

## Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso

Marcelo Macedo Rogero<sup>1</sup>, Julio Tirapegui<sup>1\*</sup>, Rogério Graça Pedrosa<sup>1</sup>, Inar Alves de Castro<sup>1</sup>,  
Ivanir Santana de Oliveira Pires<sup>1</sup>, Antônio Altair Magalhães Oliveira<sup>2</sup>,  
Maristela Marques Salgado<sup>3</sup>, Aguinaldo Roberto Pinto<sup>3</sup>, Mirthes Ueda<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, <sup>3</sup>Serviço de Microbiologia e Imunologia, Instituto Adolfo Lutz

*O treinamento intenso e o exercício exaustivo podem ocasionar imunossupressão em atletas por meio da diminuição da concentração plasmática de glutamina. O presente estudo verificou inicialmente o efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina sobre a resposta ao teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) em ratos submetidos ao treinamento intenso em natação durante seis semanas. Posteriormente, foi avaliado o efeito dessas intervenções nutricionais sobre a contagem total e percentual de leucócitos e concentração sérica de anticorpos IgG anti-albumina de soro bovino, em animais submetidos ao teste de exaustão e recuperados durante o período de 3 horas. Não houve efeito do treinamento e da suplementação sobre a resposta ao teste de HTT. Animais suplementados apresentaram maior concentração de glutamina no plasma ( $P < 0,05$ ), contudo, esse aumento da glutaminemia não influenciou a concentração sérica de anticorpos IgG. O período de recuperação pós-exercício intenso acarretou diminuição da glutaminemia em relação aos valores obtidos imediatamente após o teste de exaustão ( $P < 0,05$ ). O aumento da concentração de corticosterona induzida pelo exercício exaustivo casou leucocitose, neutrofilia e linfopenia durante o período pós-exercício ( $P < 0,05$ ). O presente estudo não sustenta a hipótese de que a alteração da concentração plasmática de glutamina induzida tanto pela suplementação quanto pelo exercício tenha influência sobre a resposta ao teste de HTT ou a concentração sérica de anticorpos IgG em ratos treinados.*

### Unitermos:

- Glutamina
- Nutrição
- Exercício
- L-alanil-L-glutamina
- Sistema imune

### \*Correspondência:

J. Tirapegui  
Departamento de Alimentos e  
Nutrição Experimental  
FCF – USP  
Caixa Postal 66335  
05389-970 – São Paulo – SP - Brasil  
E-mail: tirapegu@usp.br

## INTRODUÇÃO

Exercício físico causa mobilização de neutrófilos e linfócitos para o sangue. Contudo, após o exercício intenso com duração superior a uma hora, ocorre a diminuição de alguns parâmetros da resposta imune, tais como contagem de linfócitos, atividade de células *natural killer*, resposta ao teste de hipersensibilidade do tipo tardio, concentração de anticorpos e proliferação de linfócitos estimulada por mitógenos. Durante este período de imunossupressão, referido como fenômeno “open window”, o indivíduo estaria mais suscetível a adquirir algum tipo de infecção (Hall, Wagenmakers, 1998; Rohde *et al.*, 1998a).

Os mecanismos relacionados à imunomodulação induzida pelo exercício são provavelmente multifatoriais e incluem alterações circulatórias (hemodinâmicas) e hormonais (liberação de cortisol e catecolaminas). Além disso, a modulação da resposta imune mediada pelo exercício pode estar ligada a fatores metabólicos, tais como a concentração de glutamina plasmática (Hack *et al.*, 1997; Bailey *et al.*, 2000).

A glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e tecido muscular e é utilizada em altas taxas por células de divisão rápida, incluindo leucócitos, para fornecer energia e favorecer a biossíntese de nucleotídeos (Nieman, Pedersen, 1999; Koyama *et al.*, 1998; Curi, 2000). Uma alta proporção da glutamina da dieta é utilizada pelas células do intestino. Desse modo, para atender à elevada demanda de glutamina pelos diversos tecidos e órgãos, este aminoácido deve ser sintetizado pelo organismo. Quantitativamente, o mais relevante tecido de síntese, estoque e liberação de glutamina é o músculo esquelético, que apresenta atividade das enzimas glutamina sintetase e aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (Castell *et al.*, 1996; Rogero, Tirapegui, 2000).

As concentrações plasmática e tecidual de glutamina estão diminuídas em situações clínicas e catabólicas tais como: traumas, queimaduras, sepse, pós-operatório, diabetes não-controlado, após exercício exaustivo e durante períodos de treinamento intenso. Durante estes eventos, a diminuição da concentração de glutamina plasmática ocorre devido à maior taxa de captação e utilização deste aminoácido por diversos tecidos em relação à taxa de síntese e liberação pelo músculo esquelético (Parry-Billings *et al.*, 1989; Rowbottom, 1996). Estas situações estão associadas com um aumento na suscetibilidade a infecções, sendo sugerido que isto pode ser parcialmente devido à diminuição do fornecimento de glutamina para células imunocompetentes, tais como linfócitos (Rowbottom *et al.*, 1995; Kew *et al.*, 1999).

A relação entre exercício, sistema imune e glutamina tem sido estudada por diversos pesquisadores, porém a relação causal entre a diminuição das concentrações plasmática e tecidual de glutamina decorrente do exercício intenso e prolongado e o prejuízo da imunocompetência do atleta ainda não foi estabelecida completamente (Shewchuk *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1998; Antonio, Street, 1999; Bishop *et al.*, 1999). Desse modo, o presente estudo investigou o efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina e L-glutamina sobre a resposta imune *in vivo* mediada por células em ratos submetidos ao treinamento intenso em natação. Posteriormente, foi verificado o efeito dessas intervenções nutricionais sobre a contagem de leucócitos e concentração sérica de anticorpos específicos anti-albumina de soro bovino (ASB) da classe IgG em ratos imediatamente após e 3 horas depois do término do exercício de natação até a exaustão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

#### *Animais*

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, albinos, machos, adultos, obtidos do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e alimentados com ração elaborada segundo a recomendação do American Institute of Nutrition – 93 para ratos adultos (Reeves *et al.*, 1993). Os animais foram mantidos em sala com temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $55 \pm 10\%$  e obedecendo a um ciclo invertido 12 h claro/12 h escuro, com luz acesa às 19:00 horas.

Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Os animais, com peso variando entre 280 a 300 g, foram divididos em 9 grupos (n=6 por grupo), sendo três grupos sedentários: controle (C-Sed), glutamina (G-Sed) e alanil-glutamina (D-Sed) e seis grupos treinados, que foram subdivididos em três grupos submetidos ao teste de exaustão: controle (C-Exa), glutamina (G-Exa) e alanil-glutamina (D-Exa), e três grupos submetidos ao teste de exaustão e recuperados durante três horas: controle (C-Rec), glutamina (G-Rec) e alanil-glutamina (D-Rec).

Todos os grupos foram avaliados inicialmente quanto à resposta ao teste de hipersensibilidade do tipo tardio, visando verificar tanto o efeito da suplementação como do treinamento intenso. No último dia do protocolo experimental, os seis grupos de animais treinados foram submetidos ao teste de exaustão, sendo que imediatamente após o término, os grupos C-Rec, G-Rec e D-Rec foram

suplementados novamente com água, L-glutamina e L-alanil-L-glutamina, respectivamente, e mantidos em repouso durante 3 horas.

### Suplementação

Os animais foram suplementados com o aminoácido L-glutamina (Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda, Brasil) ou o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (Fórmula Medicinal – Suporte Nutricional e Manipulação Ltda, São Paulo, Brasil) através de sonda gástrica (gavagem) durante os últimos 21 dias do protocolo experimental, sendo que os animais treinados recebiam a suplementação imediatamente após o término do treinamento diário em natação. Aliada à suplementação crônica, os grupos G-Rec e D-Rec também foram suplementados imediatamente após o término do exercício até a exaustão.

A quantidade administrada do dipeptídeo foi calculada para que o total de glutamina fosse o mesmo administrado na sua forma isolada, ou seja, 1 g de glutamina/kg de massa corporal. O grupo controle recebeu água via gavagem.

### Protocolo de treinamento

O treinamento dos animais foi realizado em um sistema de natação (Vieira *et al.*, 1988) com água aquecida por um sistema central de resistência elétrica e temperatura de  $31 \pm 2$  °C. O período de treinamento foi de seis semanas, cinco dias por semana, 60 minutos por dia.

Durante a primeira semana, os animais iniciaram um treinamento progressivo visando sua adaptação ao meio líquido. No primeiro dia da segunda semana de treinamento foi utilizado o protocolo de teste progressivo para determinação do limiar anaeróbio metabólico e sobrecarga inicial de treinamento, sendo que o segundo teste foi realiza-

do no primeiro dia da quinta semana para a correção da sobrecarga de treinamento (Marquezi, 1999). O protocolo de teste consistiu de exercício agudo de natação com sobrecarga progressiva, sob a forma de pesos atados à cauda do animal, correspondendo a 4, 5, 6, 7 e 8% do seu peso corporal, durante períodos de três minutos de natação intercalados com um minuto de repouso. Visando minimizar qualquer tipo de estresse decorrente da manipulação dos animais e da mudança de ambiente, foi realizado um período de aquecimento com duração de 20 minutos sem sobrecarga.

Coletas de sangue a partir da veia caudal foram realizadas aos 10 e 20 minutos do período de aquecimento e nos períodos de sobrecarga. O sangue foi coletado por meio de capilares heparinizados e, posteriormente, foi realizada a dosagem de lactato. O limiar anaeróbio metabólico foi determinado a partir da inflexão da curva de concentração de lactato sangüíneo pela sobrecarga utilizada. O ponto de inflexão da curva correspondia à sobrecarga considerada como a carga do limiar anaeróbio metabólico.

No último dia de experimento os animais foram submetidos ao exercício até a exaustão. O tempo de exaustão foi caracterizado no momento em que o animal não conseguia manter as narinas fora da água durante 10 segundos.

### Obtenção do material de ensaio

Todos os animais foram sacrificados por decapitação, entre 10:00 e 12:00 horas (com exceção dos animais submetidos ao teste de exaustão). O sangue foi coletado, centrifugado para a separação do plasma e do soro e armazenados em “freezer” (-80 °C) para subsequente determinação da concentração de corticosterona, glutamina,

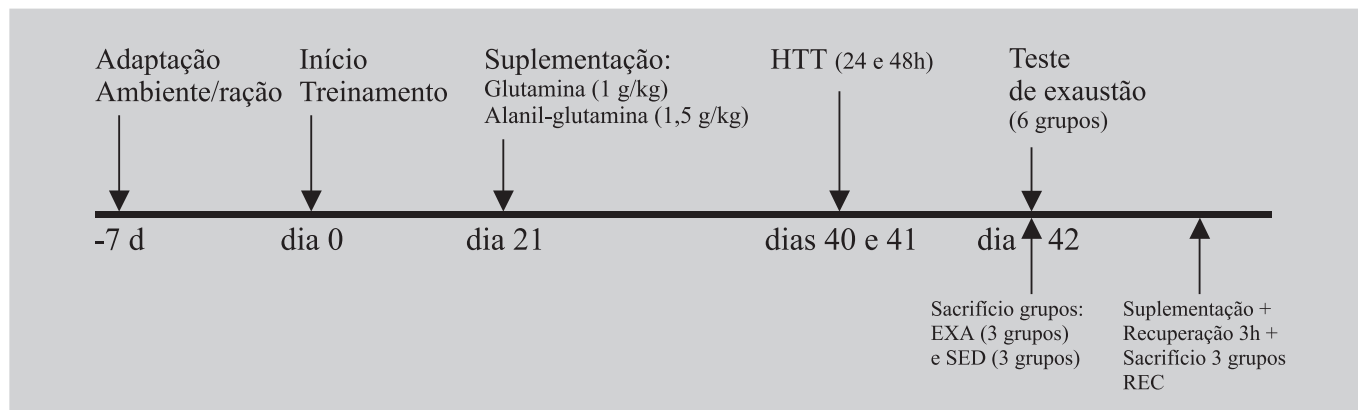


FIGURA 1 - Esquema do protocolo experimental.

glutamato e anticorpos anti-ASB da classe G (IgG). Uma amostra de sangue coletado com anticoagulante (EDTA (K<sub>3</sub>) líquido 15%) foi utilizada para realização do leucograma.

