

Efeitos do estresse agudo de contenção, do estresse crônico de natação e da administração de glutamina sobre a liberação de superóxido por macrófagos alveolares de ratos<sup>1</sup>

*Effects of acute restraint stress, chronic swim stress and glutamine administration on the release of superoxide from alveolar macrophages of rats*

Elizabeth do NASCIMENTO<sup>2</sup>

Carol Virgínia Góis LEANDRO<sup>3</sup>

Marco Antônio Fidalgo AMORIM<sup>4</sup>

América PALMEIRA<sup>5</sup>

Taisy Cavalcante FERRO<sup>6</sup>

Célia Maria Machado Barbosa de CASTRO<sup>7</sup>

Raul Manhães de CASTRO<sup>2</sup>

## RESUMO

---

### Objetivo

Avaliar a liberação de ânion superóxido por macrófagos alveolares em ratos submetidos ou não ao estresse agudo, ao exercício físico de natação e à suplementação com glutamina.

### Métodos

Quarenta e dois ratos machos da linhagem *Wistar* com idade em torno de 62 (desvio-padrão=3) dias de idade foram divididos em grupos controle, treino, estresse e glutamina. Após a intervenção, macrófagos alveolares

---

<sup>1</sup> Artigo elaborado a partir de dissertação de E. NASCIMENTO, intitulada “Efeitos da L-Glutamina ou do treinamento físico moderado sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos ou não a estresse agudo”. Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Recife; 2004

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição. Av. Nelson Chaves, s/n., Campus Universitário, 50760-901, Recife, PE, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: E. NASCIMENTO. E-mail: <nlizbeth01@hotmail.com>.

<sup>3</sup> Universidade de Pernambuco, Escola Superior de Educação Física. Recife, PE, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Educação Física. Recife, PE, Brasil.

<sup>5</sup> Fisioterapeuta. Recife, PE, Brasil.

<sup>6</sup> Nutricionista. Recife, PE, Brasil.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Medicina Tropical, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. Recife, PE, Brasil.

foram coletados e estimulados com acetato de formol miristato para a avaliação da liberação de ânion superóxido.

### Resultados

Em comparação à primeira hora (controle=26,2, desvio-padrão=4,2; treino=28,7, desvio-padrão=5,1; estresse=20,3, desvio-padrão=4,4; glutamina=26,2, desvio-padrão=4,2), houve aumento ( $p<0,001$ ) da liberação de superóxido em todos os grupos experimentais na segunda hora (controle=38,4, desvio-padrão=4,9; treino=40,7, desvio-padrão=6,1; estresse=30,2, desvio-padrão=5,6; glutamina=39,2, desvio-padrão=5,2) de observação. O treinamento e a suplementação com glutamina não provocaram diferenças na liberação de superóxido em macrófagos alveolares quando comparados ao grupo controle. Apenas nos ratos submetidos a estresse houve redução da liberação de superóxido tanto na primeira (20,3, desvio-padrão=4,4;  $p<0,05$ ) quanto na segunda hora (30,2, desvio-padrão=5,6;  $p<0,05$ ) de observação.

### Conclusão

Os achados sugerem que o estresse pode ser um dos fatores implicados na imunossupressão, uma vez que a redução da produção de ânion superóxido por macrófagos pode levar à diminuição de sua capacidade microbicida. No entanto, o protocolo de treinamento físico de natação usado e a suplementação com glutamina, na quantidade e na forma administrada, não alteraram a liberação de superóxido por macrófagos alveolares.

**Termos indexação:** macrófagos alveolares; liberação de ânion superóxido; estresse; natação; glutamina.

## ABSTRACT

### Objective

To assess the release of superoxide anion from alveolar macrophages of rats submitted or not to acute restraint stress, forced swimming and glutamine supplementation.

### Methods

Forty-two male Wistar rats aging roughly 62 days (standard deviation=3) were randomly divided into four groups: control, training, stress and glutamine. After the intervention, alveolar macrophages were collected and stimulated with phorbol myristate acetate to assess the release of superoxide anion.

