁺ para NADH foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UVmini – 1240, Tóquio, Japão) com comprimento de onda de 340 nm.

4.2.1.3. Amônia

A determinação da amônia plasmática foi realizada por meio de kit comercial (KIT Determinação de Amônia, Interprise Instrumentos Analíticos, Brasil), como preconizado no método de Ratcliff e Hall (1982). 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 absorvância de 340 nm. A diminuição na quantidade de luminosidade óptica é proporcional à concentração da amônia plasmática.

4.2.1.4. Creatina Quinase

A determinação da concentração plasmática de creatina quinase total, foi realizada utilizando-se 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 da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é oxidada a 6-fosfogluconato e reduz o NAD a NADH. A velocidade de aumento na absorvância de 340 nm, medida em espectrofotômetro termostaticado, à temperatura de 37°C (Hitachi, modelo U-3410, Tóquio, Japão) é proporcional à concentração de CK na amostra.

4.2.1.5. Mioglobina

A quantificação da concentração plasmática de mioglobina foi realizada pela metodologia do teste de ELISA. Para tanto, foi utilizado o kit comercial (Myoglobin Enzyme Immunoassay Test Kit, MP Biomedicals Diagnostics Division, EUA), como preconizado por Volek et al. (2002). O teste é baseado no princípio de uma fase sólida onde a enzima está ligada à microplaca, após reagir, simultaneamente, com dois anticorpos monoclonais. O primeiro anticorpo é específico a molécula de mioglobina, enquanto que o segundo é um antimoglobina, conjugado com uma peroxidase. A concentração de mioglobina é diretamente proporcional à absorvância, que é medida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 450 nm.

4.2.1.6. Peroxidação Lipídica

A determinação da peroxidação lipídica, no plasma, foi realizada pela análise da concentração plasmática de aldeído malônico (MDA), conforme a metodologia descrita por Yagi (1976). Para tanto, empregou-se o teste “das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)”. Inicialmente se processou a condensação do MDA com o ácido tiobarbitúrico. Posteriormente, a absorvância desta condensação foi medida em espectrofotômetro, a partir da formação de um cromógeno de cor rosa fluorescente.

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; KATZ; BROBERG, (1990). Inicialmente, as amostras congeladas de músculo (sóleo e gastrocnêmio) e fígado foram pulverizadas em placas de alumínio sob adição constante de nitrogênio líquido, pesadas e imediatamente homogeneizadas em ácido perclórico (0,5M), gelado. A seguir, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga Juan, modelo BR41, Franca) a 13000g a 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante foi neutralizado com KHCO₃ e, posteriormente, determinada a concentração de glutamina segundo a metodologia proposta por Lund (1985). Os valores médios foram expressos em micromoles (μmols) de glutamina/glutamato por grama de tecido e por miligramas (mg) de proteína no tecido.

4.2.2.2. Proteínas Totais

A determinação da concentração de proteína tecidual total foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951). O princípio

deste método consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares, com posterior adição do reagente colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de ondas de 600nm.

4.2.2.3. GSH e GSSG Muscular e Hepática

As determinações das concentrações de glutathiona reduzida e oxidada no músculo esquelético e fígado foram realizadas segundo a metodologia descrita por Nogueira et al. (2005). Inicialmente, em duas placas de alumínio, mantidas constantemente em nitrogênio líquido os tecidos foram macerados e imediatamente homogenizados 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 em metade do volume de ácido perclórico a 10% e 2 mM de EDTA, sob agitação durante 15 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 9000g por 15 minutos. Feito isto, se separaram 0,375 mL do sobrenadante, ao qual foram adicionados 0,37 mL de solução fresca de ácido iodoacético (20 mg/ mL), 0,337 mL de KOH 2M e KHCO₃ 2,4M. 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, e a mistura retornou a ser incubada por 24 horas, no escuro, a 4°C. Após, a mistura foi centrifugada a 2400g por 5 minutos e filtrada em filtro Millex® 0,45 µm (Milipore, 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 (Metanol e água – 4:1); Tampão B (200 mL de solução 1, composta por 272g de acetato de sódio tri-hidratado, 122

mL de água e 378 mL de ácido acético glacial, mais 800 mL de Tampão A). O tempo total de corrida para cada amostra foi de 30 minutos.

No mesmo sistema, foi realizada uma curva padrão para GSH e outra para GSSG. Tal procedimento foi adotado com a finalidade de determinar o tempo de retenção de cada composto, e possibilitar a quantificação da amostra no "software".

4.2.2.4. Expressão Gênica da Enzima Glutamina Sintetase

A determinação da expressão gênica da enzima glutamina sintetase (GS) no tecido muscular esquelético e hepático foi realizada utilizando-se a metodologia de "Western Blot", conforme descrito por LABOW; SOUBA; ABCOUWER (1999). Para o isolamento da proteína, 100 mg de tecido (fígado e músculos sóleo e gastrocnêmio) foram cortados em pequenos pedaços e, imediatamente colocados em um tubo de microcentrífuga estéril. Na sequência, cada amostra foi lavada com PBS pH 7,2 e centrifugada a 500 x g, por 5 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado, a fim de deixar o sedimento bem seco. Feito isso, o tecido foi homogeneizado em homogeneizador tipo Potter Elvehjem utilizando-se pistilo com ponta de teflon. Para tanto, adicionou-se volume adequado do reagente CER I, que faz parte do kit NE-PER (Termoscientific – Pierce) para extração de proteína tecidual, em frações citoplasmática e nuclear, seguindo as instruções do fabricante. Após a aplicação do volume adequado do reagente CER I, o tubo foi agitado vigorosamente em agitador vórtex, na potência máxima, por 15 segundos, a fim de se ressuspender totalmente, o sedimento e incubado em gelo, por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado volume adequado do reagente CER II gelado, igualmente seguindo-se as instruções do fabricante, constantes na bula do Kit NE-PER. Na sequência, o tubo foi novamente agitado vigorosamente em agitador vórtex durante 5 segundos na

potência máxima e incubado no gelo por 1 minuto. Após este período de tempo, o tubo foi centrifugado durante 5 minutos a $16.000 \times g$ e o sobrenadante (fração citoplasmática) transferido imediatamente para um novo tubo de microcentrífuga estéril, pré-resfriado. Este tubo, contendo a fração citoplasmática, foi armazenado em gelo até a sua utilização, enquanto que o sedimento (fração insolúvel) produzido no procedimento anterior, foi ressuspenso, através da adição de volume adequado do reagente NER gelado, também seguindo as instruções contidas no Kit NE-PER. O tubo foi então, vortexado vigorosamente na potência máxima por 15 segundos e incubado em gelo, sendo agitado em agitador vórtex em potência máxima, por 15 segundos a cada 10 minutos, até completar 40 minutos. Posteriormente, o tubo contendo o homogeneizado, foi novamente centrifugado a $16.000 \times g$ por 10 minutos e o extrato sobrenadante (fração nuclear) transferido imediatamente para um tubo de microcentrífuga limpo, pré-refrigerado. Ambas as frações obtidas, foram armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para utilização a posteriori.

A quantificação das frações de proteína foi realizada pela utilização do kit BCA (Pierce Chemical), conforme as especificações do fabricante. Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteína: músculo sóleo, 23 μg ; músculo gastrocnêmio, 23 μg ; fígado, 63, foram carregadas e separadas durante 4 horas (a 15 miliampères - mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizado-se sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida constituído de Tris a 25mM, glicina a 192mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3, usando-se 1 cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) de gel de separação (corrida) a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10cm. Cada amostra, foi, anteriormente, ao carregamento no gel

diluída em tampão de amostra redutor 1x, constituído de Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (w/v) e 2-mercaptoetanol a 5%, conforme descrito por Santoro, Garaci e Amici (1989). Como marcador de peso molecular foram utilizados 10µL da mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (GE/Amershan).

Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE/Amershan), com poros de 0,45 µm de diâmetro, utilizando-se sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100Vxh, durante 2 horas. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, foram evidenciadas pela coloração com vermelho de Ponceau, (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN-TWEEN 1x (Tris 50mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150mM), sob agitação manual. Antes do "immunoblotting", a membrana foi hibridizada com leite em pó desnatado a 1% (m/v) em TEN-TWEEN 1x, a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligações inespecíficas aos anticorpos a membrana. Na sequência, a membrana foi incubada com o anticorpo primário, monoclonal, de camundongo, antiglutamina sintetase (BD Transduction Laboratories - 610517), em uma diluição (1:10.000), em solução composta por leite em pó desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x, por 15 minutos a temperatura ambiente, utilizando-se o sistema Snap Id (Millipore). Depois disso, a membrana foi lavada por três vezes com 15 ml de TEN-TWEEN 1x, igualmente utilizando-se o sistema Snap Id (Millipore), e submetida a uma nova incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente, com o segundo anticorpo, IgG B8520 (de cabra, contra imunoglobulinas de camundongo, biotilado, Sigma) numa diluição (1:10.000), em solução idêntica a utilizada na incubação com o anticorpo

primário. Posteriormente, repetiu-se a lavagem da membrana, como descrito acima e uma nova incubação da mesma com estreptoavidina A2192 (Sigma) diluída (1:10.000), seguindo os mesmos procedimento adotados nas incubações anteriores.

Após nova lavagem, a membrana foi novamente incubada com anticorpo monoclonal anti- β -actina A3854 (Sigma), de camundongo, contra imunoglobulinas de rato, conjugado com peroxidase de rabanete, numa diluição (1:10.000), em solução idêntica a utilizada nas incubações anteriores. Tal procedimento foi adotado para comparação do carregamento de quantidades iguais de proteína no gel. Por fim, realizou-se a imunodeteção das bandas, onde a membrana foi submetida à reação com o revelador ECL (GE/Amersham), por meio da utilização do sistema de quimiluminescência ImageQuant 350 (GE/Amersham). Imediatamente após o aparecimento das bandas de interesse, com boa resolução, as imagens foram registradas digitalmente e analisadas, posteriormente, para cálculos do volume de expressão, das proteínas de interesse.

4.2.2.5. Expressão Gênica do Fator Transcricional de Choque Térmico-1 (HSF-1)

A determinação da expressão de HSF-1, em suas formas fosforilada e não fosforilada foi realizada empregando-se a técnica de Western Blot, adaptando-se os protocolos propostos por Milne et al. (2006) e Wischmeyer et al. (2001). Para tanto, as amostras foram preparadas utilizando-se os mesmos procedimentos técnicos adotados em relação à análise da expressão gênica da enzima GS. Entretanto, para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteína: músculo sóleo, fração citoplasmática - 23 μ g; fração nuclear - 9 μ g; músculo gastrocnêmio, fração citoplasmática - 23 μ g; fração nuclear - 17 μ g; fígado, fração citoplasmática - 63 μ g; fração nuclear - 27 μ g, foram carregadas e separadas durante 4 horas (a 15 miliamperes - mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de

poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizado-se sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida constituído pH 8,3, utilizando-se 1 cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) de gel de separação (corrida) a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm. Cada amostra, foi anteriormente, ao carregamento no gel diluída em tampão de amostra redutor 1x, para amostras citoplasmáticas, constituído de Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v), azul de bromofenol 0,1% (w/v) e 2-mercaptoetanol a 5%, e 10x para amostras nucleares, constituído de Tris 2,5 M pH 6,8, SDS 2% (v/v), azul de bromofenol 0,5% (w/v), ditioneitol (DTT) ou ditioeritritol (DTE) 1 M e glicerol 50% (v/v), conforme descrito por Santoro, Garaci e Amici (1989). Como marcador de peso molecular foram utilizados 10µL da mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (GE/Amershan).

Após as corridas as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE/Amershan), com poros de 0,45 µm de diâmetro, utilizando-se sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100 V x h, durante 2 horas. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, foram evidenciadas pela coloração com vermelho de Ponceau, (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN-TWEEN 1x, sob agitação manual. Antes do "immunoblotting", a membrana foi hibridizada com leite desnatado a 1% (m/v) em TEN-TWEEN 1x, a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligações inespecíficas aos anticorpos a membrana. Na sequencia, a membrana foi incubada com o anticorpo primário, monoclonal, de rato, anti-HSF1 (Stressgen), em uma diluição (1:500), em solução composta por leite em pó

desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x, por 15 minutos a temperatura ambiente, utilizando-se o sistema Snap Id (Millipore). Este anticorpo detecta tanto a forma fosforilada, quanto a não fosforilada do fator transcricional. Depois disso, a membrana foi lavada por três vezes com 15 ml de TEN-TWEEN 1x, igualmente utilizando-se o sistema Snap Id (Millipore), e submetida a uma nova incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente, com o segundo anticorpo, IgG A9542 (de camundongo, contra imunoglobulinas de rato, Sigma), conjugado a uma peroxidase de rabanete, diluído (1:2.000), em solução idêntica a utilizada na incubação com o anticorpo primário.

Após nova lavagem, a membrana foi novamente incubada na presença do anticorpo monoclonal anti- β -actina A3854 (Sigma), de camundongo, contra imunoglobulinas de rato e conjugado com peroxidase de rabanete, numa diluição (1:10.000) em solução composta por leite em pó desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x. Tal procedimento foi adotado para comparação do carregamento de quantidades iguais de proteína no gel. Por fim, realizou-se a imunodeteção das bandas, mediante a utilização da mesma técnica em relação à determinação da expressão gênica da enzima GS. As imagens das bandas, com boa resolução, foram registradas digitalmente, se utilizado o sistema de quimiluminescência ImageQuant 350 (GE/Amersham), e analisadas, posteriormente, para cálculos do volume de expressão, das proteínas de interesse.

4.2.2.6. Expressão Gênica das Proteínas de Choque Térmico-73 (HSP-73), 72 (HSP-72) e 70 (HSP-70)

A metodologia empregada para a determinação da expressão de HSP-73, HSP-72 e HSP-70 foi a de “Western Blot”, a partir da adaptação do protocolo

proposto por Milne et al. (2006) e Smolka et al. (2000). A preparação das amostras seguiu a mesma metodologia adotada em relação a determinação da expressão gênica de HSF-1 e da enzima GS.

Quantidades iguais de proteína: músculo sóleo, fração citoplasmática - 23 µg; fração nuclear - 9 µg; músculo gastrocnêmio, fração citoplasmática - 23 µg; fração nuclear - 17 µg; fígado, fração citoplasmática - 63 µg; fração nuclear - 27 µg, foram carregadas e separadas durante 4 horas (a 15 miliamperes - mA/gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizado-se sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida pH 8,3, utilizando-se 1 cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) de gel de separação (corrida) a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm. Cada amostra, foi anteriormente, ao carregamento no gel diluída em tampão de amostra redutor 1x, para amostras citoplasmáticas e 10x para amostras nucleares, conforme já havia sido adotado em relação a análise de HSF-1. Como marcador de peso molecular foi utilizado 10µL da mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (GE/Amershan).

Após as corridas as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GE/Amershan), com poros de 0,45 µm de diâmetro, utilizando-se sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100 V x h, durante 2 horas. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas, foram evidenciadas pela coloração com vermelho de Ponceau, (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução de TCA a 3%. Após a verificação, as membranas foram descoradas em tampão TEN-TWEEN 1x (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM), sob agitação manual. Antes do "immunoblotting", as membranas foram hibridizadas com leite em pó desnatado a

1% (m/v) em TEN-TWEEN 1x, a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se, então, bloqueio de ligações inespecíficas dos anticorpos a membrana. Na sequência, para o blotting das HSP-70, a membrana foi incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos utilizando-se o sistema Snap Id (Millipore), em solução composta por leite em pó desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x, na presença do anticorpo monoclonal de camundongo H5147 (hibridoma BRM-22 Sigma), diluído 1:1.000, que reage especificamente com o polipeptídeo de 73 kDa, HSP-73 (ou HSC-70, proteína constitutiva) e com o de 72 kDa, HSP-72 (ou HSP-70 induzível). Logo após, a membrana foi lavada por três vezes com 15 ml de TEN-TWEEN 1x, e submetida a uma nova incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente, com o segundo anticorpo, IgG B7014 (de cabra, contra imunoglobulinas de camundongo, biotinilado, Sigma) numa diluição (1:10.000), em solução composta por leite em pó desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x. Posteriormente, repetiu-se a lavagem da membrana, como descrito acima e uma nova incubação da mesma com estreptoavidina A2192 (Sigma) diluída (1:10.000), igualmente em solução composta por leite em pó desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x, por 15 minutos.

Após nova lavagem, a membrana foi incubada, uma vez mais, com o anticorpo monoclonal anti- β -actina A3854 (Sigma), de camundongo, contra imunoglobulinas de rato e conjugado com peroxidase de rabanete, numa diluição (1:10.000) em solução composta por leite em pó desnatado a 1% (m/v) mais TEN-TWEEN 1x. Tal procedimento foi adotado para comparação do carregamento de quantidades iguais de proteína no gel. Finalmente, realizou-se a imunodeteção das bandas, através da utilização da mesma técnica implicada em relação a análise da expressão gênica da enzima GS e de HSF-1, sendo as imagens das bandas, com

boa resolução, registradas digitalmente e analisadas, posteriormente, para cálculos do volume de expressão, das proteínas de interesse.

4.3. Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). A análise estatística utilizada foi o ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey HSD (Honestly Significant Differences) e teste de homogeneidade de Levene. Para o nível de significância foi adotado um $p < 0,05$ e o programa utilizado foi o SPSS para Windows versão 15.0.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros Biométricos

5.1.1 Consumo de Ração

A Tabela 1 mostra o consumo de ração dos animais no período de experimento.

Tabela 1 - Consumo de ração por animal (g/dia) durante o período de 8 semanas de treinamento.

Ração ingerida (g/dia)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	19,3 ± 1,8	19,0 ± 1,5	20,4 ± 1,8

Dados expressos em média e desvio padrão; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme descrito na tabela 1, não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação ao consumo de ração durante o período de 8 semanas de treinamento.

5.1.2 Peso Corporal

A tabela 2 mostra o peso dos animais após o período de 8 semanas de treinamento.

Tabela 2 - Peso dos animais após o período de 8 semanas de treinamento.

Peso (g)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	288,1 ± 29,6	290,1 ± 34,3	301,0 ± 29,2

Dados expressos em média e desvio padrão; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 2, não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação ao peso corporal no período de 8 semanas de treinamento.

5.2 Parâmetros Plasmáticos e Séricos

5.2.1 Concentração de glutamina plasmática

A tabela 3 mostra a concentração de glutamina plasmática nos três grupos estudados após 8 semanas de experimentação.

Tabela 3 - Concentração de glutamina plasmática

Glutamina plasmática (mmol/L).	CONTR	GLN+ALA	DIP
	0,99 ± 0,03	1,26 ± 0,03*	1,28 ± 0,03*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com grupo CONTR, p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

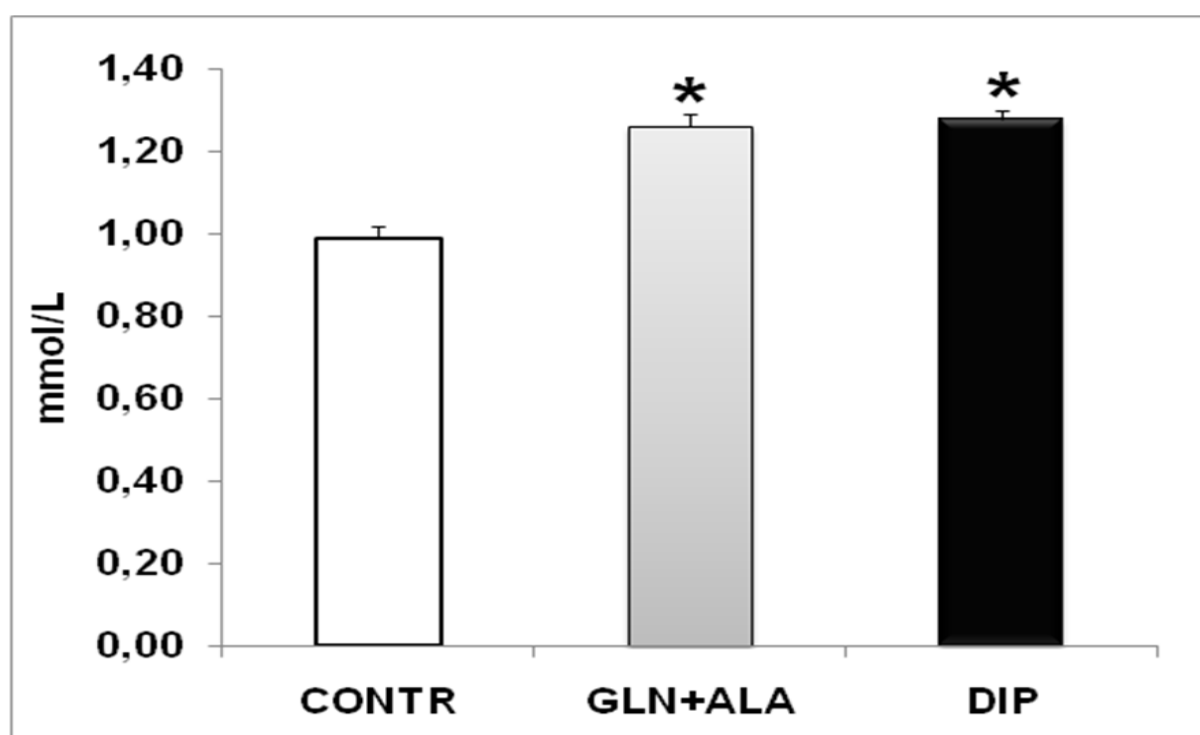


Figura 7 - Concentração plasmática de glutamina. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com grupo CONTR, p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 3 e a figura 7, tanto a suplementação com L-glutamina na forma livre quanto com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, promoveram aumento na concentração de glutamina no plasma, aumento esse que se deu na ordem de 21,4% no grupo GLN+ALA e 22,6% no grupo DIP, respectivamente, em comparação ao grupo controle do estudo.

5.2.2 Concentração de glutamato plasmático

A tabela 4 mostra os níveis obtidos de glutamato plasmático nos três grupos estudados.

Tabela 4 - Concentração de glutamato plasmático

Glutamato plasmático (mmol/L).	CONTR	GLN+ALA	DIP
	0,36 ± 0,04	0,38 ± 0,01	0,41 ± 0,03

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

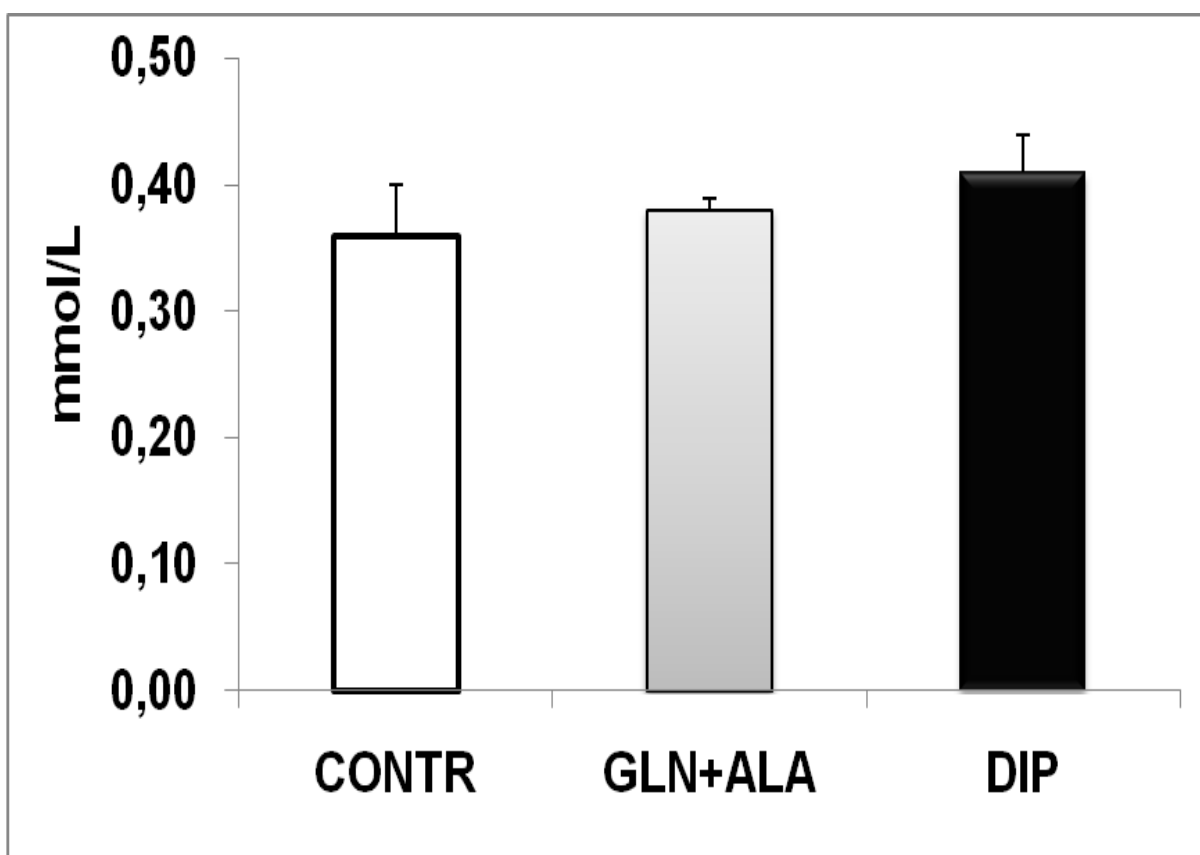


Figura 8 - Concentração plasmática de glutamato. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação à concentração plasmática de glutamato.

5.2.3 Concentração de amônia plasmática

A tabela 5 e a figura 9 mostram os níveis de amônia obtidos nos grupos estudados.

Tabela 5 - Concentração de amônia plasmática

Amônia ($\mu\text{mol/mL}$)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	5,30 \pm 0,16	4,1 \pm 0,22*	3,8 \pm 0,08*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

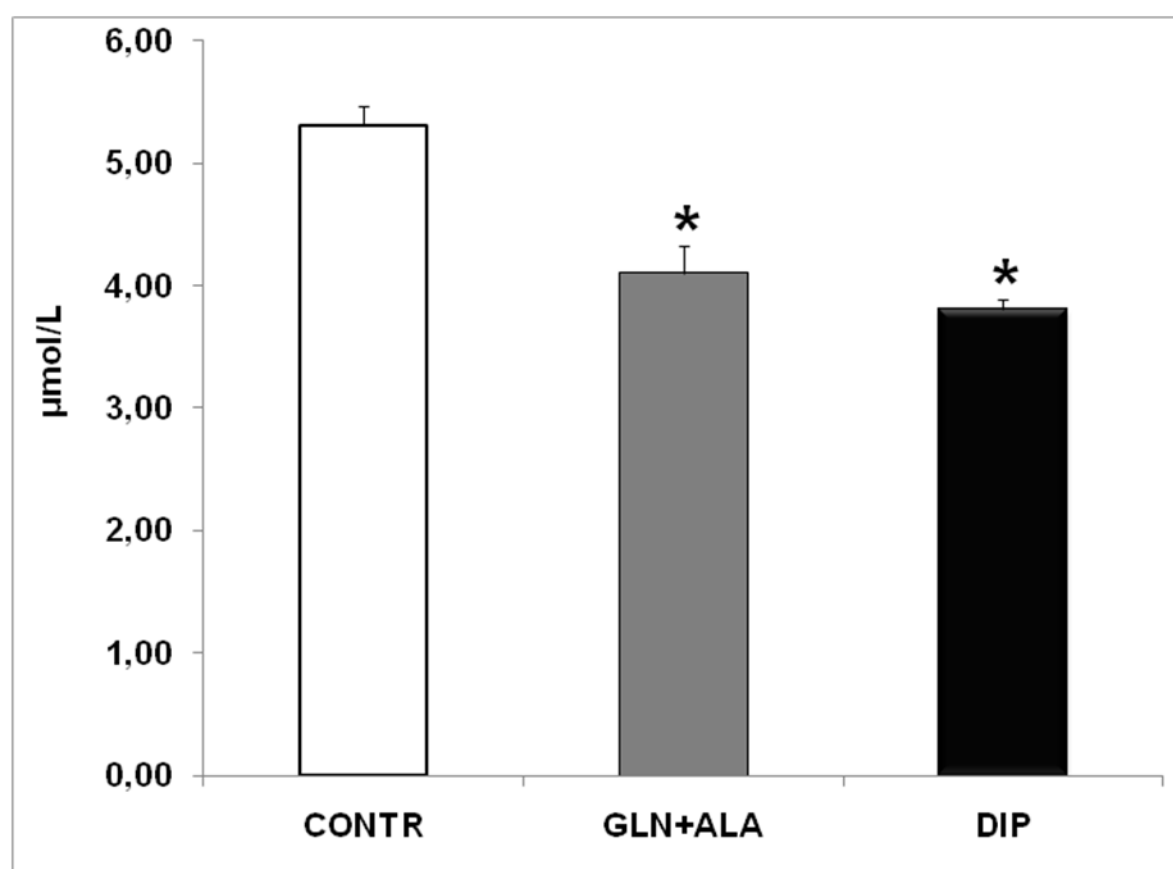


Figura 9 - Concentração de amônia plasmática. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 5 e a figura 9, a concentração de amônia plasmática após 8 semanas de treinamento foi menor nos grupos que sofreram a suplementação do que no grupo controle da ordem de 22,4% e 28,3%, respectivamente.

5.2.4 Atividade plasmática de creatina quinase

A Tabela 6 e a figura 10 mostram os dados obtidos da atividade de CK no grupo controle e nos grupos que receberam suplementação.

Tabela 6 - Atividade plasmática de creatina quinase

Creatina quinase (U/mL)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	378,3 ± 1,6	286,2 ± 1,5*	283,0 ± 1,5**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,005 (Anova One-Way; Tukey HSD).

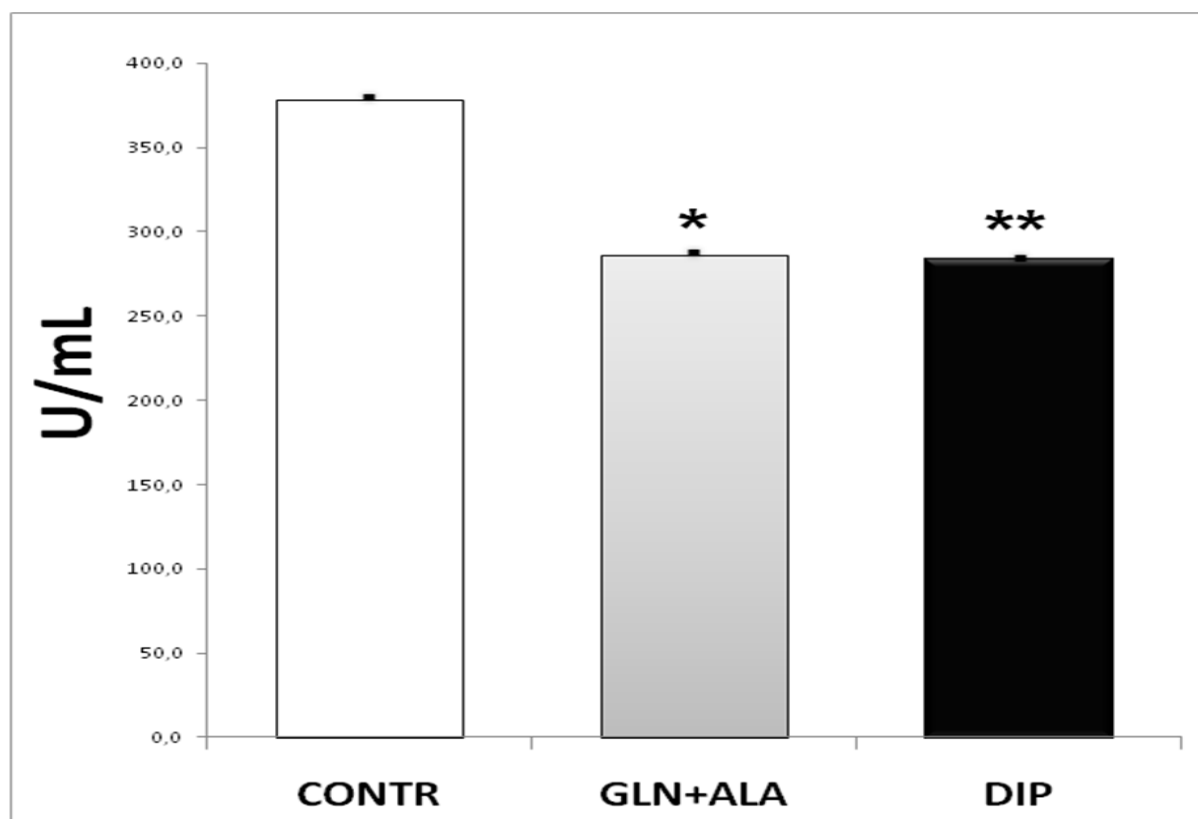


Figura 10 - Atividade plasmática de creatina quinase. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,005 (Anova One-Way; Tukey HSD).

Em relação à atividade plasmática de creatina quinase, de acordo com a tabela 6 e a figura 10, os grupos GLN+ALA e DIP apresentaram redução de 24,3% e 25,1%, na atividade de CK no plasma, após 8 semanas de treinamento aeróbio intenso, em relação ao grupo controle do estudo.

5.2.5 Concentração plasmática de mioglobina

A Tabela 7 e a figura 11 mostram os dados obtidos de MIO no grupo controle e nos grupos que receberam suplementação.

Tabela 7 - Concentração plasmática de mioglobina

Mioglobina (ng/mL).	CONTR	GLN+ALA	DIP
	114,9 ± 1,69	74,3 ± 1,88*	64,5 ± 206**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo (CONTR), p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR.. p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

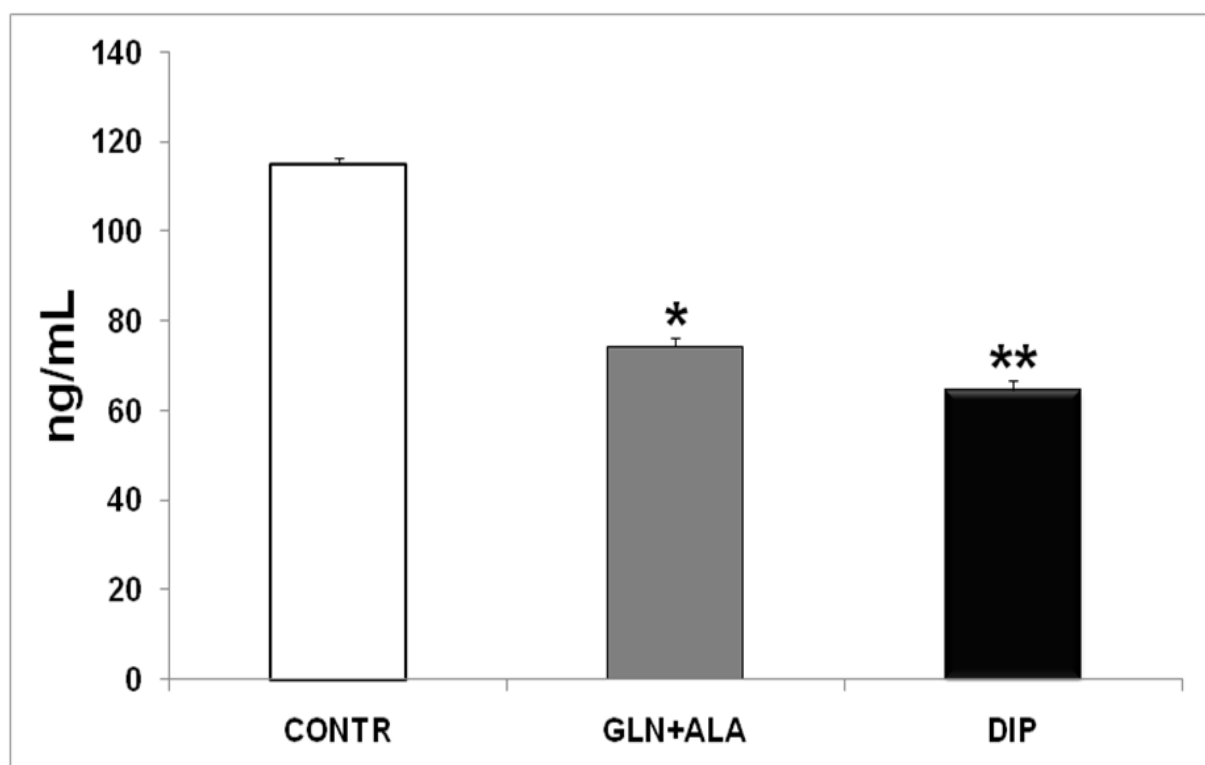


Figura 11 - Concentração plasmática de mioglobina. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo (CONTR), p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR.. p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 7 e a figura 11, a concentração plasmática de mioglobina foi 35,33% e 43,86% menor nos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente, quando comparado, ao grupo controle do estudo. Observou-se, igualmente, uma redução de 13,19% na concentração de mioglobina no grupo DIP, em comparação ao grupo GLN+ALA.

5.2.6 Concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – malondialdeído aldeído (TBARS)

A tabela 8 e a figura 12 mostram os dados relativos à dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos três grupos estudados.