## Métodos

A determinação da concentração de glutamina e glutamato no plasma foi realizada segundo a metodologia descrita por Lund (1986). A concentração de corticosterona livre sérica foi determinada por radioimunoensaio utilizando-se o “kit” Biotrak™ (Amersham International, Buckinghamshire, UK). A leitura da reação foi realizada em contador de cintilação gama (Beckman L600).

As amostras de sangue utilizadas para a realização do leucograma foram inicialmente diluídas (1/20) em líquido de Turk, o qual lisa os eritrócitos e preserva as células nucleadas. A contagem global de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, obtendo o número de leucócitos/mm<sup>3</sup> de sangue (Dacie, Lewis, 1995). Os esfregaços de sangue utilizados para a contagem relativa e absoluta das formas leucocitárias foram submetidos à coloração panóptica, segundo a técnica de May-Grunwald-Giensa, modificada por Rosenfeld (1947).

O teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) baseado na metodologia descrita por Titus e Chiller (1981) e modificada por Henningsen *et al.* (1984) foi utilizado para avaliar a resposta de HTT em ratos usando albumina sérica bovina (ASB) (Sigma Chem. CO., USA) como antígeno. Os animais foram sensibilizados com 100 µg de ASB em 50 µL de solução salina estéril homogeneizada com igual volume de adjuvante completo de *Freund* (ACF). Esta sensibilização foi realizada 13 dias antes do sacrifício. Cada animal foi sensibilizado por via subcutânea na base da cauda, sendo desafiados 10 dias após a primeira sensibilização com 50 µg/100 µL de solução salina de ASB na pata direita, sendo esta solução aquecida previamente à inoculação por 10 minutos a 60 °C. O mesmo volume de solução salina estéril foi injetado na pata esquerda como medida de controle. A reação de HTT foi determinada 24 e 48 horas após o desafio, por meio da medida da espessura de ambas as patas com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Kanagawa, Japão). Duas leituras foram realizadas para cada pata e o grau de reação, em milímetros, foi calculado pela diferença entre a espessura da pata direita e esquerda.

A dosagem de anticorpos anti-ASB da classe IgG foi realizada pela técnica imunoenzimática (ELISA) seguindo-se o procedimento descrito por Engvall e Perlmann (1972). Para a padronização da técnica, utilizou-se como

controle positivo o soro hiperimune de um rato Wistar imunizado na base da cauda no dia 0 (200 µg de ASB/100 µL de salina+100 µL de ACF), por via intraperitoneal no dia 7 (200 µg de ASB/100 µL de salina+100 µL de adjuvante incompleto de *Freund*) e pela veia caudal no dia 14 (200 µg de ASB/200 µL de salina estéril). Após 15 dias o animal foi submetido à sangria branca e o soro foi estocado a -80 °C. Foram obtidos soros de sete ratos não imunizados, os quais foram utilizados como controles negativos da reação. Após as etapas de padronização, os soros dos animais a serem testados foram diluídos a 1:400 e distribuídos, em duplicata, em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc – MaxiSorp™ Surface, Brand Prod., Denmark) previamente sensibilizadas com ASB (300ng em PBS pH7,2/poço). A sensibilização foi realizada durante 18 horas a 37 °C. Após lavar 4 vezes com salina 0,85% acrescida de 0,05% de Tween 20 (Amersham Pharmacia, EUA), as placas foram incubadas por 45 min a 37 °C com anti-IgG de rato biotinizada (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, EUA) diluída a 1:25000 em PBS. Após nova etapa de lavagem com salina/Tween, as placas foram incubadas com estreptavidina (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, EUA) a 1:25000 em PBS por mais 30 min a temperatura ambiente. A reação foi revelada com ortofenilenodiamina (OPD – Merck, S.A. Ind. Quím., RJ, Brasil) por 7 min a 37 °C e bloqueada com 100 µL de solução de ácido sulfúrico 2 N. Os resultados foram avaliados empregando-se o método proporcional onde a razão entre as densidades ópticas (DOs) da amostra e o valor médio das DOs de 7 soros negativos foi calculada, sendo que razões acima de 2 foram consideradas positivas (Sanchez, 2000).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram separados em três blocos e classificados neste estudo como: Suplementação, Exercício e Repetições (ratos), para que o efeito isolado de cada tratamento e suas possíveis interações pudessem ser analisadas separadamente.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada ao conjunto de dados para analisar os efeitos lineares e interativos das variáveis independentes (suplementação e exercício) sobre o resultado de diferentes determinações analíticas, sendo então aplicado o teste de Tukey HSD para identificar os tratamentos que apresentassem um contraste significativo ( $p < 0,05$ ). O tratamento dos dados e sua análise de variância foram executados por meio da utilização do programa *Statistica* (versão 6.0) (Bower, 1998).

## RESULTADOS

De acordo com a Tabela I, observa-se que a resposta ao teste de HTT não diferiu significativamente entre os grupos estudados, tanto em relação ao efeito do treinamento intenso, como da suplementação com L-glutamina ou L-alanil-L-glutamina.

