Elizabeth do Nascimento

Efeitos da L-Glutamina ou do treinamento físico moderado sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos ou não a estresse agudo

RECIFE

2004

Elizabeth do Nascimento

Efeitos da L-Glutamina ou do treinamento físico moderado sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos ou não a estresse agudo

RECIFE

2004

Elizabeth do Nascimento

Efeitos da L-Glutamina e/ou do treinamento físico sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos ou não a estresse agudo

Tese apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de "Doutor em Nutrição"

Elizabeth do Nascimento

Orientador: Raul Manhães de Castro

Doutor em Farmacologia Experimental e Clínica pela Universidade de Paris

Profº. Adjunto do Dep. de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde,

Universidade Federal de Pernambuco

Co- orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará

Profª Adjunta do Dep. de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde,

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2004

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde em colaboração com o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), no Setor de Microbiologia Clínica, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)

"Para um grande sonho tornar-se verdadeiro, a primeira condição é ter uma grande capacidade de sonhar; a segunda, é a perseverança, a fé no sonho."

Hans Selye

Recife

2004

MENSAGEM

ECO DA VIDA

Um pequeno garoto e seu pai caminhavam pelas montanhas,

De repente o garoto cai, se machuca e grita:

- Aai!!!!!!

Para sua surpresa escuta a voz se repetir, em algum lugar da montanha:

- Aai!!!!!!

Curioso, pergunta: - Quem é você?

Recebe como resposta: - Quem é você?

Contrariado, grita: - Seu covarde!!!

Escuta como resposta: - Seu covarde!!!

Olha para o pai e pergunta aflito: - O que é isso?

O pai sorri e fala: - Meu filho, preste atenção!!!

Então o pai grita em direção a montanha: - EU ADMIRO VOCÊ!

A voz responde: - EU ADMIRO VOCÊ!

De novo o homem grita: - VOCÊ É UM CAMPEÃO!

A voz responde: - VOCÊ É UM CAMPEÃO!

O garoto ficou espantado sem entender nada.

Então o pai explica:

As pessoas chamam isso de ECO, mas na verdade isso é a VIDA.

Ela lhe dá de volta tudo o que você diz ou faz.

Nossa vida é simplesmente o reflexo das nossas ações

Se você que mais amor no mundo, crie mais amor no seu coração.

Se você quer mais responsabilidade da sua equipe, desenvolva a sua responsabilidade.

Se você quer mais tolerância das pessoas, seja mais tolerante.

Se você quer mais alegria no mundo, seja mais alegre.

Tanto no plano pessoal quanto no profissional, a vida vai lhe dar de volta o que você deu a ela.

SUA VIDA NÃO É UMA COINCIDÊNCIA;

SUA VIDA É A CONSEQÚÊNCIA DE VOCÊ MESMO!!!

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos Meus pais (minha mãe in memória) por terem contribuído de forma fundamental para a minha formação como pessoa e como profissional.

Aos Meus filhos (Maíra e Tiago) por serem uma das forças que me impulsiona a ter coragem de enfrentar os grandes obstáculos.

A mim mesma por todo o esforço desprendido, pelas noites mal dormidas, pelas lágrimas perdidas, pelas horas dedicadas, pelas alegrias recebidas, pelos frutos colhidos, pelas pessoas que tive o prazer de conhecer e de conviver, pelas abdicações e decisões necessárias, em fim, por todo o aprendizado que vivenciei para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Em especial, ao meu orientador e amigo, Profº Raul Manhães de Castro que aceitou o desafio da realização deste trabalho, que me guiou como orientador e amigo, que teve toda dedicação, paciência, persistência, compreensão, sutileza e sabedoria em me mostrar os caminhos a ser seguidos até a conclusão deste estudo.

A profª Célia M. M. B. de Castro, minha co-orientadora, com quem aprendi a gostar e interessar-me pela imunologia e com a qual aprendi como se deve trabalhar em um laboratório.

A Antônio de Pádua, meu esposo, por estar ao meu lado e tentar compreender-me na árdua e difícil busca da realização de meus objetivos.

A Roberto Pereira, Silvano Araújo, Cauê Veríssimo e Antônio de Pádua, pela realização das ilustrações (fotodigitalização).

Aos colegas, estagiários e todo o pessoal dos laboratórios (LIKA e LAFINNT) que sempre colaboraram com muita dedicação, sobrepujando alguns contratempos, mas, sem os quais seria impossível a realização deste estudo: Carol Leandro, Andrezza Viegas, Magdala Azevedo, América Palmeira, Taisy Ferro, Silene Alves, América Palmeira Maria Carolina, Fátima, Rosângela, Wylla Tatiana, Sônia Marinho, Rogério Silva, Sandra Lopes, Tereza Deiró, Jairza Medeiros, Adenilda Queirós, Lúcia Pires e tantos outros que mesmo sem saberem ou perceberem ajudaram para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Departamento de Nutrição da UFPE que contribuíram das mais diversas formas na trilha deste caminho.