### Results

When compared with the first hour (control=26.2, standard deviation=4.2; training=28.7, standard deviation=5.1; stress=20.3, standard deviation=4.4; glutamine=26.2, standard deviation=4.2), the release of superoxide increased ( $p<0.001$ ) in all experimental groups in the second hour (control=38.4, standard deviation=4.9; training=40.7, standard deviation=6.1; stress=30.2, standard deviation=5.6; glutamine=39.2, standard deviation=5.2) of observation. Training and glutamine supplementation did not induce differences in the release of superoxide from alveolar macrophages when compared with the control group. Only the rats submitted to stress showed a reduction in the release of superoxide in both the first (20.3, standard deviation=4.4;  $p<0.05$ ) and second hours (30.2, standard deviation=5.6;  $p<0.05$ ) of observation.

### Conclusion

The results suggest that stress can be one of the factors associated with immunosuppression since reduced release of superoxide anion from macrophages can lead to reduced microbicidal capacity. On the other hand, the swimming protocol we used and the amount and route of glutamine supplementation did not change the release of superoxide from alveolar macrophages.

**Indexing terms:** macrophages; alveolar; superoxide anion; stress; swimming; glutamine.

## INTRODUÇÃO

Mudanças nos estados fisiológicos podem alterar a atividade de estruturas dos sistemas nervoso, endócrino e imune. O funcionamento das

células imunes é regulado por diversas biomoléculas, como neurotransmissores, hormônios e citocinas<sup>1,2</sup>. Assim, regiões do Sistema Nervoso Central, como o hipotálamo, parecem alterar seu funcionamento frente a agentes estressores ou

ainda sob a influência de citocinas, liberadas por células imunes durante a defesa do organismo, em resposta aos agentes infecciosos<sup>3,4</sup>. Ademais, as células imunes possuem receptores para os denominados hormônios do estresse e a estes respondem<sup>1,2</sup>. Estabelece-se, assim, na maioria dos casos, um processo multidirecional de interações neuro-endócrino-imunes, sob forte influência do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).

As repercussões sofridas pelo sistema imune, originadas a curto ou longo prazo por estressores, revelam o aspecto complexo e multifacetado do problema. Foi demonstrado, previamente, que macrófagos alveolares de ratos reduzem a produção de superóxido<sup>5</sup> na seqüência do estresse agudo de contenção. De modo similar, Oishi et al.<sup>6</sup> encontraram redução da produção de superóxido por macrófagos alveolares em ratos submetidos a estresse físico de choques nas patas, aplicados de forma aguda.

Em alguns aspectos, dependendo da duração, intensidade e caráter agudo ou crônico, os exercícios físicos podem ou não estimular a resposta imune<sup>4</sup>. A resposta frente ao exercício físico depende da idade do animal, do tipo, da duração e da intensidade do esforço realizado<sup>7</sup> e do tipo celular estudado<sup>8</sup>. Neste último aspecto, as células imunes, a depender do tipo, respondem de forma diferente aos hormônios, em especial, os do estresse<sup>1</sup>. Os macrófagos parecem estar entre as células imunes mais responsivas ao exercício físico<sup>8,9</sup>.

As células imunes têm sua função alterada frente à presença ou não de determinados nutrientes, agora, conhecidos como imunonutrientes. Dentre os nutrientes com ação imunomoduladora, destaca-se a glutamina, aminoácido não essencial com diversas funções comprovadas sobre a atividade de células imunes, como os neutrófilos, os linfócitos e os macrófagos<sup>10,11</sup>. Macrófagos utilizam glutamina ativamente como substrato fundamental para a reconstituição da membrana celular durante o processo fagocítico<sup>10</sup> e a produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido<sup>11</sup>. Este agente oxidante atua na

gênese de diversas doenças, devido à sua capacidade de oxidar lipoproteínas<sup>12</sup> ou alterar a transcrição gênica<sup>13</sup>, mas, também, ataca microorganismos e/ou células infectadas, proporcionando a defesa do hospedeiro contra patógenos<sup>13-15</sup>.

Contudo, apesar de macrófagos serem células efetivas na defesa do hospedeiro, a produção desses agentes oxidantes tem sido mais extensivamente pesquisada em neutrófilos<sup>14-16</sup>. Assim, a produção de espécies reativas de oxigênio, em particular, de ânion superóxido por macrófagos alveolares, ainda constitui um campo a ser explorado. Portanto, a partir das evidências acerca da influência do exercício físico e dos imunonutrientes sobre a regulação de funções de células imunes, este estudo se propôs a avaliar a produção e liberação de ânion superóxido por macrófagos alveolares estimulados *in vitro* com PMA (acetato de formol miristato) obtidos de ratos submetidos ou não a estresse agudo, ao treinamento aquático e à suplementação com glutamina.