Tabela 8 – Concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

TBARS ($\mu\text{mol/L}$ de malondialdeído).	CONTR	GLN+ALA	DIP
	$27,7 \pm 1,18$	$17,3 \pm 2,55^*$	$14,8 \pm 0,75^*$

Dados expressos em média e desvio padrão; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); $n = 8$ por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

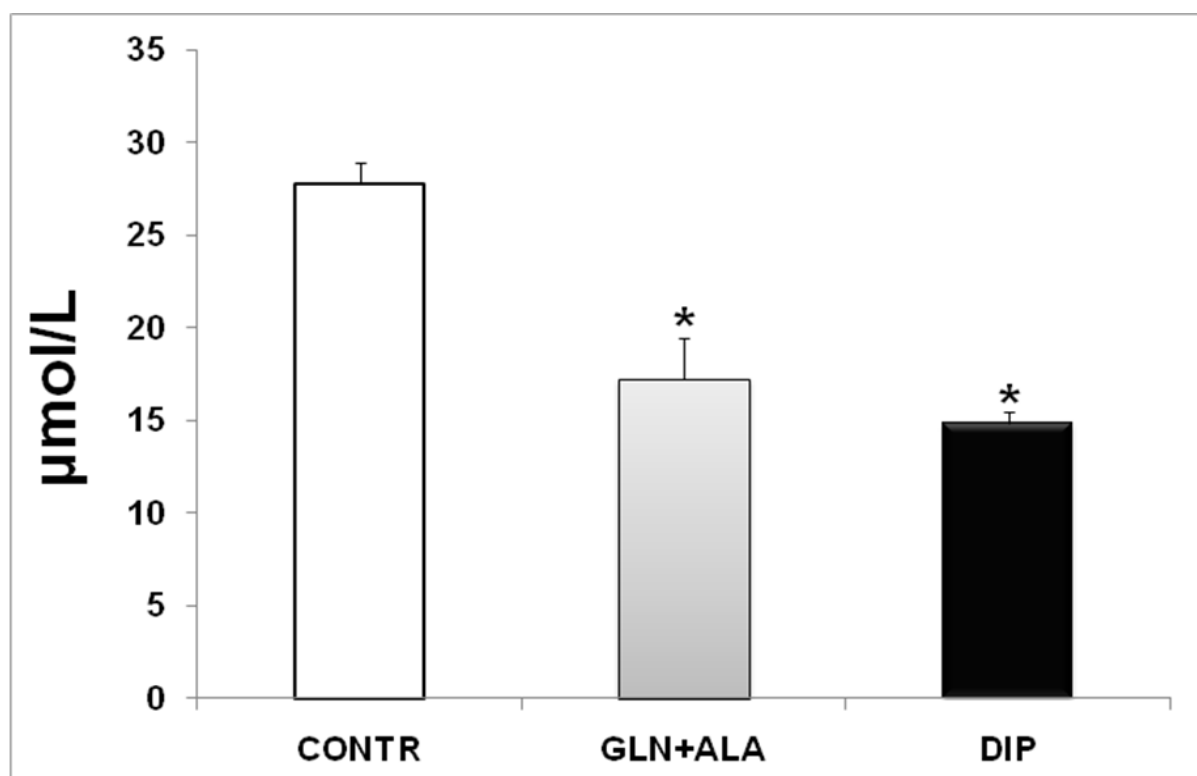


Figura 12 - Concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – malondialdeído (TBARS). Dados expressos em média e desvio padrão; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); $n = 8$ por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 8 e a figura 12, a concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico malondialdeído (TBARS) foi 37,6% e 46,6% menor após 8 semanas de treinamento aeróbio intenso nos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente, se comparado ao grupo controle do estudo.

5.3 Parâmetros Teciduais

5.3.1 Concentração de glutamina no músculo sóleo

A tabela 9 e a figura 13 expressam os dados referentes à concentração de glutamina no músculo sóleo.

Tabela 9 - Concentração de glutamina no músculo sóleo

Glutamina (μmol de glutamina/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	8,11 \pm 0,13	11,27 \pm 0,12*	12,17 \pm 0,10**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

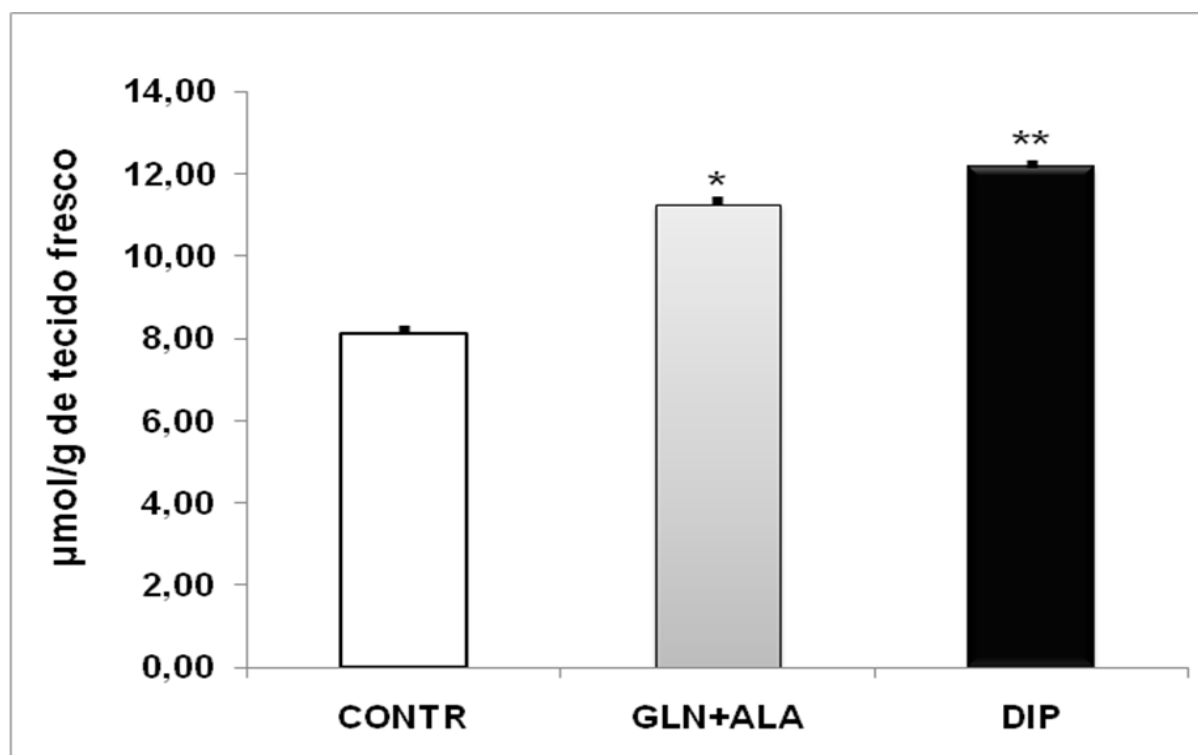


Figura 13 - Concentração de glutamina no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 9 e a figura 13, a suplementação com L-glutamina na forma livre e com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina promoveram aumento na ordem de 28% e 33,4%, na concentração de glutamina, no músculo sóleo, quando comparado ao grupo controle do estudo, respectivamente. Já na comparação entre

os dois grupos suplementados, observou-se que a suplementação com o dipeptídeo, promoveu aumento de 7,4%, na concentração de glutamina, no músculo sóleo, se comparada ao grupo GLN+ALA.

5.3.2 Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo sóleo

Para determinar a influência da suplementação sobre a quantidade de proteína total no músculo sóleo, foi calculada a razão entre a concentração de glutamina e a quantidade de proteína total, neste tecido. Os dados acham-se expressos na tabela 10 e representados graficamente na figura 14.

Tabela 10 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo sóleo (nmol de glutamina/mg de proteína).

Glutamina (nmol de glutamina/mg de proteína)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	51,33 ± 1,34	53,03 ± 3,67*	63,00 ± 2,81**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

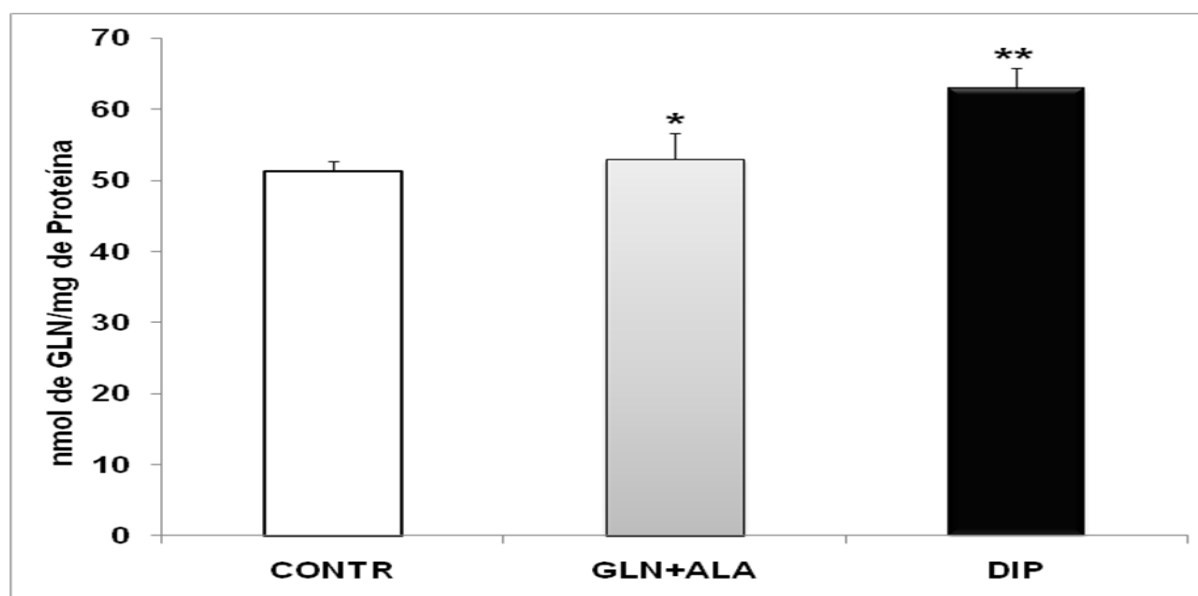


Figura 14 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 10 e a figura 14, o grupo DIP apresentou um aumento na ordem de 18,5% e 15,8% na razão entre glutamina/proteína total no músculo sóleo, quando comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. Já o grupo GLN+ALA apresentou concentração superior de glutamina/proteína total no músculo sóleo, na ordem de 3,2%, em relação ao grupo controle do estudo.

5.3.3 Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio

A concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio é apresentada na tabela 11 e representada graficamente na figura 15.

Tabela 11 - Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

Glutamina (μmol de glutamina/g de tecido fresco).	CONTR	GLN+ALA	DIP
	$5,50 \pm 0,12$	$5,59 \pm 0,04$	$5,62 \pm 0,06$

Dados expressos em média e erro padrão da média; n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

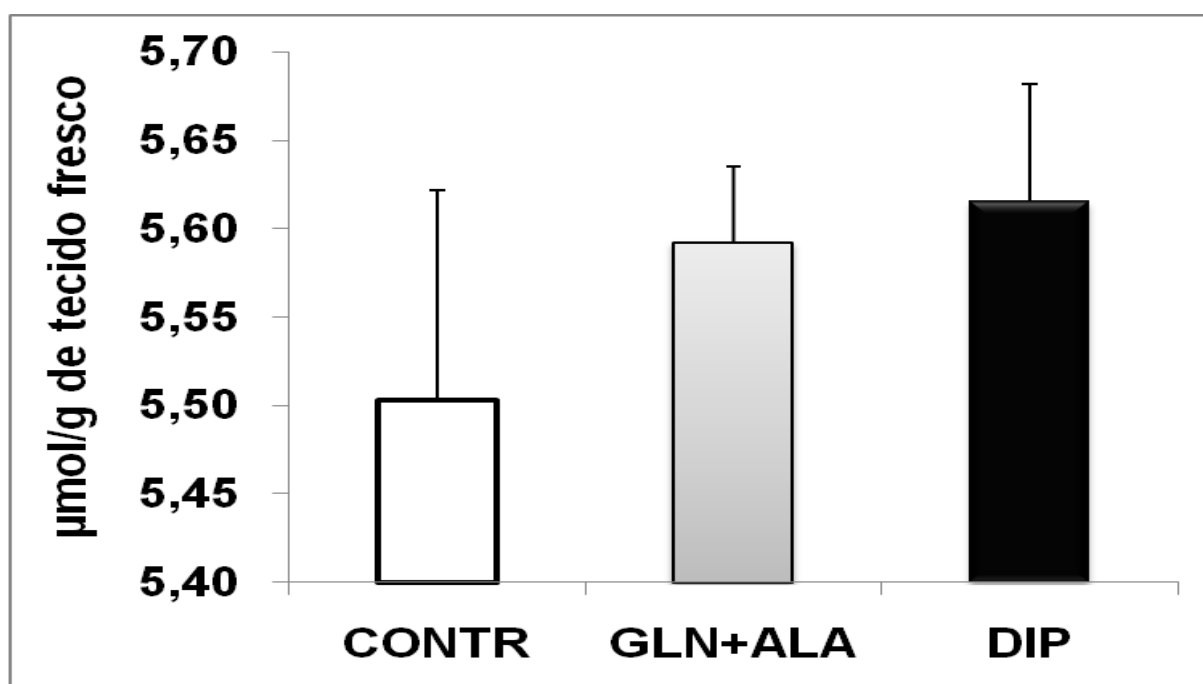


Figura 15 - Concentração de glutamina no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 11 e a figura 15, 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 no músculo gastrocnêmio

Para determinar a influência da suplementação sobre a quantidade de proteína total no músculo gastrocnêmio, foi calculada a razão entre a concentração de glutamina e a quantidade de proteína total. Os dados acham-se expressos na tabela 12 e representados graficamente na figura 16.

Tabela 12 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo gastrocnêmio (nmol de glutamina/mg de proteína).

Glutamina (nmol de glutamina/mg de proteína)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	26,67 ± 1,6	35,47 ± 2,09*	46,44 ± 1,09**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

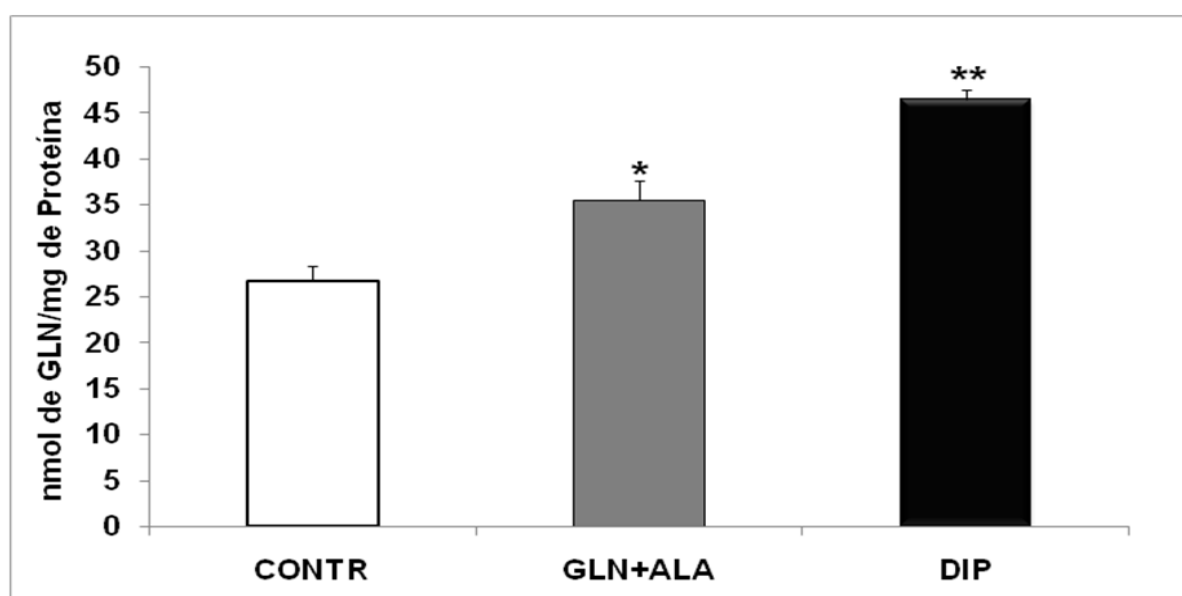


Figura 16 - Razão entre a concentração de glutamina e proteína total no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 12 e a figura 16, a suplementação com L-glutamina na forma livre promoveu aumento de 24,8% na razão entre glutamina/proteína total no músculo gastrocnêmio, quando comparado ao grupo controle do estudo. Já o grupo DIP apresentou concentração superior de glutamina/proteína total no músculo gastrocnêmio, na ordem de 42,6% e 23%, na comparação com os grupos controle e GLN+ALA, respectivamente.

5.3.5 Concentração hepática de glutamina

Para estimar a concentração de glutamina absorvida pelo fígado foi calculada a concentração hepática desse aminoácido. A tabela 13 apresenta esses dados, que são representados graficamente na figura 17.

Tabela 13 - Concentração hepática de glutamina (μmol de glutamina/g de tecido fresco).

Glutamina (μmol de glutamina/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	4,18 \pm 0,63	6,21 \pm 0,60*	6,62 \pm 0,09**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

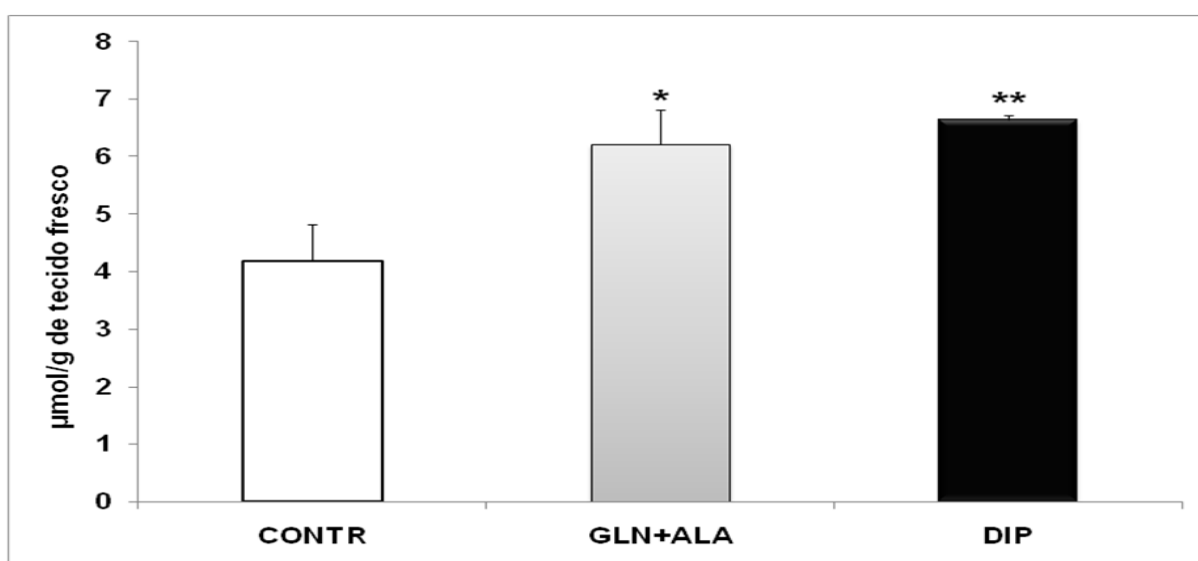


Figura 17 - Concentração hepática de glutamina. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os e os grupos GLN+ALA e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 13 e a figura 17, os animais dos grupos DIP e GLN+ALA apresentaram concentração superior de glutamina no fígado, na ordem de 36,9% e 32,7%, respectivamente em comparação com os animais do grupo controle, do estudo.

5.3.6 Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total

A razão entre a concentração hepática de glutamina e a quantidade de proteína total acha-se apresentada na tabela 14 e representada, graficamente, na figura 18.

Tabela 14 – Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total (nmol de glutamina/mg de proteína)

Glutamina (nmol de glutamina/mg de proteína)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	27,39 ± 3, 10	52,59 ± 4,64*	56,62 ± 4,11*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

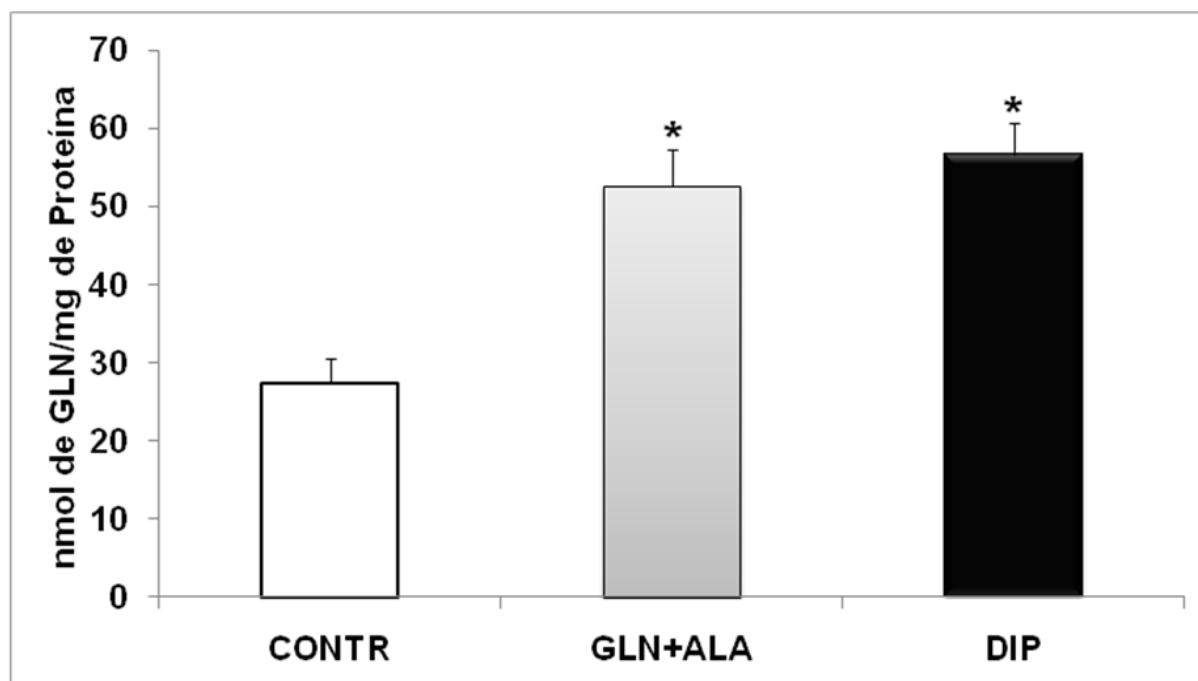


Figura 18 - Razão entre a concentração hepática de glutamina e proteína total. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 14 e a figura 18, tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre, quanto com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, promoveram aumento na concentração de glutamina/proteína total no fígado na ordem de 47,7% e 51,6%, respectivamente, em comparação ao grupo controle do estudo.

5.3.7 Concentração de glutamato no músculo sóleo

A concentração de glutamato no músculo sóleo é apresentada na tabela 15 e representada graficamente na figura 19.

Tabela 15 - Concentração de glutamato no músculo sóleo (μmol de glutamato/g de tecido fresco)

Glutamato (μmol de glutamato/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	$3,78 \pm 0,09$	$4,31 \pm 0,15^*$	$4,83 \pm 0,13^{**}$

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os e os grupos GLN+ALA e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

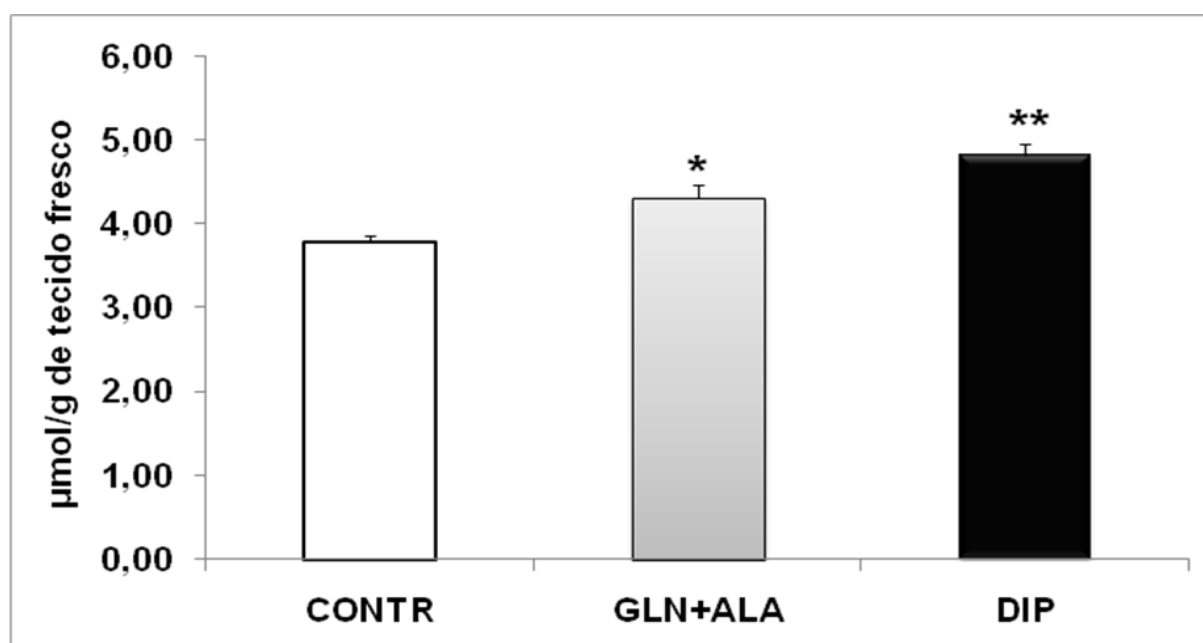


Figura 19 - Concentração de glutamato no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os e os grupos GLN+ALA e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 15 e a figura 19, a concentração de glutamato no músculo sóleo dos animais do grupo DIP foi 21,7% e 10,8% superior, se comparado aos animais dos grupos controle e GLN+ALA, respectivamente. Já os animais do grupo GLN+ALA apresentaram concentração de glutamato no músculo sóleo, 12,3% superior, se comparado aos animais do grupo controle.

5.3.8 Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio

A concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio é apresentada na tabela 16 e representada graficamente na figura 20.

Tabela 16 - Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio

Glutamato (μmol de glutamato/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,59 \pm 0,05	1,83 \pm 0,06*	1,77 \pm 0,09*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

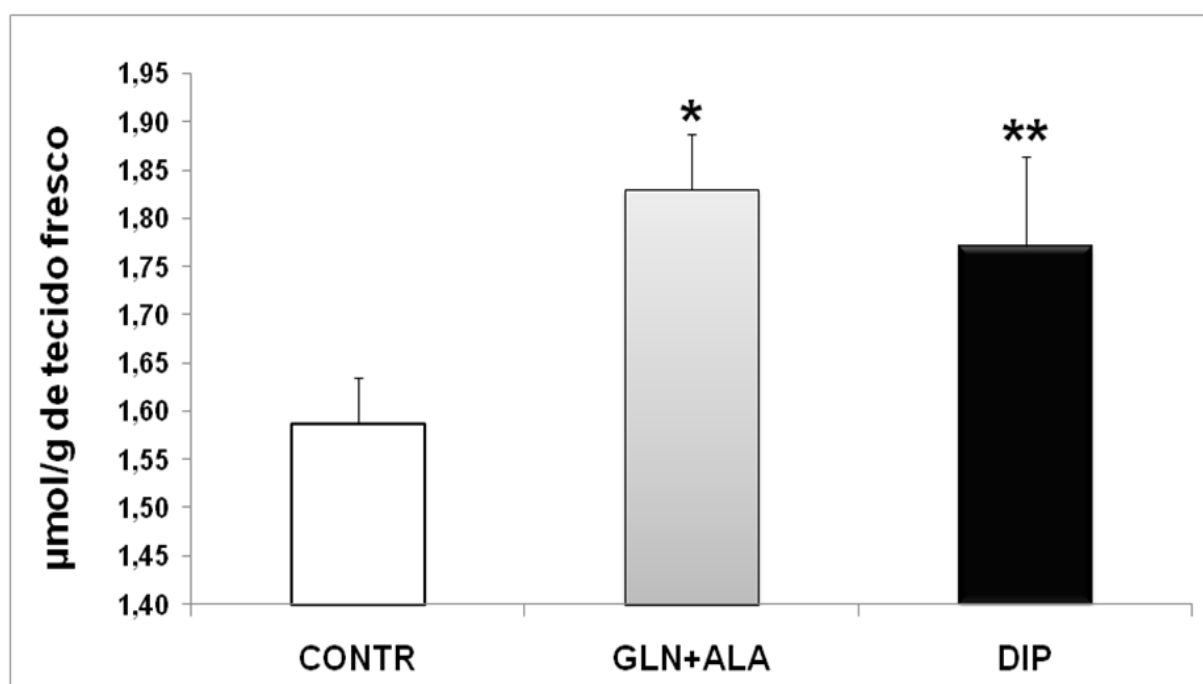


Figura 20 - Concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 16 e a figura 20, a concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio nos grupos GLN+ALA e DIP foi 13,1% e 10,1% superior, respectivamente, se comparado ao grupo controle do estudo.

5.3.9 Concentração hepática de glutamato

Foi estimada a concentração de glutamato no fígado. Os dados encontram-se na tabela 17 e representados na figura 21.

Tabela 17 - Concentração hepática de glutamato

Glutamato (μmol de glutamato/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	2,06 \pm 0,04	2,12 \pm 0,02*	2,16 \pm 0,03**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,005$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+Ala e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

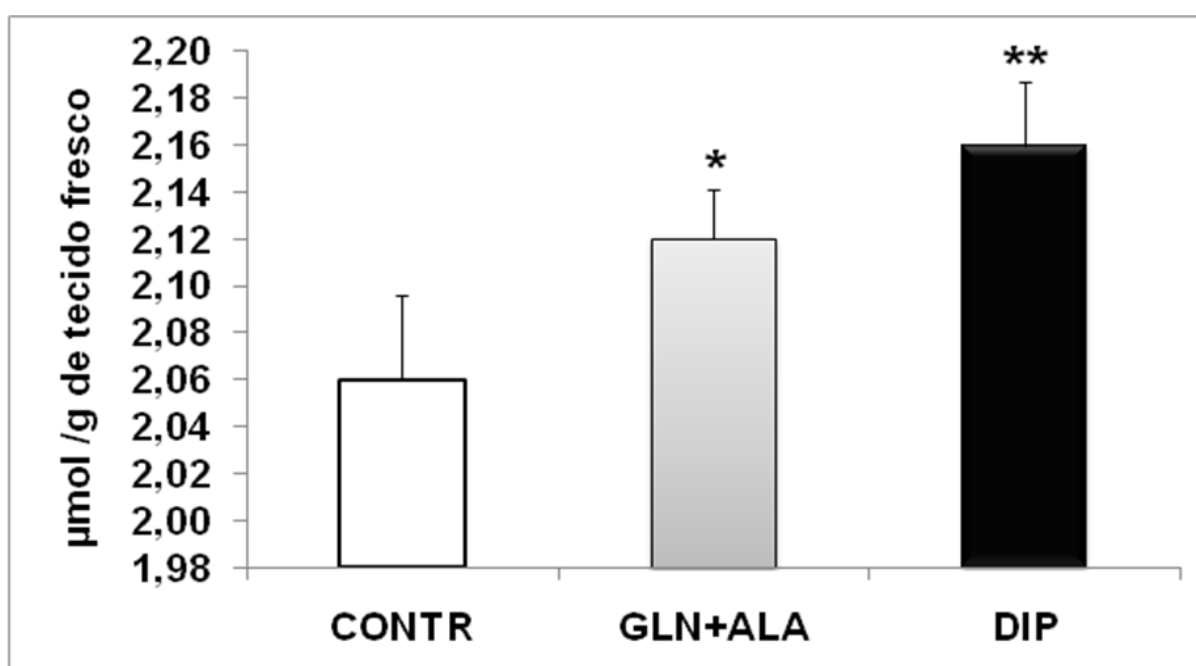


Figura 21 - Concentração hepática de glutamato. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,005$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+Ala e CONTR. $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Em relação á concentração hepática de glutamato, os grupos DIP e GLN+ALA apresentaram concentração 4,6% e 2,8% superior, respectivamente, se comparado ao grupo controle do estudo.

5.3.10 Concentração de GSH no músculo sóleo

Foi dosada a concentração de glutathiona reduzida no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 18 e representados na figura 22.

Tabela 18 – Concentração de glutathiona reduzida (GSH) no músculo sóleo

GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	$0,33 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,12^*$	$0,69 \pm 0,09^*$

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

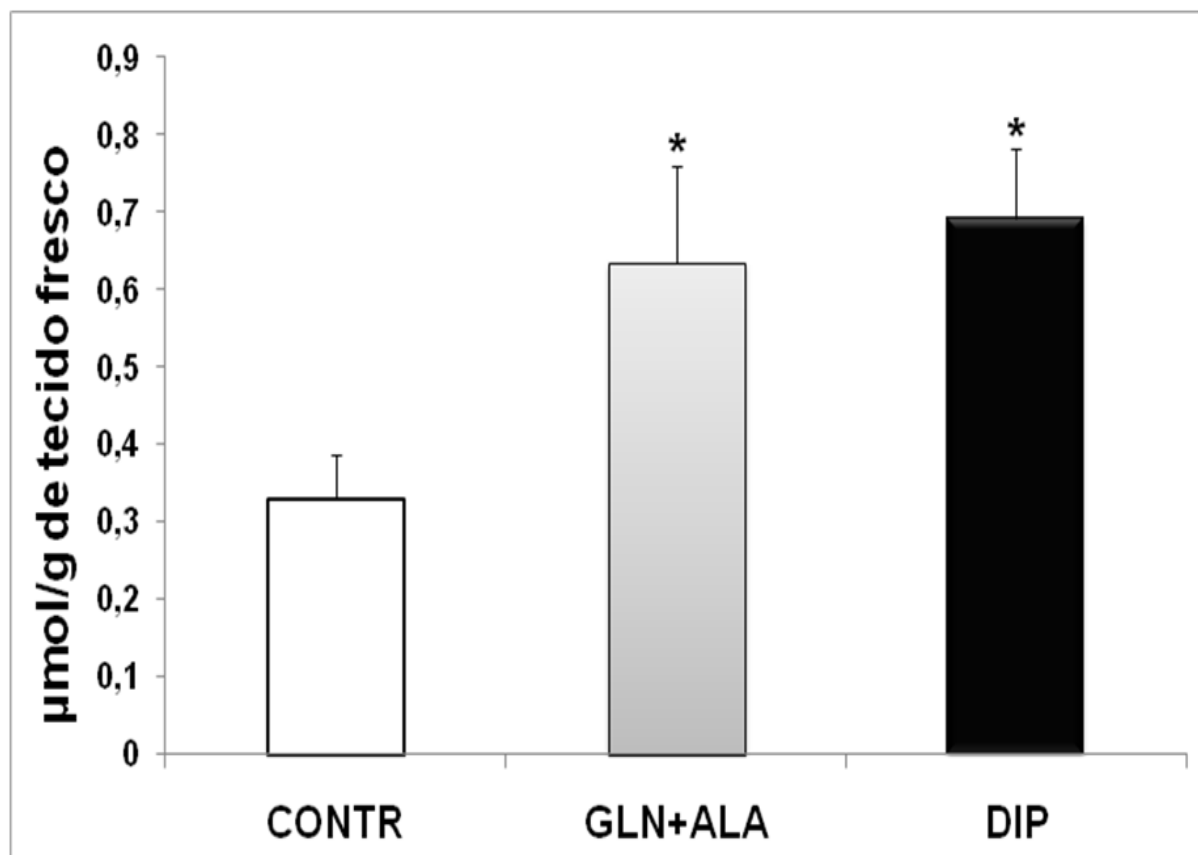


Figura 22 - Concentração de GSH no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 18 e a figura 22, tanto a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, quanto com L-glutamina e L-alanina na forma livre, promoveram aumento de 52,2% e 48,4%, na concentração de GSH no músculo sóleo, em comparação ao grupo controle do estudo.

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

Foi calculada a razão entre glutathiona reduzida e glutathiona oxidada. Os dados acham-se expressos na tabela 19 e representados na figura 23.

Tabela 19 - Razão entre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) no músculo sóleo ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

Razão GSH/GSSG	CONTR	GLN+ALA	DIP
	2,96 \pm 0,83	4,65 \pm 0,99	5,07 \pm 0,98*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,005$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

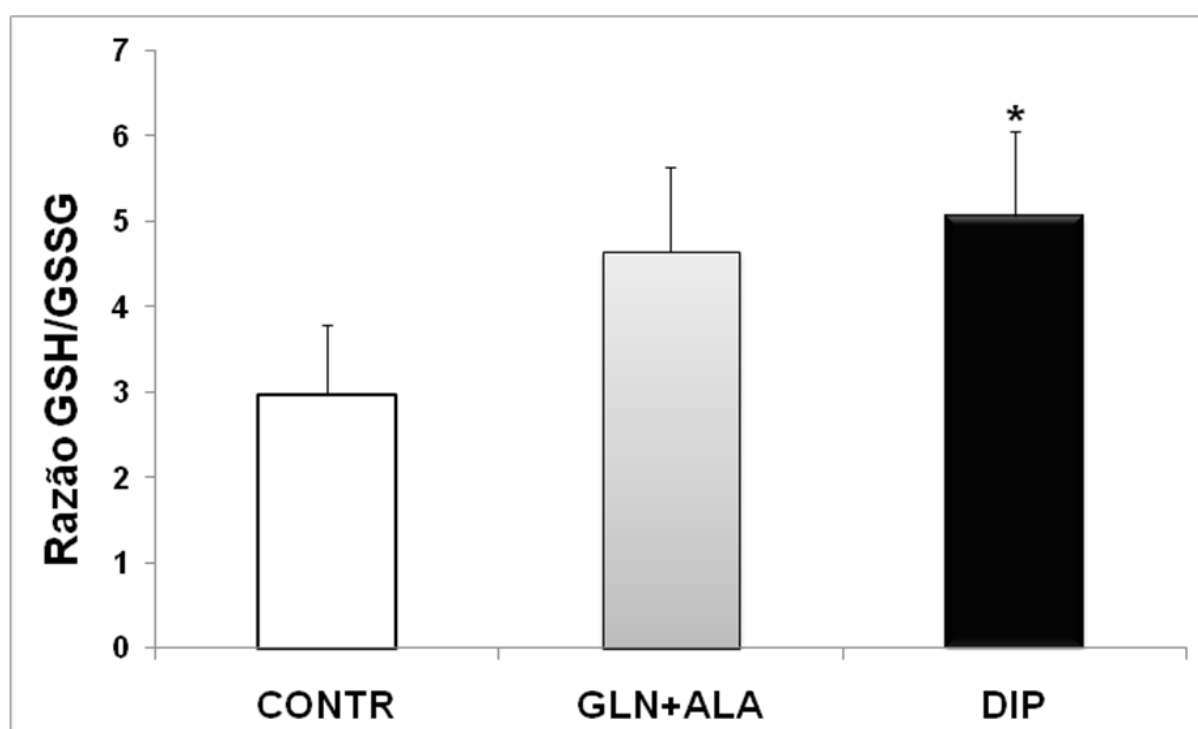


Figura 23 - Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,005$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 19 e a figura 23, o cálculo da razão entre GSH/GSSG no músculo sóleo demonstra aumento de 41,6% no grupo DIP, se comparado ao grupo controle do estudo.