**TABELA I** - Efeito do treinamento intenso e da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina sobre o teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) em ratos

Grupos <sup>1</sup>	HTT 24 h (mm)	HTT 48 h (mm)
C-Sed	1,16 ± 0,34	1,10 ± 0,38
G-Sed	1,23 ± 0,24	1,13 ± 0,30
D-Sed	1,39 ± 0,24	0,94 ± 0,31
C-Exa	0,91 ± 0,16	0,87 ± 0,24
G-Exa	1,25 ± 0,42	0,92 ± 0,20
D-Exa	1,30 ± 0,26	0,94 ± 0,28
C-Rec	1,18 ± 0,45	1,03 ± 0,31
G-Rec	1,50 ± 0,32	0,75 ± 0,22
D-Rec	1,21 ± 0,48	0,73 ± 0,20
p (suplementação)	0,068	0,392
p (exercício)	0,433	0,056
p (interação)	0,446	0,383

<sup>1</sup> Não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos para ambos os efeitos (suplementação e exercício)

Nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao consumo de ração e tempo de natação até a exaustão entre os grupos estudados (Tabela II). A concentração plasmática de glutamina foi significativamente maior nos grupos suplementados com glutamina, tanto na sua forma livre quanto de dipeptídeo. Os animais recuperados apresentaram diminuição da concentração plasmática de glutamina e glutamato, respectivamente de 19% e 36%, em relação aos valores obtidos imediatamente após o teste de exaustão. O exercício até a exaustão aumentou em 28% a concentração de glutamato no plasma em relação ao grupo sedentário, enquanto a suplementação com L-alanil-L-glutamina aumentou em 22% a concentração plasmática de glutamato em relação aos animais suplementados com L-glutamina (Tabela II).

Os animais suplementados apresentaram aumento da razão glutamina/glutamato no plasma, ao passo que essa razão foi menor nos animais submetidos ao exercício exaustivo em relação às condições sedentário e recuperado. O exercício até a exaustão e o período de recuperação apresentaram aumento da concentração sérica de corticosterona de 2,8 vezes e 32% respectivamente, em relação à condição sedentário (Tabela II).

A contagem de leucócitos e neutrófilos foi significativamente maior nos animais suplementados com L-alanil-L-glutamina em relação aos animais controles (Tabela III). Os animais recuperados apresentaram aumento da contagem de leucócitos e neutrófilos em relação aos valores observados nos animais na condição sedentário e

**TABELA II** - Consumo de ração, tempo até a exaustão e concentrações plasmática de glutamina e glutamato e sérica de corticosterona em ratos sedentários e treinados submetidos ao teste de exaustão aliado à recuperação

Grupos	Consumo de Ração (g/dia)	Tempo exaustão (min)	Glutamina plasmática (mmol/L)	Glutamato plasmático (mmol/L)	Razão glutamina/glutamato	Corticosterona sérica (ng/mL)
C-Sed	20,8 ± 2,5	—	1,03 ± 0,09	0,25 ± 0,04	4,3 ± 0,6	55,8 ± 15,7
G-Sed	21,1 ± 2,4	—	1,16 ± 0,11	0,26 ± 0,02	4,5 ± 0,7	49,9 ± 12,4
D-Sed	20,8 ± 4,4	—	1,07 ± 0,17	0,23 ± 0,04	4,7 ± 0,8	47,8 ± 14,2
C-Exa	21,4 ± 1,3	140,3 ± 35,7	0,84 ± 0,22	0,31 ± 0,08	2,8 ± 0,7	148,3 ± 25,4
G-Exa	21,4 ± 2,1	135,2 ± 31,0	1,17 ± 0,13	0,26 ± 0,04	4,5 ± 0,8	134,1 ± 24,8
D-Exa	20,6 ± 1,0	140,5 ± 43,3	1,37 ± 0,41	0,38 ± 0,07	3,6 ± 0,7	153,9 ± 19,7
C-Rec	21,3 ± 0,9	139,7 ± 40,0	0,74 ± 0,23	0,21 ± 0,02	3,6 ± 0,9	67,3 ± 12,7
G-Rec	22,0 ± 1,3	140,2 ± 41,8	0,91 ± 0,25	0,17 ± 0,02	5,5 ± 1,5	74,7 ± 21,2
D-Rec	21,8 ± 3,8	144,3 ± 42,6	1,09 ± 0,17	0,23 ± 0,01	4,8 ± 0,8	61,2 ± 22,2
p (suplementação)	0,845	0,957	0,001	0,009	0,001	0,800
p (exercício)	0,623	0,837	0,011	0,001	0,002	0,001
p (interação)	0,981	0,983	0,088	0,015	0,130	0,310

Valores médios ± desvio, com n=6 para cada grupo, com diferença identificada pelo 2-way ANOVA e teste de Tukey considerando  $p < 0,05$ .

**TABELA III** - Contagem absoluta de leucócitos e concentração sérica de anticorpos IgG anti-albumina de soro bovino em ratos sedentários e treinados submetidos ao teste de exaustão aliado a recuperação