## MÉTODOS

Ratos machos albinos da linhagem *Wistar* da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com idade em torno de 60 dias de vida, e peso médio de 209 a 220g, foram divididos em quatro grupos: controle (C) n=10, estresse (E) n=10, treino (T) n=11 e glutamina (GLN) n=11. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (4 a 6 animais), com temperatura ambiente de  $\pm 22^{\circ}\text{C}$  e em ciclo claro/escuro de 12/12h (claro, de 6h às 18h e escuro de 18h às 6h) sem restrição de acesso a água e alimento (ração comercial). Seus pesos eram mensurados e acompanhados semanalmente. Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA).

O protocolo do treinamento físico (natação) iniciou-se com os animais em torno do 62° (DP= 3) dias de vida. Na primeira semana de protocolo, procedeu-se a adaptação dos animais ao exercício aquático, conforme o seguinte procedimento: 1° dia=10min; 2° dia=20min; 3° dia=30min; 4° dia=40min e 5° dia=45min. Subseqüentemente, os animais foram exercitados durante seis semanas consecutivas, com incremento de sobrecarga (percentual do peso corporal) atado à cauda dos animais. Os pesos de chumbo foram amarrados à cauda do animal por uma liga. Este peso correspondeu inicialmente a 1% do seu peso corporal, sendo incrementado progressivamente. Portanto, o acréscimo da sobrecarga ficou assim distribuído: 2ª semana=1%; 3ª semana=2%; 4ª semana=2%; 5ª semana=3% e 6ª semana=3%. O treinamento ocorria no horário entre 10h e 12h, cinco dias por semana, com tempo total de 45min/dia. O tanque de natação possuía um sistema de aquecimento que mantinha a temperatura da água em 31°C (DP=2°C). Para o controle do estresse aquático, animais controles permaneciam em cuba com água (10cm de profundidade) sem realizar esforço físico, por período de tempo igual ao do grupo exercitado. Após o término do período de exercício, os animais eram, cuidadosamente, secos e permaneciam em câmara de aquecimento a 32°C por cerca de 15 minutos, para evitar o estresse provocado pelo frio.

A partir dos 90 dias de idade, os animais recebiam suplementação de glutamina, administrada por via intraperitoneal na dose de 0,2g/kg/dia, diluída em água destilada, durante 10 dias, sempre no mesmo horário. Para os animais controle, era administrada glicina na proporção de 0,4g/kg/dia, de forma a manter as dietas isonitrogenadas.

Para indução de estresse (psicológico) agudo de contenção, animais não treinados e não suplementados, eram colocados em cilindro de plástico PVC, não transparente, com dimensões de 20cm de comprimento e 8cm de diâmetro, encaixado em duas outras partes formando um tubo, que mantinha os animais contidos, durante

40 minutos sobre superfície plana, longe de ruídos e outros fatores estressantes que pudessem interferir no estudo. Esses animais constituíram o grupo estresse (E).

As amostras de macrófagos eram coletadas 24 horas após o término da aplicação da glutamina ou do exercício de natação. Para os animais estressados, a coleta era realizada imediatamente após o término de indução do estresse. A obtenção do lavado broncoalveolar foi desenvolvida de acordo com a técnica de De Castro et al.<sup>12</sup>.

Os animais eram anestesiados com clorose a 0,5% e uretana a 12,5%, na proporção de 8mL/kg de peso por via intraperitoneal. Em sala climatizada, injetavam-se alíquotas de 3 a 5mL de solução de soro fisiológico (0,9% NaCl) a temperatura ambiente, através de cânula de plástico inserida na traquéia do animal. Posteriormente, fazia-se a recuperação do lavado a partir de movimentos de entrada e saída, por 3 a 5 vezes. O lavado recuperado era colocado em tubo de polipropileno (tubo Falcon) com capacidade de 50mL ficando armazenado em recipiente estéril e em banho de gelo, protegido da luz, até que se iniciasse a próxima etapa. Ao final, obtinha-se em torno de 30mL de lavado para cada animal e cerca de  $3 \times 10^6$  de macrófagos em cada lavado