5.3.12 Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio

Foi dosada a concentração de glutatona reduzida no músculo gastrocnêmio.

Os dados acham-se expressos na tabela 20 e representados na figura 24.

Tabela 20 - Concentração de glutatona reduzida (GSH) no músculo gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	0,19 \pm 0,03	0,36 \pm 0,05*	0,39 \pm 0,02*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

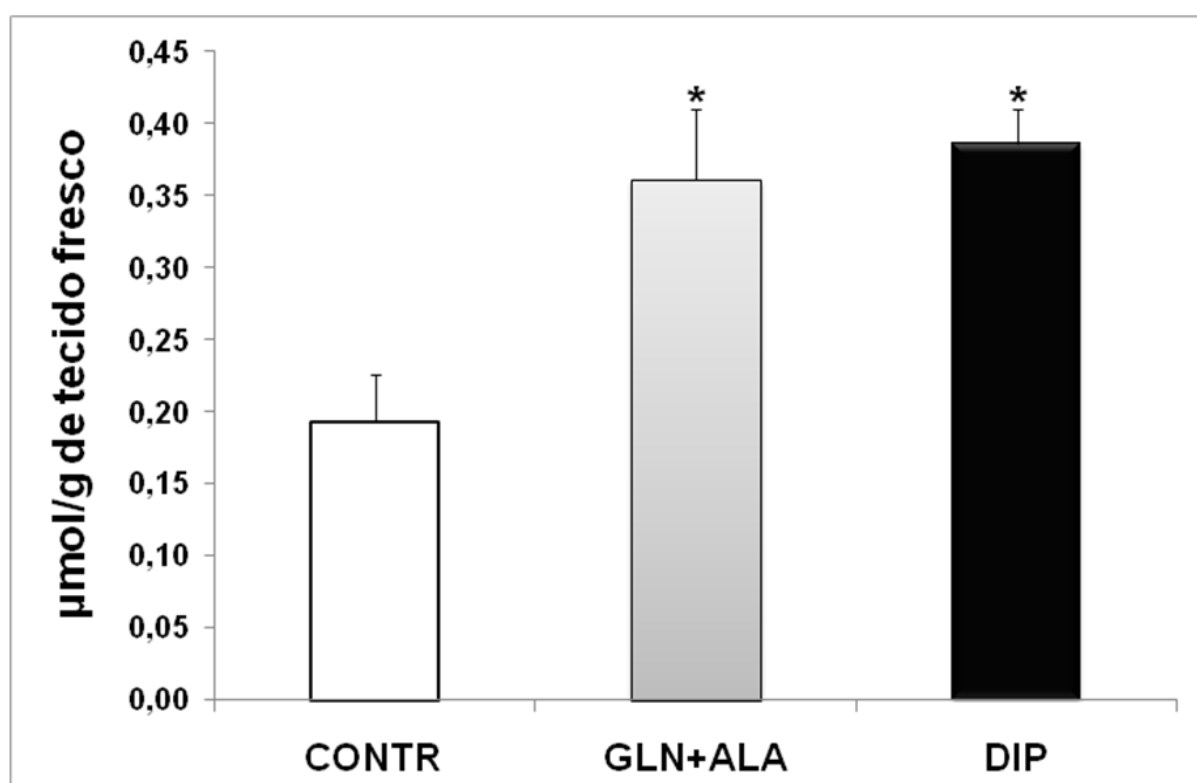


Figura 24 - Concentração de GSH no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 20 e a figura 24, a concentração de GSH no músculo gastrocnêmio nos grupos DIP e GLN+ALA foi 51,3% e 47,2% superior, respectivamente, se comparado ao grupo controle do estudo.

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

Foi calculada a razão entre glutatona reduzida e glutatona oxidada no músculo gastrocnêmio. Os dados acham-se expressos na tabela 21 e representados na figura 25.

Tabela 21 - Razão entre a concentração de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) no gastrocnêmio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

Razão GSH/GSSG	CONTR	GLN+ALA	DIP
	2,21 \pm 0,33	3,79 \pm 0,61*	4,11 \pm 0,75*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

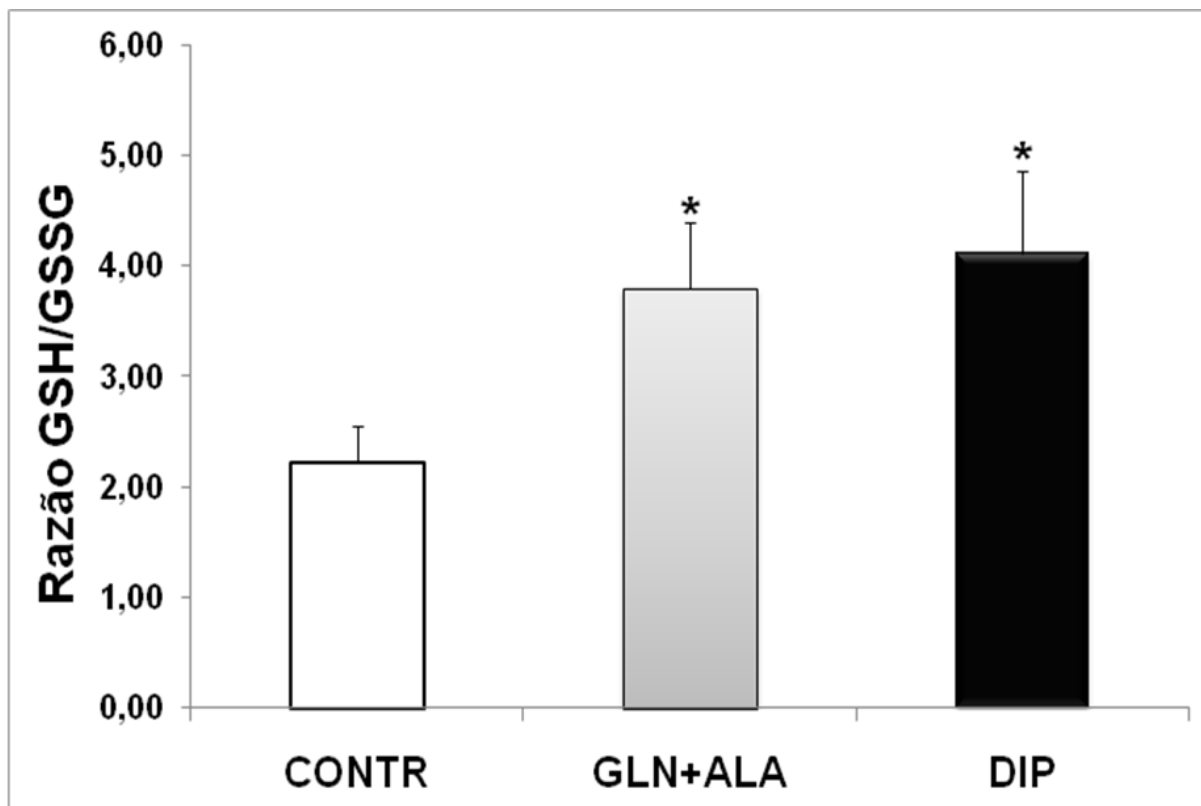


Figura 25 - Razão entre a concentração de GSH e GSSG no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 21 e a figura 25, o cálculo da razão entre GSH/GSSG no músculo gastrocnêmio demonstra aumento de 46,3% e 41,7%, nos grupos DIP e GLN+ALA, respectivamente, em relação ao grupo controle, do estudo.

5.3.14 Concentração hepática de GSH

Foi estimada a concentração de glutatona reduzida no fígado. Os dados acham-se expressos na tabela 22 e representados na figura 26.

Tabela 22 – Concentração hepática de glutatona reduzida (GSH)

GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	$0,37 \pm 0,08$	$0,69 \pm 0,07^*$	$0,70 \pm 0,07^*$

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

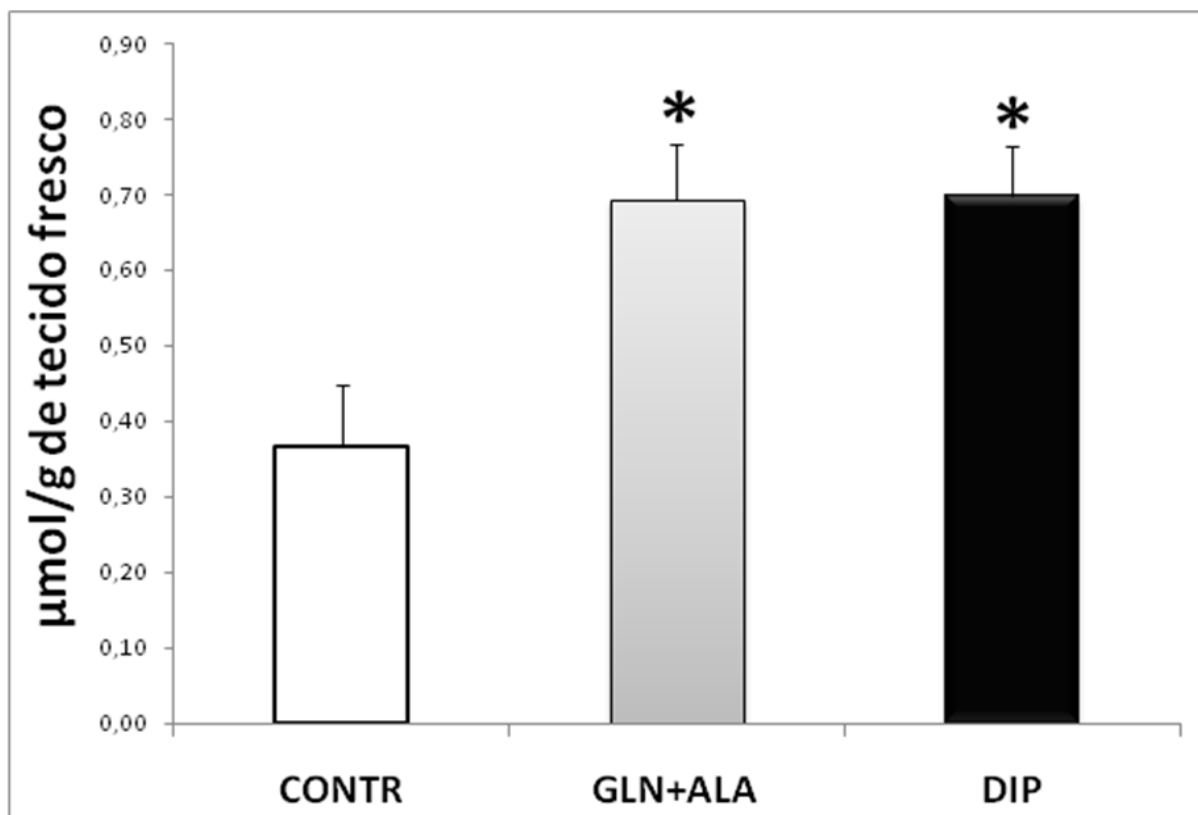


Figura 26 - Concentração hepática de glutatona reduzida (GSH). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,0001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 22 e a figura 26, a concentração hepática de GSH foi 47,1% e 46,4% superior nos grupos DIP e GLN+ALA, respectivamente, em relação ao grupo CONTR.

5.3.15 Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG

Foi calculada a razão entre glutathiona reduzida e glutathiona oxidada no fígado.

Os dados acham-se expressos na tabela 23 e representados na figura 27.

Tabela 23- Razão entre a concentração hepática de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) ($\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco).

Razão GSH/GSSG	CONTR	GLN+ALA	DIP
	5,33 \pm 0,72	6,69 \pm 1,17	7,77 \pm 1,50*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

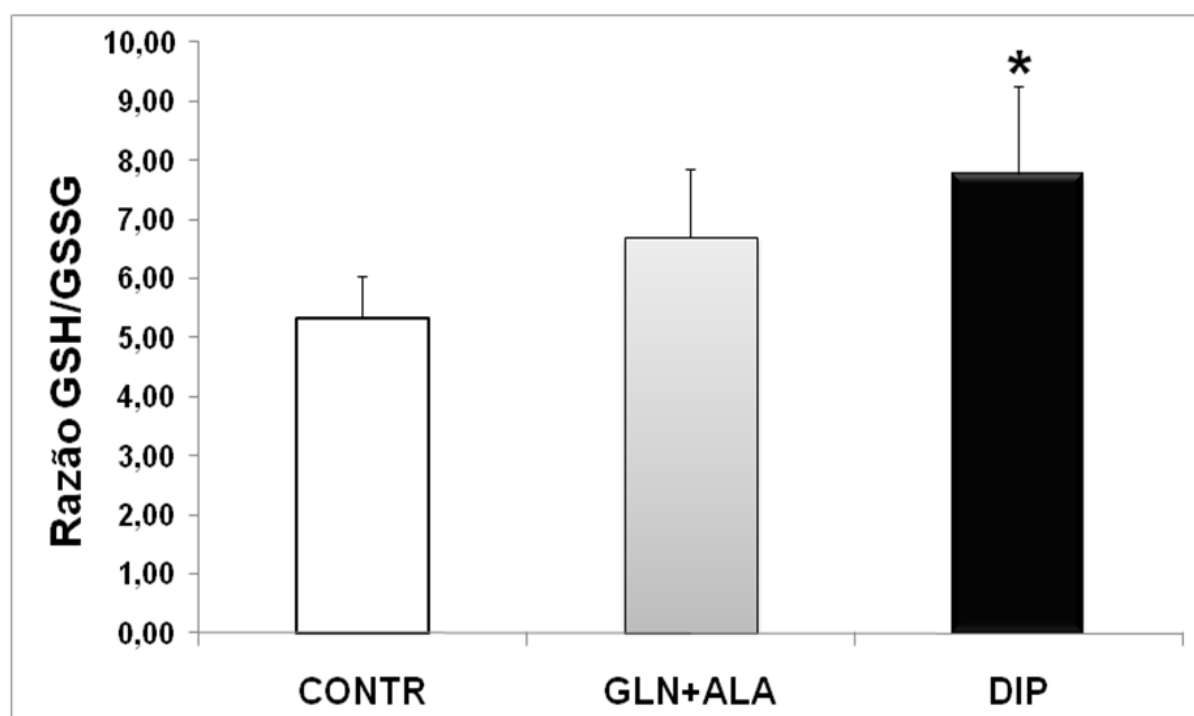


Figura 27 - Razão entre a concentração hepática de GSH e GSSG. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 23 e a figura 27, o cálculo da razão entre GSH/GSSG no fígado demonstra aumento de 31,4% no grupo DIP, em relação ao grupo controle do estudo.

5.3.16 Concentração de proteína no músculo sóleo

Estimou-se a concentração de proteínas totais no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 24 e representados na figura 28.

Tabela 24 - Concentração de proteína no músculo sóleo.

Proteína total (mg/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	15,85 ± 0,50	19,28 ± 0,86*	21,68 ± 1,06*

Dados expressos em média e erro padrão média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

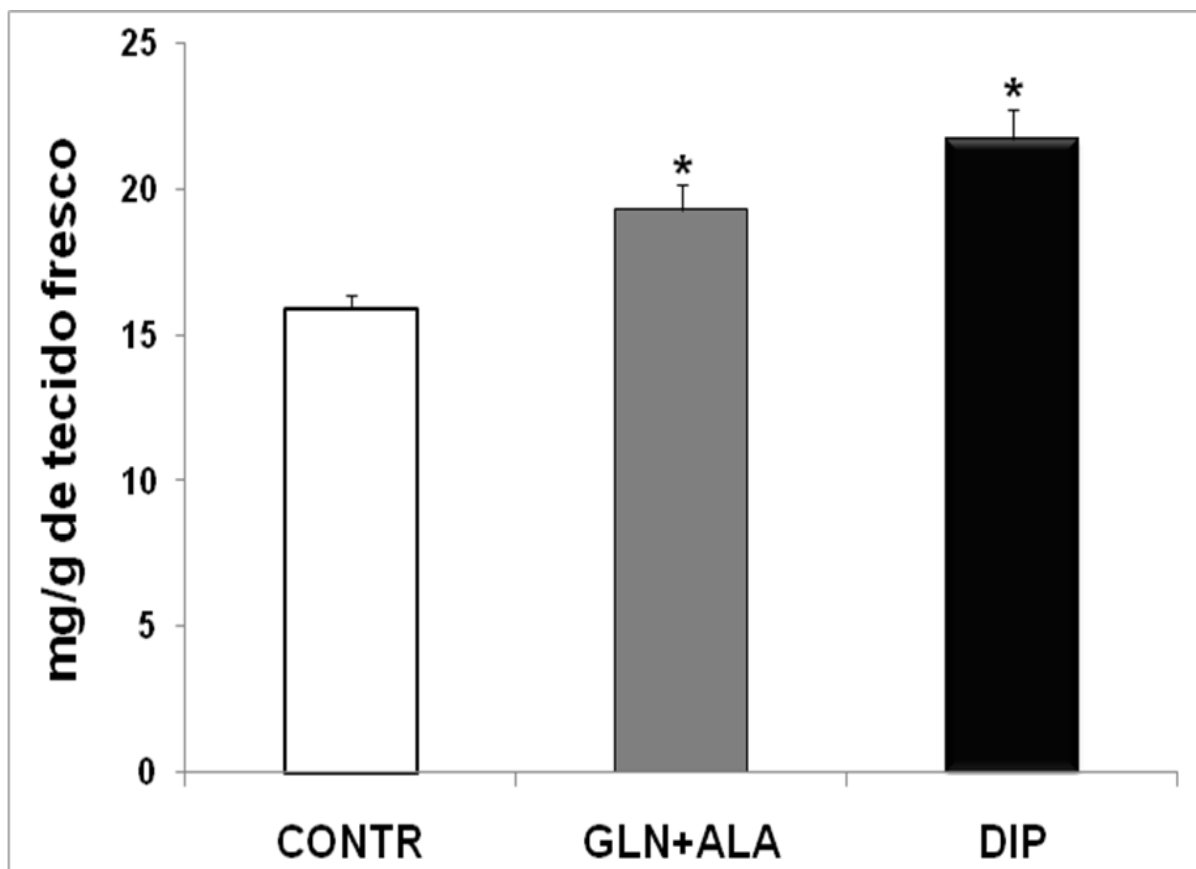


Figura 28 - Concentração de proteína no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 24 e a figura 28, a concentração de proteína total no músculo sóleo nos grupos DIP e GLN+ALA foi 26,9% e 17,8% superior, em relação ao grupo CONTR.

5.3.17 Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio

Estimou-se a concentração de proteínas totais no músculo gastrocnêmio. Os dados acham-se expressos na tabela 25 e expressos na figura 29.

Tabela 25 - Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio (mg/g de tecido fresco).

Proteína total (mg/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	12,96 ± 0,72	15,81 ± 0,96*	19,41 ± 0,36**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,005. (Anova One-Way;Tukey HSD).

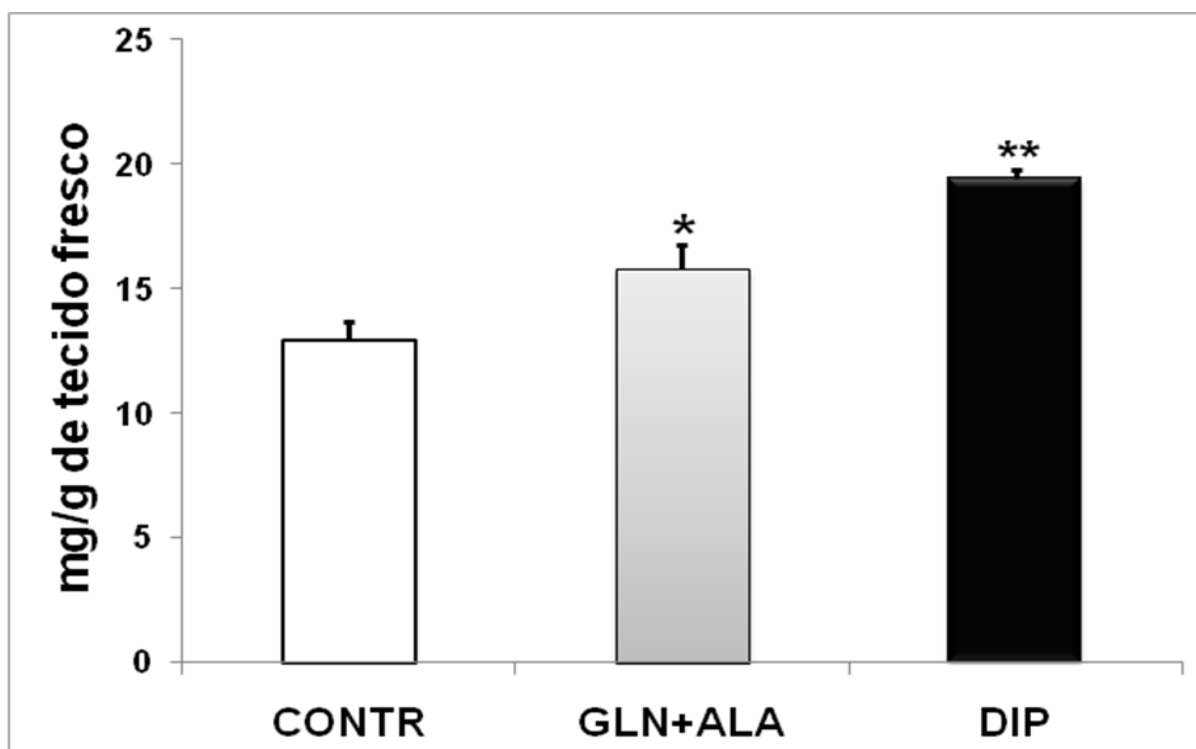


Figura 29 - Concentração de proteína no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,0001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,005. (Anova One-Way;Tukey HSD).

De acordo com a tabela 25 e a figura 28, a concentração de proteína total no músculo gastrocnêmio no grupo DIP foi 18,5% e 33,3% superior, se comparado aos grupos GLN+ALA e CONTR, respectivamente. Já o grupo GLN+ALA apresentou concentração de proteína total no músculo gastrocnêmio, 18% superior em relação ao grupo CONTR.

5.3.18 Concentração de proteína hepática

Estimou-se a concentração de proteína no fígado. Os dados acham-se expressos na tabela 26.

Tabela 26 - Concentração de proteína no músculo hepática (mg/g de tecido fresco)

Proteína total (mg/g de tecido fresco)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	16,94 ± 1,04	17,70 ± 1,66	18,57 ± 1,06

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

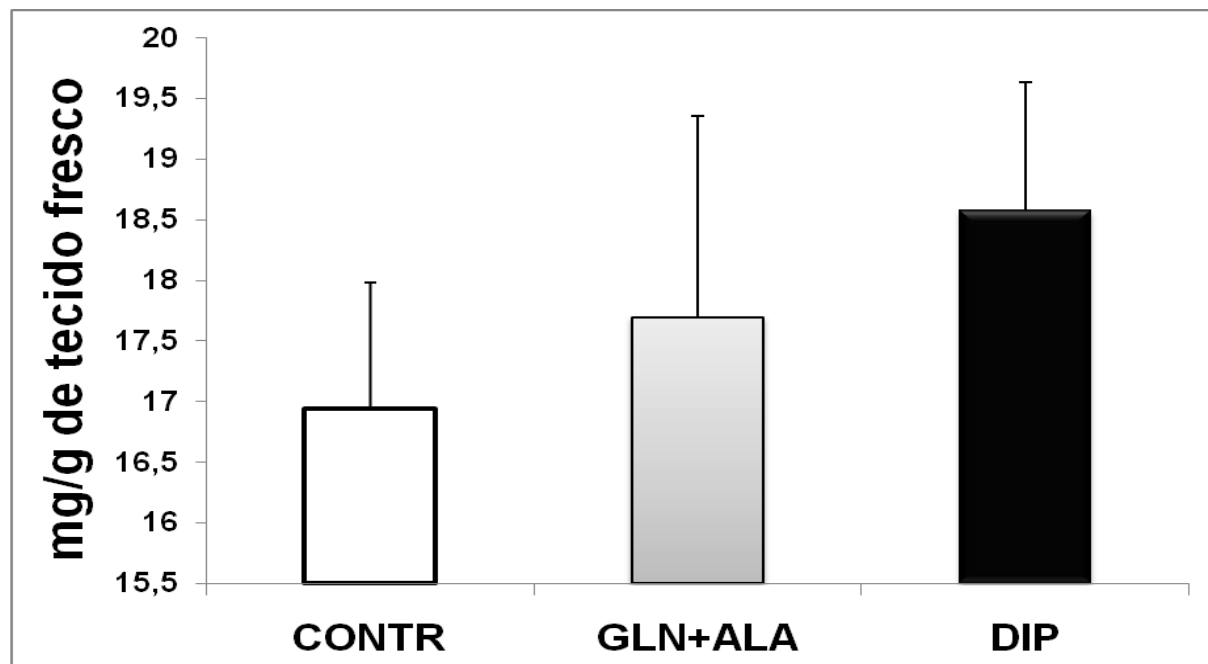


Figura 30 - Concentração de proteína no Fígado. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

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

5.3.19 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo

Para determinar a influência das suplementações sobre a expressão gênica da forma constitutiva da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no citoplasma celular, foi realizada a análise da expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 27 e representados graficamente na figura 31.

Tabela 27 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSP-73 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,02	0,83 ± 0,02*	0,70 ± 0,02**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo DIP, p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

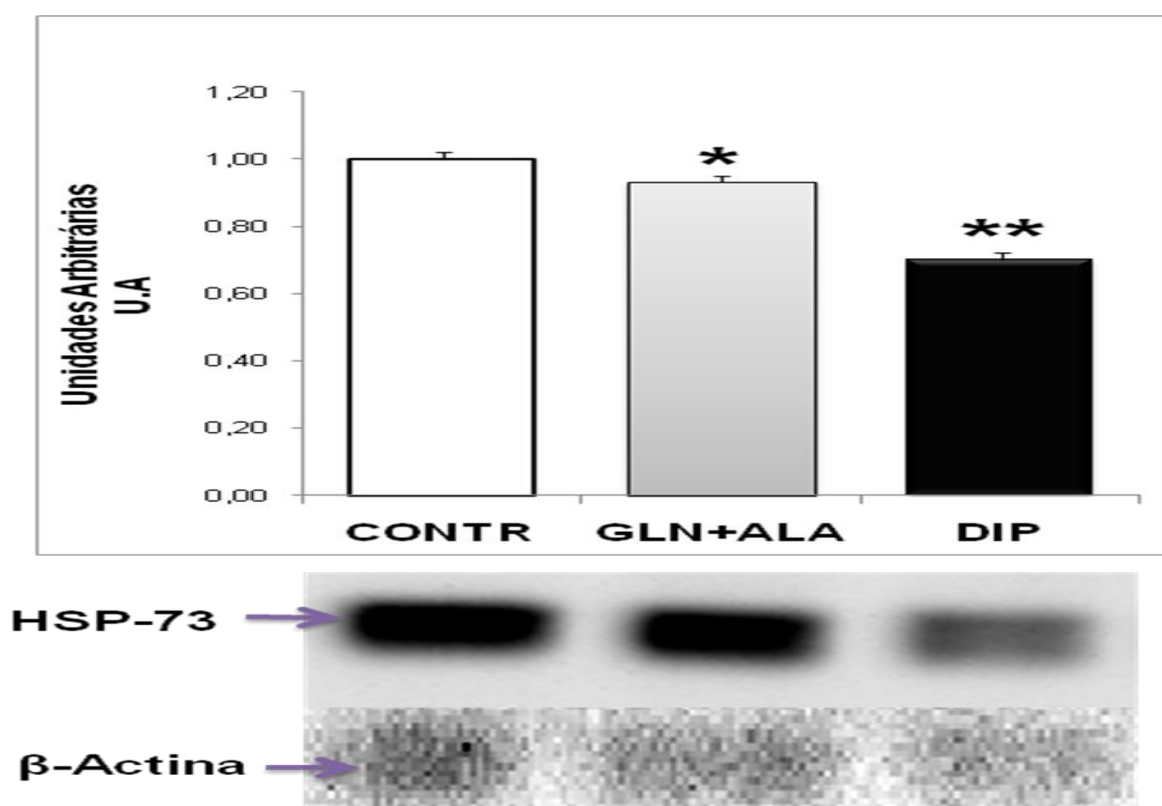


Figura 31 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo DIP, p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos GLN+ALA e CONTR. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 27 e a figura 31, os animais do grupo DIP apresentaram expressão citoplasmática de HSP-73, no músculo sóleo, 42,8% e 18,6% inferior, se comparado aos animais dos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. Já quando comparado ao grupo CONTR, o grupo GLN+ALA apresentou expressão citoplasmática de HSP-73, 20,5% inferior.

5.3.20 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo

Analisou-se a expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 28 e representados graficamente na figura 32.

Tabela 28 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSP-72 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,04	0,74 ± 0,02*	1,73 ± 0,03**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

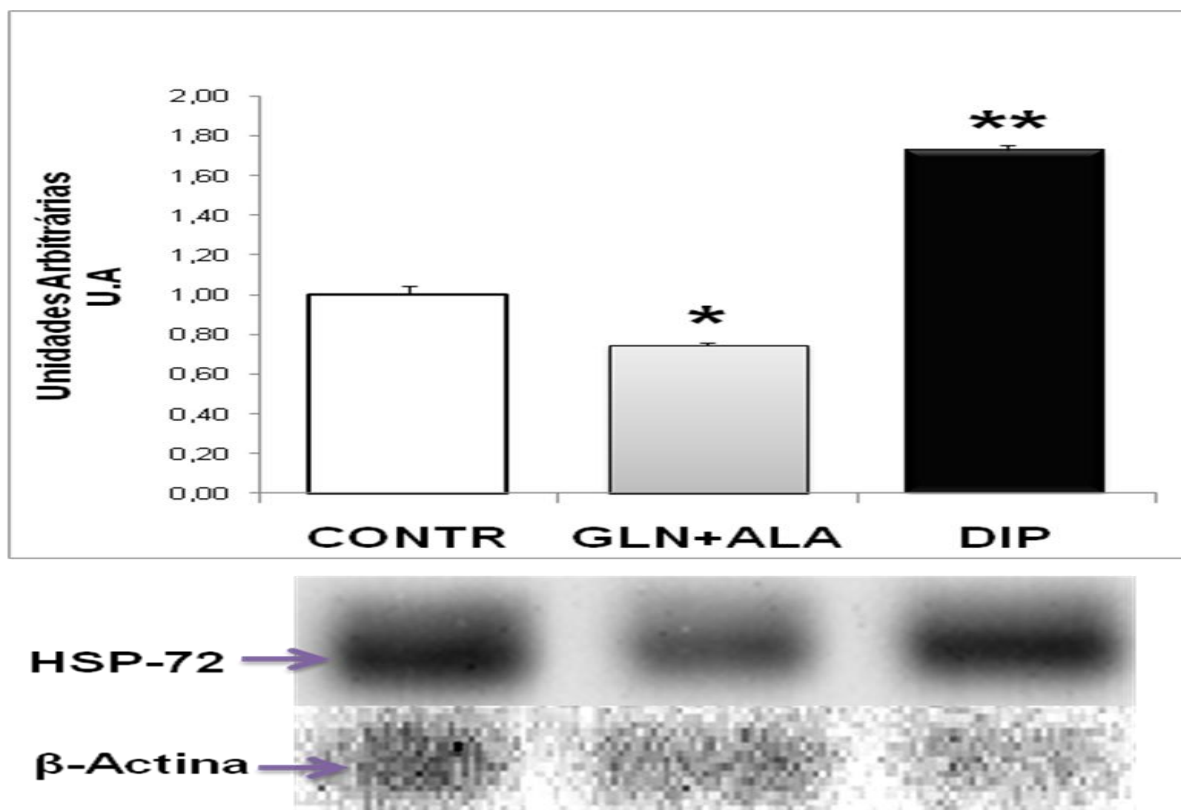


Figura 32 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme a tabela 28 e figura 32, o grupo GLN+ALA apresentou expressão citoplasmática de HSP-72, no músculo sóleo, 35,1% menor quando comparado ao CONTR. Já o grupo DIP apresentou aumento de 42,2% e 57,2%, neste mesmo parâmetro, se comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente.

5.3.21 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo

Através da média aritmética da soma do volume de expressão da forma constitutiva (HSP-73) e induzível (HSP-72), estimou-se a expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 29 e representados graficamente na figura 33.

Tabela 29 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSP-70 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,05	0,83 ± 0,03*	1,27 ± 0,03**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way;Tukey HSD).

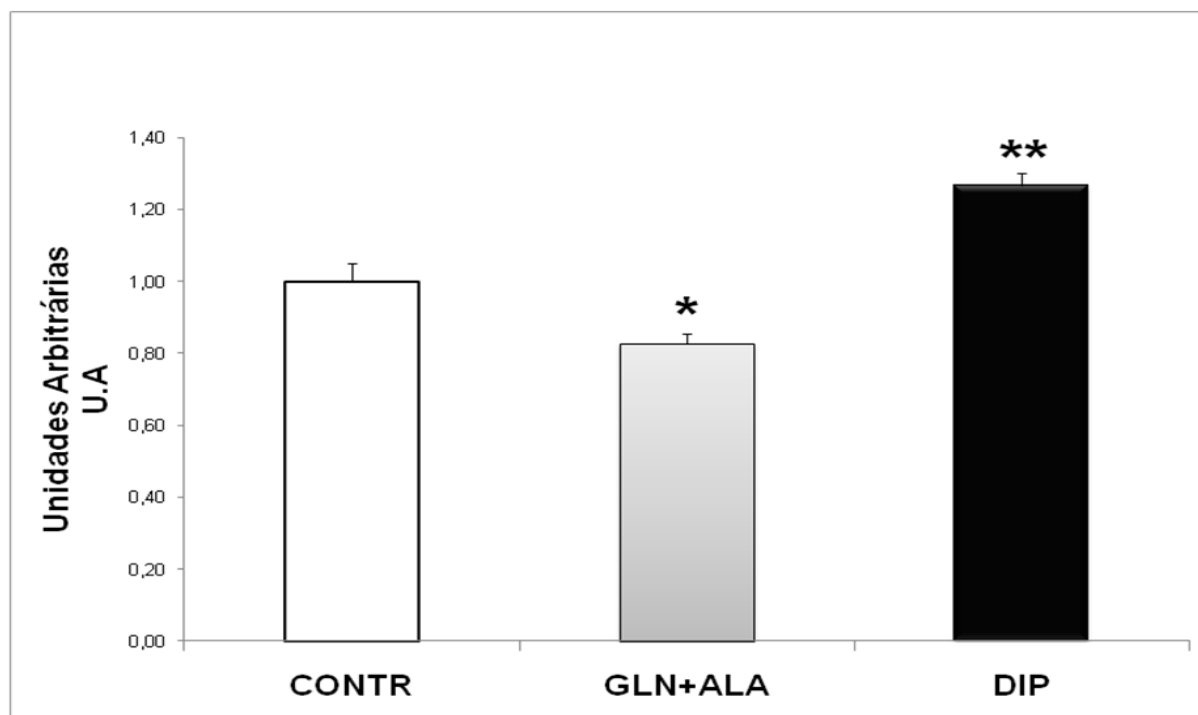


Figura 33 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way;Tukey HSD).

Os dados apresentados na tabela 29 e figura 33 indicam que a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, induziu aumento de 21,2% e 34,6%, na expressão citoplasmática de HSP-70, quando comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. A mesma tabela e figura indicam ainda, que quando comparado ao grupo CONTR, o grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre apresentou expressão citoplasmática de HSP-70, no músculo sóleo, 20,5% inferior.

5.3.22 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo sóleo

Para determinar a influência das suplementações sobre a expressão gênica do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1 NF) no tecido muscular esquelético, foi realizada a análise da expressão citoplasmática deste fator transcricional, no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 30 e representados graficamente na figura 34.

Tabela 30 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF), no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1NF (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,09	1,90 ± 0,09**	1,20 ± 0,04

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

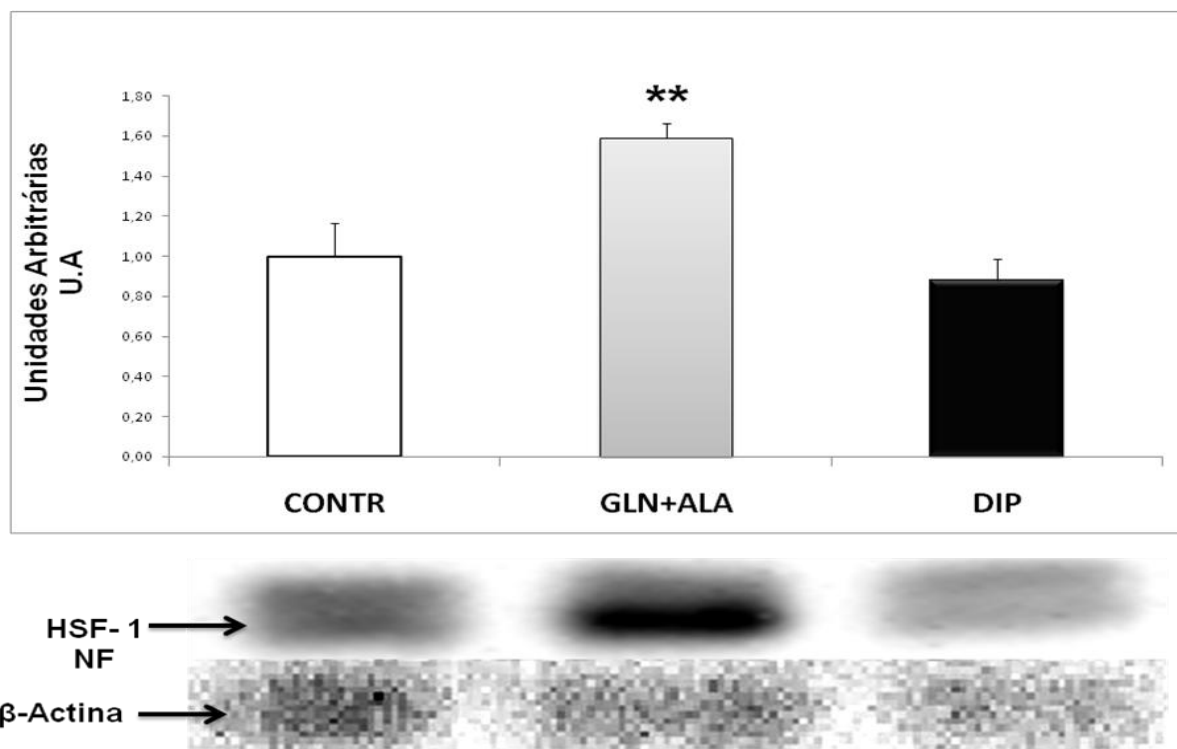


Figura 34 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1 NF) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 30 e a figura 34, os animais do grupo GLN+ALA apresentaram expressão citoplasmática de HSF-1NF, 47,4% e 36,8% superior em comparação aos animais do grupo CONTR e DIP, respectivamente.