Aos colegas de turma, com os quais compartilhei momentos alegres, tristes, difíceis, prazerosos e importantes da minha vida.

A profª Silvia Regina e aos estagiários do Departamento de Anatomia, que participaram comigo na realização deste projeto.

A todos os meus amigos que de forma direta ou indireta sempre me deram força, às vezes mais perto, às vezes mais longe, porém, presentes na hora certa para que eu cumprisse mais essa jornada.

Aos estudantes com quem tive a oportunidade de ensinar e (muito mais) de aprender durante o percurso desta tese.

Aos colegas e técnicos (Fábio Poroca, Moreno e Bruno) que tanto me ajudaram para solucionar os problemas de informática, permitindo a finalização deste trabalho.

E, acima de tudo e de todos, a Deus, por me dar condições de enfrentar as diversas batalhas que a vida nos reserva.

RESUMO

Estudaram-se os efeitos do treinamento físico moderado e da suplementação com glutamina sobre parâmetros imunológicos de ratos submetidos ou não a estresse agudo na idade adulta. Foram avaliadas: eventuais alterações qualitativas e quantitativas nas séries vermelha e branca do sangue, a taxa de fagocitose e a liberação de radical superóxido em macrófagos alveolares. Animais jovens recebiam dietas suplementadas com L-glutamina ou com L-glicina durante 10 dias prévios a realização dos estudos. Outro grupo foi submetido a treinamento de natação durante 45 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, com aumento progressivo de carga, segundo o peso corporal do animal até atingir um máximo de 3%. Após 24 horas do término do período de suplementação ou do treinamento, eram submetidos ou não a estresse agudo de contenção durante 40 minutos.. O estresse, a aplicação de programa controlado de treinamento moderado ou o emprego de suplementação com glutamina, não modificaram os níveis hematimétricos nos animais. Demonstrou-se que o estresse agudo reduz o número total de leucócitos periféricos com aumento no percentual de neutrófilos ($p < 0,002$) e eosinófilos($p < 0,02$) e, redução de linfócitos ($p < 0,001$). Foi demonstrado que o estresse causa redução na taxa de fagocitose ($p < 0,001$) e na liberação de radicais superóxido ($p < 0,001$) por macrófagos. O modelo do treinamento evitou a redução de leucócitos periféricos ($p<0,001$) e diminuição da fagocitose ($p<0,001$) ocorrida após estresse, mas não alterou a liberação de superóxido. A suplementação com glutamina não induziu proteção à redução de leucócitos ou na taxa de fagocitose após o estresse e nem alterou a liberação de superóxido. Porém, suprimiu a neutrocitose ($p<0,002$) e linfopenia ($p<0,001$). Os achados constituem um alerta acerca dos efeitos deletérios que o estresse pode vir a causar no organismo, sugerem que a realização de exercícios moderados regulares fortalece algumas funções do sistema imune contra as reações adversas do estresse psicológico. Além disso indicam que mais estudos devem ser realizados para discernirem o real efeito de imunonutrientes como a glutamina, uma vez que não foi detectada mudanças globais na imunidade ou proteção contra reações deletérias do estresse agudo em indivíduos sadios, mas, detectou-se efeitos específicos em subpopulações leucocitárias.