### Procedimento da cultura de células

O lavado broncoalveolar recolhido era centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. Após essa etapa, as células eram ressuspensas em meio de cultura (RPMI 1640 CULTILAB) suplementado com soro fetal bovino a 3,00% (CULTILAB) e antibióticos: penicilina (100U/mL), estreptomomicina (100µg/mL), anfotericina B (0,25µg/mL) (SIGMA) para lavagem e, em seguida, as células eram contadas em Câmara de Neubauer, colocando-se a suspensão de células e o corante azul tripan a 0,05% em uma diluição de 1:10. O azul tripan é um corante vital que tem a propriedade de corar as células mortas, excluindo-as das células

vivas. Após a contagem, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 contendo soro fetal bovino a 3,00% e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100µg/mL), anfotericina B (0,25µg/mL) (SIGMA) em uma densidade de  $1 \times 10^6$  de células. Subseqüentemente, este era colocado em placas com poços de 35 mm de diâmetro (1mL/poço). Para adesão, as células foram mantidas em placa por 1 hora a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células não aderentes eram descartadas e, estando a proporção de macrófagos em torno de 95%, estas células eram incubadas por mais 1 hora em meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) com antibióticos e sem soro fetal bovino.

### Determinação da liberação de superóxido

A liberação de ânion superóxido foi induzida pelo acetato de forbol miristato (PMA-SIGMA) em solução de Hanks (HBSS, Gibco) na concentração de 2µg/mL. O ânion superóxido pode ser detectado por sua habilidade em reduzir quimicamente um composto acceptor de elétrons. Neste estudo, utilizou-se o ferrocitocromo C tipo VI do coração de cavalos (30mg/mL em HBSS a  $2,4 \times 10^{-3}$  M, SIGMA). Porém, por este acceptor não ser específico apenas para a redução do superóxido, foi necessário o uso de uma enzima específica, a superóxido dismutase (SOD), SIGMA. Assim, dois sistemas de análise descontínuos foram utilizados com avaliação a cada 1 hora, durante período de 2 horas. No primeiro sistema, a SOD obtida de eritrócitos bovinos, em concentração de 3mg/mL, foi adicionada para bloquear a produção de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e garantir a especificidade do experimento.

No segundo sistema, macrófagos alveolares eram cultivados sem a presença de SOD. Os dois sistemas eram mantidos em câmara incubadora (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C) por 10 minutos (tempo necessário para ativação da SOD). A seguir, ferrocitocromo-C era adicionado às células em meio de cultura. Subseqüentemente, alíquotas de

600 µL eram retiradas de cada sistema, colocadas em tubos eppendorf e mantidas em banho de gelo pra inibir a reação. A primeira amostra recolhida expressava o tempo "zero". Em seqüência, ao tempo anteriormente citado, amostras subseqüentes eram retiradas e o mesmo procedimento descrito era realizado.

### Determinação espectrofotométrica

Ao término da última coleta, as amostras eram levadas a microcentrifuga durante 5 minutos (25.000x g, rotor Ra Kubota) em eppendorf de 1,5mL. O sedimento era descartado e o sobrenadante era coletado com uma pipeta Pasteur e levado para determinação do grau de redução do ferrocitocromo C em cubetas de 1mL. A medida espectrofotométrica era obtida em aparelho com comprimento de onda ajustado para a faixa de vermelho (550nm).

A liberação de superóxido foi obtida pela conversão dos valores de absorbância para nanomoles de superóxido/minuto (nmols O<sub>2</sub><sup>-</sup>/min), de acordo com a fórmula  $[O] = 47,7 \times \text{valor de absorbância} \times \text{volume coletado da amostra}$ .

Os dados de liberação de superóxido em nmols O<sub>2</sub><sup>-</sup>/10<sup>6</sup>/2 células estão expressos em média e erro-padrão da média (EP). O nível de significância adotado no estudo foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Para comparação entre as médias dos grupos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA *one-way*), seguida do teste de Tukey. Para a comparação intragrupo durante as duas horas de observação, utilizou-se a Análise de Variância de medidas repetidas (ANOVA RM).