5.3.23 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F), no músculo sóleo

Foi analisada a influência das suplementações sobre a expressão gênica do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 31 e representados graficamente na figura 35.

Tabela 31 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F), no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSF-1F (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,08	1,58 ± 0,03 [*]	2,20 ± 0,03 ^{**}

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR. p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

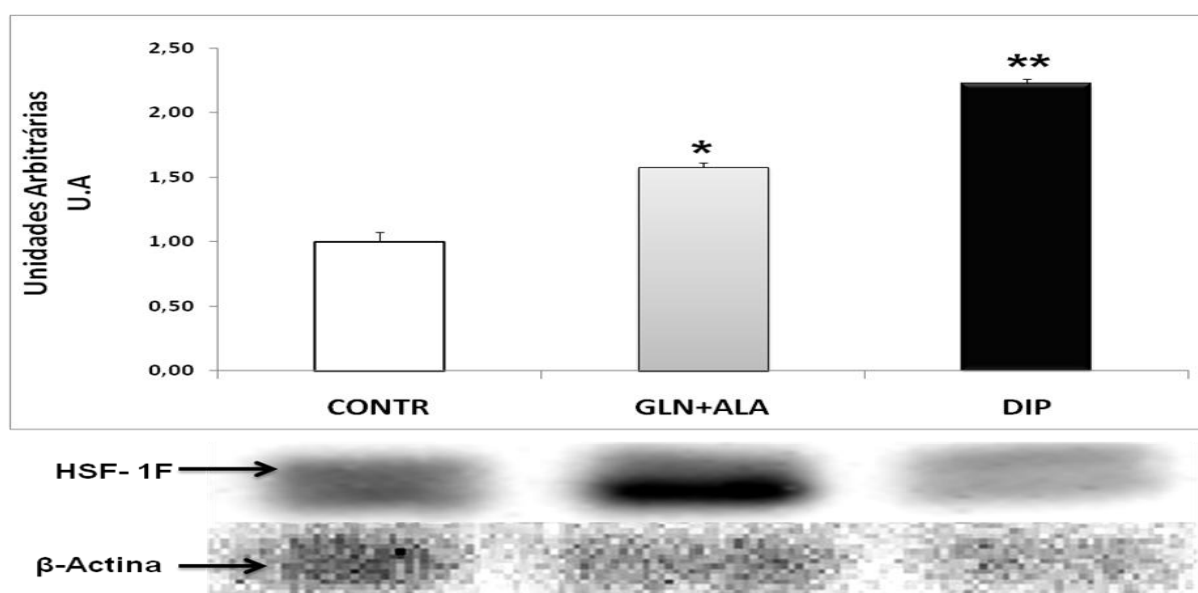


Figura 35 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F), no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR. p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme a tabela 31 e a figura 35, o grupo DIP apresentou aumento na ordem de 54,5% e 28,2%, na expressão citoplasmática de HSF-1F, quando comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. Já quando comparado ao grupo CONTR, o grupo GLN+ALA apresentou expressão citoplasmática de HSF-1F 36,7% superior.

5.3.24 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo

No intuito de investigar a influência das suplementações sobre a expressão gênica de proteínas de choque térmico, no núcleo celular, foi realizada a análise da expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 32 e representados graficamente na figura 36.

Tabela 32 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSP-73 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,10	2,01 ± 0,07*	2,20 ± 0,06*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

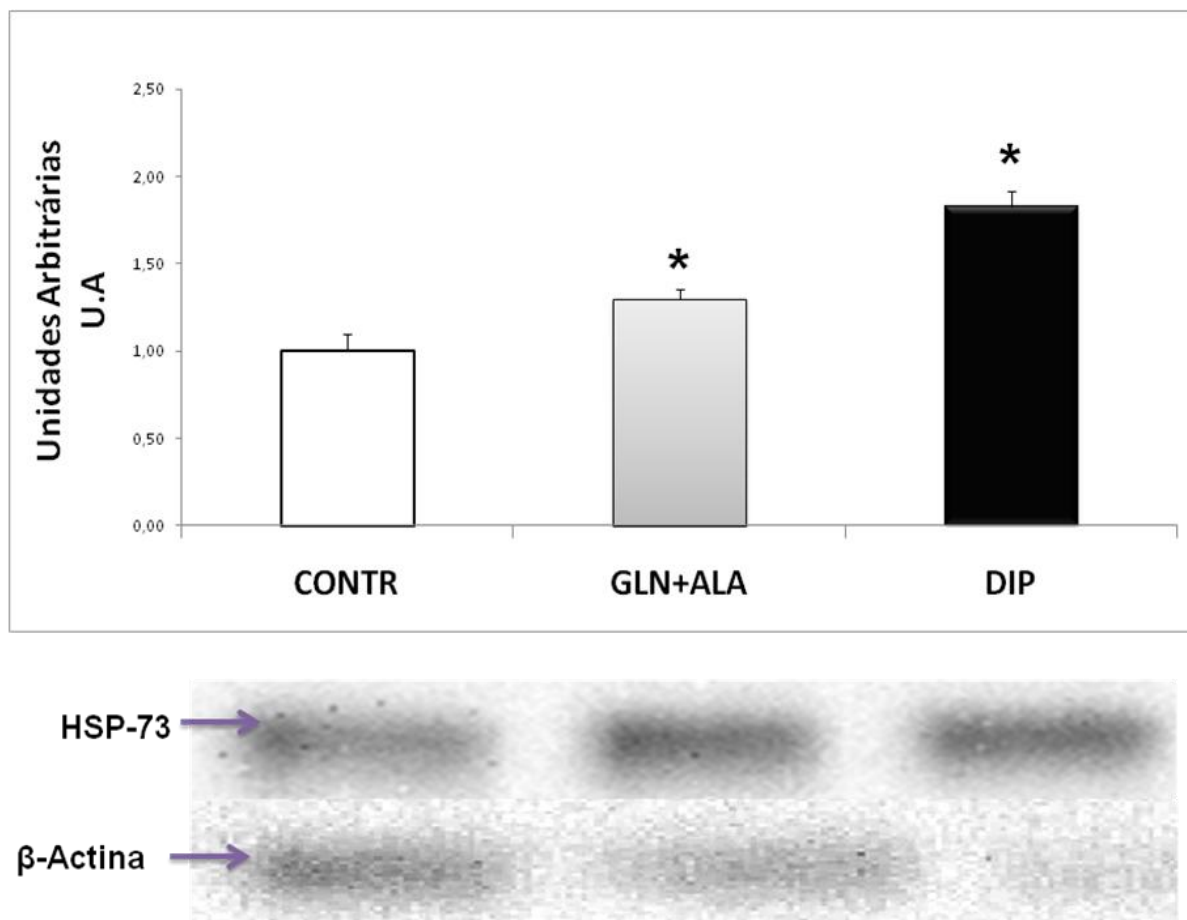


Figura 36 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme descrito na tabela 32 e representado graficamente na figura 36, o grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, apresentou um aumento de 50,2%, na expressão nuclear de HSP-73, quando comparado ao grupo controle do estudo. Já o grupo suplementado como o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina apresentou aumento, na ordem de 54,5%, na expressão nuclear, desta mesma proteína, quanto igualmente comparado ao grupo controle do estudo.

5.3.25 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo

A fim de determinar a influência das suplementações sobre a forma induzível da HSP-70, no núcleo celular, estimou-se a expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 33 e representados graficamente na figura 37.

Tabela 33 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-72 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,16	1,87 ± 0,07*	2,05 ± 0,06*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. ((Anova One-Way; Tukey HSD).

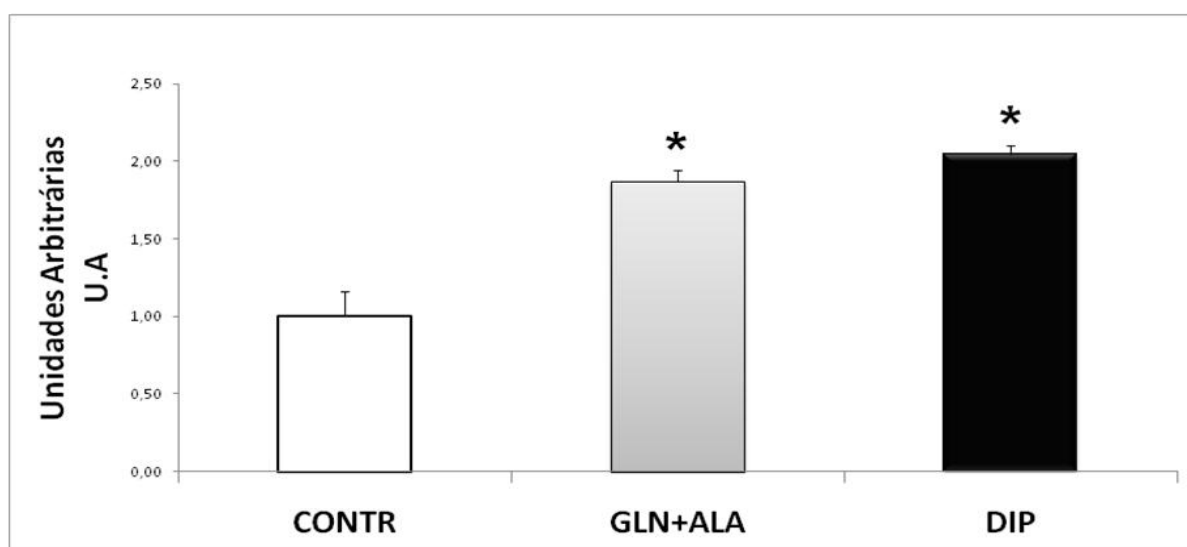


Figura 37 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme visualizado na tabela 33 e figura 37, os grupos DIP e GLN+ALA apresentaram expressão nuclear de HSP-72, no músculo sóleo, 51,2% e 46,5% superior, quando comparados ao grupo CONTR, respectivamente.

5.3.26 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo

Através da média aritmética da soma do volume de expressão da forma constitutiva (HSP-73) e da forma induzível (HSP-72), estimou-se a expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 34 e representados graficamente na figura 38.

Tabela 34 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-70 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,20	1,94 ± 0,07*	2,12 ± 0,08*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

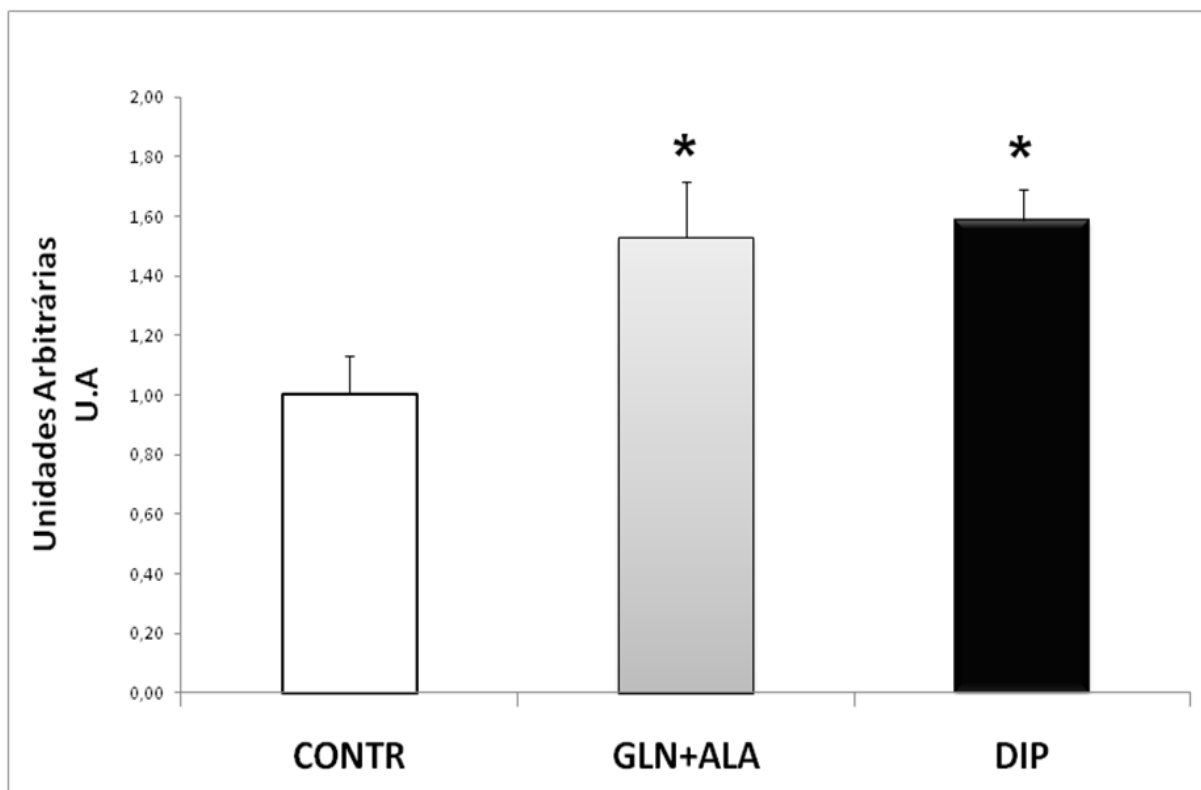


Figura 38 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme descrito na tabela 34 e representado graficamente na figura 38, os animais do grupo suplementado como o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina apresentaram expressão de HSP-70 nuclear, no músculo sóleo, 52,8% superior, na comparação com o grupo controle do estudo. Na mesma tabela e figura, observa-se que os animais do grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, apresentaram expressão de HSP-70 nuclear, também no músculo sóleo, 48,4% superior, quando também comparado com o grupo controle.

5.3.27 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo sóleo

A fim de se avaliar a influência das suplementações sobre a expressão gênica nuclear do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF), no tecido muscular esquelético, foi realizada a análise da expressão nuclear deste fator transcricional, no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 35 e representados graficamente na figura 39.

Tabela 35 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1NF (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,09	3,07 ± 0,04*	2,84 ± 0,03*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

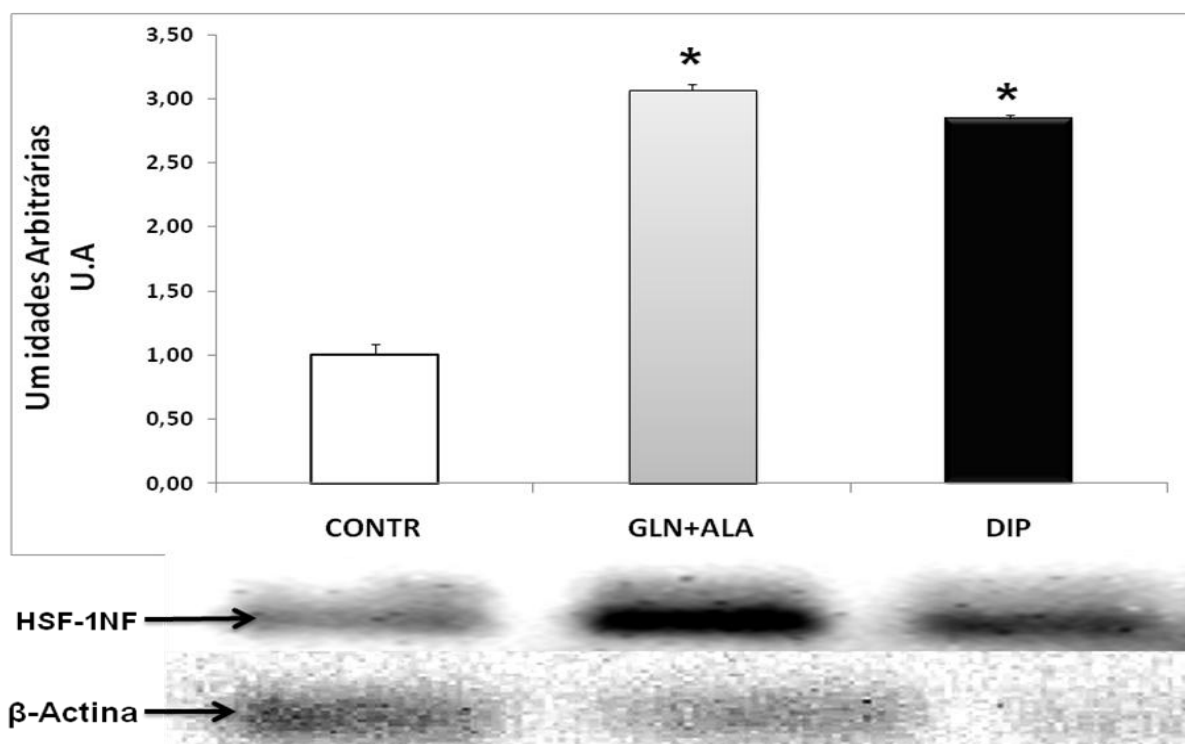


Figura 39 – Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, não fosforilado, (HSF-1NF) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 35 e figura 39, os animais dos grupos GLN+ALA e DIP apresentaram expressão nuclear de HSF-1NF, 67,4% e 64,8% superior, respectivamente, quando comparados ao grupo controle do estudo.

5.3.28 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo sóleo

Foi realizada a análise da expressão gênica nuclear do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F), no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 36 e representados graficamente na figura 40.

Tabela 36 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1F (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,09	1,98 ± 0,07*	1,78 ± 0,08*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

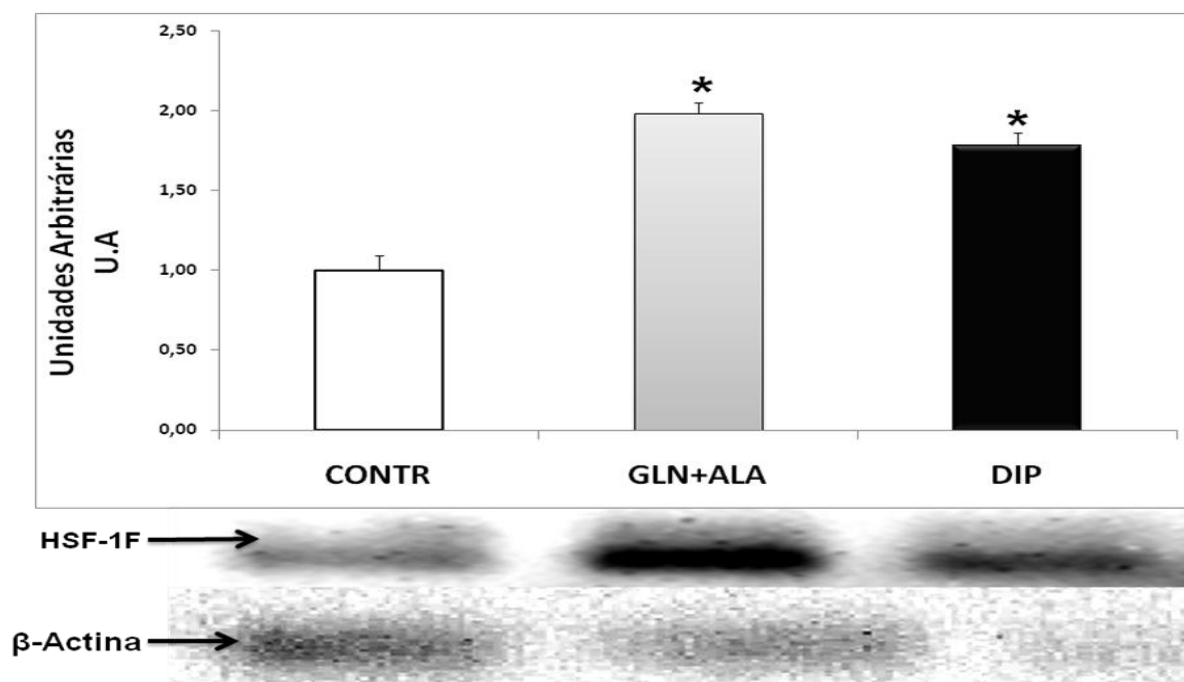


Figura 40 – Expressão nuclear do fator de choque térmico-1, fosforilado, (HSF-1F) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme descrito na tabela 36 e representado graficamente na figura 40, tanto a suplementação com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre, quanto na forma de dipeptídeo, induziram aumento na expressão nuclear de HSF-1N, quando comparadas ao grupo controle do estudo, aumento este que se deu na ordem de 49,5% e 43,8%, respectivamente.

5.3.29 Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo sóleo

Para determinar a influência das suplementações sobre a expressão gênica da enzima glutamina sintetase (GS) no tecido muscular esquelético, estimou-se a expressão desta enzima, no músculo sóleo. Os dados acham-se expressos na tabela 37 e representados graficamente na figura 41.

Tabela 37 – Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo sóleo (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
GS (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,14	0,90 ± 0,09	1,69 ± 0,05**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

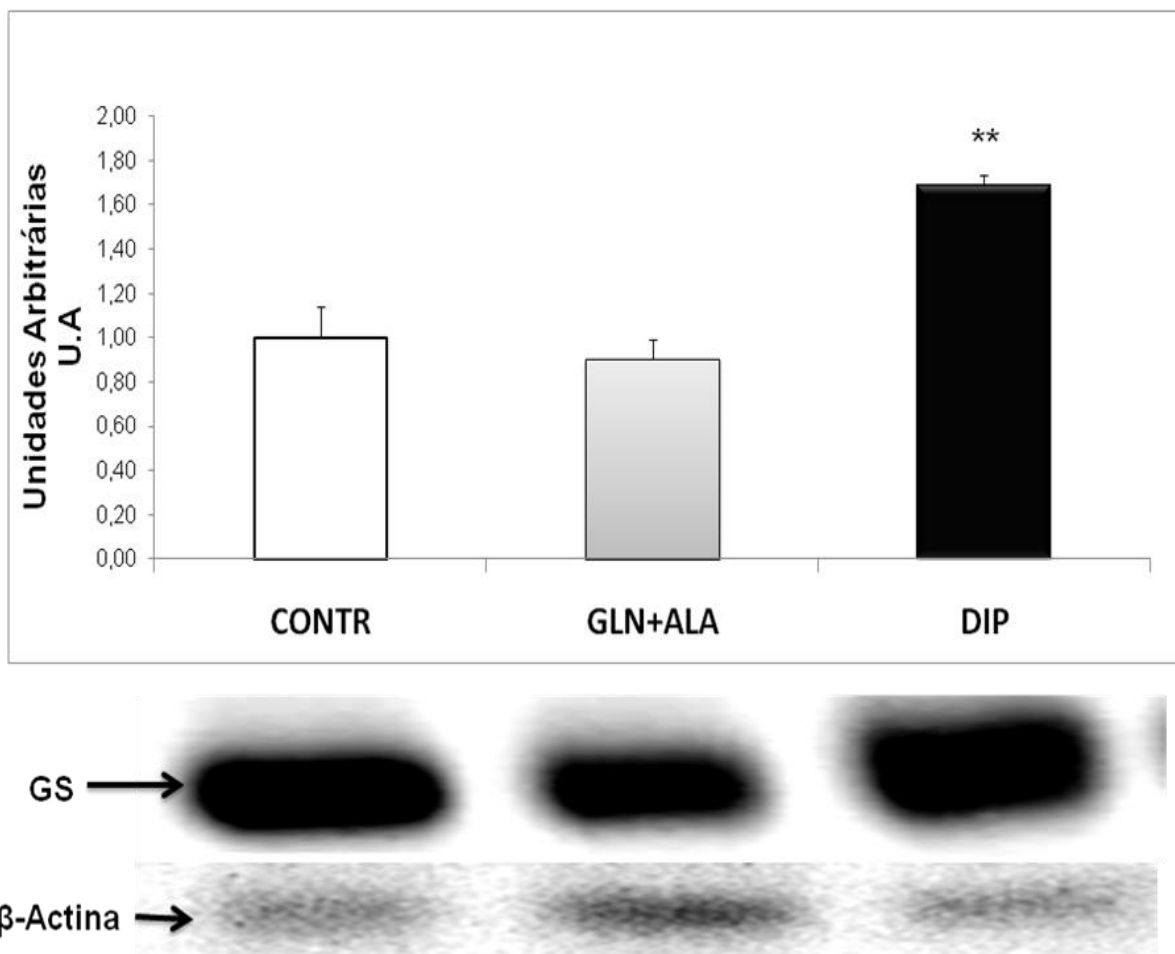


Figura 41 – Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo sóleo. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 37 e a figura 41, a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, promoveu aumento na expressão da enzima glutamina sintetase, no músculo sóleo, na ordem de 40,8% e 46,7%, quando comparado aos grupos suplementado como os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre e controle, respectivamente.

5.3.30 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio

Avaliou-se a influência das suplementações, sobre a expressão gênica citoplasmática, da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no músculo gastrocnêmio. Os dados encontram-se expressos na tabela 38 e representados graficamente na figura 42.

Tabela 38 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSP-73 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,07	1,39 ± 0,02*	1,24 ± 0,04*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

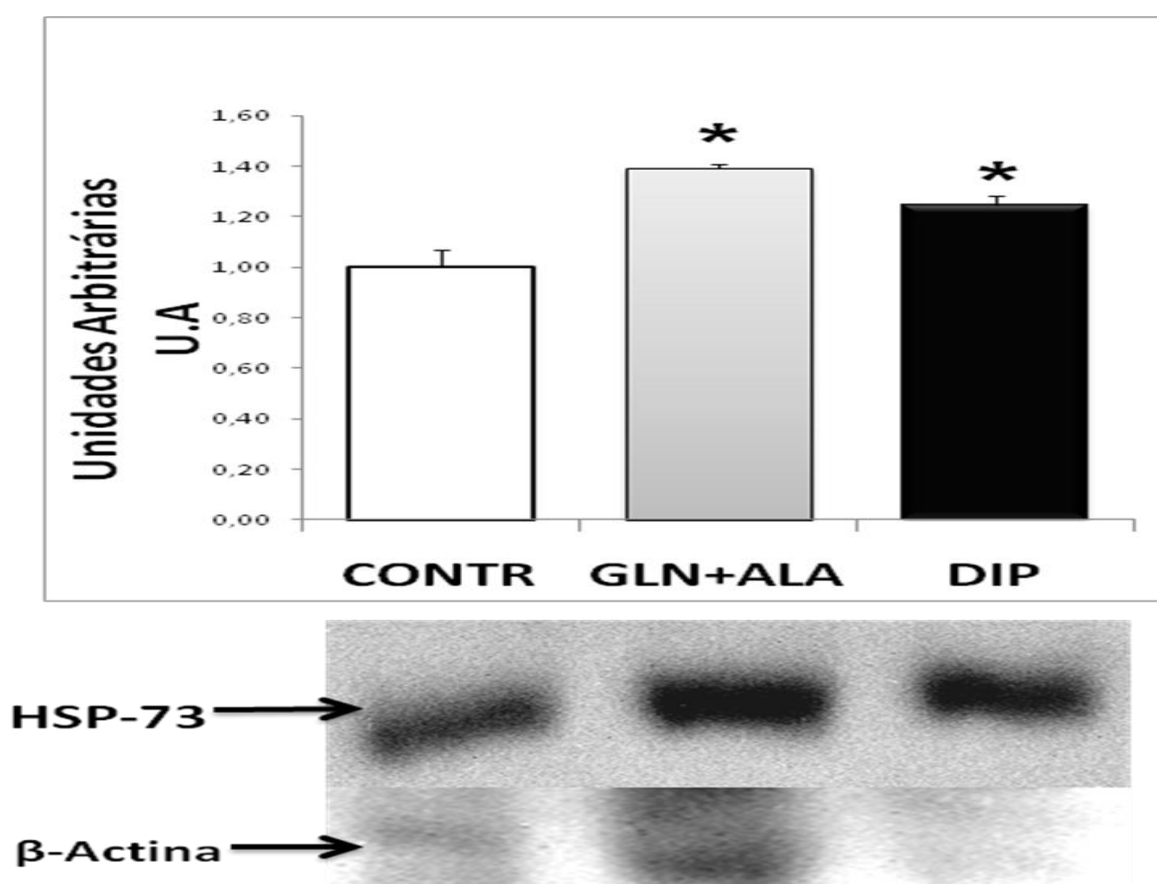


Figura 42 – Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme representado na tabela 38 e figura 42, os grupos GLN+ALA e DIP apresentaram expressão citoplasmática de HSP-73, no músculo gastrocnêmio, 28% e 19,3% superior, respectivamente, quando comparados ao grupo controle do estudo.

5.3.31 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio

No intuito de determinar a influência das suplementações, sobre a expressão gênica citoplasmática, da forma induzível da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no músculo gastrocnêmio, foi realizada a análise da expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72), neste tecido. Os dados acham-se expressos na tabela 39 e representados graficamente na figura 43.

Tabela 39 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-72 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,05	1,72 ± 0,02 ^{**}	1,31 ± 0,03 [*]

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

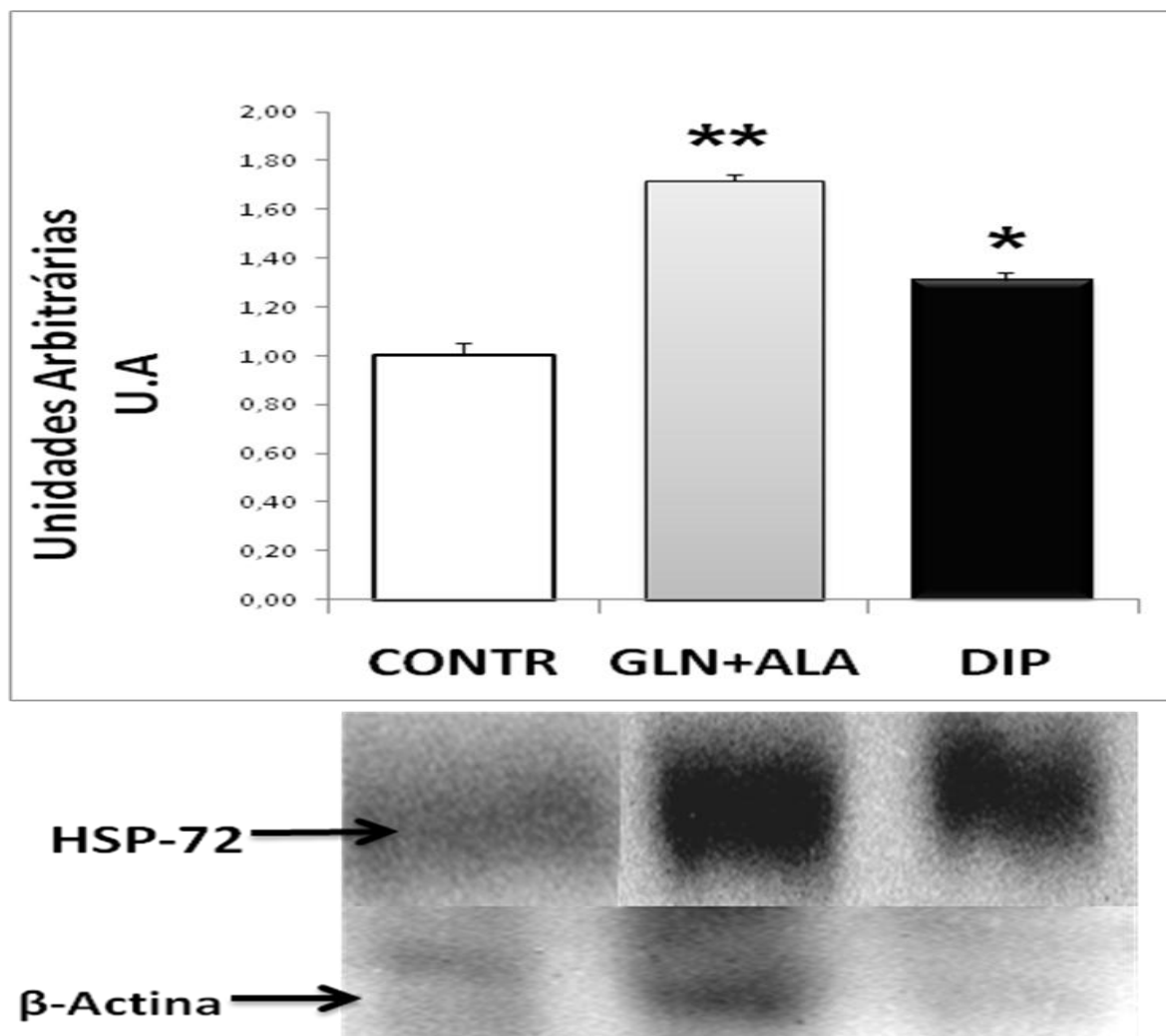


Figura 43 – Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Os dados expressos na tabela 39 e figura 43, demonstram que a suplementação com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, induziu aumento de 41,9% e 23,8% na expressão citoplasmática de HSP-72, no músculo gastrocnêmio, na comparação com os grupos suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e controle, respectivamente. Por outro lado, na comparação com o grupo controle do estudo, a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, induziu aumento de 23,7% na expressão citoplasmática de HSP-72, também, no músculo gastrocnêmio.

5.3.32 Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio

Por meio da média aritmética da soma do volume de expressão da forma constitutiva (HSP-73) e induzível (HSP-72), estimou-se a expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no músculo gastrocnêmio. Os dados acham-se expressos na tabela 40 e representados graficamente na figura 44.

Tabela 40 - Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-70 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,11	1,71 ± 0,03 ^{**}	1,31 ± 0,03 [*]

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

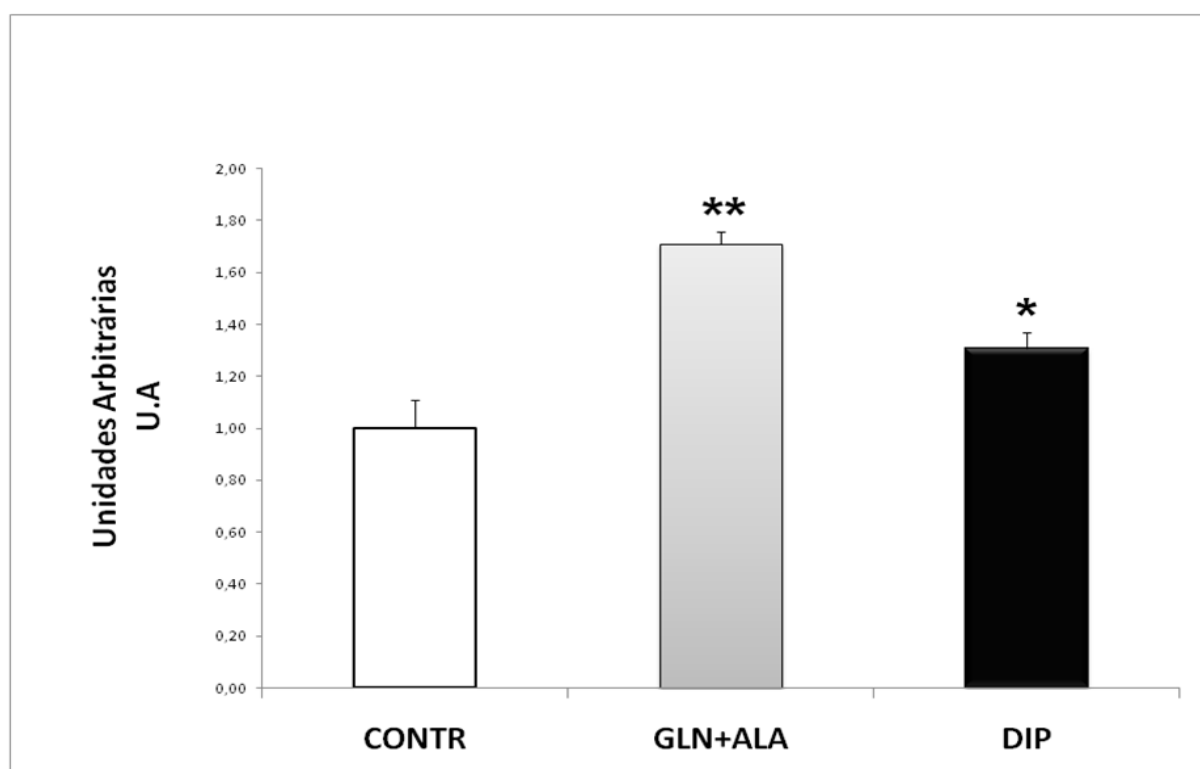


Figura 44 – Expressão citoplasmática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Através dos dados expressos na tabela 38 e figura 42, observa-se que o grupo GLN+ALA apresentou aumento de 41,5% e 23,4%, na expressão citoplasmática de HSP-70, no músculo gastrocnêmio, quando comparado aos grupos CONTR e DIP, respectivamente. Já na comparação entre o grupo DIP e o grupo CONTR, observa-se que este grupo apresentou aumento na ordem de 23,7%, igualmente na expressão de HSP-70, no músculo gastrocnêmio.

5.3.33 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio

Foi realizada a análise da expressão citoplasmática da expressão gênica do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio. Os dados encontram-se expressos na tabela 41 e representados graficamente na figura 45.