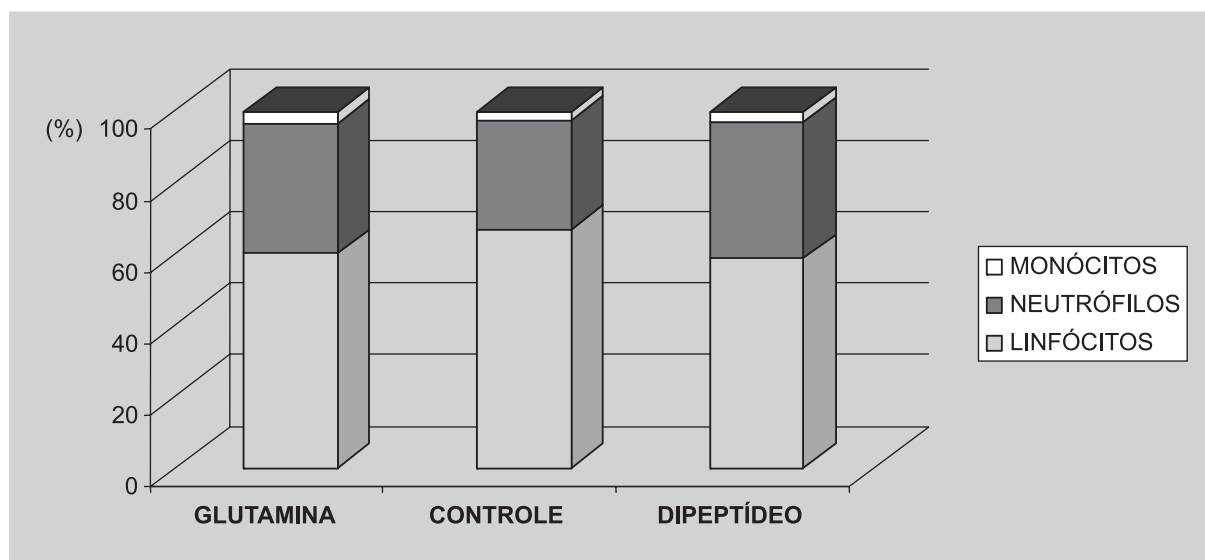
Grupos	Contagem absoluta ( $\times 10^9$ células/L)				IgG*
	Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	
C-Sed	4,4 ± 1,2	1,4 ± 0,4	2,9 ± 0,7	0,1 ± 0,2	9,82 ± 1,96
G-Sed	4,9 ± 0,7	1,3 ± 0,3	3,5 ± 0,5	0,1 ± 0,1	8,84 ± 2,27
D-Sed	4,9 ± 0,5	1,2 ± 0,2	3,6 ± 0,4	0,1 ± 0,1	9,45 ± 1,97
C-Exa	4,6 ± 0,7	1,1 ± 0,1	3,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	9,09 ± 2,00
G-Exa	5,8 ± 1,3	1,3 ± 0,4	4,3 ± 1,1	0,2 ± 0,2	8,54 ± 1,64
D-Exa	4,7 ± 1,3	1,3 ± 0,3	3,4 ± 1,0	0,2 ± 0,1	8,89 ± 2,42
C-Rec	5,1 ± 0,6	1,9 ± 0,6	3,1 ± 0,2	0,1 ± 0,0	9,84 ± 3,17
G-Rec	5,8 ± 1,1	3,5 ± 0,7	2,0 ± 0,4	0,3 ± 0,2	9,61 ± 3,40
D-Rec	7,6 ± 2,1	4,7 ± 1,2	2,6 ± 0,8	0,3 ± 0,3	8,27 ± 2,14
p (suplementação)	0,032	0,001	0,828	0,254	0,638
p (exercício)	0,001	0,001	0,001	0,022	0,789
p (interação)	0,033	0,001	0,007	0,210	0,866

Valores médios  $\pm$  desvio com  $n=6$  para cada grupo, com diferença identificada pelo 2-way ANOVA e teste de Tukey considerando  $p < 0,05$ . \*Valores expressos como razão DO da amostra/valor médio de DO de soros negativos

exaustão. A contagem total de linfócitos diminuiu 22% e 30% durante o período de recuperação, quando comparada às condições sedentário e exaustão, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação à concentração sérica de anticorpos IgG entre os grupos estudados (Tabela III).

De acordo com a Figura 2, a suplementação com L-alanil-L-glutamina aumentou a porcentagem de neutró-

filos e diminuiu a porcentagem de linfócitos em relação aos animais não-suplementados. A porcentagem de neutrófilos foi significativamente maior nos animais recuperados em relação às demais condições. Por outro lado, a porcentagem de linfócitos apresentou-se significativamente menor na condição recuperado quando comparada às condições sedentário e exaustão (Figura 3).

**FIGURA 2** - Efeito da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina sobre a porcentagem de leucócitos.

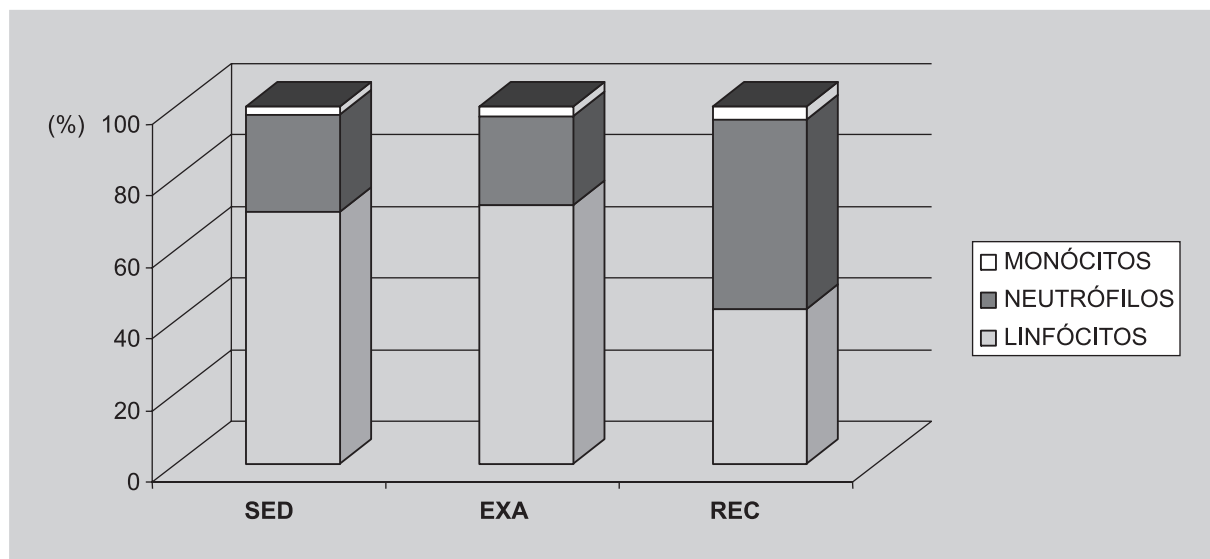


FIGURA 3 - Efeito do exercício exaustivo e recuperação sobre porcentagem de leucócitos.