ABSTRACT

The effects of the moderate physical training were studied and of the supplementation with glutamine on immunological parameters of rats that were submitted or not to acute stress in the adult age. It was evaluated: eventual qualitative and quantitative alterations in the series red and white of the blood, the phagocytosis rate and the liberation of superoxide radical in alveolar macrophages. Young animals received supplemented diets with L-glutamine or with L-glicin for 10 previous days the accomplishment of the studies. Another group was submitted to swimming training for 45 minutes a day, 5 days a week, for 6 weeks. There was progressive increase of the overload, until reaching a maximum of 3% of the corporal weight of the animal. After 24 hours of the end of the period of the supplementation with glutamine or of the training, the animals were submitted or not to acute stress of contention for 40 minutes. The stress, the application of controlled program of moderate training or the glutamina supplementation, they didn't modify the hematimetric levels in the animals. It was demonstrated that the acute stress reduces the total number of leucocytes with increase in the percentage of neutrophils ($p < 0,002$) and eosinophils ($p < 0,02$) and, reduction of lymphocytes ($p < 0,001$). It was demonstrated that the stress causes reduction in the phagocytosis rate ($p < 0,001$) and in the liberation of superoxide radicals ($p < 0,001$) for microphages. The model of the training avoided the reduction of outlying leukocytes ($p < 0,001$) and the decrease of the phagocytosis ($p < 0,001$) that happens after stress, but it didn't alter the superoxide liberation. The supplementation with glutamina didn't induce protection against the leucocyte reduction or in the phagocytosis rate after the stress and nor altered the superoxide liberation. However, it suppressed the neutrocytosis ($p < 0,002$) and linphocyte reduction ($p < 0,001$). The data constitute an alert one concerning the deleterious effects that the stress can come to cause in the organism. The accomplishment of you regular exercises seems to strengthen functions of the immune system against the adverse reactions of the psychological stress. Besides, the data indicate that more studies should be accomplished to discern the true effect of the imunonutrientes as the glutamine. In this study, in healthy individuals, global changes were not detected in the immunity or protection against deleterious reactions of the acute stress, but specific effects were detected in subpopulations of leucocytes.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS 13
LISTA DE TABELAS 15
LISTA DE QUADROS 16
LISTA DE FIGURAS 17
RESUMO 19
ABSTRACT 20
1. INTRODUÇÃO 22
1.1. Estresse e Imunidade 22
1.2. Exercício físico, estresse e imunidade 25
1.3 Glutamina, estresse e imunidade. 30
2.JUSTIFICATIVA 37
3. HIPÓTESE 39
4. OBJETIVO 41
4.1. Geral 41
4.2. Específicos 41
5. METODOLOGIA 43
5.1 . Delineamento Experimental 43
5.2. Grupos Experimentais 44
5.2.1. Segundo a manipulação nutricional 44
5.2.2. Treinamento físico moderado 45
5.2.3. Segundo o estado fisiológico 47
5.3. Parâmetros Hematológicos 48
5.3.1. Procedimento de coleta do sangue 48
5.3.2. Análise da série vermelha – hemácias, hemoglobina e hematócrito 49
5.3.2.1. Contagem total de hemácias 49
5.3.2.2. Determinação de Hemoglobina 51
5.3.2.3. Determinação de Hematócrito 51
5.4. Análise da série branca – Leucograma 52
5.4.1. Contagem total de leucócitos 53
5.4.2. Contagem diferencial de leucócitos 54
5.5. Análise da atividade celular 55
5.5.1. Cultura dos macrófagos 57
5.5.2. Estudo da taxa de fagocitose 58
5.5.3. Estudo da liberação de superóxido 58
5.5.4. Determinação da liberação de superóxido 59
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA 61
7. RESULTADOS 63
7.1. Análise da série vermelha – estudo dos índices hematimétricos 63
7.1.1. Hemácias (nº de células $x10^6/mm^3$) 63
7.1.2. Hemoglobina (g/dl) 63
7.1.3. Hematócrito (%/mm^3) 63
7.2. Análise da série branca - leucograma 65
7.2.1. Contagem total de leucócitos 65
7.2.2. Contagem diferencial de leucócitos 66

7.3. Estudo da atividade celular – macrófagos alveolares 68
7.3.1. Taxa de fagocitose por macrófagos do lavado broncoalveolar 68
7.3.2. Análise da liberação de superóxido (O_2^-) por macrófagos alveolares 70
8. DISCUSSÃO 74
9. CONCLUSÕES 88
10. PERSPECTIVAS 90
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92
ANEXOS 104
ARTIGOS PUBLICADOS 106

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BAL	Lavado bronco alveolar
C	Controle
CD+	“Cluster of diferentiation” – marcadores celulares
CO_2	Dióxido de carbono
dl	Decilitro
DMSO	Dimetil sulfóxido de sódio
DO	Densidade ótica
E	Estresse
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EP	Erro padrão
FC	Fator de calibração
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
GH	Hormônio do crescimento
GLI	Glicina
GLN	Glutamina
GLN/E	Glutamina \Estresse
h	hora
HANKS	Solução salina balanceadas
Hb	Hemoglobina
Hm	Hematócrito
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ip.	Intraperitonial
K	Constante para cálculo da liberação de superóxido
Kg	kilograma
Lc	Leucócitos