Tabela 41 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1NF (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,05	1,07 ± 0,03	0,70 ± 0,03 ^{**}

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

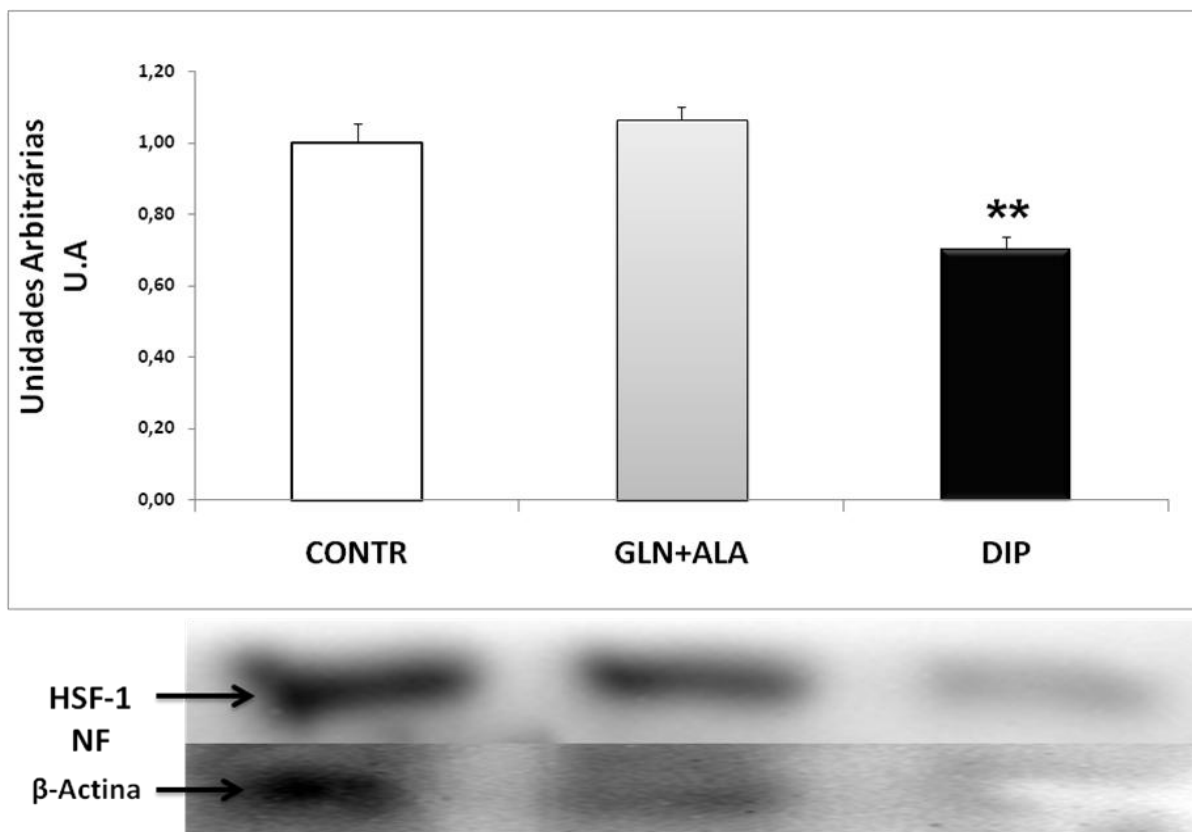


Figura 45 – Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme descrito na tabela 41 e figura 45, a expressão citoplasmática de HSF-1NF no grupo de animais suplementados com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, foi 34,6% superior, se comparado aos animais do grupo suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina. Já quando realizada a comparação entre o grupo suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e grupo controle do estudo, observou-se que o grupo DIP apresentou expressão citoplasmática de HSF-1NF, 42,8% inferior em relação ao grupo CONTR.

5.3.34 Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio

Os dados referentes a análise da expressão gênica do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio, encontram-se expressos na tabela 42 e representados graficamente na figura 46.

Tabela 42 - Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1F (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,09	1,34 ± 0,06*	1,23 ± 0,06*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

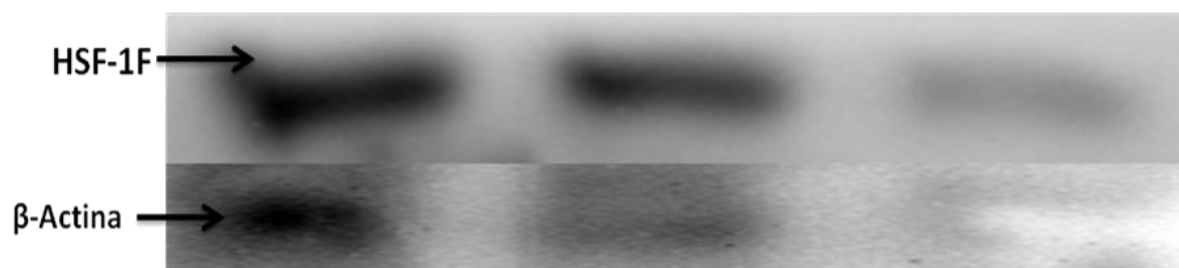
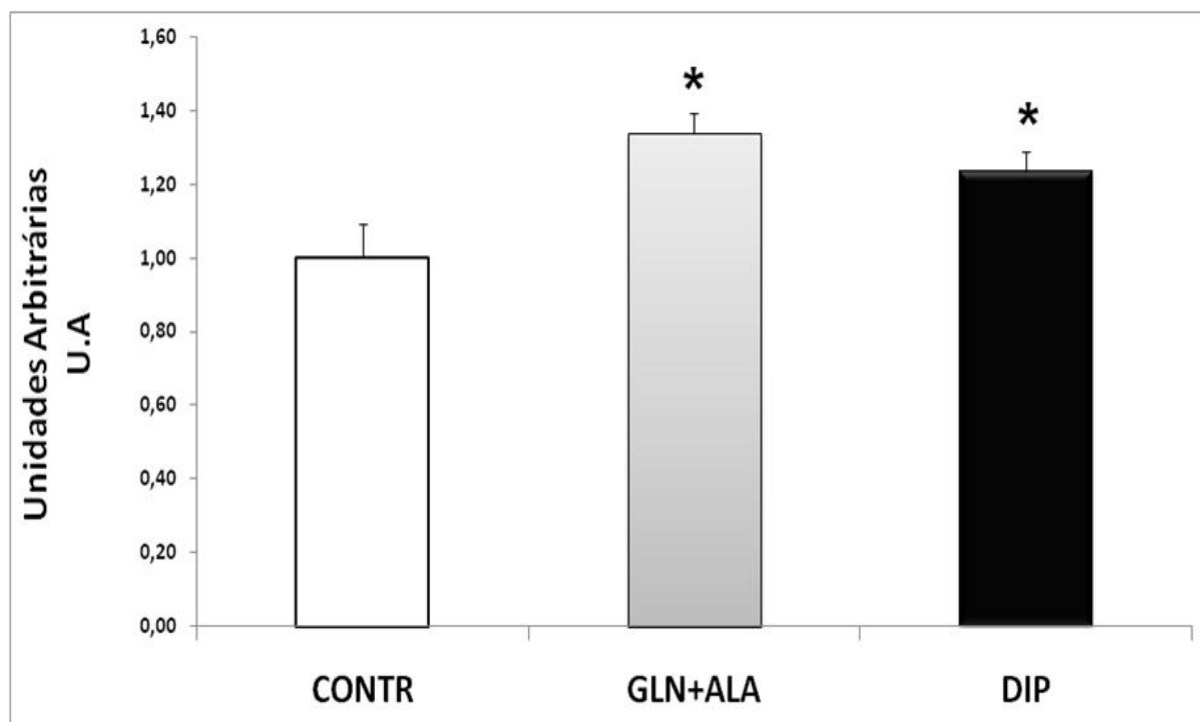


Figura 46 – Expressão citoplasmática do fator de choque térmico-1, fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme a tabela 42 e figura 46, os grupos GLN+ALA e DIP apresentaram expressão citoplasmática de HSF-1F, no músculo gastrocnêmio, 25,4% e 18,7% superior, se comparados ao grupo CONTR, respectivamente.

5.3.35 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio

Analisou-se a influência das suplementações, sobre a expressão gênica, no núcleo celular, da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no músculo gastrocnêmio. Os dados encontram-se expressos na tabela 43 e representados graficamente na figura 47.

Tabela 43 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSP-73 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,12	1,30 ± 0,05	1,26 ± 0,06

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

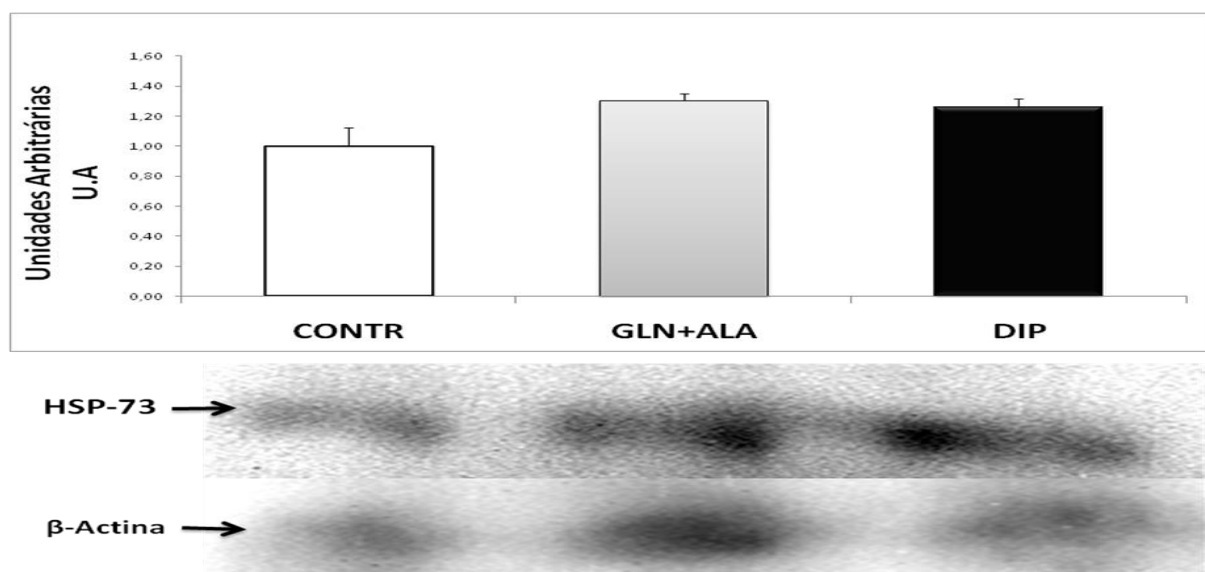


Figura 47 – Expressão nuclear da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação à expressão nuclear de HSP-73, no músculo gastrocnêmio.

5.3.36 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio

No intuito de determinar a influência das suplementações, sobre a expressão gênica nuclear, da proteína de choque térmico 72 (HSP-72), no músculo gastrocnêmio, realizou-se a análise da expressão desta proteína neste tecido. Os dados acham-se expressos na tabela 44 e representados graficamente na figura 48.

Tabela 44 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-72 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,08	1,27 ± 0,02*	1,14 ± 0,06

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

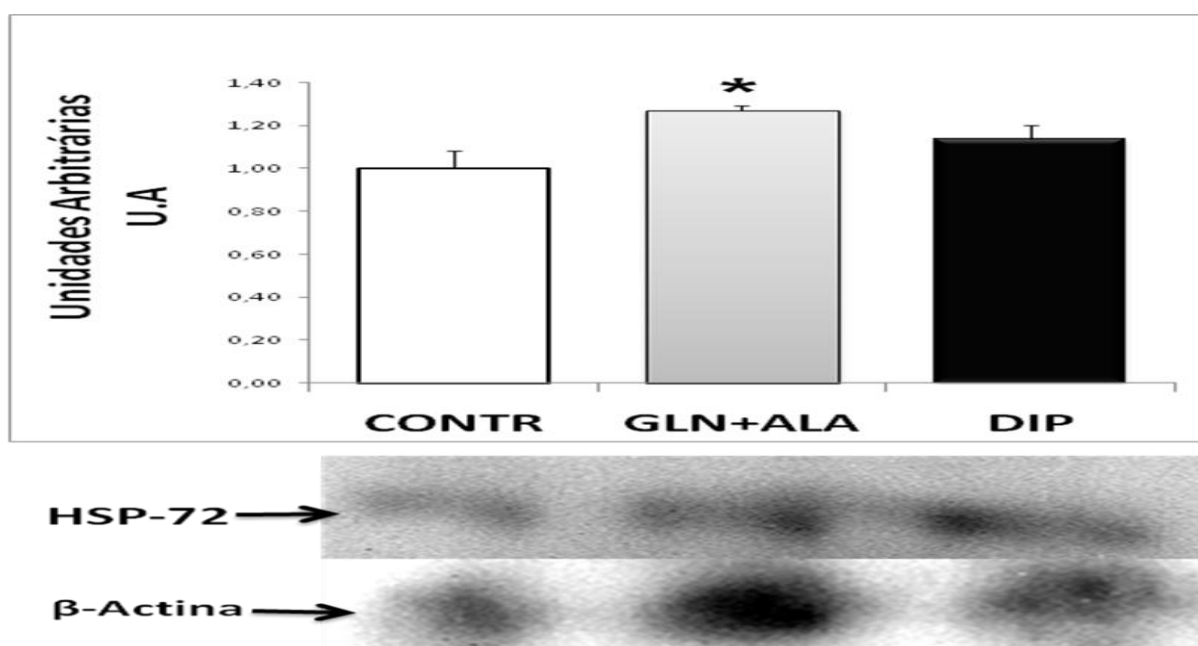


Figura 48 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 44 e figura 48, a suplementação com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, induziu aumento na expressão nuclear de HSP-72, no músculo gastrocnêmio, na ordem de 21,2%, na comparação com o grupo controle do estudo.

5.3.37 Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio

Com base na média aritmética da soma do volume de expressão da HSP-73 e HSP-72, estimou-se a expressão nuclear de HSP-70, no músculo gastrocnêmio. Os dados acham-se expressos na tabela 45 e representados graficamente na figura 49.

Tabela 45 - Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSP-70 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,15	1,28 ± 0,03	1,15 ± 0,11

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

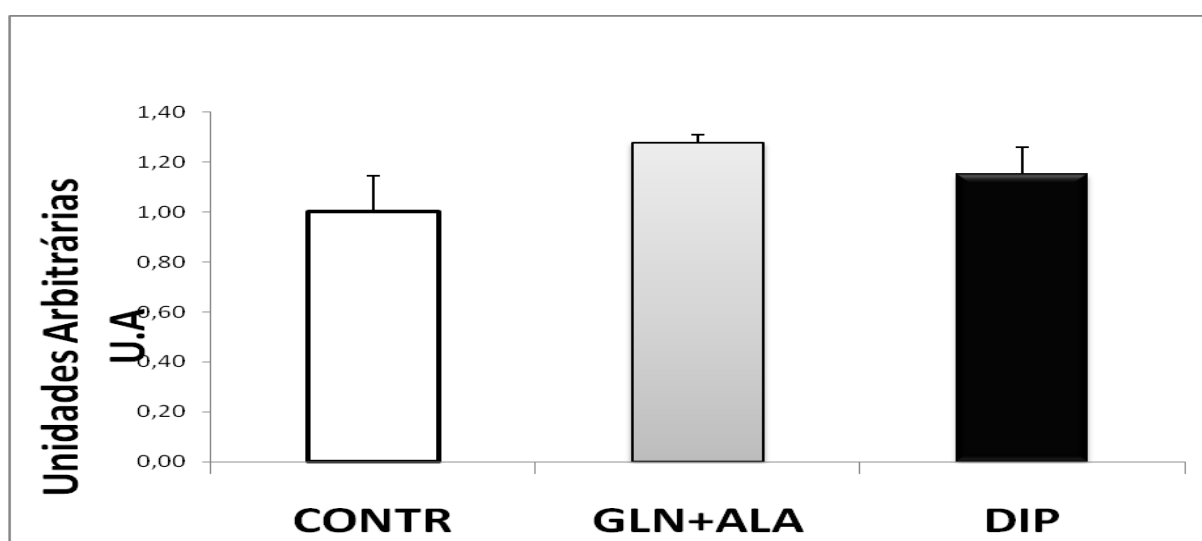


Figura 49 – Expressão nuclear da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme representado na tabela 45 e figura 49, não houve diferença estatística significativa entre os grupos do estudo em relação à expressão nuclear de HSP-70, no músculo gastrocnêmio.

5.3.38 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio

Avaliou-se a influência das suplementações sobre a expressão gênica nuclear de HSF-1NF, no músculo gastrocnêmio. Os dados encontram-se expressos na tabela 46 e representados graficamente na figura 50.

Tabela 46 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1 NF (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,06	1,92 ± 0,04 *	2,11 ± 0,04 **

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. (Anova One-Way; Tukey HSD).

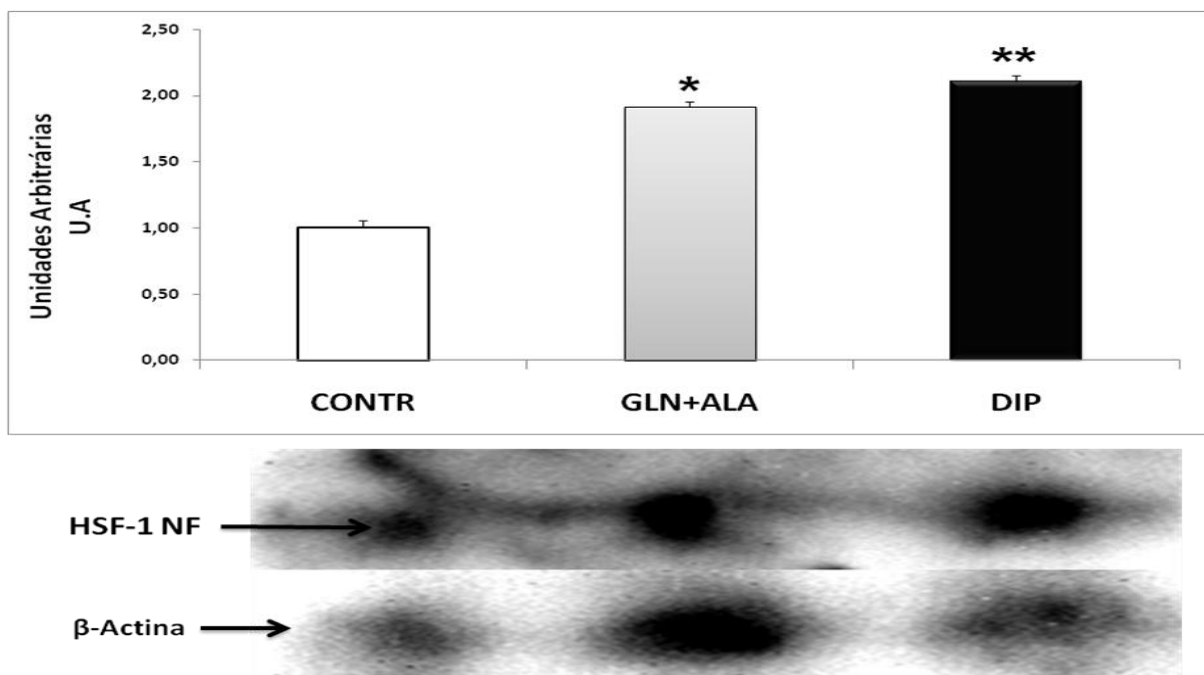


Figura 50 – Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Os dados expressos na tabela 46 e figura 50, indicam que quando comparado ao grupo CONTR e GLN+ALA, o grupo DIP apresentou expressão nuclear de HSF-1NF, no músculo gastrocnêmio, 52,6% e 9% superior, em relação, aos respectivos grupos. Já o grupo GLN+ALA, apresentou expressão nuclear de HSF-1NF, também no músculo gastrocnêmio, 48% superior, quando comparado ao grupo CONTR.

5.3.39 Expressão nuclear do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio

Avaliou-se a expressão gênica nuclear de HSF-1F, no músculo gastrocnêmio. Os dados encontram-se expressos na tabela 47 e representados graficamente na figura 51.

Tabela 47 - Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1F) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1F (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,08	1,92 ± 0,07 [*]	2,20 ± 0,07 ^{**}

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

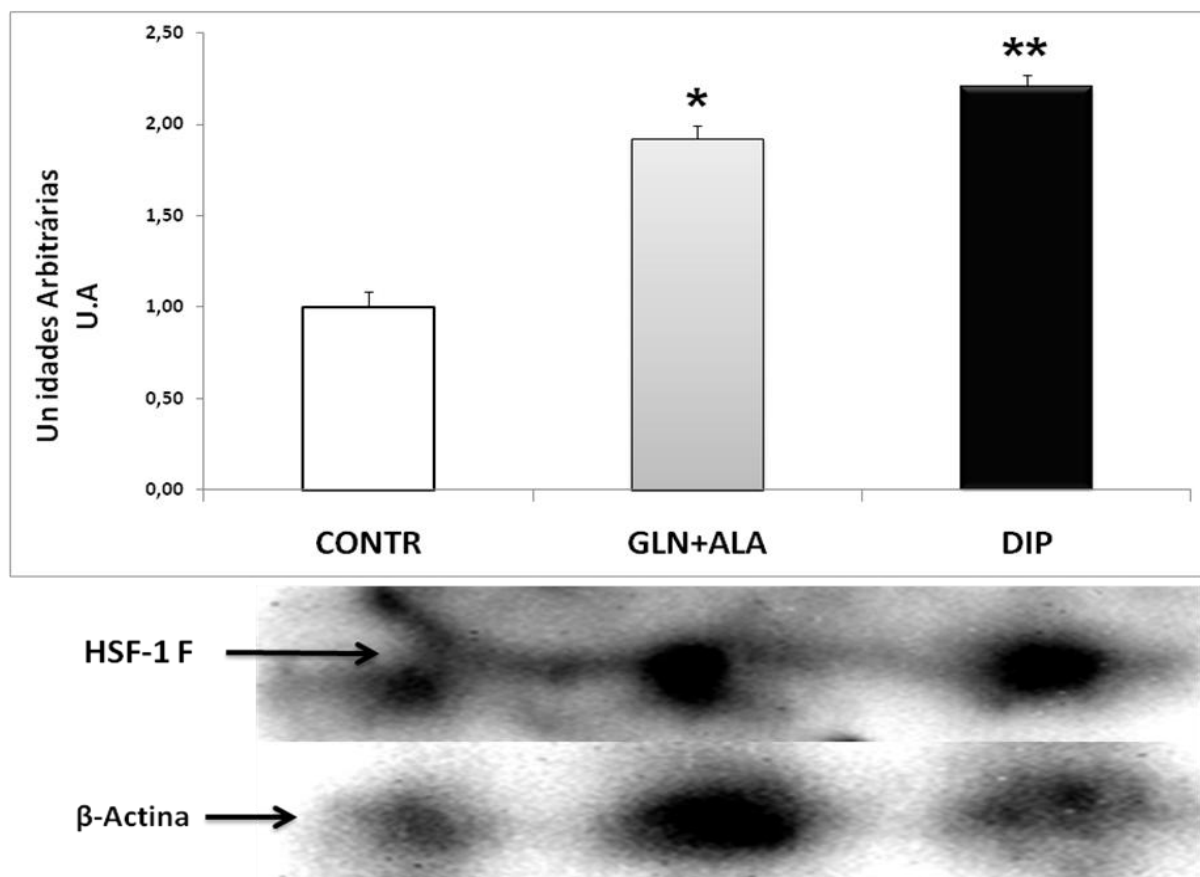


Figura 51 – Expressão nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F), no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 47 e figura 51, os animais do grupo DIP apresentaram aumento na ordem de 54,5% e 12,7%, na expressão nuclear de HSF-1F, no músculo gastrocnêmio, quando comparados aos animais dos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. Já os animais do grupo GLN+ALA apresentaram aumento, neste mesmo parâmetro, na ordem de 48%, se comparados ao grupo CONTR.

5.3.40 Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo gastrocnêmio

A fim de determinar a influência das suplementações sobre a expressão gênica da enzima glutamina sintetase (GS) no tecido muscular esquelético, estimou-se a expressão citoplasmática desta enzima, no músculo gastrocnêmio. Os dados encontram-se expressos na tabela 48 e representados graficamente na figura 52.

Tabela 48 – Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo gastrocnêmio (unidades arbitrárias U.A).

GS (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,8	1,36 ± 0,05**	0,87 ± 0,03

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

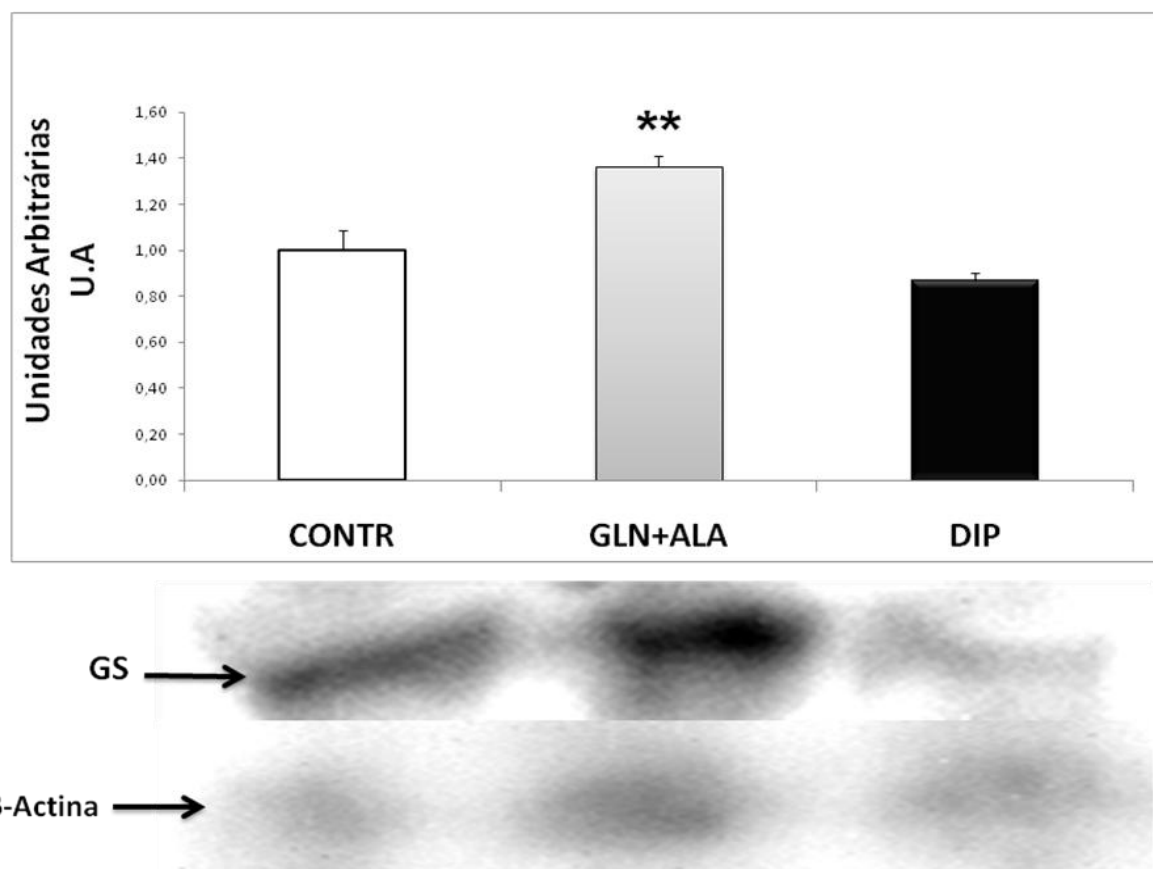


Figura 52 – Expressão da enzima glutamina sintetase (GS) no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo GLN+ALA e os grupos CONTR e DIP. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com os dados descritos na tabela 48 e representados graficamente na figura 52, os animais do grupo GLN+ALA apresentaram aumento na ordem de 36% e 26,5%, na expressão da enzima GS no músculo gastrocnêmio, quando comparados aos animais dos grupo DIP e CONTR, respectivamente.

5.3.41 Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73)

A fim de verificar a influência das suplementações sobre a expressão gênica hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), estimou-se a expressão citoplasmática, desta proteína no fígado. Os dados acham-se expressos na tabela 49 e representados graficamente na figura 53.

Tabela 49 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) (unidades arbitrárias U.A).

HSP-73 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,10	1,39 ± 0,06*	1,55 ± 0,07*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

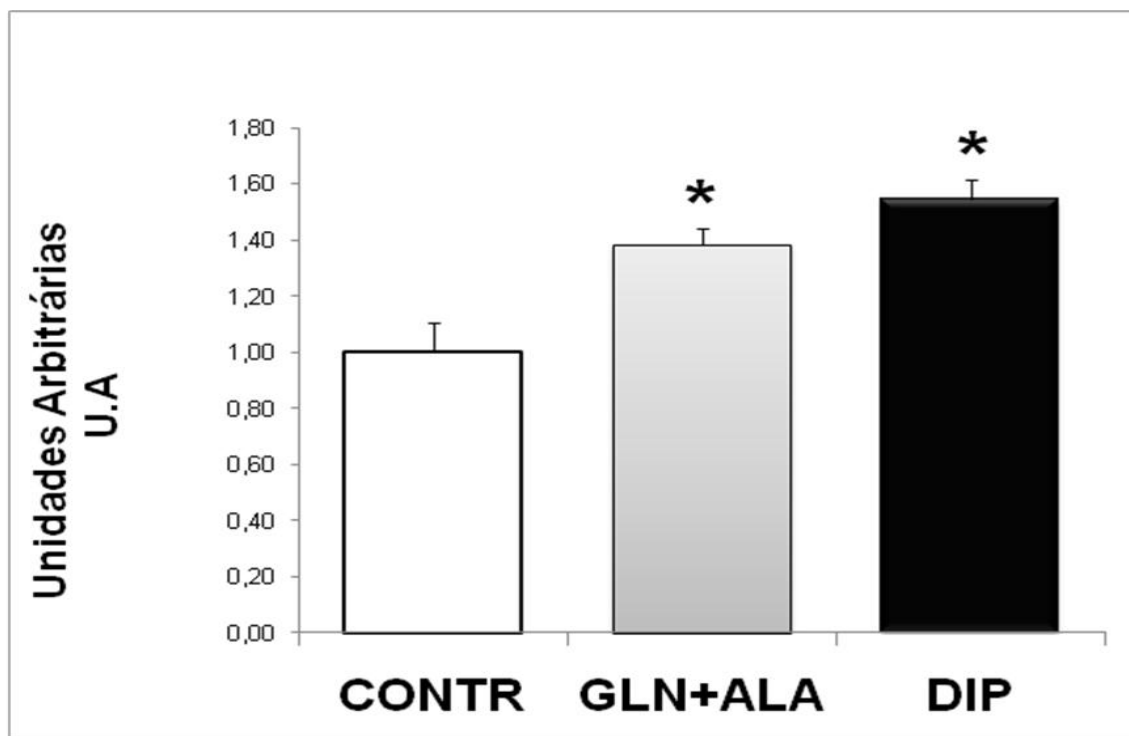


Figura 53 – Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme a tabela 49 e figura 53, a suplementação com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre, bem como o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina promoveram aumento na ordem de 28% e 35,5%, na expressão citoplasmática hepática de HSP-73, quando comparado ao grupo controle do estudo, respectivamente.

5.3.42 Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72)

A tabela 50 e a figura 54 expressam os dados referentes a expressão gênica citoplasmática, hepática, da proteína de choque térmico 72 (HSP-72).

Tabela 50 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-72 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,02	0,95 ± 0,03	1,36 ± 0,07**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP com os grupos CONTR e GLN+ALA, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

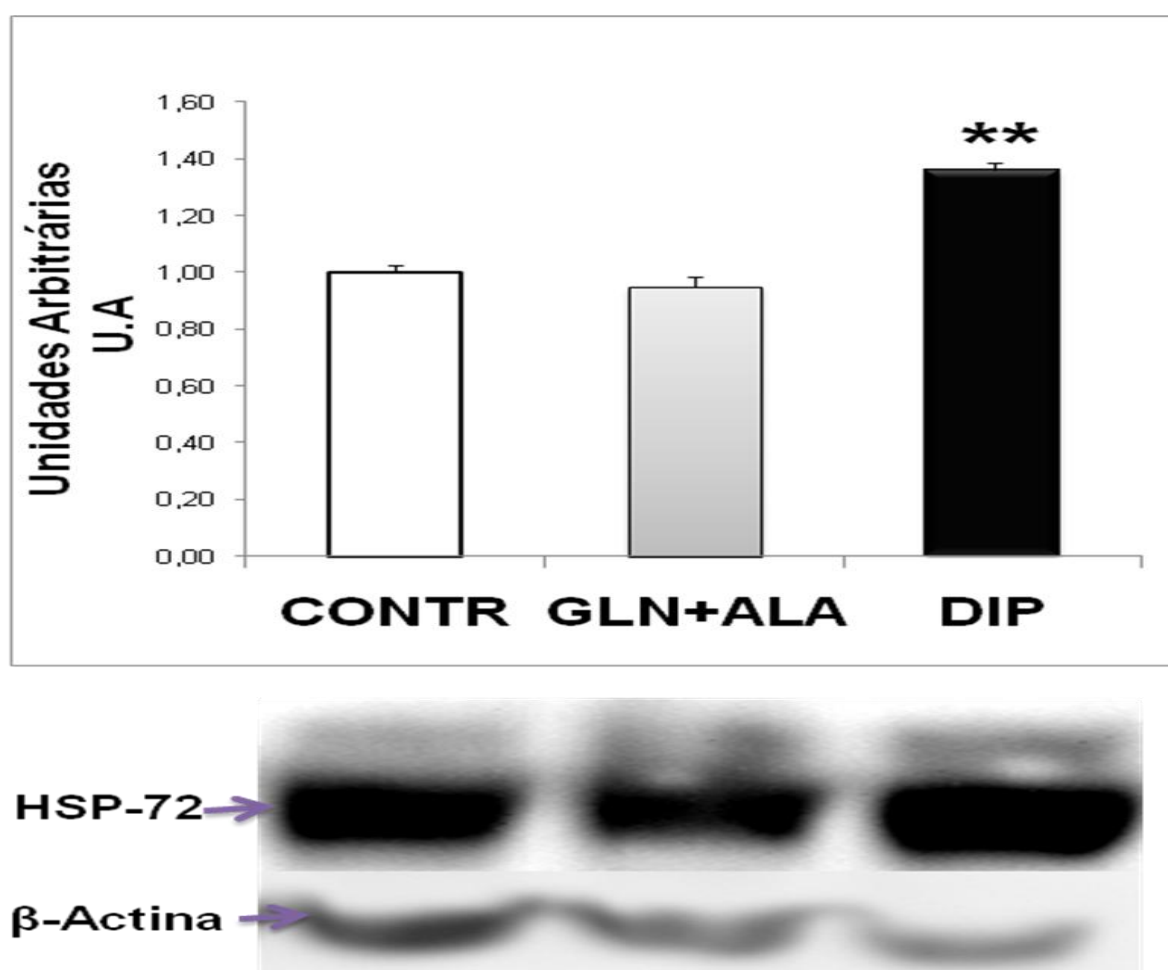


Figura 54 – Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 50 e a figura 54, o grupo DIP apresentou aumento na expressão hepática citoplasmática de HSP-72, na ordem de 26,5% e 30,1%, quando comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente.

5.3.43 Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70)

Através da média aritmética da soma do volume de expressão de HSP-73 e HSP-72, estimou-se a expressão citoplasmática, hepática, de HSP-70. Os dados acham-se expressos na tabela 51 e representados graficamente na figura 55.

Tabela 51 - Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) (unidades arbitrárias U.A).

HSP-70 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,05	0,98 ± 0,07	1,37 ± 0,05**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

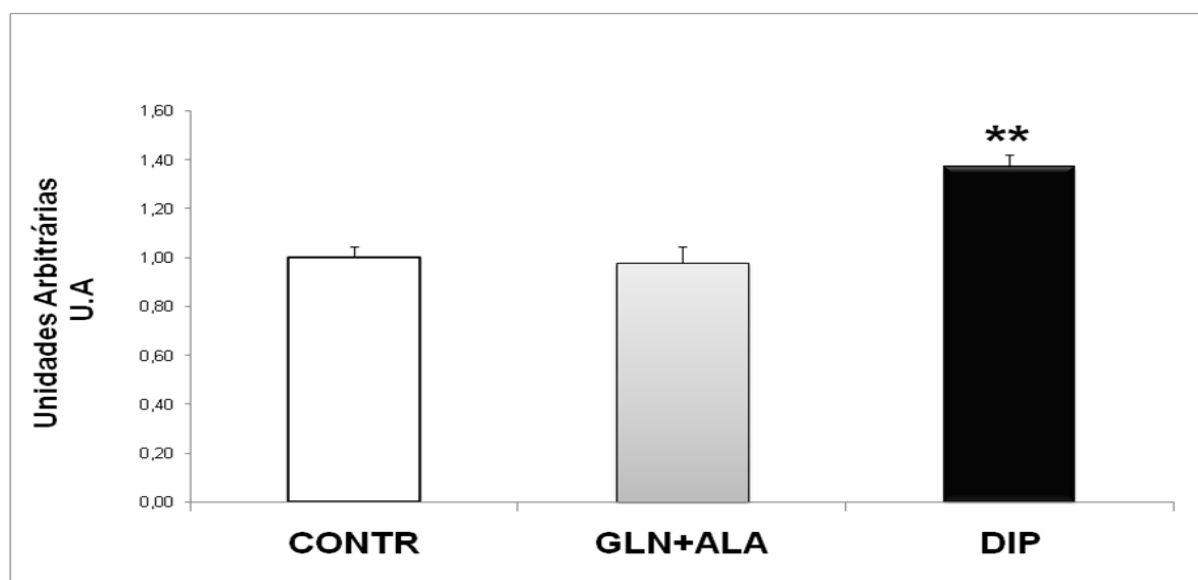


Figura 55 – Expressão citoplasmática hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Os dados apresentados na tabela 51 e figura 55 demonstram que quando comparado ao grupo controle e suplementado com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, o grupo suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, apresentou aumento na ordem de 26% e 30,1%, respectivamente, na expressão hepática, citoplasmática, de HSP-70.