## RESULTADOS

A liberação de superóxido por macrófagos alveolares em ratos intragrupo aumentou ( $p < 0,001$ ), na segunda hora de observação em relação à primeira em cada um dos grupos estudados. Em adição, apenas os animais submetidos a estresse agudo de contenção apresentaram

redução na liberação de superóxido ( $p < 0,05$ ) por macrófagos alveolares tanto na primeira hora (C=20,3, EP=4,4; E=26,2, EP=4,2) quanto na segunda hora (30,2, EP=5,6; 38,4, EP=4,9). Quando comparado ao grupo controle, na primeira (26,2, EP=4,2) ou na segunda hora (38,4, EP=4,9), a liberação de superóxido por macrófagos alveolares no grupo treino (1º h=28,7, EP=5,1; 2º h=40,7, EP=6,1) e no grupo glutamina (1º h=26,5, EP=3,9; 2º h=39,2, EP=5,2) foi semelhante (Figura 1).

## DISCUSSÃO

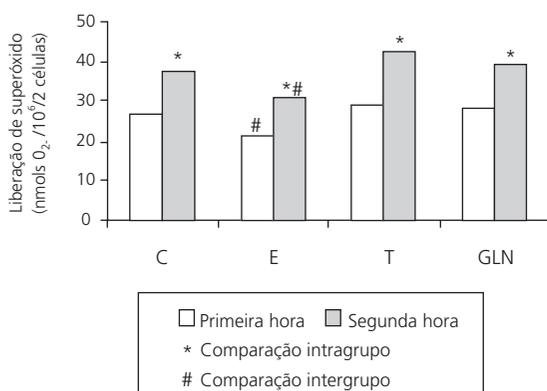
A liberação da produção de ânion superóxido em ratos manipulados, segundo o estado fisiológico, foi observada em cultura de macrófagos alveolares estimulada com PMA. De Castro et al.<sup>5</sup> observaram a cinética da liberação de superóxido por macrófagos durante o período de 24 horas. Em estudo prévio, De-Castro et al.<sup>5</sup>, em nosso laboratório, descreveram a ocorrência de progressivo aumento dessa liberação até o

período de 6 horas. Subseqüentemente, ocorreu um decréscimo de 50% do máximo em 24 horas. Em função de esta cinética ter sido realizada anteriormente pelo grupo no mesmo laboratório, considerou-se desnecessário repetir tal procedimento. Assim, optou-se por realizar o acompanhamento apenas durante duas horas. De Castro também faz parte deste estudo e realizou em nosso laboratório estudo semelhante utilizando a cinética de acompanhamento da liberação de superóxido.

No presente estudo, o estresse agudo de contenção parece ter sido a causa da redução da liberação de ânion superóxido nos macrófagos. Existem conspícuos dados na literatura de que o estresse e outras situações emocionais produzem alterações funcionais nos sistemas fisiológicos, particularmente, o nervoso, o endócrino e o imune<sup>3</sup>.

Nos macrófagos, a redução da produção de ânion superóxido em ratos estressados pode estar associada à concomitante liberação de glicocorticóides, ocorrida em condições de estresse<sup>5,17</sup>. A redução da liberação de superóxido em macrófagos encontrada neste estudo assemelha-se àquela relatada por De Castro et al.<sup>5</sup> e àquela encontrada, também, por Oshi et al.<sup>6</sup> em ratos submetidos ou a estresse físico agudo ou a estresse psicológico repetido, quando verificado 24 horas depois. Contudo, Nakamura et al.<sup>18</sup> encontraram aumento da liberação de superóxido por macrófagos, porém provenientes da mucosa gástrica e em ratos que sofreram estresse psicológico provocado por restrição alimentar durante 1 a 5 dias.

É reconhecido que glicocorticóides inibem a produção e, por vezes, a ação de diversos mediadores intracelulares como metabólitos provenientes do ácido araquidônico e citocinas<sup>16,19,20</sup>. Outrossim, outros fatores podem estar indiretamente relacionados às ações dos glicocorticóides, entre os quais: liberação de opióides e outros hormônios<sup>21</sup>. Oshi et al.<sup>6</sup> sugerem que a diversidade das respostas orgânicas frente ao estresse pode estar associada à natureza ou tipo



**Figura 1.** Liberação de superóxido (nmols[O<sub>2</sub><sup>-</sup>]/10<sup>6</sup>/2 células) por macrófagos alveolares de ratos, em cada hora de observação, segundo os grupos controle (C), estresse (E), treino (T), glutamina (GLN).