LH	Hormônio luteinizante
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm^3	Milímetros cúbicos
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeos fosfato (reduzida)
NK	Linfócitos Natural Killer (externinadoras naturais)
nm	Nanômetro
ºC	Graus Celsius
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Concentração de íons hidrogênios em uma solução.
PMA	Acetato miristato de forbol
POMC	Pró ópio melanocortina
PRL	Prolactina
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura para macrófagos
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SOD	Superóxido dismutase
T	Treino
T/E	Treino / estresse
TNF	Fator de necrose tumoral
TSH	Hormônio estimulador da tireóide
TURK	Solução de ácido acético a 3%
VO_2mäx	Capacidade máxima de captação de oxigênio durante o exercício

LISTA DE TABELAS

1. Composição da dieta padrão LABINA (Purina do Brasil), utilizada na alimentação dos animais. 43
2. - Efeitos do treinamento e do estresse sobre a contagem total de hemácias, valores de hemoglobina e hematócrito de ratos adultos. Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T), Treino/ Estresse (T/E). 64
3. Efeito da suplementação com glutamina e do estresse sobre a contagem total de hemácias, valores de hemoglobina e hematócrito de ratos adultos. Grupos: Controle(C), Estresse (E), Glutamina (GLN) Glutamina/Estresse (GLN/E). 64
4. Efeito do estresse e do treinamento de natação sobre a contagem diferencial de leucócitos (%) de animais adultos. Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T), Treino/Estresse (TE). 67

5 - Efeito do estresse e da suplementação com glutamina sobre a contagem diferencial de leucócitos (%) de animais adultos. Grupos: Controle (C) , Estresse (E), Glutamina (GLN), Glutamina/Estresse(GLN/E). 68

LISTA DE QUADROS

Q 1	Organograma geral da distribuição dos grupos	44
Q2	Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para contagem da série vermelha.	49
Q3	Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para contagem da série branca	52
Q4	Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para análise da liberação de superóxido.	55
Q5	Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para análise da liberação de superóxido	58

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Aminoácido glutamina	45
FIGURA 2	Aminoácido glicina	45
FIGURA 3	(A) Cuba de natação em visão de perfil	46
	(B) Cuba de natação em visão de profundidade	
FIGURA 4	Colocação de peso na cauda	47
FIGURA 5	Rato em treinamento de natação	47
FIGURA 6	Ratos em controle do estresse aquático	47
FIGURA 7	Ratos em aquecimento pós-treino	47
FIGURA 8	Cilindro de contenção do animal	47
FIGURA 9	(A). Coleta de sangue periférico	48
	(B). Obtenção do sangue periférico	
FIGURA 10	Hemocitômetro ou câmara de Neubauer	50
FIGURA 11	Hemocitômetro ou câmara de Neubauer	54
FIGURA 12	Traqueostomia	56
FIGURA 13	Lavado coletado	56

FIGURA 14 Lavado centrifugado 56

G1 - Número total de leucócitos segundo o estresse, o treino e o treino/ estresse em ratos adultos. Ratos: Controle(C), Estresse (E), Treino (T), Treino/Estresse (T/E). 65

G2 Número total de leucócitos segundo o estresse e a suplementação com glutamina (GLN). Grupos Controle (C), Estresse (E), Glutamina (GLN), Glutamina/Estresse (GLN/E). 66

G3 Efeito do estresse, do treinamento sobre a taxa de fagocitose por macrófagos do lavado broncoalveolar de ratos adultos. Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T), Treino/Estresse (T/E). 69

G4 Efeito do estresse e da suplementação com glutamina sobre a taxa de fagocitose por macrófagos do lavado broncoalveolar de ratos adultos. Grupos: Controle (C), Estresse (E), Glutamina (GLN), Glutamina/Estresse (GLN/E). 70

G5 Efeito do estresse, do treinamento e da suplementação com glutamina e sobre a liberação de superóxido por macrófagos do lavado broncoalveolar de ratos adultos segundo o tempo transcorrido. 71

G6 Efeito do estresse, do treinamento e da suplementação com glutamina e sobre a liberação de superóxido por macrófagos do lavado broncoalveolar de ratos adultos. Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T), Glutamina/Estresse (GLN). 72

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse e Imunidade

A população adulta a partir de meados do século XX foi evidentemente marcada por uma mudança no estilo de vida associado a um incremento da ocorrência de doenças como hipertensão arterial, cardiopatias, distúrbio emocional e outras morbidades. O desenvolvimento dessas enfermidades tem sido associado a desequilíbrios homeostáticos. Uma vez rompido esse equilíbrio, o organismo pode utilizar mecanismos mais amplos de adaptação (MCEWEN, 1997).

O estresse pode constituir um dos fenômenos de maior relevância na promoção do desequilíbrio homeostático, uma vez que o mesmo está associado a redução da atividade do sistema vigilante do corpo, o sistema imune (OTTAVIANI e FRANCESHI, 1996; GAILLARD, 1994) e não menos freqüente com o desencadeamento de algumas patologias supracitadas (MELLO et. al., 2003; MARGIS et. al., 2003).