## DISCUSSÃO

Numerosos estudos têm demonstrado a alteração significativa das concentrações plasmática e tecidual de glutamina durante e após exercício intenso e prolongado (Castell, Newsholme, 1997; Castell, Newsholme, 1998; Antonio, Street, 1999). A glutamina é utilizada como substrato energético por diversas células do sistema imune, incluindo neutrófilos, linfócitos e macrófagos e, desse modo, tem sido sugerido que a diminuição da concentração plasmática de glutamina pode contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções do trato respiratório superior em atletas após o exercício intenso e prolongado, ou durante o período de treinamento exaustivo (Rohde *et al.*, 1996; Curi *et al.*, 1997; Blachard *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que, durante e após o exercício exaustivo, ocorre um aumento da captação de glutamina por diversos órgãos, o que supera as taxas de síntese e liberação de glutamina pelo músculo esquelético, acarretando diminuição do fornecimento desse aminoácido para as células do sistema imune, o que pode afetar temporariamente a sua função (Rohde *et al.* 1998b; Gibala, 2001).

No presente estudo, a concentração de glutamina no plasma foi maior nos animais suplementados com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina em relação aos animais não-suplementados. Este resultado demonstra que a suplementação com glutamina na forma livre e de dipeptídeo representa rotas de eficaz fornecimento de glutamina para a circulação periférica, apesar da extensiva utilização desse aminoácido pelo leito esplâncico

(Ziegler *et al.*, 1990; Déchelotte *et al.*, 1991). Por outro lado, verificou-se que o período de recuperação de três horas pós-exercício exaustivo diminuiu a concentração plasmática de glutamina em relação aos valores obtidos imediatamente após o exercício. Este resultado pode estar relacionado ao aumento da captação de glutamina pelos rins, visando tamponar a acidose sangüínea decorrente do aumento da liberação de ácido láctico, a partir do tecido muscular solicitado durante o exercício aliado ao aumento da concentração de ácidos graxos livres no plasma (Brosnan, 2000). Alternativamente, a diminuição da glutaminemia pós-exercício durante o período de recuperação pode refletir a diminuição da taxa de liberação de glutamina pelo tecido muscular e/ou aumento da taxa de captação por outros tecidos, tais como fígado, que utiliza glutamina como substrato para gliconeogênese (Mackinnon, Hopper, 1996; Borba-Murad *et al.*, 1998). O aumento da contagem de leucócitos pós-exercício, decorrente principalmente de neutrofilia, também pode colaborar para a diminuição da glutaminemia pós-exercício (Gleeson *et al.*, 1998).

A ausência de diferença significativa sobre a resposta ao teste de HTT apresentado pelos animais deste estudo demonstrou que o treinamento intenso e a suplementação crônica não alteraram esse parâmetro de imunidade celular *in vivo*. Estes resultados sugerem a ocorrência de adaptação ao treinamento intenso, durante o período de seis semanas, associado ou não à suplementação, o que estaria relacionado à diminuição dos efeitos imunossupressivos causados por esta situação de estresse fisiológico (Wannam *et al.*, 1997). Aliado a este fato observou-

se que a sobrecarga corporal individual adotada, de acordo com os testes para determinação do limiar anaeróbio metabólico, não diferiu entre os grupos durante o período de treinamento.

As imunoglobulinas apresentam um papel relevante na resposta imune e, portanto, baixas concentrações podem ser indicativas de aumento do risco de infecção. Segundo Mackinnon (2000), o exercício moderado exerce pouco ou nenhum efeito sobre a concentração de imunoglobulinas séricas. Em contraste, a concentração de imunoglobulinas pode estar reduzida durante períodos de treinamento intenso em atletas. No presente estudo, a suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina e o exercício agudo (teste de exaustão) associado ao período de recuperação de três horas não provocaram alterações na resposta de IgG específicas para albumina sérica bovina, demonstrando assim que o sistema imune humoral, particularmente os linfócitos B, não sofreu influência pelo menos nesse protocolo experimental. Paralelamente, observou-se que o tempo de resistência ao esforço e à sobrecarga corporal foram semelhantes em todos os grupos submetidos ao teste de exaustão, o que exclui qualquer efeito relacionado ao aumento de desempenho, decorrente da suplementação adotada no presente protocolo. Resultados semelhantes foram relatados por Rowbottom e Green (2000), que não observaram alterações das concentrações séricas de IgA, IgE, IgG e IgM em indivíduos submetidos a exercícios intensos (70-80% do  $VO_{2max}$ ) com duração entre 20-120 minutos. Gleeson *et al.* (2000) constataram que nadadores de elite submetidos a um programa de treinamento de 12 semanas não apresentavam qualquer modificação das concentrações séricas de imunoglobulinas. Além disso, Bruunsgaard *et al.* (1997) observaram que triatletas vacinados contra difteria e tétano e com polissacarídeos purificados de pneumococos, imediatamente após uma prova de triatlo, não apresentaram diminuição da síntese de anticorpos *in vivo* duas semanas após a vacinação. Gleeson *et al.* (1996) constataram que não havia diferença na capacidade de síntese de anticorpos séricos específicos para seis polissacarídeos de pneumococos entre nadadores de elite submetidos a um período de treinamento intenso, comparados a indivíduos sedentários.

Os animais recuperados demonstraram diminuição do número de linfócitos circulantes, enquanto o número de leucócitos e neutrófilos circulantes aumentou em relação aos valores observados imediatamente após o término do exercício exaustivo. Segundo Rowbottom e Green (2000), a magnitude destes fenômenos são dependentes da intensidade, duração e tipo de exercício, aliado ao aumento de

corticosteróides induzido pelo exercício intenso e prolongado.

A leucocitose observada durante o período de recuperação foi devida quase inteiramente ao aumento do número de neutrófilos, sendo esta neutrofilia parcialmente decorrente do aumento da concentração de corticosteróides, que induzem a liberação de neutrófilos, a partir da medula óssea, e diminuem o egresso destas células oriundas da circulação sistêmica (Rowbottom, Green, 2000).

A ocorrência de linfopenia observada também nos animais recuperados pode estar relacionada à liberação hormonal de corticosterona, cuja concentração aumentou significativamente durante o exercício exaustivo e permaneceu acima dos valores basais três horas após o término do exercício. Os corticosteróides causam linfopenia por meio da inibição da entrada de linfócitos na circulação sanguínea, ao mesmo tempo em que facilitam o egresso destas células a partir do sangue para os tecidos, fatos estes que estão relacionados à expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular (Shinkai *et al.*, 1996).