Os dados estão representados em média (erro-padrão da média - EPM). Houve diferença intragrupo em todos os grupos entre a segunda e a primeira hora de observação ( $*p < 0,001$ ) (ANOVA *RM*). Na comparação intergrupo observa-se diferença ( $p < 0,05$ ) entre o grupo estresse (E) e o grupo controle (C) tanto na primeira quanto na segunda hora de acompanhamento (ANOVA *one-way*, seguido do teste de Tukey).

do estresse, em outras palavras; dependerá de sua natureza: se física, ou psicológica, ou do tipo, se agudo ou crônico. A produção desses agentes oxidantes constitui um dos mecanismos de avaliação da função de macrófagos<sup>20</sup> e essa diminuição sugere a existência de alterações na atividade de macrófagos de ratos estressados, quando estimulados *in vitro*.

O exercício físico, seja de natureza aguda ou crônica, como indutor de estresse, na maioria das vezes, associa-se a uma maior captação de oxigênio e, por conseguinte, ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio<sup>8,21</sup>. O exercício agudo de alta intensidade produz aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio decorrentes do estresse oxidativo, sobretudo em animais destreinados<sup>22</sup>. No entanto, a contínua repetição de exercícios, caracterizada por treinamento, não parece produzir as mesmas mudanças ocorridas nos parâmetros imunes após uma carga de exercício agudo<sup>4,23,24</sup>.

Neste estudo, macrófagos de ratos submetidos à natação não alteraram sua liberação de superóxido em resposta ao estímulo com PMA. Por outro lado, Salman et al.<sup>23</sup> observaram aumento da liberação de superóxido em macrófagos peritoniais de ratos submetidos a exercício de natação, com duração progressiva do tempo, que permaneciam se exercitando ao longo de seis semanas de treinamento quando submetidos a estresse. A diferença de tempo com que os animais permaneciam nadando, ou ainda o período no qual se observou a liberação de ânion superóxido, vista neste estudo e no de Salman et al.<sup>23</sup> pode explicar, em parte, a diversidade de resultado encontrado. Ainda em função do tempo de treinamento, Sugiura et al.<sup>8</sup> observaram que a liberação de superóxido por macrófagos, medidos 72 horas após o término do exercício, só demonstrava aumento quando os animais treinaram entre 60 e 120 minutos/dia. Em grupos com menores tempos de exercício, os autores não encontraram diferenças.

O aumento da liberação de ânion superóxido por macrófagos pode ser um indicador do

aumento de sua função. Porém, a capacidade funcional de macrófagos não é restrita à liberação de espécies reativas de oxigênio, mas também se estende a funções como adesividade e fagocitose. Em estudo anterior, foi demonstrado que ratos submetidos ao treinamento de natação durante seis semanas, por 45 minutos ao dia, tiveram sua capacidade fagocítica aumentada<sup>24</sup>.

Ianvareva et al.<sup>25</sup> sugerem que o estresse contínuo, seja em animais ou em humanos, propicia uma adaptação orgânica contra espécies reativas de oxigênio e que esta adaptação associa-se ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase. Em adição, o treinamento parece atenuar a descarga hormonal, modificar a expressão de receptores e alterar a sensibilidade das células imunocompetentes<sup>1,26</sup> aos efeitos dos agentes estressores.

Portanto, a falta de associação entre treinamento de natação e aumento da produção de superóxido por macrófagos alveolares neste estudo, em parte, pode dever-se à ocorrência de adaptações fisiológicas, à duração ou à intensidade do treinamento aos quais foram submetidos os animais, à idade do animal, ao período no qual realizou-se a coleta dos macrófagos, ou ainda, a mecanismos subjacentes não totalmente esclarecidos.

De modo similar ao treinamento de natação, os ratos suplementados com glutamina não apresentaram qualquer diferença na produção de superóxido, em relação aos animais controles. A importância da glutamina para a formação de superóxido por células imunes tem sido determinada em diversos trabalhos *in vitro*<sup>16,27,28</sup>. Essa dependência parece associar-se às concentrações adequadas do aminoácido de maneira dose-dependente<sup>14,16,29</sup> e da sua relação com a atividade da enzima NADPH oxidase<sup>15</sup>. Apesar das evidências acerca do papel da glutamina na atividade da enzima NADPH oxidase, Pithon-Curi et al.<sup>27</sup> observaram que sua adição ao meio de cultura de neutrófilos não elevou a atividade da enzima mas acarretou aumento da liberação de superóxido nas concentrações estudadas.