Segundo Selye (1976), o estresse constitui uma resposta não específica do organismo a cada situação (GRAY, 1993). Esta é uma definição muito genérica para um fenômeno já bem conhecido e experimentado (GRAY, 1993). Ademais, parece haver mas ambigüidades semânticas fundamental, relacionadas ao fato de que o estresse tem dois lados intimamente associados, o estímulo e a resposta (OTTAVIANI e FRANCESCHI, 1996). Realmente, estresse pode indicar estímulo, a resposta ao estímulo ou ambos. Diante deste fato, Selye (1976) criou um neologismo e introduziu a palavra “estressor” para significar agente causal, mantendo o termo “estresse” para a condição resultante.

De acordo com Selye (1976), estressores são estímulos que induzem mudanças na estrutura e composição química do corpo, enquanto estresse é a reação induzida pelos

estressores (GRAY, 1993). Não obstante, muitos cientistas relutaram em aceitar o desmembramento arbitrário do estresse que consideram fenômeno unitário e indissociável.

O estresse está associado a alterações anatomo-funcionais, nas quais muitas são de conseqüências desconhecidas. A totalidade destas alterações, segundo Selye (1946), é a Síndrome da Adaptação Geral (SAG). A SAG evolui em três estágios: inicialmente, a reação de alarme; em seguida, o estágio de resistência e, finalmente, o estágio de exaustão (OTTAVIANI e FRANCESCHI, 1996).

Já está bem estabelecido que estressores atingem o encéfalo, particularmente, a região do hipotálamo e locus coeruleus, em recíproca inervação com várias regiões do sistema nervoso central (SNC) (MELLO et. al., 2003). Deste ponto, há secreção de várias substâncias como pro-opiomelanocortina (POMC) e peptideos relacionados , GH, PRL, TSH, LH, FSH e peptideos derivados da pró-enceflaina (GAILLARD, 1994), que funcionam como sinais do sistema nervoso em resposta ao estresse, atuando principalmente via eixo HPA ou via ativação do sistema nervoso simpático (MELLO et. al., 2003; DE CASTRO et. al., 1999). A hipófise é o principal alvo das substâncias liberadas pelo hipotálamo (MELLO et. al., 2003). Em seqüência, hormônios hipofisários atuarão na tireóide (FORNER et. al., 1996), adrenal, (MCEWEN et. al., 1997), glândulas sexuais (GAILLARD, 1994; OTTAVIANI e FRANCESCHI, 199) timo e outros órgãos linfóides (GAILLARD et. al., 1994; DE CASTRO et. al., 1999). Indiscutivelmente, os órgãos linfóides (STEFANSKI et. al., 2003) e as células imunes (ELENKOV et. al., 1999; BRENNER et. al., 1998) constituem um alvo extremamente sensível aos mediadores liberados pelas estruturas nervosas (ELENKOV et. al., 1999).

As células do sistema imune parecem possuir receptores para opióides, adrenalina, cortisol, hormônio do crescimento e diversos outros mediadores envolvidos na reação ao estresse (BRENNER et. al., 1998; GAILLARD, 1994). Além dos receptores, essas células parecem possuir também a capacidade de secretar alguns destes mediadores (DE CASTRO et.al., 1999; GAILLARD, 1994). De forma idêntica, os diferentes tipos de células do sistema nervoso (neurônios, astrócitos e microgliócitos) também sintetizam citocinas e/ou respondem a elas (GAILLARD 1994; DE CASTRO et.al., 1999). Com base nestes pressupostos, admite-se que substâncias secretadas pelo sistema imune influenciem a funcionalidade de estruturas nervosas e o padrão de liberação hormonal.

O efeito do estresse emocional sobre o sistema imune em humanos, é empiricamente bem conhecido, mas apenas "recentemente" vem sendo estudado de forma sistemática e científica. A maior evidência em favor de um envolvimento da "mente" na resposta imune ao estresse vem de estudos sobre o estresse emocional, psicológico e social (ELENKOV et. al., 1999; MELLO et. al., 2003; STEFANSK et. al., 2003).