Os animais recuperados apresentaram diminuição da concentração plasmática de glutamina e da contagem de linfócitos, os quais têm sido sugeridos como dois dos fatores que ocasionam o quadro de imunossupressão pós-exercício intenso e prolongado (Hall, Wagenmakers, 1998; Rohde *et al.*, 1998a). Contudo, estes resultados sugerem que a diminuição da glutaminemia e linfopenia induzidas pelo exercício intenso e prolongado podem não se relacionar com a concentração sérica de anticorpos IgG.

## CONCLUSÕES

Em nosso estudo, a ausência de diferença significativa em relação ao teste de HTT e a concentração de IgG específicas para albumina sérica bovina demonstrou que estes parâmetros de imunidade celular e humoral, respectivamente, são menos sensíveis às variações ocorridas na concentração plasmática de glutamina decorrentes da suplementação com L-glutamina e L-alanil-L-glutamina em ratos submetidos ao treinamento intenso ou exercício agudo exaustivo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas outorgadas.



**ABSTRACT****Effect of L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine supplementation on the response to delayed-type hypersensitivity test (DTH) in rats submitted to intense training**

*Intense training and exhaustive exercise may cause immunosuppression in athletes by reducing plasma glutamine concentration. Initially, this study verified the effect of L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine supplementation on the response to delayed-type hypersensitivity test (DTH) in rats submitted to intense swimming training for six weeks. Later on, we assessed the effect of these nutritional interventions on total and differential white blood cell counts and on concentration of anti-bovine serum albumin IgG antibodies, in animals submitted to exhaustion test and a three-hour recovery period. There was no effect of training and supplementation on the response to DTH. Supplemented animals presented greatest plasma glutamine concentration ( $p < 0.05$ ), though this increase in glutaminemia did not interfere on the serum IgG antibody concentration. The recovery period after intense exercise resulted in decreased glutaminemia as compared with the values obtained immediately after exhaustion test ( $p < 0.05$ ). Increase in corticosterone levels induced by strenuous exercises led to leukocytosis, neutrophilia and lymphopenia in post-exercise period ( $p < 0.05$ ). The present study does not confirm the hypothesis that changes in plasma glutamine concentration induced by both supplementation and exercises influence on the response to DTH or for serum IgG antibody concentration in rats submitted to training.*

**UNITERMS:** Glutamine. Nutrition. Exercise. L-alanyl-L-glutamine. Immune system.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ANTONIO, J., STREET, C. Glutamine: a potentially useful supplement for athletes. *Can. J. Appl. Physiol.*, Champaign, v.24, p.1-14, 1999.
- BAILEY, D. M., CASTELL, L. M., NEWSHOLME, E. A., DAVIES, B. Continuous and intermittent exposure to the hypoxia of altitude: implications for glutamine metabolism and exercise performance. *Br. J. Sports Med.*, London, v.34, p.210-212, 2000.
- BISHOP, N. C., BLANNIN, A. K., WALSH, N. P., ROBSON, P. J., GLEESON, M. Nutritional aspects of immunosuppression in athletes. *Sports Med.*, Baltimore, v.28, p.151-176, 1999.
- BLANCHARD, M. A., JORDAN, G., DESBROW, B., MACKINNON, L. T., JENKINS, D. G. The influence of diet and exercise on muscle and plasma glutamine concentrations. *Med. Sci. Sports Exercise*, Baltimore, v.33, p.69-74, 2001.
- BORBA-MURAD, G. R., SOUZA, H. M., LOPES, G., FERREIRA, E. B., DAMBROSO, D., BAZOTTE, R. B. Changes in glycemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, Westbury, v.102, p.113-123, 1998.
- BOWER, J. A. Statistics for food science V: ANOVA and multiple comparisons (part B). *Nutr. Food Sci.*, v.1, p.41-48, 1998.
- BROSNAN, J. T. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J. Nutr.*, Bethesda, v.130, p.988S-990S, 2000.
- BRUUNSGAARD, H., HARTKOPP, A., MOUHR, T. *In vivo* cell-mediated immunity and vaccination response following prolonged, intense exercise. *Med. Sci. Sports Exercise*, Baltimore, v.29, p.1176-1181, 1997.
- CASTELL, L. M., NEWSHOLME, E. A. Glutamine and the effects of exhaustive exercise upon the immune response. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, v.76, p.524-532, 1998.
- CASTELL, L. M., NEWSHOLME, E. A. The effect of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. *Nutrition*, New York, v.13, p.738-742, 1997.
- CASTELL, L. M., POORTMANS, J. R., NEWSHOLME, E. A. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v.73, p.488-490, 1996.
- CURI, R. *Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte*. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. 261p.