5.3.44 Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF)

Analisou-se a expressão gênica hepática do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF), no citoplasma celular. Os dados encontram-se expressos na tabela 52 e graficamente representados na figura 56.

Tabela 52 - Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF) (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1NF (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,04	3,86 ± 0,05 [*]	5,85 ± 0,05 ^{**}

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. ^{*}Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. ^{**}Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

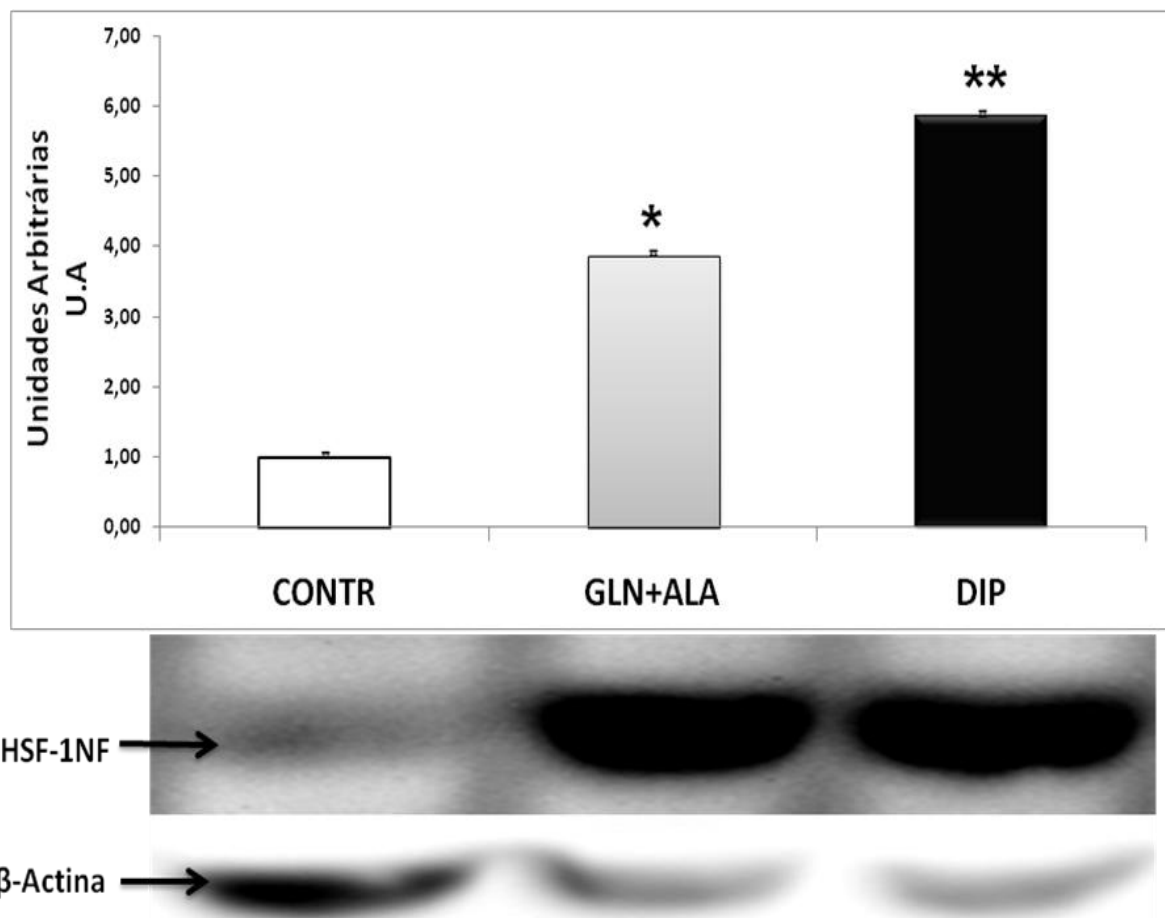


Figura 56 – Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme a tabela 52 e figura 56, o grupo suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina apresentou aumento na expressão hepática, citoplasmática, de HSF-1NF, na ordem de 34% e 83%, quando comparado ao grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, e controle, respectivamente. Já o grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, apresentou aumento, igualmente na expressão hepática, citoplasmática, de HSF-1NF, na ordem de 74,1%, na comparação com o grupo controle do estudo.

5.3.45 Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F)

Realizou-se a análise da expressão gênica hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1NF). Os dados encontram-se expressos na tabela 53 e graficamente representados na figura 57.

Tabela 53 - Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F) (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1F (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,07	2,99 ± 0,09*	3,20 ± 0,09**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

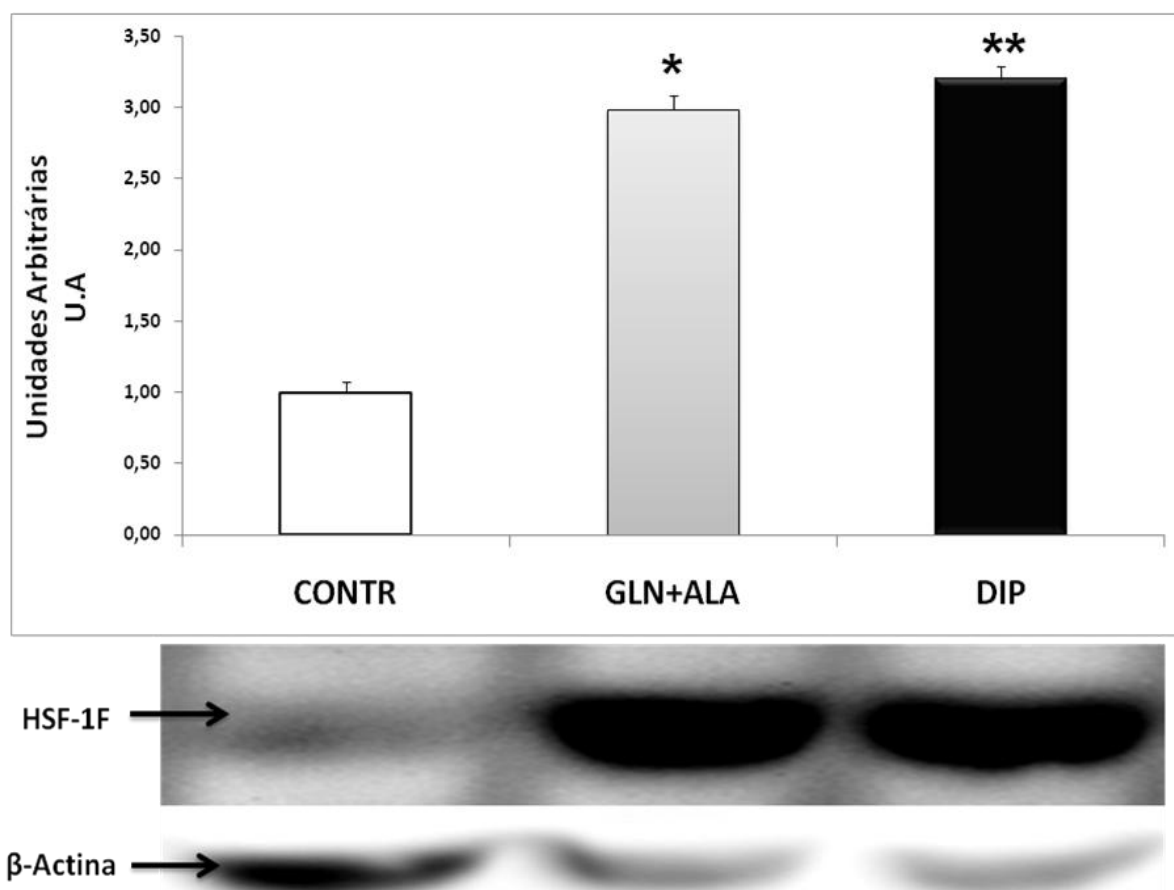


Figura 57 – Expressão hepática, citoplasmática, do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 53 e a figura 57, o grupo DIP apresentou expressão hepática, citoplasmática, de HSF-1F, 6,6% e 69% superior, quando comparado aos grupos GLN+ALA e CONTR, respectivamente. Por outro lado, a expressão hepática, citoplasmática, de HSF-1F, no grupo GLN+ALA foi 66,5% superior, se comparado ao grupo controle do estudo.

5.3.46 Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73)

Analisou-se a influência das suplementações sobre a expressão gênica hepática, da proteína de choque térmico 73 (HSP-73), no núcleo celular. Os dados encontram-se expressos na tabela 54 e graficamente representados na figura 58.

Tabela 54 - Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73) (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-73 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,06	1,19± 0,03	1,09 ± 0,06

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

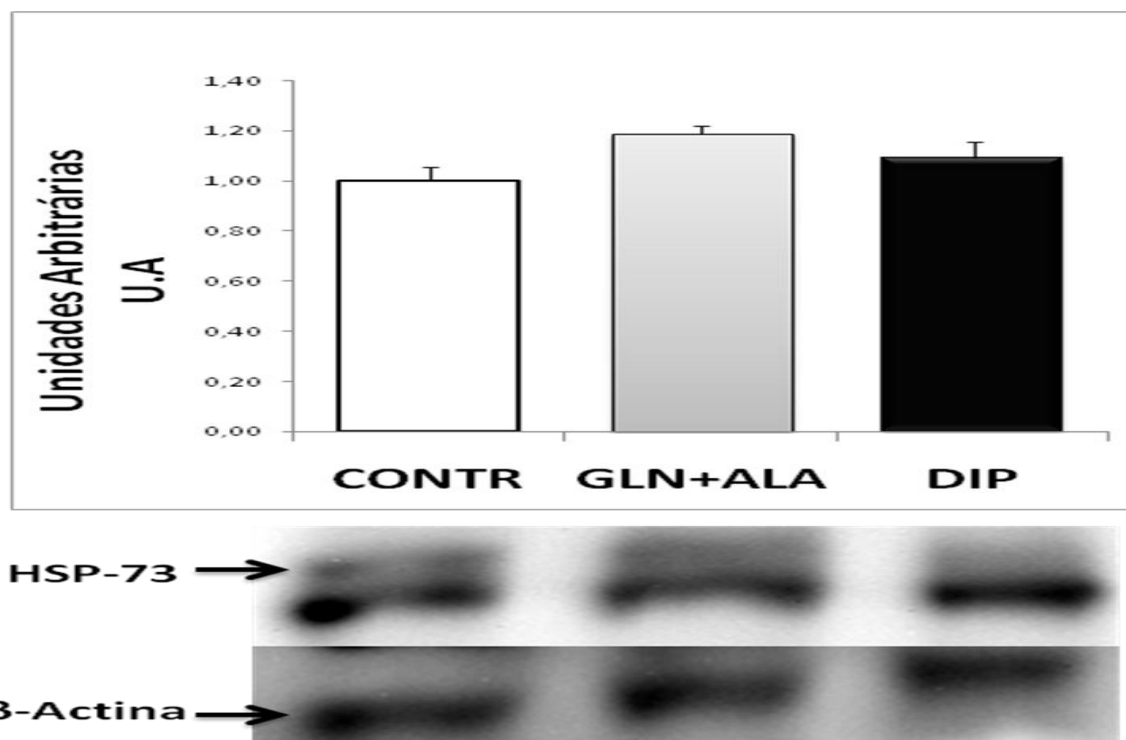


Figura 58 – Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 73 (HSP-73). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos do estudo em relação à expressão nuclear hepática de HSP-73.

5.3.47 Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72)

Realizou-se a análise da expressão gênica nuclear, hepática, da proteína de choque térmico 72 (HSP-72). Os dados encontram-se expressos na tabela 55 e graficamente representados na figura 59.

Tabela 55 - Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72) (unidades arbitrárias U.A).

	CONTR	GLN+ALA	DIP
HSP-72 (unidades arbitrárias U.A)	1,00 ± 0,13	1,38 ± 0,04*	1,94 ± 0,03**

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. (Tukey HSD). **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

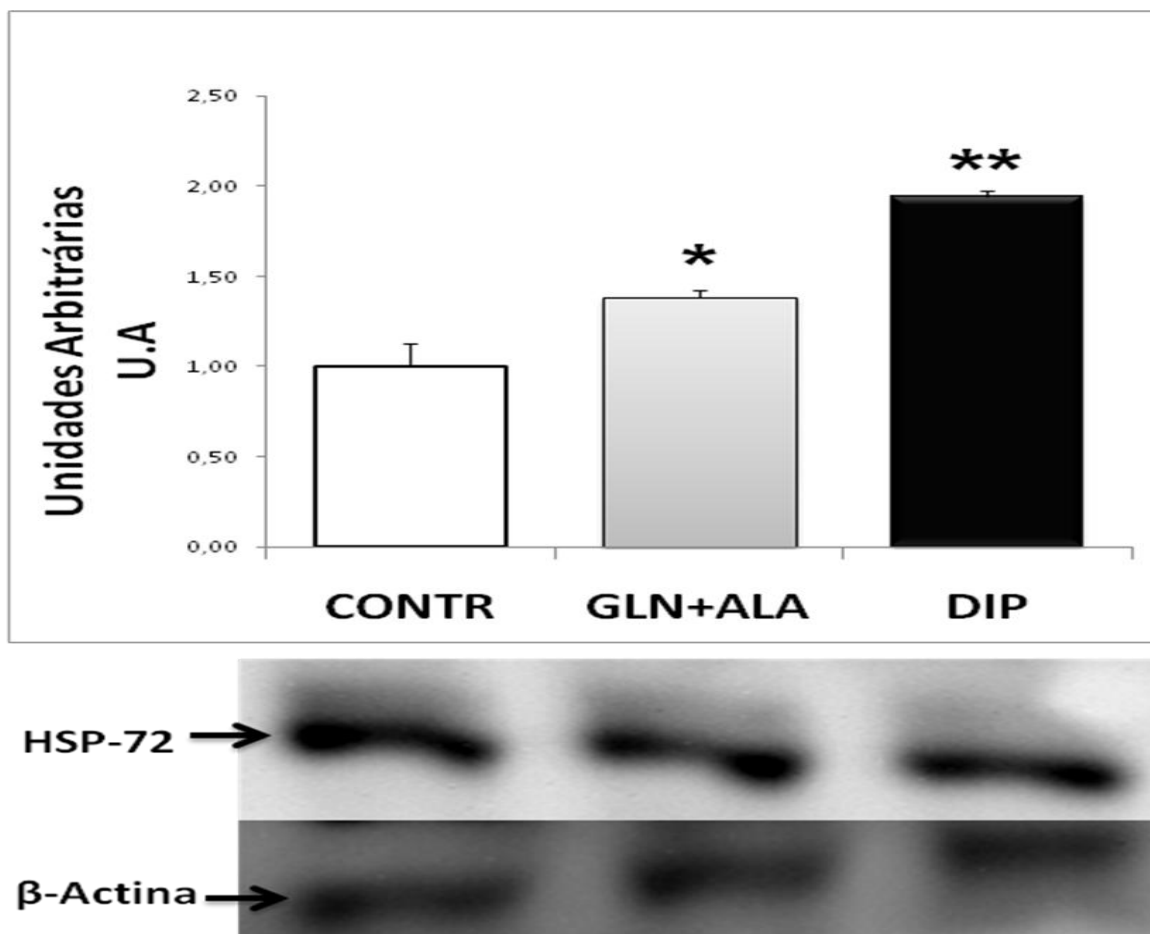


Figura 59 – Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 72 (HSP-72). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Tukey HSD). **Diferença na comparação entre o grupo DIP e os grupos CONTR e GLN+ALA. $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 55 e a figura 59, a expressão hepática nuclear de HSP-72 no grupo DIP foi 29% e 48,4% superior, se comparado aos grupos GLN+ALA e CONTR, respectivamente. Já o grupo GLN+ALA apresentou aumento na ordem de 27,5% na expressão hepática nuclear de HSP-72, quando comparado ao grupo controle do estudo.

5.3.48 Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70)

Com base na média aritmética da soma do volume de expressão nuclear hepática de HSP-73 e HSP-72, estimou-se a expressão nuclear de HSP-70, no

fígado. Os dados acham-se expressos na tabela 56 e representados graficamente na figura 60.

Tabela 56 - Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70) (unidades arbitrárias U.A).

HSP-70 (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,15	1,30 ± 0,06	1,57 ± 0,07*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

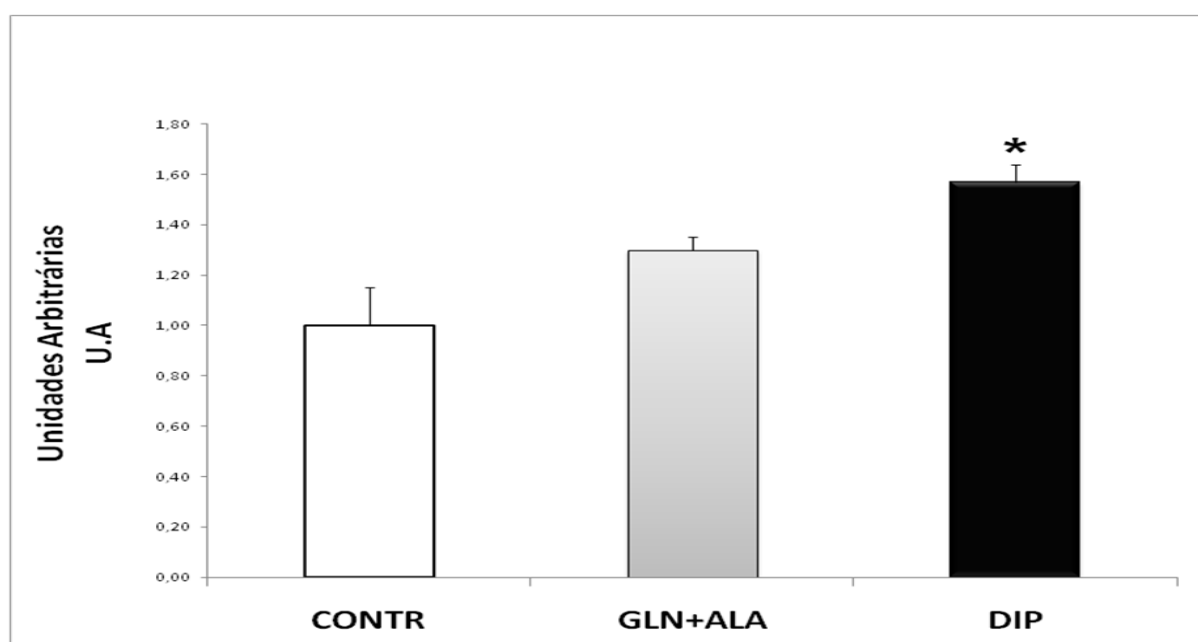


Figura 60 – Expressão nuclear hepática da proteína de choque térmico 70 (HSP-70). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,05$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Os dados apresentados na tabela 56 e figura 60 indicam que a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina induziu aumento na expressão nuclear hepática de HSP-70, na ordem de 36,3%, na comparação com o grupo controle do estudo.

5.3.49 Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF)

Analisou-se a expressão gênica hepática nuclear do fator de choque térmico-1, não fosforilado (HSF-1NF). Os dados encontram-se expressos na tabela 57 e representados graficamente na figura 61.

Tabela 57 - Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF) (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1NF (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,04	2,89 ± 0,03 ^{**}	2,32 ± 0,06 [*]

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. (Anova One-Way; Tukey HSD).

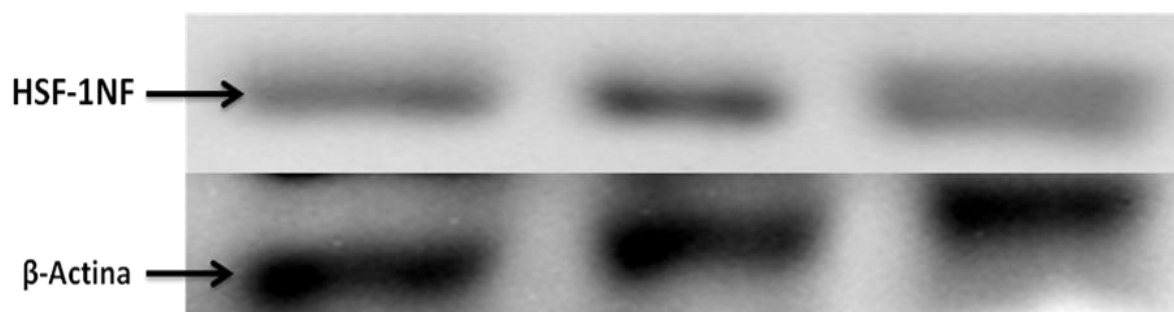
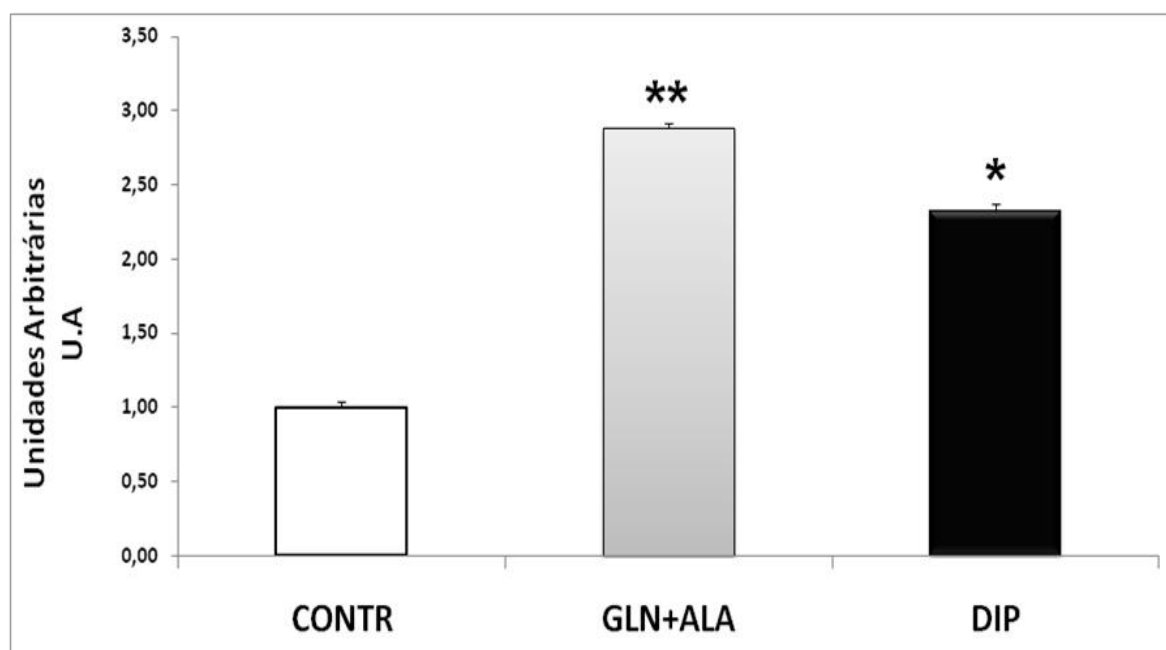


Figura 61 – Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 não fosforilado (HSF-1NF). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,05. (Anova One-Way; Tukey HSD).

De acordo com a tabela 57 e a figura 61, a expressão gênica hepática nuclear de HSF-1NF no grupo GLN+ALA foi 65,4% e 19,4% superior, em relação aos grupos CONTR e DIP, respectivamente. Por outro lado, o grupo DIP apresentou expressão gênica hepática nuclear de HSF-1NF, 56,9%, superior, se comparado ao grupo CONTR.

5.3.50 Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F)

Os dados referentes a análise da expressão gênica hepática nuclear do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F), encontram-se expressos na tabela 58 e graficamente representados na figura 62.

Tabela 58 - Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1fosforilado (HSF-1F) (unidades arbitrárias U.A).

HSF-1F (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,05	0,93 ± 0,04	2,55 ± 0,06 ^{**}

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. ^{**}Diferença na comparação com o grupo CONTR e GLN+ALA, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

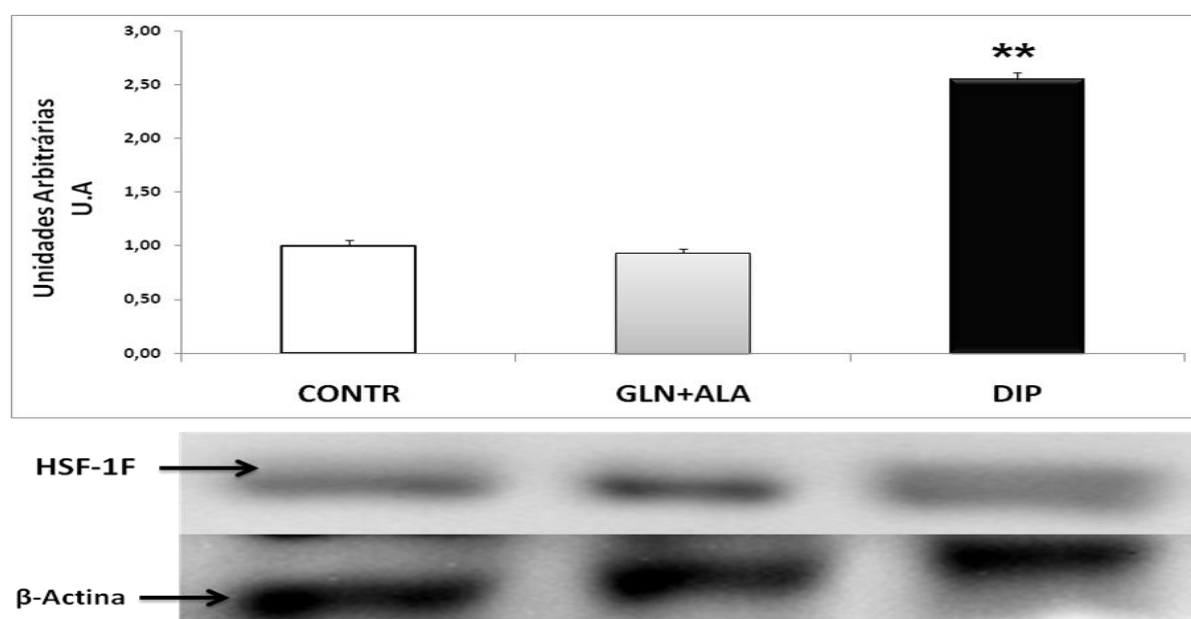


Figura 61 – Expressão hepática nuclear do fator de choque térmico-1 fosforilado (HSF-1F). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. ^{**}Diferença na comparação com o grupo CONTR e GLN+ALA, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme observado na tabela 58 e na figura 62, o grupo suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina apresentou expressão hepática nuclear de HSF-1F, 63,5% e 60,8%, superior, se comparado ao grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre e controle, respectivamente.

5.3.51 Expressão hepática da enzima glutamina sintetase (GS)

No intuito de avaliar-se a influência das suplementações sobre a expressão gênica da enzima glutamina sintetase (GS) no fígado, analisou-se a expressão citoplasmática desta enzima, no tecido hepático. Os dados encontram-se expressos na tabela 59 e representados graficamente na figura 63.

Tabela 59 – Expressão hepática da enzima glutamina sintetase (GS) (unidades arbitrárias U.A).

GS (unidades arbitrárias U.A)	CONTR	GLN+ALA	DIP
	1,00 ± 0,04	1,63 ± 0,03*	1,45 ± 0,07*

Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, p<0,001. (Anova One-Way; Tukey HSD).

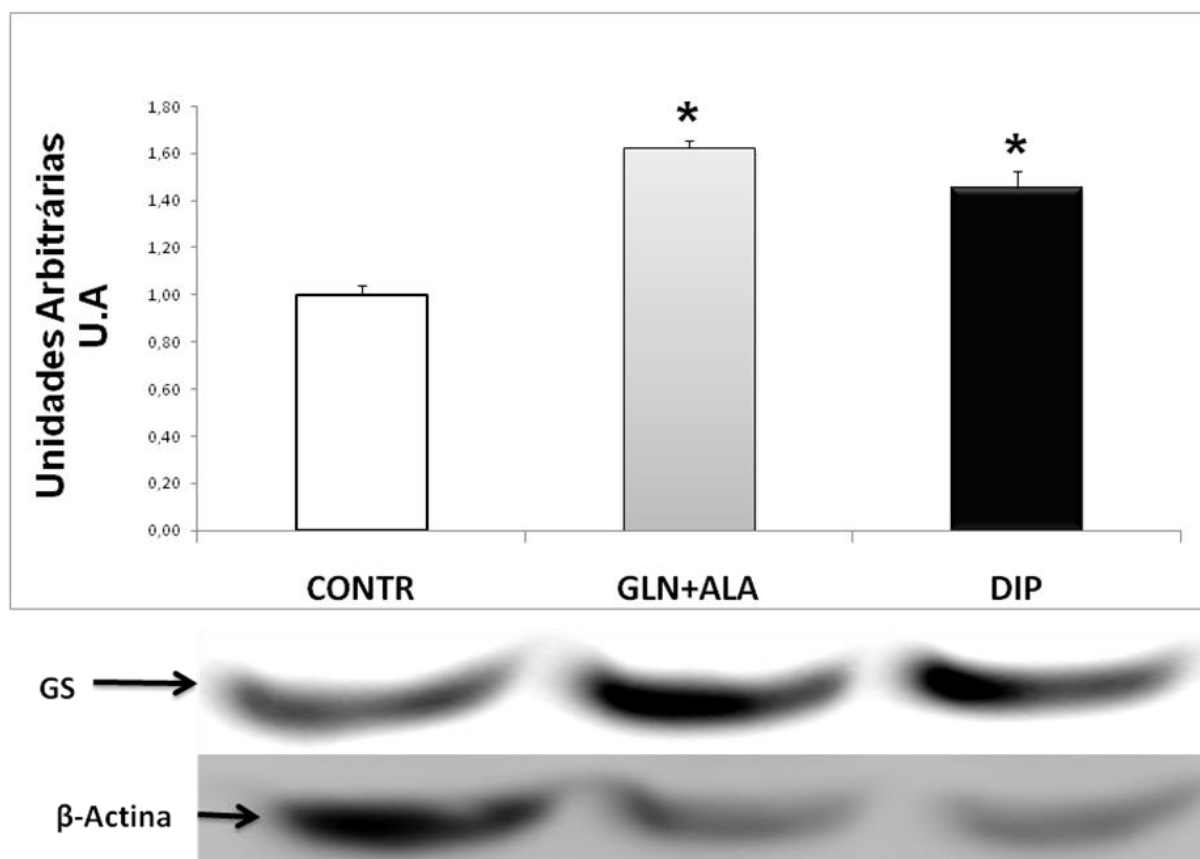


Figura 63 – Expressão hepática da enzima glutamina sintetase (GS). Dados expressos em média e erro padrão da média; grupo controle (CONTR); grupo glutamina+alanina (GLN+ALA); grupo dipeptídeo (DIP); n = 8 por grupo. *Diferença na comparação com o grupo CONTR, $p < 0,001$. (Anova One-Way; Tukey HSD).

Conforme os dados apresentados na tabela 53 e figura 57, os grupos suplementados com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, e com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina apresentaram aumento, na ordem de 38,6% e 31%, respectivamente, na expressão hepática da enzima GS, na comparação com o grupo controle do estudo.

6. DISCUSSÃO

As primeiras evidências de que a glutamina possuía propriedades metabólicas importantes surgiu dos trabalhos desenvolvidos por Eagle em 1955, que demonstrou a importância deste aminoácido para o crescimento e manutenção de diversos tipos de células. Desde então, o metabolismo da glutamina vem sendo intensamente estudado. Recentemente, o emprego de técnicas de biologia molecular possibilitou a observação de que a glutamina não só influencia o metabolismo de um variado número de tipos celulares, mas também exerce importante modulação sobre relevantes vias de sinalização celular, sobretudo aquelas relacionadas a processos antiapoptóticos (BRENNAN *et al.*, 2003; NEWSHOLME *et al.*, 2003b; CURI *et al.*, 2005; SINGLETON *et al.*, 2005; CORLESS *et al.*, 2006; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007).

De acordo com Newsholme *et al.* (2003a) e Newsholme *et al.* (2003b), a glutamina, assim como a glicose, configura-se como um nutriente indispensável para as células, uma vez que está envolvida na manutenção e promoção de diversas funções essenciais a homeostasia celular, como a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, regulação do balanço ácido básico, manutenção do volume celular, transporte de amônia entre os tecidos, proliferação e desenvolvimento de células, em especial do sistema imune (CURI, 2000; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002; CORLESS *et al.*, 2006). Embora não seja o único, o tecido muscular esquelético exerce importante influência sobre a concentração de glutamina corporal, uma vez que este tecido é, quantitativamente, o mais relevante sítio de síntese, estoque e liberação de glutamina (CURI *et al.*, 2005).

Diversas pesquisas científicas apontam que a prática regular de atividades físicas, configura-se como importante meio de prevenção e redução do risco de ocorrência de doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras (RADAK *et al.*, 2001; NOBREGA, 2005). Entretanto, diversas outras pesquisas, salientam que a realização de exercícios físicos, sobretudo aqueles praticados de forma intensa e prolongada podem promover efeitos adversos à saúde (LIJNEN; HESPEL, FAGARD, 1988; RADAK *et al.*, 2001). De maneira geral, tais atividades, embora praticadas por atletas bem treinados, predispõem estes indivíduos a um maior risco de serem acometidos por fadiga crônica, infecções, graves lesões musculares e *overtraining*, fato que além de comprometer o desempenho atlético do indivíduo, também compromete o seu estado geral de saúde (ROWBOTTON *et al.* 1996; CASTELL; NEWSHOLME, 1997). A redução na disponibilidade de glutamina corporal, fato que ocorre pelo desequilíbrio entre a síntese deste aminoácido e sua degradação, durante e após exercícios intensos e prolongados, têm sido correlacionada, de forma direta, como fator desencadeador de tais ações deletérias (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1989; CASTELL; POORTMANS; NEWSHOLME, 1996; ROHDE *et al.*, 1998; SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007). Por esta razão, alternativas nutricionais, tais como a suplementação com L-glutamina tem sido investigada com o objetivo de atenuar os efeitos promovidos pelo exercício intenso e prolongado.

São diversos os estudos, que ao investigarem os efeitos da suplementação oral com L-glutamina em indivíduos saudáveis, humanos ou animais, envolvidos com exercícios físicos, demonstraram baixa efetividade desta intervenção nutricional (CASTELL *et al.*, 1997; ROHDE *et al.*, 1998; KRYWKOWSKI *et al.*, 2001a; KRYWKOWSKI *et al.*, 2001b; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002). Tais resultados

têm sido creditados, entre outros fatores, ao fato de uma taxa entre 50% a 80% do total de L-glutamina na forma livre, que é administrada por via oral, poder ser consumida pelos enterócitos (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; D'SOUZA;TUCK, 2004) e o restante, ainda poder ser utilizada pelo fígado. Desta forma, uma reduzida quantidade de glutamina estaria disponível para outras células e tecidos, tais como células do sistema imune e músculos esqueléticos. Assim, estudos têm sugerido que a utilização de dipeptídeos de glutamina tais como o L-alanil-L-glutamina, também por via oral, pode representar uma alternativa nutricional eficiente, não invasiva, de aumentar a disponibilidade de glutamina às células, quando comparada à utilização de L-glutamina na forma livre, tanto em situações de estresse metabólico, como exercícios intensos e prolongados, quanto em situações de repouso (Rogerero *et al.*, 2002; Rogerero *et al.*, 2004; Rogerero *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, seguindo a linha de pesquisa adotada por Cruzat e Tirapegui (2009) propusemo-nos a estudar não só o efeito da suplementação oral com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, mas também com uma solução, com fórmula igual ao dipeptídeo, mas com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, dispostos na forma livre (grupo GLN+ALA). Cabe enfatizar que este grupo recebeu a mesma quantidade de nitrogênio e calorias advindas dos mesmos aminoácidos, do que o grupo suplementado com o dipeptídeo.

Com 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 aeróbio, de corrida, em esteira rolante. Estes resultados se assemelham aos de outras pesquisas onde não se verificou alterações nesses parâmetros, em animais submetidos a exercício físico 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.*, 2006).

Em nosso estudo, o treinamento promoveu alteração estatisticamente significativa na concentração plasmática de glutamina no grupo controle, ao passo que as intervenções nutricionais mostraram-se efetivas em elevar esta mesma concentração, nos grupos GLN+ALA e DIP. Este efeito pode ser um reflexo da maior concentração de glutamina encontrada nos músculo sóleo e gastrocnêmio, nos grupos DIP e GLN+ALA. Uma vez que o músculo esquelético é o principal sítio envolvido na síntese, estoque e liberação de glutamina, responsável por mais de 60% do total de glutamina livre no organismo, seu metabolismo intracelular pode influenciar a concentração de glutamina no plasma (NEWSHOLME *et al.*, 2003). A concentração de glutamina plasmática, todavia, não representa sua concentração em tecidos, tais como o muscular, mesmo em condições de elevado catabolismo muscular (Hammarqvist *et al.* 2005). Tal resultado sugere também, que as suplementações atenderam à demanda de glutamina para órgãos como rins, fígado, intestino e células de rápida divisão, tais como células do sistema imune, durante o exercício. Cabe salientar, contudo, que os efeitos da suplementação oral crônica com L-glutamina, seja na forma livre ou como dipeptídeo, sobre a concentração plasmática de glutamina, ainda demonstram-se controversos (FLARNG *et al.*, 2003; ROGERO *et al.*, 2004, ROGERO *et al.*, 2006; WALSH *et al.*, 2000).

Em alguns trabalhos tanto com humanos quanto com animais, a análise da cinética da glutamina revelou que, imediatamente após a administração oral de L-glutamina, seja na forma livre ou como dipeptídeo, um aumento na glutaminemia foi observado (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; NEWSHOLME, 1997; BOZA *et al.*, 2000;

KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2004). Os valores máximos deste aumento tendem a ocorrer por até 30 minutos após a suplementação com L-glutamina na forma livre (CASTTEL; NEWSHOLME, 1997; BOZA *et al.*, 2000) ou entre 40 e 60 minutos após a suplementação com L-glutamina na forma de dipeptídeo (KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2004). Entretanto, ao transcorrer 180 minutos após ambas as suplementações, a concentração plasmática de glutamina tende a retornar a valores próximos aos basais (DÉCHELOTTE *et al.*, 1991; NEWSHOLME, 1997; BOZA *et al.*, 2000; KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2004).

Nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada em relação à concentração plasmática de glutamato em nosso estudo. Fato semelhante, também foi verificado em outras pesquisas, mesmo em condições de elevado catabolismo muscular, onde as células necessitam de elevada disponibilidade deste aminoácido, para a síntese de outros compostos tais como a GSH. De acordo com Rutten *et al.*, (2005) tal fato pode ser creditado ao transportador de glutamato (denominado X_{ag}^-) localizado na membrana celular. Tal transportador, apesar de possuir alta afinidade por este aminoácido, contudo, possui um Km muito elevada ($\pm 100 \mu\text{mol/L}$) em comparação a concentração plasmática de glutamato ($\pm 64 \mu\text{mol/L}$). Desta forma, o transporte de glutamato para o interior das células é limitado. Este resultado também sugere que o aumento na oferta de glutamina provocado pelo tratamento com GLN+ALA e DIP, tenha sido canalizado para uma rota metabólica adiante das glutaminases intracelulares, em algum território tecidual dos animais.

Entre os fatores estressantes promovidos pelo exercício físico prolongado e intenso, está a elevação da concentração plasmática de amônia (NH_3). Embora ainda não completamente esclarecidos, os mecanismos de síntese de NH_3 durante o

exercício físico têm sido relacionados, entre outros fatores, com a redução intramuscular de ATP, em virtude de um desequilíbrio entre a utilização deste substrato e sua regeneração, a partir da refosforilação do ADP. Tal fato leva a um aumento na concentração muscular de ADP e AMP. Cabe salientar que a proporção de restauração ADP/ATP é dada em cada duas moléculas de ADP rendendo uma molécula de ATP, mais uma de AMP (KUIPERS, 1998). Deste modo, no intuito de evitar acúmulo demasiado de ADP e, principalmente, de AMP, no interior das células, a AMP sofre desaminação passando a IMP e NH_3 (GRAHAM *et al.*, 1997), a partir de uma reação de desaminação catalisada pela enzima AMP desaminase. Em repouso, a AMP desaminase é uma enzima praticamente inativa no músculo esquelético. Contudo, durante exercícios físicos, sobretudo aqueles caracterizados por contrações musculares intensas, esta enzima torna-se muito ativa, fato que torna o músculo esquelético, o principal sítio de geração de NH_3 , durante o exercício (GRAHAM *et al.*, 1997). Um efeito combinado da desaminação de purinas e do catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), dentro das miofibrilas (GRAHAM *et al.*, 1995; CASTELL, 1996) também têm sido apontado como fator desencadeador do aumento da síntese de NH_3 , durante exercícios intensos e prolongados.

É fato conhecido que a NH_3 livre pode se combinar com o glutamato e formar glutamina, que se configura num dos principais transportadores de NH_3 entre tecidos. Estudos indicam que a redução da concentração intramuscular de glutamato (fato observado, em nosso estudo) nos músculos sóleo e gastrocnêmio dos animais do grupo controle, induz a uma inibição da atividade da enzima glutamina sintetase (GS), evitando, conseqüentemente, que a NH_3 gerada pelo exercício, seja removida

na forma de glutamina conforme observações anteriores (HOOD; TENJUNG, 1994; GRAHAN *et al.*, 1995).

Em nosso estudo, os animais do grupo CONTR apresentaram uma hiperamonemia cerca de 29,3% e 39,5% maior, se comparado aos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente. Tal fato demonstra que tanto a intervenção nutricional com L-glutamina associada à L-alanina, na forma livre, ou com L-glutamina na forma de dipeptídeo, além de promoverem alterações significativas nas concentrações de glutamina e glutamato musculares, também se mostraram eficientes em reduzir os níveis plasmáticos de NH_3 , nos grupos suplementados. Esses achados, somados ao fato de termos encontrado concentração de glutamina e glutamato estatisticamente superior no músculo sóleo e gastrocnêmio permitem-nos inferir que a amônia gerada pelo exercício prolongado e intenso, serviu de substrato para síntese de glutamina, por meio da ação da enzima GS, ou então, tenha havido um aumento da eliminação renal de amônio, por incremento da metabolização de glutamina nos rins.

Embora alguns estudos considerem a administração de 1g/Kg de peso corporal de L-glutamina, tanto na forma livre, quanto na de dipeptídeo seja elevada (D'SOUZA *et al.*, 2004; GARLICK, 2004), e desta forma possivelmente tóxica ao organismo, cabe enfatizar, que no presente estudo, não foi constatado qualquer indício de toxicidade, decorrentes das intervenções nutricionais, tais como hiperamonemia.

Apesar de alguns estudos terem observado poucos efeitos da utilização de L-glutamina na forma livre seja em modelos experimentais ou humanos (CASTELL *et al.*, 1997, ROHDE *et al.*, 1998, KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001a, VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002b), nossos resultados, entretanto, indicam que ambas as

suplementações, ou seja, tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre, quanto com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, resultaram em maior concentração de glutamina no músculo sóleo (aumento de 28,3% e 33,4%, respectivamente, se comparado ao grupo controle). Resultado semelhante, também foi observado quando as concentrações de glutamina foram expressas em função do conteúdo protéico total (concentração de glutamina/proteína total), no sóleo.

Este efeito de ambas as suplementações pode ser creditado, provavelmente, à adição de L-alanina, também na forma livre, à solução contendo L-glutamina livre. Em estudos similares, apesar do cálculo da quantidade de glutamina oferecida ser igual, não havia uma equivalência de aminoácidos entre os grupos (ROGERO *et al.*, 2004; KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2006). Deste modo, é provável que a adição de L-alanina livre à solução tenha elevado sua concentração no plasma rapidamente, uma vez que seu transporte através da célula epitelial intestinal ocorre de forma preferencial pelo transportador (BRÖER, 2008). Estudos avaliando o transporte de L-alanina em células do epitélio intestinal verificaram que sua absorção pode ser reduzida, quando em conjunto com alguns aminoácidos neutros. Nestes estudos, todavia, não estava incluída a L-glutamina (SIGRIST-NELSON *et al.*, 1975). A forma em que a L-glutamina é oferecida por via oral é um fator importante a ser considerado no aumento da disponibilidade de glutamina corporal. Nossos resultados indicam que a presença do aminoácido L-alanina também deve ter contribuído de alguma forma, para o efeito do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina.

Em parte, a maior concentração de glutamina observada no músculo sóleo, pode ser atribuída à elevada concentração de glutamato, também observada neste tecido. Deve ser lembrado que, na reação catalisada pela enzima GS e com gasto

de ATP, o glutamato reage com a amônia, formando glutamina (NEU; SHENOY; CHAKRABARTI, 1996). Deste modo, uma maior concentração de glutamato, tal como observado no músculo sóleo, em especial nos animais do grupo DIP (aumento de 21,7% se comparado ao grupo controle), representa parte característica do ciclo glutamina-glutamato, o que também nos leva a inferir que tenha provocado impacto na expressão gênica da enzima GS, naquele tecido. Resultados similares com a utilização do DIP, também foram observados por Rogero *et al.* (2006), quando estes submeteram ratos a exercício exaustivo de natação. Desta forma, nossos resultados atestam, claramente, que ambas as suplementações com L-glutamina, foram eficazes em atenuar a redução da concentração de glutamina e glutamato, no músculo sóleo, durante o treinamento aeróbio intenso.

No presente estudo, as sessões de exercício às quais os animais foram submetidos tiveram, na maior parte do período de treinamento, duração de uma hora de forma contínua, fato que caracteriza o exercício como predominantemente aeróbio. É de consenso entre os diferentes autores que exercícios com tais características induzem a um exacerbado aumento no consumo de O₂, fato que pode chegar a cerca de 20% no organismo como um todo e a 200% ao nível da fibra muscular isolada, quando comparado ao estado de repouso (OGONOVSKY *et al.*, 2005). Embora importante para suprir a elevada demanda energética durante tais atividades, esta elevação no consumo de O₂ tem se correlacionado de forma direta com um aumento no sinal indutor para a síntese de ERO na musculatura esquelética ativa (JI, 1999; CLARKSON, THOMPSON, 2000; SEN, 2001; MASTALLOUDIS *et al.*, 2004).

Sabe-se, também, que a solicitação de fibras oxidativas (tipo I) prepondera, sobre as fibras glicolíticas (tipo II), durante a realização de exercícios predominantemente aeróbios (STARON *et al.*, 1984; GRAHAN; MACLEAN, 1998). As fibras do tipo I se caracterizam por apresentarem maior quantidade de mitocôndrias se comparadas às fibras do tipo II (LEARY *et al.*, 2003). A mitocôndria é apontada, em diversos estudos, como principal sítio de síntese de ERO nos organismos aeróbios (JI, 1999; SERVAIS *et al.*, 2003; MASTOLOUIS *et al.*, 2004; FINAUD; FILAIRE, 2006). Embora possa variar, de acordo com fatores adaptativos ao treinamento ou genéticos, de maneira geral, o músculo sóleo, se caracteriza por ser predominantemente composto por fibras oxidativas ($\leq 80\%$) (STARON *et al.*, 1984; LEARY *et al.*, 2003).

A redução da concentração de compostos envolvidos com a síntese de substâncias antioxidantes é tida como fator desencadeador de maior suscetibilidade das células a serem acometidas pelas ações lesivas promovidas pelas ERO. Entre essas ações deletérias estão lesões ao DNA, proteínas e a peroxidação dos fosfolipídios que compõe a as membranas celulares e subcelulares (JENKINS, 1988; BEJMA; JI, 1999; JI, 1999; HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999; DRÖGE, 2002; DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, observamos que o exercício aeróbio intenso induziu aumento de 60,1% e 81,8% na concentração plasmática de MDA, nos animais do grupo controle, se comparado aos animais dos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente. Por outro lado, tanto os animais suplementados com L-glutamina e L-alanina na forma livre, quanto com L-glutamina na forma de dipeptídeo, demonstraram redução na concentração de MDA no plasma. Nossos resultados

concordam com os encontrados em outros estudos, tanto com modelos experimentais ou humanos (PREM *et al.*, 1999; PRABHU; THOMAS; BALASUBRAMANIAN, 2003; MORA *et al.*, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2005; FILMANN *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2007; ABILÉS *et al.*, 2008; KRETZMANN *et al.*, 2008) onde a suplementação com L-glutamina, seja na forma livre ou na de dipeptídeo foi administrada, como meio de atenuar a peroxidação lipídica induzida por situações catabólicas, como cirurgias, câncer, colite ulcerativa, isquemia/reperfusão tecidual e exercícios físicos intensos e prolongados. Cabe salientar, que embora estes estudos tenham observado efeitos favoráveis da suplementação com L-glutamina na redução da concentração de marcadores de peroxidação lipídica, tal como a concentração plasmática e muscular de MDA, a utilização desta intervenção nutricional, ainda demonstra-se um tanto controversa, uma vez que se observaram resultados conflitantes, de acordo com a forma como a suplementação foi administrada, ou seja, forma enteral ou parenteral (SIDO *et al.*, 2006).

No intuito de neutralizar a aumentada síntese de ERO desencadeada por inúmeras situações catabólicas, incluindo exercícios físicos intensos e prolongados, as células dispõem de um sistema antioxidante classificado como enzimático e não enzimático (JI, 1999; DRÖGE, 2002). Dentro do sistema antioxidante não enzimático, a GSH corresponde ao principal antioxidante celular não enzimático do organismo (MEISTER; ANDERSON, 1983). Deste modo, o estado redox celular está conseqüentemente relacionado com as concentrações de GSH (BEST *et al.*, 1999; ROTH *et al.*, 2002). A síntese deste antioxidante apresenta uma considerável dependência da concentração de alguns aminoácidos, com destaque para: cisteína, glicina e principalmente de glutamato (JI, 1999; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002; FLÄRING *et al.*, 2003). Evidências experimentais apontam que o glutamato

representa a primeira e provavelmente a mais importante etapa na síntese dos compostos integrantes da GSH (ANTONIO; STREET, 1999; JI, 1999; FLÄRING *et al.*, 2003). Ora, a concentração de glutamato é dependente da disponibilidade de glutamina, e o transporte deste aminoácido para dentro das células mantém a concentração de glutamato e, conseqüentemente, de GSH. Assim, a determinação da concentração deste antioxidante no músculo sóleo permitiu que fosse testada a hipótese de uma maior disponibilidade de glutamato muscular elevar a quantidade de GSH intramuscular. A GSH caracteriza-se por reagir com as ERO, tais como o H_2O_2 , ocasionando uma redução da interação destes compostos reativos com outras macromoléculas e íons metálicos, ou ainda com membranas celulares e subcelulares, o que pode resultar em menor estresse oxidativo (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001a).

A determinação da concentração de GSH no músculo sóleo demonstrou que tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre, quanto com os dois aminoácidos na forma de dipeptídeo, foi capaz de influenciar, de forma significativa, a concentração deste antioxidante neste tecido, quando comparado ao grupo controle do estudo. Sob este aspecto, ambas as suplementações administradas no presente estudo, parecem ser alternativas eficientes para elevar-se a concentração de GSH no músculo sóleo.

Por outro lado, o cálculo da razão entre GSH/GSSG, importante índice do estado redox celular, sugere outro efeito no músculo sóleo. Sob esta óptica, observou-se que, embora tenha ocorrido aumento na razão GSH/GSSG também no grupo GLN+ALA, somente a suplementação com o DIP (aumento de 41,6% em comparação ao grupo controle) mostrou-se estatisticamente eficiente em influenciar

este parâmetro. Apesar disto, tal fato não nos impede inferir que tanto a mistura de aminoácidos, quanto o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina influenciaram os estoques intracelulares de GSH, possivelmente por meio da redução da taxa de utilização ou degradação deste antioxidante, fato que concorda com os achados de Humbert *et al.* (2007) e Cruzat e Tirapegui (2009).

Em um estudo conduzido por Flaring *et al.* (2003), a maior disponibilidade de glutamina, feita por meio de suplementação parenteral em homens submetidos a eventos de estresse metabólico (cirurgias na região abdominal) atenuou a depleção muscular de GSH, fato que beneficiou a recuperação dos pacientes. Adicionalmente, os autores observaram também, maior concentração plasmática de glutamina, após a cirurgia, no grupo suplementado, quando comparado ao grupo controle do estudo. Por outro lado Valencia, Marin e Hardy (2002b), ao investigarem o efeito da suplementação oral com L-glutamina na forma livre em humanos sedentários, não observaram aumento na concentração de GSH no plasma destes indivíduos. Os resultados conflituosos dos dois estudos são creditados, entre outros fatores, a forma de suplementação utilizada, nos respectivos estudos.

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 a utilização de dipeptídeos de glutamina, tais como o L-alanil-L-glutamina por via oral, representa uma alternativa não invasiva e eficaz de aumentar a disponibilidade de glutamina às células (KLASSEN *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2002; ROGERO *et al.*, 2006).

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

No músculo gastrocnêmio, tanto as intervenções nutricionais quanto o treinamento não influenciaram a concentração de glutamina naquele tecido. Contudo, quando a concentração de glutamina foi expressa em função do conteúdo protéico total (concentração de glutamina/proteína total) observou-se aumento na ordem de 42,6% e 23% no grupo DIP, na comparação com os grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. Já quando em comparação ao grupo controle do estudo, a suplementação com L-glutamina na forma livre promoveu aumento de 24,8% na razão entre glutamina/proteína total, no músculo gastrocnêmio.

Foram observadas também alterações na concentração de glutamato neste tecido. Nossos resultados demonstram que tanto a suplementação com o DIP quanto com a mistura de aminoácidos promoveu aumento de 10,1% e 13,1% respectivamente, na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, quando comparado ao grupo controle. De acordo com Klassen *et al.* (2000), a suplementação com L-alanil-L-glutamina promove aumento estequiométrico dos aminoácidos L-glutamina e L-alanina no plasma. É provável que em nosso estudo este aumento tenha ocorrido não somente no grupo suplementado com o dipeptídeo, mas também no grupo que recebeu 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 maior concentração de glutamina tecidual, fato observado no músculo sóleo, tanto no grupo GLN+ALA, quanto no grupo DIP.

A predominância do tipo de fibra muscular também influencia a concentração tecidual de aminoácidos livres (GRAHAM; MACLEAN, 1998). Sendo o músculo gastrocnêmio composto por fibras mistas, ou seja, predominantemente do tipo IIa, este apresenta menor concentração de glutamina e glutamato em relação a músculos onde há o predomínio de fibras do tipo I, mais oxidativas, tal como o músculo sóleo (GRAHAM; MACLEAN, 1998; CURI, 2000). Entre os fatores que corroboram para esta menor concentração de glutamina e glutamato no músculo gastrocnêmio, estudos indicam que prepondera o fato deste tecido apresentar menor atividade de enzimas tais como a GS e a glutamato desidrogenase, ou ainda menor disponibilidade de ATP para a síntese de aminoácidos (GRAHAM; MACLEAN, 1998; CURI, 2000). Similar a outros trabalhos (CHRISTOPHE *et al.*, 1971; ROGERO *et al.*, 2006), a comparação entre a concentração de glutamina e glutamato, nos músculos sóleo e gastrocnêmio realizada em nosso estudo, deixa esta diferença bem clara.

O treinamento aeróbio intenso promoveu redução de 15,1% e 11,3% na concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, no grupo CONTR, se comparado aos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente. Podemos inferir que esta redução na disponibilidade de glutamato, influenciou a concentração de GSH do músculo gastrocnêmio, uma vez que foi observada redução de 89,5% e 105% na

concentração deste antioxidante, após o período de treinamento, no grupo CONTR, quando comparado aos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente.

A maior concentração de glutamato no gastrocnêmio, observada nos grupos suplementados, sobretudo no grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre, também influenciou a razão GSH/GSSG neste tecido. Foi observado aumento de 46,3% e 41,7%, nos grupos DIP e GLN+ALA, respectivamente, em relação ao grupo controle, do estudo. Este resultado nos leva a pensar que a maior concentração de glutamato no músculo gastrocnêmio, provavelmente, tenha contribuído para a atenuação da utilização ou degradação da GSH (JI, 1999; HUBERT *et al.*, 2007).

O estudo do metabolismo da glutamina assim como da GSH guarda íntima relação com o tecido hepático. Embora possa ser sintetizada em diversos tecidos, o fígado é quantitativamente o principal órgão de síntese *de novo* da GSH. Sob condições fisiológicas normais, o fígado é capaz de suprir cerca de 90% da GSH circulante (JI, 1999; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2002). A elevada concentração hepática de GSH é devida principalmente à alta atividade da enzima GR neste tecido, enzima esta que utiliza cisteína, glicina e principalmente glutamato para sintetizar GSH (VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001c). Durante a realização de exercícios físicos, sobretudo intensos e prolongados, sob a influência da elevada concentração plasmática de catecolaminas e hormônios como o glucagon e a vasopresina, ocorre um aumento do efluxo hepático de GSH, para o plasma e outros tecidos. Boa parte deste efluxo é captada, principalmente, pelo tecido muscular esquelético (JI, 1999; BEST *et al.*, 1999; VALENCIA; MARIN; HARDY, 2001b).

Em nosso estudo, de forma contrária a outras pesquisas (por exemplo, ROGERO *et al.*, 2006) observamos que tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina na forma livre, quanto com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, influenciaram a concentração hepática de glutamina. Resultado semelhante também foi verificado, quando a concentração de glutamina foi expressa em razão do conteúdo protéico total. Por outro lado, em ambas as formas de expressão observou-se que o treinamento aeróbio intenso levou a uma significativa redução na concentração hepática de glutamina, nos animais do grupo controle. Ambas as suplementações, também se mostraram eficientes em elevar a concentração hepática de glutamato, fato que teve reflexo sobre a concentração de GSH neste tecido. Contudo, em relação à razão GSH/GSSG hepática, apenas a suplementação com o dipeptídeo mostrou-se capaz de influenciar, estatisticamente, este parâmetro. Deste modo, de acordo com nossos resultados, podemos inferir que a suplementação com L-glutamina (na forma livre ou como dipeptídeo) é eficaz em promover menor ativação do estado redox celular, do principal órgão de síntese *de novo* de GSH.

Estudos apontam que a alteração no volume celular, decorrente da maior captação de íons sódio induzida pelo aumento no transporte de glutamina para o meio intracelular pode influenciar, favoravelmente, o *turnover* protéico, aumentando ou mantendo a disponibilidade de substratos para a síntese de compostos, tais como a GSH (PARRY-BILLINGS *et al.*, 1991; VARNIER *et al.*, 1995; VOM DAHL; HÄUSSINGER, 1996). Outra hipótese pode estar relacionada ao aumento nos níveis hepáticos de ATP, induzidos pela glutamina, fato que tem sido correlacionado, de forma favorável, com a redução de lesões e apoptose celular (YANG *et al.*, 2007). Em alguns estudos com modelos de lesão hepática em ratos, a administração de L-glutamina seja na forma livre ou como dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina, promoveram

aumento na concentração de GSH hepática, o que elevou a sobrevivência destas células (HONG *et al.*, 1992; YU *et al.*, 1996). Nestes estudos, também foi verificado aumento na concentração plasmática de GSH. Se transportada para fora dos hepatócitos, a concentração de GSH pode elevar-se, o que permite que esta seja utilizada por outros tecidos e células, atenuando, assim, a interação das ERO com macromoléculas como DNA, proteínas de membrana e a bicamada fosfolipídica que compõe as membranas celulares e subcelulares, fato que é apontado como essencial para a manutenção da 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 a uma maior recuperação de traumas ou condições de elevado catabolismo muscular vem sendo intensamente estudada (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 intensos e prolongados, possa contribuir para um maior desenvolvimento de lesões, microtraumas teciduais, ou ainda, desfavorecer o processo de recuperação. Deste modo, no presente estudo analisaram-se os efeitos da maior disponibilidade de glutamina e, conseqüentemente, de glutamato sobre parâmetros indicativos de lesão muscular. Constatamos que tanto a suplementação com L-glutamina na forma livre, quanto na forma de dipeptídeo, foram eficazes em reduzir a liberação de CK e MIO para o plasma (redução de 24,3% e 25,1%, na concentração de CK; e de 35,3% e 43,9% na concentração de MIO, respectivamente), em comparação com o grupo controle do estudo, o qual, por sua vez, apresentou elevação nestes parâmetros na

ordem de 54,6% e 78,1% (concentração de MIO) e 32,3% e 33,7% (concentração de CK) se comparado aos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente. Diversos estudos apontam que uma elevada liberação de parâmetros indicativos de lesão muscular, tais como CK e MIO, no plasma, é verificada por até 4 dias após a prática de exercícios físicos, sobretudo se estes forem de caráter intenso e prolongado (GLEESON *et al.*, 1998; STUPKA *et al.*, 2000; PROSKE; MORGAM, 2001; SIPSON *et al.*, 2005).

Na ocorrência de lesões teciduais, a liberação de enzimas e proteínas intracelulares para o plasma pode ocorrer por diversos mecanismos. De maneira geral, logo após a realização de uma sessão de exercícios, o movimento excêntrico, o processo de isquemia e reperfusão tecidual, o impacto das extremidades corporais com a superfície, a elevada quantidade de repetições de um mesmo movimento, entre outros fatores, propiciam o surgimento de microtraumatismos teciduais, sobretudo na musculatura esquelética (HELLSTEN *et al.*, 1997; BLOOMER; GOLDFARB, 2004; HIROSE *et al.*, 2004; MASTALLOUDIS *et al.*, 2004). A prolongada liberação de enzimas e proteínas intracelulares, também guarda relação com a ocorrência de um desequilíbrio entre a síntese e a remoção de ERO, situação conhecida como estresse oxidativo, fato que torna a extensão da lesão induzida por situações catabólicas, tais como o exercício intenso e prolongado, mais extensa (TOUMI; BEST, 2003; TIDBALL, 2005; UCHIYAMA *et al.*, 2006).

Agrupadas em 6 subfamílias, classificadas de acordo com sua sequência de aminoácidos e peso molecular, em quilodaltons (kDa) (MORIMOTO, 1993), as HSPs, correspondem a uma das principais vias de sinalização que contribuem para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostasia,

em decorrência da exposição a agentes estressores, incluindo calor, ERO e exercícios físicos prolongados, intensos ou exaustivos (SAMELMAN, 2000; GABAI e SHERMAN, 2002; VENOJÄRVI *et al.*, 2007; CRUZAT, PETRY e TIRAPÉGUI, 2009). Dentre todas as subfamílias de HSPs, os membros da subfamília da HSP-70, com destaque para sua forma induzível (HSP-72) e constitutiva (HSP-73) configuram-se na subfamília de HSPs mais abundante nas células eucariotas (LOCKE, 2002).

Pesquisas têm indicado que tanto agentes farmacológicos quanto nutricionais, em associação ou não a algum estressor fisiológico podem modular a expressão das HSPs (WISCHMEYER *et al.*, 1997; CHOW e ZHANG, 1998). Segundo WISCHMEYER (2006), a glutamina, antes tida como um aminoácido não essencial, é agora considerada um aminoácido condicionalmente essencial, uma vez que se configura no principal regulador nutricional, com capacidade de modular a ativação de proteínas relacionadas a respostas celulares antiapoptóticas, dentre as quais se incluem as HSPs. Sandres e Kon (1991) destacam que aumentos na disponibilidade de glutamina às células, além de aumentar a expressão de HSPs, contribui para o fortalecimento da capacidade da célula de resistir a lesões. Wischmeyer *et al.* (2001a e 2001b) observaram que a administração de glutamina, numa posologia de 0,75 g/Kg de peso corporal reduziu a mortalidade de animais expostos a endotoxemia, fato que se mostrou intimamente relacionado ao aumento da expressão de HSPs, como a HSP-27 e, principalmente, HSP-72.

Em nosso estudo avaliamos a hipótese da suplementação com o dipeptídeo, L-alanil-L-glutamina e de uma solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, exercer influência sobre a expressão citoplasmática e nuclear da forma constitutiva (HSP-73) e induzível (HSP-72) da HSP-70, no tecido hepático

e muscular esquelético (músculos sóleo e gastrocnêmio), em ratos submetidos a treinamento aeróbio intenso em esteira rolante.

Em relação à expressão citoplasmática de HSP-73, no músculo sóleo, nossos resultados indicam que a suplementação com a mistura de L-glutamina e L-alanina, na forma livre, induziu aumento na ordem de 15,7%, na expressão desta HSP, naquele tecido. Um aumento na expressão citoplasmática de HSP-73, induzido pela suplementação com L-glutamina na forma livre, foi igualmente observado no fígado e músculo gastrocnêmio. Nestes dois tecidos, também observamos influência da suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, inclusive com resultados se sobrepondo aos demais grupos, principalmente, no tecido hepático (aumento de 35,5%, na comparação com o grupo controle). Já em relação à expressão nuclear de HSP-73, observamos, que tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina, na forma livre, quanto na de dipeptídeo, se mostrou eficiente em promover aumento da expressão desta proteína de choque térmico, no núcleo celular. Entretanto, tal efeito foi observado apenas no músculo sóleo.

Assim, com base em nossos resultados no que tange a expressão de HSP-73, no tecido muscular esquelético e hepático, evidenciamos que a administração de L-glutamina por via oral, seja na forma livre, ou na de dipeptídeo, corresponde a uma alternativa nutricional, não invasiva, capaz de modular a expressão desta HSP, tanto no citoplasma quanto no núcleo celular.

Tais resultados, entretanto, diferem de outras pesquisas (NAKA *et al.*, 1996; WISCHMEYER *et al.*, 2003), nas quais foi observado que a suplementação com L-glutamina na forma livre ou como dipeptídeo, independentemente de administrada, na forma enteral ou parenteral, não exerceu qualquer influência sobre a expressão

de HSP-73. Adicionalmente, nossos resultados podem ser atribuídos, em parte, também, ao fato de que em nosso estudo, diferentemente dos estudos acima citados, conjugamos dois destacados fatores indutores do aumento da expressão das HSPs: exercício físico e glutamina. Deste modo, podemos inferir que tanto o exercício intenso e prolongado quanto as intervenções nutricionais influenciaram a expressão citoplasmática e nuclear de HSP-73, em nosso estudo. Nossa colocação assenta-se na observação do aumento de 30% e 17%, nos grupos DIP e GLN+ALA, respectivamente, na expressão citoplasmática de HSP-73, no músculo sóleo em comparação ao grupo CONTR. Estes dados permitem inferir que, de alguma forma, o tratamento com DIP, induziu uma redução dos estímulos indutores da expressão de HSP-73. De acordo com Chong *et al.*, (1998), a HSP-73, embora sintetizada constitutivamente nas células sob condições fisiológicas normais, também tem sua expressão induzida e aumentada, de maneira semelhante a forma induzível da HSP-70, HSP-72, por ocasião de episódios de estresse fisiológico as células, incluindo exercícios físicos intensos e prolongados.

Normalmente localizada no citoplasma da célula, agindo como chaperona em nível molecular, a HSP-72 é considerada vital para a manutenção da homeostasia celular (SAMELNAN, 2000). Adicionalmente, estudos têm indicado que esta HSP desempenha outra função citoprotetora importante, agindo como proteína sinalizadora, capaz de induzir respostas imunoestimulatórias, partir de eventos celulares como sua liberação para o meio extracelular, ou, translocação para o interior do núcleo da célula, em resposta a situações de estresse oxidativo, tal como exercícios físicos intensos e prolongados (MURLASITS *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2007; VENOJÄRVI *et al.*, 2007; OGURA *et al.*, 2008; STRAY *et al.*, 2008). Pesquisas têm indicado ainda, que a HSP-72, constitui-se na HSP de maior expressão no

tecido muscular esquelético durante e após exercícios físicos (WELCH, 1993; SMOLKA *et al.*, 2000; ANTUNES NETO *et al.*, 2006). Pesquisadores diversos mostraram que a administração de L-glutamina tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstra modular aumentos significativos, na expressão desta HSP, em diferentes tecidos e linhagens de células (CHOW; ZHANG, 1998; WISCHMEYER *et al.* 2001a e 2001b; WISCHMEYER *et al.*, 2003; ROPELESKI *et al.*, 2005; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007).

Em nosso estudo, observamos que a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina induziu aumento, na ordem de 42,2% e 57,2%, na comparação com os grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente, na expressão citoplasmática de HSP-72, no músculo sóleo. Resultado semelhante, também foi observado em relação à expressão nuclear de HSP-72, igualmente no músculo sóleo, onde se observou aumento, no grupo DIP, na ordem de 51,2% na comparação com o grupo CONTR. Ainda no músculo sóleo, foi observado um significativo aumento, na ordem de 46,5% na expressão nuclear de HSP-72, no grupo suplementado com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, quando comparado ao grupo controle do estudo, o qual, por sua vez, apresentou aumento significativo na expressão desta HSP, no citoplasma celular, quando comparado ao grupo GLN+ALA. Esses achados, somados aos dados referentes à expressão da forma constitutiva da HSP-70 (HSP-73), no músculo sóleo, sugerem que a redução da expressão de HSP-73, verifica neste tecido, sobretudo nos animais tratados com DIP, pode estar relacionada a um direcionamento desta proteína de choque térmico, para o núcleo celular, em situação de estresse, quando a expressão de HSP-72 tende a aumentar, tal como observado em nosso estudo.

No músculo gastrocnêmio, a suplementação com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, dispostos na forma livre se mostrou eficaz em induzir aumento significativo na ordem de 41,9% e 23,8% na expressão citoplasmática de HSP-72, naquele tecido, na comparação com os grupos suplementado com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina e controle, respectivamente. Esta mesma suplementação, também induziu aumento na ordem de 21,2%, na comparação com o grupo controle do estudo, na expressão nuclear de HSP-72, no músculo gastrocnêmio. Também no músculo gastrocnêmio, um significativo aumento (23,7%), na expressão citoplasmática de HSP-72 foi observado no grupo que recebeu a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, quando comparado ao grupo controle do estudo.

Uma aumentada expressão de HSP-72, no tecido muscular esquelético, tem sido correlacionada como fator contribuidor para a redução dos níveis plasmáticos de parâmetros indicativos de lesão muscular, como CK e MIO, pós-exercícios intensos (VENOJÄRVI *et al.*, 2007). Este papel direto da HSP-72 na proteção do músculo esquelético tem sido demonstrado, tanto *in vitro* quanto em modelos animais (MARBER *et al.*, 1995). De acordo com Samelnan (2000), animais geneticamente modificados, a fim de super expressarem HSP-72, demonstraram 63% menos deficiência na produção de força, quando comparados a animais normais, o que evidencia que uma maior expressão de HSP-72 atenua a deficiência na produção de força muscular, em resposta a lesões as fibras musculares durante exercícios físicos. Com base nestes estudos, bem como em nossos resultados, inferimos que a maior expressão muscular de HSP-72, observada, nos animais dos grupos DIP e GLN+ALA, principalmente, também tenha contribuído para a proteção a lesões às fibras musculares, durante o exercício físico, fato que, por consequência

contribuiu, significativamente, para a redução dos níveis plasmáticos de CK e MIO, como, igualmente observado nos animais suplementados.

A suplementação com L-glutamina na forma livre ou com dipeptídeos contendo este aminoácido, tais como o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, também tem demonstrado induzir significativo aumento na expressão de HSP-72, no fígado, sobretudo em situações de estresse fisiológico como sepse, lesão pulmonar, entre outras injúrias (HAYASHI *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2007). No presente trabalho, observamos aumento de 26,5% e 30,1% na expressão citoplasmática hepática de HSP-72, no grupo DIP, quando comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente. O grupo DIP, também apresentou expressão nuclear de HSP-72, 29% e 48,4% superior, se comparado aos grupos GLN+ALA e CONTR, respectivamente. Já quando comparado ao grupo controle do estudo, o grupo GLN+ALA apresentou aumento na ordem de 27,5% na expressão hepática nuclear de HSP-72, o que inferimos ser reflexo de uma aumentada mobilização de HSP-72 do citoplasma para o núcleo celular, fato que justificaria a menor expressão citoplasmática desta proteína de choque térmico, como observado.

Nossos resultados em relação à expressão citoplasmática e nuclear de HSP-72 se assemelham aos de outros estudos, os quais evidenciaram aumentos na expressão desta HSP, após a administração de glutamina tanto *in vivo* tanto *in vitro* (CHOW; ZHANG, 1998; WISCHMEYER *et al.*, 2003; ROPELESKI *et al.*, 2005). Não obstante, tais achados são de considerável importância, se assumirmos que uma das principais funções da HSP-72, no citoplasma da célula, é agir como chaperona em nível molecular (HIGHTOWER, 1991; HARTL, 1996; MENG e HARKEN, 2002), mantendo a homeostase celular, enquanto que no núcleo, esta HSP desempenha

importante proteção contra diversos estresses a célula, auxiliando sistemas vitais a mesma, incluindo o sistema de defesa antioxidante, como o da GSH (WELCH e FERAMISCO, 1984; VELAZQUEZ e LINDQUIST, 1984; ELLIS, KILLENDER e ANDERSON, 2000; SMOLKA *et al.*, 2000; COWAN, DIAMOND, e WELCH, 2003). Deste modo, baseados em nossos resultados, inferimos que a maior expressão de HSP-72, observada no presente estudo, contribuiu significativamente, para a proteção celular, frente às ações deletérias advindas da maior síntese de ERO, induzida pelo exercício físico, sobretudo nos grupos suplementados.

A partir da média aritmética da soma do volume de expressão citoplasmática e nuclear das suas formas constitutiva (HSP-73) e indizível (HSP-72), nos foi possível avaliar a hipótese das suplementações, empregadas neste estudo, exercer influência sobre a expressão citoplasmática e nuclear de HSP-70, no tecido muscular esquelético (músculos sóleo e gastrocnêmio) e hepático. Nossos resultados indicam que a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina mostrou-se eficiente em promover aumento da expressão hepática de HSP-70, no citoplasma celular, na ordem de 26% e 30,1%, na comparação com o grupo CONTR e GLN+ALA, respectivamente. Resultado semelhante também foi observado no músculo sóleo (aumento de 21,2% e 34,6%, quando comparado aos grupos CONTR e GLN+ALA, respectivamente). Estes achados vão ao encontro aos observados anteriormente e realmente sugerem que o DIP, de alguma forma, induziu uma situação de estresse no músculo sóleo, situação esta que se refletiu num aumento da mobilização de HSP-73 do citoplasma para o núcleo celular, paralelamente a um incremento na expressão de HSP-72.

A suplementação com L-glutamina na forma de dipeptídeo, também se demonstrou eficaz em induzir aumento da expressão nuclear hepática de HSP-70, na comparação com o grupo controle do estudo, o qual, por sua vez apresentou expressão citoplasmática de HSP-70, no músculo sóleo, 17% superior, quando comparado ao grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre.

No músculo gastrocnêmio, observamos que tanto a suplementação com os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma de dipeptídeo, quanto na forma livre, mostraram-se eficientes em induzir aumento da expressão citoplasmática de HSP-70, naquele tecido. Entretanto, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada em relação à expressão nuclear de HSP-70 naquele tecido. Tal achado pode ser atribuído, entre outros fatores, ao fato de que sob condições de elevada síntese de ERO, tal como exercícios físicos intensos e prolongados, ocorre a formação de um dissulfeto de HSPs, intermolecular, a partir da junção da HSP-70 (HSP-73 + HSP-72), com a HSP de 90 kDa (HSP-90) (MURLASITS *et al.*, 2006). Os mecanismos de formação deste dissulfeto de HSP-70, ainda encontram-se quase que totalmente desconhecidos. No entanto, estudos têm correlacionado tal fato, a uma exacerbação na síntese de moléculas pró-oxidantes, fato que, por sua vez, leva a uma aumentada necessidade, por parte da célula, de ter que exportar HSP-70, sobretudo HSP-72, para o meio extracelular, a fim de que esta, agindo como chaperona molecular, se contraponha a um possível aumento na agregação e acumulação de proteínas lesadas, nos meios intra e extracelular, em resposta a sobrecarga de trabalho físico (SAMELMAN, 2000; MURLASITS *et al.*, 2006; VENOJÄRVI *et al.*, 2007; OGURA *et al.*, 2008; STRAY *et al.*, 2008). Esta informação é de considerável significado, devido ao fato do músculo gastrocnêmio, ser

relativamente menos adaptado, em relação a outros tecidos, tal como o músculo sóleo, em termos de proteção antioxidante.