A complexidade do sistema imune e a interação entre os sistemas endócrino e nervoso permitem a observação de um padrão diverso de respostas imunes desencadeadas no estresse a partir de estímulos estressores. Assim, alguns parâmetros mostram-se aumentados enquanto outros reduzidos (DHABHAR, 2002; SILBERMAN et. al., 2004; CANNON, 1993)

De modo similar às alterações observadas pelo estresse emocional sobre componentes imunes, o exercício físico intenso tem se mostrado como um modelo aplicável e reproduzível dessas alterações (PEDERSEN E HOFFMAN-GOETZ, 2000). E, segundo os mesmos autores, as mudanças provocadas por situações de estresse físico ou psicológico,

desenvolvem respostas semelhantes sobre o funcionamento do sistema imune, culminando por vezes com o aparecimento de um quadro imunodepressivo.

A associação entre exercício físico e imunidade, desperta o interesse de pesquisadores desde o início do século passado (CANNON, 1993). Postula-se que o exercício físico moderado (< 65% do $VO_{2máx}$) esteja associado a incremento da imunidade enquanto que o exercício físico mais intenso (> 65% do VO_{2max}) e prolongado (< 90 minutos) ou o treino excessivo parecem enfraquecê-la (PEDERSEN e HOFFAMAN-GOETZ, 2000; WOODS et. al., 1997).

1.2. Exercício físico, estresse e imunidade

Diferentes tipos e cargas de exercício físico podem provocar alterações distintas no sistema imune. Neste sentido, é importante conhecer como o exercício agudo (carga súbita de esforço), moderado (entre 50 a 65% do $VO_{2\ máx}$) ou intenso (acima de 65% do $VO_{2\ máx}$) podem influenciar alguns parâmetros da imunidade tanto celular como humoral (CANNON, 1993; PYNE e GLEESON, 1998).

Encontra-se bem definido que o exercício físico, enquanto modelo mensurável de indução de estresse, provoca alterações no sistema imunológico (ESPERSEN et. al., 1996; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; BRENNER, 1998). De fato, a ativação do sistema nervoso simpático durante a atividade física, estimula a produção e a liberação de "hormônios do estresse" (BRENNER et. al., 1998). Essa ativação, modulada via eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), e sistema nervoso simpático (MELLO et al., 2003), parece possuir uma relação intrínseca com os componentes do sistema imune, não só pela presença de receptores hormonais em leucócitos, mas também pela relação anatômica observada entre os sistemas (GAILLARD, 1994).

As alterações transitórias causadas no sistema imune por uma súbita carga de exercício físico fazem parte do conjunto de respostas orgânicas agudas (ESPERSEN et. al. 1996; MACKINON, 2000; ALI et. al., 2003). Embora a significância clínica dessas mudanças ainda não esteja totalmente estabelecida, constata-se que alguns parâmetros imunes são severamente afetados (NEWSHOLME, 1994; NIELSEN, 2003). Dentre os componentes do sistema imune alterados pelo exercício físico agudo, destacam-se as alterações no perfil de leucócitos circulantes (MCCARTHY et. al., 1991; ALI et. al., 2003), proliferação de linfócitos (PEDERSEN et. al., 1997; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000), atividade de células imunocompetentes (WOODS et. al., 1997; PEDERSEN et. al., 1997) e mudanças na liberação de vários mediadores químicos (OSTROWSKI et. al. 1999).

Os efeitos do exercício físico sobre o sistema imune são complexos e podem ser vistos como uma particularidade de uma área mais ampla que é a imunologia do esporte (PYNE e GLEESON, 1998). De fato, muitas das alterações imunes ocorridas no organismo durante o exercício agudo são comuns às encontradas em outras formas de estresse físico ou psicológico (ZAHOREC, 2001; SAKAMI et. al., 2003; SILBERMAN et. al., 2004).

Durante e imediatamente a seguir a um exercício físico, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, proteínas de fase aguda e ativação de leucócitos e do sistema complemento, (OSTROWSKI et. al., 1999; BRUUNSGARD et. al., 1997). Observa-se também aumento na concentração e na função das células Natural Killer, linfócitos T e B e na atividade fagocítica e citotóxica de monócitos/macrófagos (WOODS, 1997; PEDERSEN et. al., 1989; TVEDE et. al., 1991). A magnitude e o direcionamento da resposta imune são temporários, e diretamente influenciados pela intensidade, duração, freqüência e tipo do esforço físico realizado (ESPERSEN et. al., 1996; MUJIKA et. al. 1996; LEANDRO et.al., 2002).

Exercícios agudos intensos (>65% do VO_{2max},) por exemplo, provocam alterações metabólicas (redução da saturação da hemoglobina arterial e um aumento na temperatura corporal) e lesões musculares (STEWART e MCKENZIE, 2002; BRUUNSGARD et. al., 1997). A hipóxia aguda não só induz recrutamento de células Ntural Killer para o sangue como também aumenta a atividade destas células (KUWUAHIRA et. al., 1999; OSTROWSKI et. al., 1999). Igualmente, a hipertermia e as lesões teciduais induzem a alterações na resposta imune com liberação de citocinas, em particular as interleucinas e o fator de necrose tumoral (TNF) (OSTROWSKI et. al., 1999; BRUUNSGARD et. al., 1997).