- CURI, T. C. P., MELO, M. P., AZEVEDO, R. B., ZORN, T. M. T., CURI, R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.273, p.C1124-C1129, 1997.
- DÉCHELOTTE, P., DARMAUN, D., RONGIER, M., HECKETSWEILER, B., RIGAL, O., DESJEUX, J. Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.260, p.G677-G682, 1991.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, Bethesda, v.109, p.129-135, 1972.
- GIBALA, M. J. Regulation of skeletal muscle amino acid metabolism during exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exercise Metab.*, Champaign, v.11, p.87-108, 2001.
- GLEESON, M., MCDONALD, W. A., PYNE, D. B., CLANCY, R. L., CRIPPS, A. W., FRANCIS, J. L., FRICKER, P. A. Immune status and respiratory illness for elite swimmers during a 12-week training cycle. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v.21, p.302-307, 2000.
- GLEESON, M., BLANNIN, A. K., WALSH, N. P., BISHOP, N. C., CLARK, A. M. Effect of low- and high-carbohydrate diets on the plasma glutamine and circulating leukocyte responses to exercise. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v.8, p.49-59, 1998.
- GLEESON, M., PYNE, D. B., MCDONALD, W. A., CLANCY, R. L., CRIPPS, A. W., HORN, P. L., FRICKER, P. A. Pneumococcal antibody responses in elite swimmers. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.105, p.238-244, 1996.
- HACK, V., WEISS, C., FRIEDMANN, B., SUTTNER, S., SCHYKOWSKI, M., ERBE, N., BENNER, A., BÄRTSCH, P., DRÖGE, W. Decrease plasma glutamine level and CD4<sup>+</sup> T cell number in response to 8 wk of anaerobic training. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.272, p.E788-E795, 1997.
- HALL, G. V., WAGENMAKERS, A. J. M. Effect of carbohydrate supplementation on plasma glutamine during prolonged exercise and recovery. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v.19, p.82-86, 1998.
- HENNINGSSEN, G. M., KOLLER, L. D., EXON, J. H., TALCOTT, P. A., OSBORNE, C. A. A sensitive delayed-type hypersensitivity model in the rat for assessing *in vivo* cell-mediated immunity. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.70, p.153-165, 1984.
- KEW, S., WELLS, S. M., YAQOUB, P., WALLACE, F. A., MILES, E. A., CALDER, P. C. Dietary glutamine enhances murine t-lymphocyte responsiveness. *J. Nutr.*, Bethesda, v.129, p.1524-1531, 1999.
- KOYAMA, K., KAYA, M., TSUJITA, J., HORI, S. Effects of decrease plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v.77, p.25-31, 1998.
- LUND, P. Determination of glutamine with glutaminase and glutamate dehydrogenase. In: BERGMEYER, H.U., ed. *Methods of enzymatic analysis*. 3.ed. London: Academic Press, 1986. v.8, p.357-363.
- MACKINNON, L. T. Chronic exercise training effects on immune function. *Med. Sci. Sports Exercise*, Baltimore, v.32, p.S369-S376, 2000.
- MACKINNON, L. T., HOOPER, S. L. Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. *Med. Sci. Sports Exercise*, Baltimore, v.28, p.285-290, 1996.
- MARQUEZI, M. L. *Efeito da suplementação de aspartato e asparagina sobre os determinantes de fadiga em ratos submetidos a exercício agudo de natação de intensidade supra-limiar anaeróbio metabólico até a exaustão*. São Paulo, 1999. 47p. [Dissertação de Mestrado - Escola de Educação Física e Esporte - USP].
- NIEMAN, D. C., PEDERSEN, B. K. Exercise and immune function. *Sports Med.*, Baltimore, v.27, p.73-80, 1999.
- PARRY-BILLINGS, M., LEIGHTON, B., DIMITRIADIS, G., VASCONCELOS, P. R. L., NEWSHOLME, E. A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis in the rat. *Int. J. Biochem.*, Bristol, v.21, p.419-423, 1989.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY JUNIOR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition "ad hoc" writing committee on the reformulation of the ain-76a rodent diet. *J. Nutr.*, Bethesda, v.123, p.1939-1951, 1993.

- ROGERO, M. M., TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre glutamina, atividade física e sistema imune. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.36, n.2, p.201-212, 2000.
- ROHDE, T., ASP, S., MACLEAN, D. A., PEDERSEN, B. K. Competitive sustained exercise in humans, lymphokine activated killer cell activity, and glutamine: an intervention study. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v.78, p.448-453, 1998a.
- ROHDE, T., MACLEAN, D. A., PEDERSEN, B. K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. *Med. Sci. Sports Exercise*, Baltimore, v.30, p.856-862, 1998b.
- ROHDE, T., MACLEAN, D. A., HARTKOOP, A., PEDERSEN, B. K. The immune system and serum glutamine during a triathlon. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v.74, p.428-434, 1996.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v.20, p.315-328, 1947.
- ROWBOTTOM, D. G., GREEN, K. Acute exercise effects on the immune system. *Med. Sci. Sports Exercise*, Baltimore, v.32, p.S396-S405, 2000.
- ROWBOTTOM, D. G., KEAST, D., MORTON, A. R. The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med.*, Baltimore, v.21, p.80-97, 1996.
- ROWBOTTOM, D. G., KEAST, D., GOODMAN, C., MORTON, A. R. The haematological, biochemical profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. *Eur. J. Appl. Physiol.*, Berlin, v.70, p.502-509, 1995.
- SANCHEZ, M. C. A. Testes sorológicos. In: FERREIRA, A. W., AVILA, S. L. M., eds. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p.9-48.
- SHEWCHUCK, L. D., BARACOS, V. E., FIELD, C. J. Dietary l-glutamine supplementation reduces the growth of the Morris hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.127, p.158-166, 1997.
- SHINKAI, S., WATANABE, S., ASAI, H., SHEK, P. N. Cortisol response to exercise and post-exercise suppression of blood lymphocyte subset counts. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v.17, p.597-603, 1996.
- STATISTICA for windows v.6. Statsoft, Tulsa, OK, USA, v. II, 2002.
- TITUS, R. G., CHILLER, J. M. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.45, p.65-78, 1981.
- VIEIRA, R., HAEBISCH, E., HELL, N. S., CURI, R. Sistema de natação para exercício físico de ratos. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, v.31, p.387-394, 1988.
- WALSH, N. P., BLANNIN, A. K., ROBSON, P. J., GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune function: links and possible mechanisms. *Sports Med.*, Baltimore, v.26, p.177-191, 1998.
- WANNAN, G. M., STIMSON, W. H., ALEXANDER, J. The effects of four different exercise protocols on antigen specific immunoglobulin production. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart, v.18, p. S116, 1997.
- ZIEGLER, T. R., BENFELL, K., SMITH, R. J., YOUNG, L. S., BROWN, E., FERRARI-BALIVIERA, E., LOWE, D. K., WILMORE, D. W. Safety and metabolic effects of L-glutamine administration in humans. *JPEN, J. Parenter. Enteral Nutr.*, Silver Spring, v.14, p.137S-146S, 1990.

Recebido para publicação em 20 de setembro de 2002.