Estudos sobre a produção de superóxido por células imunes têm sido mais bem explorados em neutrófilos que em macrófagos. Em macrófagos, poucos estudos têm avaliado de forma mais sistemática o uso de glutamina e suas consequências sobre a liberação de ânion superóxido por macrófagos.

Em animais com peritonite induzida, Ikeda et al.<sup>30</sup> não observaram diferenças na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritonais, de ratos que recebiam nutrição parenteral total suplementada com glutamina, quando comparados aos animais que recebiam alimentação padrão. Em monócitos humanos, Ruggeberg et al.<sup>28</sup> só observaram uma dependência entre aumento da atividade microbicida e concentração de glutamina em estudos conduzidos *in vitro*.

A divergência de resultado acerca da administração com glutamina e da liberação de superóxido pode, em parte, ser explicada pelo delineamento do estudo, ou seja, se a adição de glutamina procedeu *in vivo* ou *in vitro*. A administração de glutamina neste estudo ocorreu *in vivo* e por via intraperitoneal. Mas, estes resultados assemelham-se aos encontrados por Ikeda et al.<sup>30</sup> que não observaram alteração da produção de superóxido em animais submetidos à suplementação parenteral total adicionada de glutamina.

Portanto, o uso de glutamina em organismos vivos pode resultar em efeitos distintos daqueles observados *in vitro*, uma vez que o nutriente receberá influência de fatores adicionais, como os biológicos e fisiológicos. Assim, nem todos os resultados obtidos *in vitro* podem ser extrapolados para organismos vivos. Portanto, a liberação de ânion superóxido por macrófagos alveolares de animais submetidos à suplementação com imunomoduladores ainda é um campo a ser explorado.

## CONCLUSÃO

O estudo demonstra que o estresse agudo pode ser um dos fatores implicados na imunossupressão. Entretanto, o estresse crônico de

natação, bem como a hora na qual determinou-se a liberação de ânion superóxido e a suplementação com glutamina na quantidade e forma administrada, não alteraram a liberação de superóxido por macrófagos alveolares.

Em suma, observa-se que a administração de glutamina, da forma usada neste estudo, não promove mudanças, sejam estas benéficas ou adversas, na competência imunológica. Por outro lado, observa-se que o exercício físico, mesmo sendo um estressor, quando realizado de forma sistemática e moderada, não reduz a capacidade de macrófagos em liberar espécies reativas de oxigênio, como visto na aplicação do estresse psicológico agudo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco, por tornarem possível a realização deste estudo.

## COLABORADORES

E. NASCIMENTO participou em todas as etapas da tese e na elaboração deste manuscrito. C.V.G. LEANDRO participou inicialmente como estagiária e posteriormente contribuiu para as etapas de análise dos dados e escrita do manuscrito. M.A.F. AMORIM contribuiu na redação do artigo e análise estatística. A. PALMEIRA e T.C. FERRO, estagiárias da tese, realizaram trabalho de apoio. C.M.M.B CASTRO, co-orientadora, contribuiu em todas as etapas dos estudos imunológicos. R.M. CASTRO, orientador, contribuiu em todas as etapas da tese e na redação do artigo.

## REFERÊNCIAS

1. Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, Shepard RJ. Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med.* 1998; 19(2):130-43.
2. Pedersen BK, Hoffman-Goez L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev.* 2000; 80(3):1055-81.