Os exercícios intensos provocam neutrofilia, imediatamente e algumas horas após esforço (PEDERSEN et. al., 1997; MALM et. al., 1999; LEANDRO et. al., 2002). Este aumento é resultado da marginação de neutrófilos ligados às células endoteliais vasculares (SUWANNEE et. al., 2002) e da medula óssea (mediado pelo cortisol) ou como parte da resposta inflamatória às lesões no tecido muscular (OSTROWSK et. al., 1999).

As respostas das sub-populações de linfócitos T a um exercício físico agudo são altamente estereotipadas (ENGLER et. al., 2004; PEDERSEN E HOFFAMAN-GOETZ, 2000). Dependendo da intensidade do exercício físico, os linfócitos são recrutados de órgãos linfóides para a circulação (OTTAWAY e HUSBAND, 1994). Alguns estudos estabelecem que durante um exercício de altíssima intensidade (>90% do $VO_{2máx}$) existe um aumento da contagem de linfócitos na circulação. Imediatamente após o exercício, esse aumento é cerca de 50% a 100% em relação ao valor basal (PEDERSEN e HOFFAMAN-GOETZ, 2000). No período de recuperação (30 minutos após o exercício), a contagem de linfócitos diminui de 30% a 50% abaixo dos níveis pré-exercício, (PEDERSEN e HOFFAMAN-GOETZ, 2000). A adrenalina, e em menor grau a noradrenalina, parecem ser responsáveis pelo efeito imediato do exercício no recrutamento das sub-populações de

linfócitos (células T $CD4^+$, célula T $CD8^+$, células B $CD19^+$, células NK $CD16^+$, células NK $CD56^+$) para o compartimento vascular (BRENNER et. al., 1998; ELENKOV,1999). Ao passo que o cortisol parece ter efeito marcado na linfopenia a seguir ao esforço (PEDERSEN et. al.,1997; MCCARTHY, 1991; BRENNER et. al., 1998).

Os fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos) são importantes células efetoras, altamente regulados por outras células (linfócitos T e B) e por hormônios produzidos pelo sistema nervoso simpático e pelo eixo hipotálamo pituirária adrenal (HPA) (GAILLARD, 1994; ORTEGA et. al., 1997). Além de seu envolvimento na fagocitose e na atividade microbicida e anti-tumoral, os macrófagos manifestam uma função celular acessória como apresentadoras de antígenos, promovendo o desenvolvimento e cooperação da imunidade mediada por linfócitos (SUWANNEE et. al., 2002).

As funções de monócitos/macrófagos parecem estar permeadas por controvérsias segundo o esforço físico seja agudo ou crônico, intenso ou moderado. Ambos efeitos de exercícios agudos, moderados e intensos, em várias espécies animais (humanos, ratos, porcos) têm demonstrado incremento na funcionalidade de macrófagos, incluindo quimiotaxia, aderência e atividade fagocítica e citotóxica (ORTEGA et. al., 1996[b]; ORTEGA et. al., 1997) além da atividade anti-tumoral e produção de ânion superóxido (SUGIURA et. al., 2001). Por outro lado, foi verificado que o exercício físico extenuante induziu uma redução na capacidade de apresentação de antígenos (WOODS et. al., 1997). Assim, a hipótese do exercício ativar os macrófagos para função efetora e suprimir a função celular acessória, parece plausível.

O exercício físico moderado, no entanto, está associado a efeitos de menor intensidade, resultando em menor leucocitose, linfocitose e neutrofilia, imediatamente ao

seu término, e uma menor linfopenia, no período de recuperação (CANNON, 1993; MACKINNON, 2000).

Os efeitos do treinamento crônico sobre o sistema imune são bem menos conhecidos e de difícil aquisição (PEDERSEN e HOFFAMAN-GOETZ, 2000). A atividade de linfócitos natural killer (NK) tem se mostrado controversa entre os estudos. Alguns demonstram incremento da função destas células (NIEMAN et. al., 1993; NIEMAN et. al., 1995[a]), enquanto outros não observam efeito similar (NIEMAN et. al. 1995[b]; TVEDE et. al., 1991) ou mesmo decréscimo da função de células NK (PEDERSEN et. al., 1989). Questiona-se diante das diversidades de resultados, o período de tempo que se mensurou a atividade celular, o tipo de exercício, a intensidade e a duração do mesmo.