Outra hipótese para este resultado estaria vinculada ao fato de que sob condições de estresse fisiológico, ocorre um significativo aumento da necessidade das células, de garantir o correto dobramento e remodelamento de proteínas intracelulares, fato que reduz a capacidade da célula de translocar HSP-70, seja sua forma constitutiva (HSP-73) ou, principalmente, sua forma induzível (HSP-72), para o interior do núcleo celular (D`SOUZA e BROWN, 1998).

Apesar dos mecanismos intra e extracelulares que modulam a expressão das HSPs se constituírem num processo de múltiplas etapas e ainda encontrarem-se um tanto quanto desconhecidos, boa parte deste efeito modulador exercido pela glutamina, sobre o aumento da expressão destas proteínas, segundo diversos estudos, pode ser atribuída a uma semelhante modulação exercida por este aminoácido, sobre a ativação, transcrição e subsequente expressão dos fatores transicionais de choque térmico, comunmente conhecidos como HSFs (MORRISON *et al.*, 2006; PENG *et al.* 2006). Neste contexto, o fator transcricional de choque térmico-1 (HSF-1) é apontado como principal responsável por mediar uma resposta de estresse, por parte da célula, induzindo, a partir deste evento, uma maior síntese de HSPs (GABAI e SHERMAN, 2002; ATALAY *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* têm observado que um aumento na concentração de glutamina leva tanto ao aumento da expressão, quanto da ligação de homotrímeros ativos do HSF-1 aos elementos de choque térmico (HSEs), e destes à região promotora dos genes das HSPs, fato que modula o processo de tradução e expressão destas proteínas de choque térmico (MORRISON *et al.*, 2006; PENG *et al.* 2006).

A análise da expressão citoplasmática e nuclear de HSF-1, na sua forma fosforilada (HSF-1F) e não fosforilada (HSF-1NF), no tecido hepático e muscular esquelético, permitiu-nos testar a hipótese de que uma maior disponibilidade de glutamina como observado nestes tecidos, em nosso estudo, pudesse influenciar a expressão deste fator transcricional, tanto no citoplasma quanto no núcleo celular. Nossos resultados indicam que os animais do grupo GLN+ALA apresentaram expressão citoplasmática de HSF-1NF, no músculo sóleo, 47,4% e 36,8% superior em comparação aos animais do grupo CONTR e DIP, respectivamente. Também no músculo sóleo, tanto a suplementação com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina na forma livre e, principalmente, com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina mostraram-se eficientes em promover aumento da expressão citoplasmática de HSF-1F, naquele tecido, na comparação com o grupo controle do estudo. A expressão nuclear de HSF-1 na sua forma fosforilada e não fosforilada, também foi analisada no músculo sóleo. Observamos que tanto a suplementação com L-glutamina e L-alanina, na forma livre quanto na de dipeptídeo induziu aumento na expressão nuclear deste fator transcricional, seja na sua forma fosforilada ou não.

No músculo gastrocnêmio, a análise da expressão de HSF-1 no citoplasma e núcleo celular, indicou que o grupo DIP apresentou expressão citoplasmática de HSF-1NF, consideravelmente inferior, se comparado aos grupos GLN+ALA e CONTR, respectivamente. No entanto, também no músculo gastrocnêmio, observou-se um significativo aumento da expressão nuclear de HSF-1NF, no grupo DIP. Tal achado nos leva a pensar, que a menor expressão citoplasmática deste fator transcricional, na sua forma não fosforilada, no grupo DIP, tenha se dado por conta de uma aumentada translocação de HSF-1NF, induzida pelo tratamento com DIP,

para o interior do núcleo celular, ou então que o tratamento com o DIP tenha atuado, preponderantemente, induzindo aumento da expressão de HSF-1 fosforilado, fato que é confirmado parcialmente, por nossos resultados, haja vista que observamos aumento de 25,4% e 18,7% nos grupos GLN+ALA e DIP, respectivamente, na expressão nuclear de HSF-1F, no músculo gastrocnêmio, quando comparados ao grupo controle do estudo.

A utilização do dipeptídeo, também se mostrou eficiente em induzir aumento da expressão citoplasmática hepática de HSF-1NF, na ordem de 34% e 83%, quando comparado ao grupo GLN+ALA e controle, respectivamente. Entretanto, ficou evidente uma vez mais, que a suplementação com DIP agiu, quase que preponderantemente, induzindo um aumento da expressão da forma fosforilada do HSF-1, uma vez que, observou-se aumento na ordem de 6,6% e 69% na expressão hepática, citoplasmática, de HSF-1F, e de 63,5% e 60,8%, na expressão hepática nuclear de HSF-1F, no grupo DIP, se comparado ao grupo suplementado com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre e controle, respectivamente. De forma parcial, resultados semelhantes também foram observados com a utilização da suplementação com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, ambos na forma livre, a qual induziu aumento na ordem de 74,1% e 66,5% na expressão hepática, citoplasmática, de HSF-1NF e HSF-1F, respectivamente, na comparação com o grupo controle do estudo.

Com base nestes resultados, inferimos que a maior disponibilidade de glutamina as células, como observado no tecido muscular esquelético e hepático, nos grupos DIP e GLN+ALA mediou aumento da ativação, fosforilação, translocação nuclear e ligação dos homotrímeros ativos do HSF-1 aos HSEs, e destes à região

promotora dos genes das HSPs, junto à dupla fita de DNA, fato que cremos ter repercutido no aumento da expressão citoplasmática e nuclear de HSP-73, HSP-72 e HSP-70, observado no presente estudo.

É fato conhecido que na maioria dos mamíferos, quase toda a glutamina oriunda da dieta é metabolizada pelos enterócitos, no intestino delgado e, assim, não chega intacta a circulação (WATFORD e REEDS, 2003). Tal fato faz com que, o *pool* de glutamina para a circulação seja quase que essencialmente garantido pela síntese *de novo* deste aminoácido, fato que se dá por meio da reação catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS), a qual se configura na única enzima capaz de sintetizar glutamina *de novo*, em mamíferos (LABOW *et al.*, 1999; MANSO FILHO *et al.*, 2008).

Ainda são escassos os estudos que relacionam uma maior disponibilidade de glutamina ao organismo, com aumentos na expressão da enzima GS. Deste modo, no presente estudo, testamos a hipótese de uma maior disponibilidade de glutamina as células, advinda da suplementação com L-glutamina na forma livre, ou na de dipeptídeo exercer influência sobre a expressão gênica da enzima GS, no fígado e nos músculos sóleo e gastrocnêmio.

No fígado, observamos que tanto os grupos suplementados com a solução contendo os aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre, quanto com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina apresentaram aumento, na ordem de 38,6% e 31%, respectivamente, na expressão hepática da enzima GS, na comparação com o grupo controle do estudo. Já no sóleo, observamos que a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, promoveu aumento na ordem de 40,8% e 46,7%, na expressão desta enzima, quando comparado aos grupos suplementado como os

aminoácidos L-glutamina e L-alanina, na forma livre e controle. Esse achado faz supor que, de alguma forma, o tratamento com DIP, tenha causado estresse sobre as células musculares e hepáticas, fato que inferimos ter ocorrido por meio de uma reduzida oferta de glutamina livre, sobretudo para o músculo esquelético, o que supomos ter originado um desequilíbrio homeostático nestas células. Entretanto, cabe ressaltar que nossos resultados indicam aparentemente, que a glutamina está sendo utilizada para a síntese de GSH. Assim, como a oferta de glutamina está significativamente aumentada, tanto na corrente sanguínea, quanto de forma tecidual, tal fato pode estar aumentando o fluxo deste aminoácido para a enzima γ -glutamil-cisteína sintetase, de forma considerável. Como esta enzima trabalha, fisiologicamente, bastante fora do equilíbrio (SILVEIRA *et al.*, 2007), quando há um maior aporte de substrato (glutamato a partir da glutamina), a γ -glutamil-cisteína sintetase tem sua velocidade bastante aumenta, haja vista, passar a consumir mais glutamato do que originalmente. Isso pode ter contribuído de uma forma, mecanisticamente, ainda desconhecida, para a depleção os estoque de glutamina livres, fato que, inferimos também ter se refletido no aumento na expressão e concomitante translocação de HSP-73 para o núcleo, o que claramente evidencia uma situação de estresse celular.

No músculo gastrocnêmio verificou-se que os animais do grupo GLN+ALA apresentaram aumento na ordem de 36% e 26,5%, na expressão da enzima GS naquele tecido, quando comparados aos animais dos grupos DIP e CONTR, respectivamente. A partir destes resultados, vemos que a hipótese de estresse por desequilíbrio homeostático, levantada para o sóleo, por mobilização de glutamina pode mesmo ser verdadeira. Entretanto, no músculo no gastrocnêmio, um músuculo

de fibras menos oxidativas, a combinação de GLN+ALA, se mostrou mais eficaz em induzir exatamente o mesmo efeito observado no grupo DIP, no músculo sóleo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitem-nos concluir que a suplementação prévia por via oral com L-glutamina seja na forma livre ou como dipeptídeo, representa uma maneira eficiente de fornecimento de glutamina e glutamato para o organismo. Observou-se que tanto a administração de L-glutamina na forma livre, quanto do dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, foram capazes de promover efeitos similares tanto sobre a concentração de glutamina, quanto de glutamato. A maior disponibilidade destes aminoácidos pode atenuar a liberação de fatores indicativos de lesão muscular, induzidos pelo exercício físico e a hiperamoninemia, bem como a redução dos estoques musculares e hepáticos de GSH ou seu estado redox celular, o que inferimos estar relacionado ao fato de uma maior oferta de glutamina livre, e, principalmente glutamato, sobretudo no músculo esquelético, e à indução do aumento do fluxo deste aminoácido para a enzima γ -glutamil-cisteína sintetase, a qual utiliza glutamina, na síntese de GSH.

A aumentada oferta de glutamina, tanto tecidual, quanto plasmática, observada no presente estudo, principalmente nos grupos que receberam a suplementação com o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina, parece ter induzido considerável estresse, por meio de um mecanismo ainda desconhecido, sobre os tecidos sintetizadores de glutamina, tais como o músculo esquelético e o fígado, fato que se refletiu em uma maior expressão da enzima glutamina sintetase nestes tecidos. Ademais, os resultados deste estudo, em relação à expressão citoplasmática e nuclear de HSP-73, HSP-72 e HSP-70, no tecido muscular esquelético e hepático reforçam a hipótese de que um componente chave da proteção celular mediada pela glutamina seja uma aumentada expressão de

HSPs. Deste modo, a glutamina, não só representaria importante combustível metabólico, sobretudo durante períodos de estresse fisiológico, mas também uma molécula sinalizadora, capaz de disparar sinais de estresse, via aumento da expressão de HSF-1 fosforilado ou não, tanto no citoplasma, quanto no núcleo celular, sinais estes que seriam interpretados como uma necessidade de ativação de vias de proteção celular, tais como a via da HSP-70. Desta forma, a utilização de uma combinação de L-glutamina e L-alanina livre, em quantidades iguais às do dipeptídeo (1,49g/Kg/dia) também representa uma alternativa vantajosa de suplementação. No entanto, cabe ressaltar que outros estudos com este modelo de suplementação também devem ser realizados considerando outras situações catabólicas, no intuito de atenuar seus efeitos indesejados.

8. REFERÊNCIAS

ABILÉS, J.; MORENO-TORRES, R.; MORATALLA, G.; CASTAÑO, J.; PÉREZ ABÚD, R.; MUDARRA, A.; MACHADO, M.J.; PLANELLS, E.; PÉREZ DE LA CRUZ, A. Efectos de la suplementación con glutamina sobre el sistema antioxidante y la peroxidación lipídica en pacientes críticos con nutrición parenteral. **Nutrición Hospitalaria**, v.23, p.332-339, 2008.

ADIBI, S.M. 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-G788, 2003.

ADIBI, S.M.; 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.

AHN, S.G.; THIELE D. Redox regulation of mammalian heat shock 1 is essential for HSP gene activation and protection from stress. **Genes Development**, v.17, p. 516-528, 2003.

AL MEHDI, A.B., DODIA, C., JAIN, M.K., FISHER, A. B. A phospholipase A₂ inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1166, p.56-62, 1993.

ALESSIO, H.M.; GOLDFARB, A.H.; CUTLER, R.G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. **American Journal of Physiology**, v. 255, p. C874-C877, 1988.

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

ANTUNES NETO, J. M F.; PEREIRA DA SILVA, L.; MACEDO, D. V. Proteínas de estresse “HSP70” atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos Wistar submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. **Brazilian Journal of Biomotricity**, v. 2, p. 160-175, 2008.

ANTUNES NETO, J. M F.; TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C.; PEREIRA-DA-SILVA, L, MACEDO, D. V. Circulating leukocyte heat shock protein 70(HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. **Stress**, v. 9, p. 107–115, 2006.

ASCENSÃO, A.; REBELO, A.; OLIVEIRA, E.; MARQUES, F.; PEREIRA, L.; MAGALHÃES, J. Biochemical impacto f a soccer match – analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 841-851, 2008.

ATALAY, M.; OKSALA, N.K.J.; LAAKSONEN, D. E.; KHANNA, S.; NAKAO, C.; LAPPALAINEN, J.; ROY, S.; HÄNNINEN, O.; SEN, C. K. Exercise training modulate heat shock protein response in diabetes. **Journal Applied Physiology**, v. 97, p. 605-611, 2004.

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.

BAKER, J.S.; BAILEY, D.M.; YOUNG, D.H.I.; DAVIES, B. Metabolic implications of resistive force selection for oxidative stress and makers of muscle damage during 30 s of high-intensity exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.92, p. 321-327, 2004.

BARBER, A.D., HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmacology**, v.34, n.9, p.26-35, 1994.

BEJMA, J.; JI, L. L. Ageing and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **Journal Applied Physiology**, v. 87, p. 465-470, 1999.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal Food Science Nutritional**, v.47, p.233-261, 1996.

BERGSTRÖM, J.; FURST, P.; NORRE, L.O.; VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **Journal 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.

BINDOLLI, A. Lipid peroxidation in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 5, p. 247-261, 1988.

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

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 Applied Physiology**, v. 86, p. 1770-1777, 1999.

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.

BRENNAN, .; 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 clonal pancreatic beta-cell line. **Diabetologia**, v. 46, p. 1512-1521, 2003.

BRÖER S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal Epithelia. **Physiology Review**, v. 88, p. 249-286, 2008.

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.

BURG, M. B.; FERRARIS, J. D.; DMITRIEVA, N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological Reviews**, v.87, p.1441-1474, 2007.

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

CASTELL, L.; NEWSHOLME, E.A. The effect of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition.**, v. 13, p. 738-842, 1997.

CASTELL, L.; POORTMANS, J.R.; LECLECQ, R.; BRASSEUR, M.; DUCHATEAU, J.; NEWSHOLME, E.A. Some aspectos 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.

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

CHILD, R. B.; WILKINSON, D.M.; FALLOWFIELD, J. L.; DONNELLY, A. E. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. **Medicine Science in Sports and Exercise**, v. 30, p. 1603-1607, 1998.

CHONG, K.Y.; TERLECKY, S.; PLANT, C.; DICE, J. Stable overexpression of the constitutive form of heat shock protein 70 confers oxidative protection. **Journal Molecular Cell Cardiology**, v. 30, p. 599-608, 1998.

CHOW, A.; ZHANG, R. Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. **Journal Nutrition**, v. 128, p. 1296-1301, 1998.

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. **Americam 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.

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

COWAN, K. J.; DIAMOND, M. I.; WELCH, W. J. Polyglutamine protein aggregation and toxicity are linked to the cellular stress response. **Human Molecular Genetics**, v.12, p. 1377–1391, 2003.

CRAIG, E. A. The heat shock response. **Critical Reviews in Biochemistry**,v.18, p. 239-280, 1985.

CRUZAT, V.F.; PETRY, É.R.; TIRAPEGUI, J.O. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, p. 392-397, 2009.

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

CRUZAT, V.F.; TIRAPEGUI, J.O. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition**, v. 25, p. 428-435, 2009.

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

CURI, R.; LAGRANHA, C.J.; DOI, S.O.; 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, 2005.

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.

D'SOUZA, S.M.; BROWN, I.R. Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of rat during postnatal development. **Cell Stress & Chaperones**, v. 3, p. 188-199, 1998.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, p. 601-623, 2006.

DAS, S.; MAHAPATRA, S.K.; GAUTAM, N.; DAS, A.; ROY, S. Oxidative stress in lymphocytes, neutrophils, and serum of oral cavity cancer patients: modulatory array of L-glutamine. **Supportive Care in Cancer**, v. 15, p.1399–1405, 2007.

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.

DI PASQUALE, M.G. Amino acids and proteins for the athlete – the ababolic edge. 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.

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 Cell Function. **Physiological Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

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 reponse of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-Glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 218, p. 607-616, 1956.

ELLIS, S.; KILLENDER, M.; ANDERSON, R. L. Heat-induced alterations in the localization of HSP72 and HSP73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 48, p.321-332, 2000.

FEBBRAIO, M. A.; OTT, P.; NIELSEN, H. B.; STEENSBERG, A.; KELLER, C.; KRUSTRUP, P.; SECHER, N. H.; PEDERSEN, B. K. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. **Journal of Physiology**, v. 544.3, pp. 957–962, 2002.

FEHRENBACH, E.; NIESS, A.M.; SCHLOTZ, E.; PASSEK, F.; DICKHUTH, H.; NORTHOFF, H. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. **Journal Applied Physiology**, v. 89, p. 704-710, 2000a.

FEHRENBACH, E.; PASSEK, F.; NIESS, A.M.; POHLA, H.; WEINSTOCK, C.; DICKHUTH, H.; NORTHOFF, H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. **Medicine Science and Sports Exercise**, v. 32, p. 592-600, 2000b.

FEIGE, U.; POLLA, B.S. Heat shock proteins: the hsp 70 family. **Experientia**, v. 50, 979-986, 1994.

FILLMANN H.; KRETZMANN, N. A.; SAN-MIGUEL, B.; LLESUY, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUÑÓN, M. J. Glutamine inhibits over-expression of pro inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. **Toxicology**, v. 236, p. 217–226, 2007.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress. Relationship with exercise and training. **Sports Medicine**, v. 4, n. 36, p. 327-358, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

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.

FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de Absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. Controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 36, n. 4, p. 227-237, 1999.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

GABAI, V.L.; SHERMAN, M.Y. Molecular Biology of Thermoregulation. Invited Review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal Applied Physiology**, v. 92, p. 1743-1748, 2002.

GANAPATHY, V.; BRADSCH, 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, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology Medicine**, v.7, p.65-86, 1989.

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

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA, G.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v.53, p. 169-180, 1999.

GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355, p. 33-45, 1992.

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.

GONZALES, S.; POLIZIO, A.H.; ERARIO, M.A.; TOMARO, M.L. Glutamine is highly effective in preventing in vivo cobalt-induced oxidative stress in rat liver. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 3533-3538, 2005.

GRAHAM, T. E.; TURCOTTE, L. P.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Effect of endurance training on ammonia and amino acid metabolism in humans. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 29, p. 646 - 53, 1997.

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.

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.

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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3a ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p.571–579, 1996.

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.

HELLSTEN, Y.; FRANSEN, U.; ORTHENBLAND, 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.

HERNANDO, R.; MANSO, R. Muscle fiber stress in response to exercise. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 460-467, 1997.

HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, p. 191–197, 1991.

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

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.

HORTOBÁGYI T.; HOUMARD, J.; FRASER, D.; DUDEK, R.; LAMBERT, J.; TRACY, J. Normal forces and myofibrillar disruption after repeated eccentric exercise. **Journal Applied Physiology**, v. 84, p. 492-498, 1998.

HSIEH, R.J, KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Advances in food and nutrition research**, v.33, p.233-341,1989.

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

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.

JAVID, B.; MACARY, P. A.; LEHNER, P. J. Structure and function: heat shock proteins and adaptative immunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, p.2035-2040, 2007.

JENKINS, R.R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. **Sports Medicine**, v. 5, p. 156-170, 1988.

JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A.H. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. **Medicine Science and Sports Exercise**, v. 25, p. 210-212, 1993.

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

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

JOHNSON, J.D.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal Leukocyte Biology**, v. 79, p. 425-434, 2006.

KANTER, M.M.; LESMES, G.R.; KAMINSKY, L.A.; HAM-SAEGER, J.L.; NEQUIN, N.D. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. **European Journal Applied Physiology**, v. 57, p. 60-63, 1988.

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.1621, p. 5-18, 1995.

KINGSLEY, M.I.; WADSWORTH, D.; KILDUFF, L.P.; MCENENY, J.; BENTON, D. Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent reunning. **Medicine Science and Sports Exercise**, v. 37, p. 1300-1306, 2005.

KLASSEN, P.; MAZARIEGOS, M.; SOLOMNS, 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.

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.

KRETZMANN, N. A.; FILLMANN, H.; MAURIZ, J.L.; MARRONI, C.A.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. TUÑÓN, M.J. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa b and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, p. 1504-1513, 2008.

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 Applied Physiology**, v. 91, p. 832-838, 2001a.

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, 2001b.

KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, p.1137-1139, 1998.

KUKREJA, R.C. KONTOS, M. C.; LOESSER, K. E.; BATRA, S. K.; QIAN, Y. Z.; GBUR, C. J.; NASSEN, S. A.; JESSE, R. L.; HESS, M. L. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. **The American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, p.2213-2219, 1994.

LABOW, B.I.; SOUBA, W.W.; ABCOUWER, S.F. Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. 1136-1145, 1999.

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.

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

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.

LEEUWENBURGH 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.

LEHAMANN, M.; HUONKER, M.; DIMEO, F.; HEINZ, N.; GASTMANN, U.; TREIS, N.; STENACKER, J.M.; KEUL, J.; KAJEWSKI, R.; HAUSSINGER, D. Serum amino acid concentrations in nine athletes before and after the 1993 Colmar Ultra Triathlon. **International Journal Sports Medicine**, v. 16, p. 155-159, 1995.

LEHNINGER, ALBERT L.; NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. **Princípios de bioquímica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

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

LIBONI, K.C.; LI, N.; SCUMPIA, P.O.; NEU, J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through I κ B/NF- κ B in human fetal and adult intestinal epithelium. **Journal Nutrition**, v. 135, p. 245-251, 2005.

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.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p.1151-1191, 1986.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v.22, p.631-677,1988.

LIU, J.; YEO, H.C.; OVERVIK-DOUKI, E.; 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 Applied Physiology**, v. 89, p. 21-28, 2000.

LOCKE, M. Overview of stress response. In: LOCKE, M.; NOBLE, E. G. **Exercise and Stress Response: the role of stress proteins**. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 1-12.

LOCKE, M.; NOBLE, E. G.; ATKINSON, B. G. Exercising mammals synthesize stress proteins. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. C723-C729, 1992.

LOVLIN, R.; COTTLE, W.; PYKE, I.; KAVANAGH, M.; BELCASTRO, A.N. Are indices of free radical damage related to exercise intensity. **European Journal Applied Physiology**, v. 56, p. 313-316, 1987.

LOWRY, O.H.; ROSEBWOUGH, 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: BERGMEYER, H. U. (Eds). **Methods of Enzymatic Analysis**, London: Academic Press, p. 357-363, 1985.

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

MACHEFER, G.; GROUSSARD, C.; RANNOU-BEKONO, F.; ZOUHAL, H.; FAURE, H.; VICENT, S.; CILARD, J.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Extreme running competition decreases blood antioxidant defense capacity. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, p. 358-364, 2004.

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.

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

MARBER, M.S.; MESTRIL, R.; CHI, S.; SAYEN, M.R.; YELLON, D.M.; DILLMANN, W.H. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 1446-1458, 1995.

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, 2004.

McBRIDE, J. M. et. al. The effect of resistance exercise on free radical production. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, p.67-72, 1998.

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

MENG, X.; HARKEN, A. H. The interaction between Hsp70 and TNF-expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against postinjury depression. **Shock**, v. 17, p. 345-353. 2002.

MILNE, K.J.; THORP, D.B.; MELLING, C.W.J.; NOBLE, E.G. Castration inhibits exercise-induced accumulation of HSP70 in male rodent hearts. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, p. H1610-H1616, 2006.

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

MORA, L. DE OLIVEIRA; ANTUNES, L.M.G.; FRANCESCATO, H. DELLA COLETTA.; BIANCHI, M. DE LOURDES P. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 517–522, 2003.

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 Clinical Nutrition**, v. 61, p. 443-460, 2007.

MORIGUCHI, S.; MIWA H.; KISHINO, Y. Glutamine supplementation prevents the decrease of mitogen response after a treadmill exercise in rats. **Journal of Nutrition and Vitaminology**, v. 41, p. 115-125, 1995.

MORIMOTO, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. **Science**, v. 259, p. 1409-1410, 1993.

MORRISON, A.L.; DINGES, M.; SINGLETON, K.D.; ODIMS, K.; WONG, H.R.; WISCHMEYER, P.E. Glutamine's protection against cellular injury is dependent on heat shock factor-1. **American Journal Physiology. Cell Physiology**, v. 290, p. C1625-C1632, 2006.

MURLASITS, Z.; CUTLIP, R.G.; GERONILL, K.B.; RAO, K.M.K.; WONDERLIN, W.F.; ALWAYS, S.E. Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 398-406, 2006.

NAKA, S.; SAITO, H.; HASHIGUCHI, Y.; LIN, M.T.; FURUKAWA, S.; INABA, T.; FUKUSHIMA, R.; WADA, N.; MUTO, T. Alanyl-glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. **Journal Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 20, p. 417-423, 1996.

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

NEUBAUER, O.; KÖNING, D.; WAGNER, K-H. Recovery after an ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. **European Journal Applied Physiology**, v. 104, p. 417-426, 2008.

NEUPERT, W.; HARTL, F. U.; CRAIG, E. A. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? **Cell**, v. 63, p. 447-450, 1990.

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

NIKOLAIDIS, M.G.; JAMURTAS, A.Z.; PASCHALIS, V.; KOSTAROPOULOS, I.A.; KLADI-SKANDALI, A.; BALAMITSI, V.; KOUTEDAKIS, Y.; KOURETAS, D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. **Medicine Science, Sports and Exercise**, v. 38, p. 1443-1450, 2006.

NOBREGA, 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.

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

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.; STEENBERG, 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.

OGURA, Y.; NAITO, H.; AKIN, S.; ICHINOSEKI-SEKINE, N.; KUROSAKA, M.; KAKIGI, R.; SUGIURA, T.; POWERS, S.K.; KATAMOTO, S.; DENIREL, H. Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, p. R1600-R1607, 2008.

PARRY-BILLINGS, M.; BUDGETT, R.; KOUTEDAKIS, Y.; BLOMSTRAND, E.; BROOKS, S.; WILLIAMS, C.; CALDER, P.C.; PILLING, S.; BAIGRIE, R.; NEWSHOLME, E.A. Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. **Medicine Science, Sports and Exercise**, v. 24, p. 1353-1358, 1992.

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.

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

PARSELL, D.A.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of Genetics**, v.27, p. 437-496, 1993.

PENG, Z.Y.; SERKOVA, N.J.;KOMINSKY, D.J.; BROWN, J.L.; WISCHEMEYER, P.E. Glutamine-mediated attenuation of cellular metabolic dysfunction and cell death after injury is dependent on heat shock factor-1 expression. **Journal Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 30, p. 373-379, 2006.

PINEL, C.; COXAN, 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.

PIRKKALA, L.; NYKANEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the shock response and beyond. **FASEB. Journal**, v. 15, p. 1118-1131, 2001.

PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, n.4, p.277-290, 1995.

PRABHU, R.; THOMAS, S.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Oral glutamine attenuates surgical manipulation-induced alterations in the intestinal brush border membrane. **Journal of Surgical Research**, v. 115, p. 148–156, 2003.

PRADA, F.J.A.; VOLTARELLI, F.A.; OLIVEIRA, C.A.M.; GOBATTO, C.A.; MACEDO, D. V.; MELLO, M. A. R. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 12, p. 29-34, 2004.

PREM, J. T.; EPPINGER, M.; LEMMON, G.; MILLER, S.; NOLAN, D.; PEOPLES, J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. **The American Journal of Surgery**, v. 178, p. 147-150, 1999.

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.

RÁDAK, 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.

RATCLIFF, C.R., HALL, F.F. Blood ammonia returns to the laboratory. In: FAULKNER, W.R.; MEITES, S., eds. **Selected methods of clinical chemistry**. Washington: American Association of Clinical Chemistry, 1982, v.9, p. 85.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., 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.

REINNIE, 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.

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

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

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 glutamine, atividade física e sistema imune. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, p. 202-212, 2000.

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

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.

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.; PEDERESSEN, B. K. Competitive sustained exercise in humans, lymphokine activated killer cell activity, and glutamine-na intervention study. **European Journal Applied Physiology and Occupation Physiology**, v.78, p. 261-270, 1998.

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, 217-221, 2002.

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

RUTTEN, E.P.A.; ENGELEN, M.P.K.J.; SCHOLS, A.M.W.J.; DEUTZ, N.E.P. 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. Tricarboxylic acid cycle intermitentes in human muscle during prolonged exercise. **American Journal Physiology**, v. 259, p. C834-C841, 1990.

SAMELMAN, T.R. Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. **Experimental Physiology**, v. 85, p. 97-102, 2000.

SANDRES, M.M.; KON, C. Glutamine is a powerfull effector of heat shock protein expression in drosophila Kc cells. **American Journal Physiology. Cell Physiology**, v. 146, p.180- 191, 1991.

SANTORO, M.G.; GARACI, E.; AMICI, C. Prostaglandins with antiproliferative activity induce the synthesis of a heat shock protein in human cells. **Proceedings of the National Academic for Sciencie**, v. 86, p. 8407-84011, 1989.

SANTOS, R.V.T.; 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 Sciencies**, v. 75, p. 1917-1924, 2004.

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

SCHETT, G.; REDLICH, K.; XU, Q.; BIZAN, P.; GRÖGER, M.; TOHIDAST-AKRAD, M.; KIENER, H.; SMOLEN, J.; STEINER, G. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. **Journal Clinical Investigation**, v. 102, p. 302-311, 1998.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, p. 308-313, 2004.

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.; KRISTIENSEN, N.; LESSINGER, J.M.; SCHIMMEL, H.G.; VIALLE, A.; WEIDEMANN, G.; SIEKMANN, L. IFCC primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degreesC. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 635-642, 2002.

SEN, C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. **Journal Applied 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.

SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Review Nutrition**, v. 5, p. 365-390, 1985.

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.

SIDO, B.; SEEL, C.; HOCHLEHNERT, A.; BREITKREUTZ, R.; DRÖGE, W. Low intestinal glutamine level and low glutaminase activity in Crohn's Disease: a rationale for glutamine supplementation?. **Digestive Diseases Sciences**, v. 51, p. 2170-2179, 2006.

SIGRIST-NELSON, K.; MURER, H.; HOPFER, U. Active alanine transport in isolated brush border Membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.5674-5680, 1975.

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

SIMPSON, R.J.; WILSON, M.R.; BLACK, J.R.; ROSS, J.A.; WHYTE, G.P.; GUY, K.; 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.

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Schock**, v. 24, n.6, p. 583-589, 2005.

SINGLETON, K.D.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **American Journal of Physiology. Regulatory. Integral. Comportament. Physiology**, v.292, p.1839-1845, 2007.

SMOLKA, M. B.; ZOPPI, C. C.; ALVES, A. A.; SILVEIRA, L. R.; MARANGONI, S.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, D. V. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. **American Journal of Physiology**, v. 279, p. R1539- R1545, 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.

SORICHTER, S.; MAIR, J.; KOLLER, A.; GEBERT, W.; CALZOLARI, C.; ARTNER-DWORZAK, E.; PUSCHENDORF, B. Skeletal troponin I as marker of exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, p. 1076-1082, 1997.

SORICHTER, S.; MAIR, J.; KOLLER, A.; PELSERS, M.M.A.L.; PUSCHENDORF, B.; GIATZ, J.F.C. Early assesment of exercise induced skeletal muscle injury using plasma fatty acid binding protein. **British Journal Sports Medicine**, v. 32, p. 121-124, 1998.

SPITELLER, P., SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe^{2+}/O_2 or Fe^{3+}/O_2 is used as oxidant. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1392, p.23-40, 1998.

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

STRAY, C.M.; WALSH, B.J.; KNAPP, A.E.; BRAFMAN, D.; HOGAN, M.C. Elevation in heat shock protein 72 mRNA following contractions in isolated single skeletal muscle fibers. **American Journal of Physiology. Regulatory, Intergrative and Compartive Physiology**, v.295, p. R642-R648, 2008.

STEINBERG, J.G.; BA, A.; BRÉGEON, F.; DELLIAUX, S.; JAMMES, Y. Cytokine and oxidative responses to maximal cycling exercise in sedentary subjects. **Medicine Science and Sports Exercise**, v. 39, p. 964-968, 2007.

STEINBERG, J.G.; DELLIAUX, S.; JAMMES, Y. Reability of different blood indices to explore the oxidative stress in response to maximal cycling and static exercises. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 26, p. 106-112, 2006.

STUART, R. A.; CYR, D. M.; NEUPERT, W. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. **Experimentia**, v. 50, p. 1002-1011, 1994.

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

STUPKA, N.; TARNOPOLSKY, M.A.; YARDLEY, N.J.; PHILLIPS, S.M. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1669-1678, 2001.

TANG, D.; KAMG, R.; XIAO, W.; JIANG, L.; LIU, M.; SHI, Y.; WANG, K.; WANG, H.; XIAO X. Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 7376-7384, 2007.

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.

TERLECKY, S. R. Hsp70s and lysosomal proteolysis. **Experimentia**, v. 50, p.1021-1025, 1994.

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

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.

VACA, C.E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Studies on lipid peroxidation in rat liver nuclei and isolated nuclear membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 958, p.375-387, 1998.

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. 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 II. **Nutrition**, v. 17, p. 485-486, 2001a.

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. Impact of L-glutamine on glutathione, glutamine and glutamate in 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.

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 and Endocrinology Metabolism**, v. 269, p. E309-E315, 1995.

VELAZQUEZ, J. M.; LINDQUIST, S. HSP70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. **Cell**, v. 36, p. 655-662, 1984.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 331, p. 63-68, 1996.

VENOJÄRVI, M.; KVIST, M.; JOZSA, L.; KALIMO, H.; HÄNNINEN, O.; ATALAY, M. Skeletal muscle HSP expression on response to immobilization and remobilization. **International Journal of Sports Medicine**, v.28, p. 281-286, 2007.

VOLEK, J.S. KRAEMER, W.L.; RUBIN, M.R.; GÓMEZ, A.L.; RATAMESS, N.A.; GAYNOR, P. L-carnitine L-tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress. **American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 282, p. 474-482, 2002.

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.

WAGENMAKERS, A.J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exercise Sports Science Review.**, v. 26, p. 287-314, 1998.

WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P. J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. **European Journal Applied Physiology**, v. 77, p. 434-438, 1998a.

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 Sports Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 10, p. 39-50, 2000.

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

WATFORD, M.; REEDS, P.J. Glutamate metabolism in the gut. **Forum of Nutrition**, v. 56, p. 81-82, 2003.

WELCH, W. J. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, p. 34-41, 1993.

WELCH, W. J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function. **Nature Reviews**, v. 72, p. 1063-1081, 1992.

WELCH, W. J.; FERAMISCO, J. R. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000 dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *The Journal Biological Chemistry*, v. 259, p. 4501–4513, 1984.

WERNERMAN, J.; HAMMARQVIST, F. Modulation of endogenous glutathione availability. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.2, p. 487-492, 1999.

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.

WILLOUGHBY, D.S.; VANENK, C.; TAYLOR, L. Effects of concentric and eccentric contractions on exercise-induced muscle injury, inflammation, and serum IL-6. **Journal of Exercise Physiology**, v. 6, p. 8-15, 2003.

WILMORE, J.H.; COSTILL, D.L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. São Paulo: Manole, 2001.

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

WISCHEMYER, P.E.; KAHANA, M.; WOLFSON, R.; REN, H.; MUSCH, M.M.; CHANG, E.B. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. **Shock**, v.16, p. 398-40, 2001a.

WISCHEMYER, P.E.; KAHANA, M.; WOLFSON, R.; REN, H.; MUSCH, M.M.; CHANG, E.B. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in rat. **Journal of Applied Physiology**, v.90, p. 2403-2410, 2001b.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition.**, v.18, p. 225-228,2002.

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

WISCHMEYER, P. E. Glutamine: the first clinically relevant pharmacological regulator of heat shock protein expression? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, p. 201-206, 2006.

WISCHMEYER, P.E.; MUSCH, M.W.; MADONNA, M.B.; THISTED, R.; CHANG, E.B. Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. **American Journal Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 272, p. G879-G884, 1997.

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.

YAGI, K. A. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemistry and Medicine**, v. 15, p. 212-216, 1976.

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

YANG, R.; MARTIN-HAWVER, L.; WOODAL, 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.

YOO, C.G.; LEE, S.; LEE, C.T. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilization of I κ B- α through preventing I κ B kinase activation in respiratory epithelial cells. **Journal Immunology**, v. 164, p. 5416-5420, 2000.

YORK, J.L. Enzimas: classificação, cinética e controle. In: DEVLIN, T.M.; MICHELACCI, Y.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2003, p. 364 – 402.

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 Applied Physiology**, v. 75, p. 543-548, 1997.

ZIEGLER, T. R. Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. **Journal of Nutrition**, v.131, p. 2578S-2584S, 2001.

9. ANEXOS

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

Ingredientes	g/Kg de dieta
Amido de milho	465,692
Caseína (\geq 85% de proteína)	140,000
Amido dextrinizado (90-94% de 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% de colina)	2,500
Tert-butilhistidina	0,008

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

Nutriente	(unidade/Kg de dieta)
Energia total (kcal)	3601,0
%Proteínas	14,1
%Carboidratos	75,9
%Lipídios	10,0
Umidade (g)	68,0
Cinzas (g)	38,9

Anexo 3 – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

Anexo 4 – Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)