3. Ottaviani E, Franceschi C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Progress in Neurobiology*. 1996; 48(4-5):421-40.
4. Leandro CG, Nascimento E, Manhães-De-Castro R, Duarte JÁ, De Castro CMMB. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Rev Port Cienc Desp*. 2002; 2(5):80-90.
5. De Castro CMMB, Manhães-De-Castro R, Medeiros AF, Queirós-Santos A, Ferreira e Silva WT, Lima Filho JL. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub> in alveolar macrophages. *J Neuroimmunology*. 2000; 108(1-2):68-72.
6. Oishi K, Nishio N, Konishi K, Shimokawa M, Okuda T, Kuriyama T, et al. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats. *Stress*. 2003; 6(1):33-40.
7. Ferrandez MD, De la Fuente M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand*. 1999; 166(1):47-53.
8. Sugiura H, Nishida H, Inaba Mirbod RSM, Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophages functions in mice. *Appl Physiol*. 2001; 90(3):789-94.
9. Kuriyama T, Machida K, Suzuki K. Importance of correlations between phagocytic activity and superoxide production of neutrophils under conditions of voluntary exercise and stress. *Clin Lab Anal*. 1996; 10(6):458-64.
10. Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-De-Melo M, Garcia C, Homem-De-Bittencourt PIJR, et al. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(1):15-21.
11. Yassad A, Lavoine A, Bion A, Daveau M, Husson A. Glutamine accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture. *FEBS Lett*. 1997; 413(1):81-4.
12. De Castro CMMB, Bureau MF, Nahori MA, Dumarey CH, Vargaftig BB, Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A<sub>2</sub> activities in endotoxemic guinea pigs. *J Appl Physiol*. 1995; 79(4):1271-7.
13. Bauerle PA, Rupec RA, Pahl HL. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol*. 1996; 44(1):29-35.
14. Furukawa S, Saito H, Matsuda T. Relative effects of glucose and glutamine on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock*. 2000; 13(4):274-8.
15. Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> in rat neutrophils. *Clin Sci*. 2002; 103(4):403-8.
16. Muhling J, Nicholas KA, Halabi M, Fuchs M, Krull M, Engel J, et al. Alterations in neutrophil (PMN) free intracellular alpha-keto acid profiles and immune functions induced by L-alanyl-L-glutamine, arginine or taurine. *Amino Acids*. 2005; 29(3):289-300.
17. Fahey JV, Guyre PM, Munck AA. Mechanisms of anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Adv Inflamm*. 1981; Res 2, 21-7.
18. Nakamura K, Aoite A, Rokutan K, Hosokawa T, Koyama K, Kawai K. The role of oxygen radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced in mice by feeding-restriction stress. *Scand J Gastroenterol*. 1980; 162(Suppl):47-50.
19. Ortega E, Rodriguez MJ, Barriga C, Forner MA. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high intensity exercise. *Int J Sports Med*. 1996; 17(2):149-55.
20. Johnston RB Jr. Measurement of O<sub>2</sub>-secreted by monocytes and macrophages. *Methods in Enzymology*. 1984; 5:365-9.
21. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kodja G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*. 2000; 105(11):1631-9.
22. Shuji Oh-Ishi, Kizaki T, Okawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, et al. Endurance training improves the resistance of the rat diaphragm to exercise induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 156(5):1579-85.
23. Salman H, Bergman M, Bessler H, Weiss J, Punskey I, Djaldetti M. Effect of training on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from rats exposed to swim stress. *Acta Haematol*. 1999; 102(4):180-4.
24. Nascimento E, Cavalcante T, Pereira S, Palmeira A, Rocha MC, Viana MT, et al. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Rev Port Ciênc Desp*. 2004; 4(3):26-33.
25. Iannvareva IN, Kovalenko RI, Molchanov AA, Kamardina TA, Zhekalov NA, Pevtosov DI. Activation of the antioxidant system as a factor in increasing the body resistance during combined adaptation. *Russ Fisiol Zh IM Sechenova*. 2001; 87(10):1382-92.
26. Woods JA, Ceddia MA, Zack MD, Lowder TW, Lu Q. Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. *Brain Behav Immun*. 2003; 17(5):384-92.

27. Pithon-Curi TC, De Melo MP, Curi R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22(5):321-6.
28. Ruggeberg J, Stalmach E, Zubrod-Eichert C, Wahn V, Schrotten H. Antimicrobial functions of human monocytes depend on concentration of glutamine in vitro. *Ann Nutr Metab.* 1997; 41(6):371-5.
29. Furukawa S, Saito H, Inoue T, Matsuda T, Fukatsu K, Han I, et al. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. *Nutrition.* 2000; 16(5):323-9.
30. Ikeda S, Kudsk KA, Le T, Zarzaur BL, Johnson DC. Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen induced murine peritonitis. *Shock.* 2003; 9(1): 50-4.

Recebido em: 21/3/2006  
Versão final reapresentada em: 30/10/2006  
Aprovado em: 12/12/2006