A proliferação de linfócitos tem sido relatada por aumento, ou ainda pouco ou nenhum efeito (MACKINNON, 2000; PEDERSEN e HOFFAMAN-GOETZ, 2000) a seguir ao exercício. De modo análogo, os níveis de imunoglobulinas e anticorpos na mucosa mostram padrão comparável aos encontrados para linfócitos (MACKINNON, 2000; PYNE e GLEESON, 1998). Na função de neutrófilos, alguns estudos mostram-na suprimidos (MALM, 1999) ou sem influência (NIEMAN, et. al., 1995[a]).

A evidência que o treinamento físico moderado pode atenuar o efeito do estresse sobre os componentes do sistema imune, está embasada na diminuição da concentração de cortisol no plasma, modulação do número de receptores hormonais nas células imunes (MUJIKA et. al.,1996; BRENNER et. al., 1998), a liberação e ação de outros hormônios como prolactina, opióides e triiodotironina (ORTEGA et. al., 1996[a]; ORTEGA et. al., 1996[b] ORTEGA et. al., 1996[c]) e o aumento do mecanismo de defesa antioxidante (FEHRENBACH e NORTHOFF, 2001; CAMPISI et. al., 2003). Porém, os mecanismos subjacentes a estas alterações ainda não estão totalmente elucidados.

Portanto, a diferença de resultados e opiniões acerca do exercício físico na modulação da função imune advém do uso de diversos tipos e protocolos de esforço físico realizado, da complexidade do sistema imune, dos mecanismos de infecção e virulência para cada patógeno, do estado físico, emocional e nutricional de cada indivíduo.

1.3. Glutamina, estresse e imunidade.

A glutamina é um aminoácido não essencial, sintetizado por diversos tecidos como o fígado, tecido adiposo, pulmão e tecido muscular esquelético (CALDER E YAQOOB, 1999; NASCIMENTO et. al., 2001). Sob condições fisiológicas normais, sua síntese endógena é suficiente para manter as concentrações plasmáticas e as demandas orgânicas em níveis adequados (CALDER E YAQOOB, 1999; WALSH et. al., 1998[a]) Contudo, situações de estresse têm demonstrado que seus níveis séricos em geral, encontram-se reduzidos e que esta redução parece estar diretamente associada a diminuição de várias funções imunes (OEHLER et. al., 2002; MANHART et., al., 2001; NEWSHOLME, 2001; WALSH et. al., 1998[b]).

Dos aminoácidos mobilizados do meio intra para o extracelular, em resposta ao estresse, a glutamina figura entre os primeiros (WALSH et al., 1998[a]). A mobilização da glutamina provavelmente está associada à regulação que os glicocorticóides parecem exercer sobre a atividade da glutamina sintetase e sobre o aumento da liberação de glutamina pelo músculo esquelético (MUHLBACHER et. al. 1984). Além disso, o estresse parece causar aumento da captação da glutamina pelo fígado, rins e intestino (SOUBA et. al. 1990; NASCIMENTO et.al., 2001). O incremento no metabolismo da glutamina durante situações de estresse possui profunda associação com o aumento da proteólise muscular e manutenção do equilíbrio ácido-básico (WALSH et. al. 1998[a]; MAX et. al. 1988). O

aumento catabólico promove aumento na liberação de nitrogênio via desaminação e transaminação, com incorporação deste ao oxoglutarato ou glutamato, com formação de glutamina (GARCIA JÚNIOR et. al., 2000). Neste contexto, ocorre maior liberação muscular deste aminoácido que atua como carreador de amônia para o fígado, para a síntese de uréia ou para a via neoglicogênica (PERRIELO et. al., 1995). O estado de acidose crônica leva o fluxo do aminoácido para o rim e, proporciona a formação de sais de amônio (HWANG e CURTHOYS, 1991). A eliminação dos sais de amônia leva a redução do excesso de íons hidrogênio, e, portanto, manutenção do equilíbrio ácido-básico (HWANG E CURTHOYS, 1991).

Portanto, estados estressantes ou catabólicos associam-se ao aumento do efluxo de glutamina muscular para a circulação, maior transporte para órgãos viscerais (GARCIA JÚNIOR et. al., 2000; WALSH et. al., 1998[a]; PERRIELO et. al., 1995) e concomitantemente, diminuição dos seus níveis plasmáticos (NEWSHOLME et. al., 1988; NEWSHOLME, 2001). Portanto, as mudanças metabólicas ocorridas no estresse, parecem possuir profundas relações com o metabolismo da glutamina no músculo e com a integridade das células imunocompetentes. Newsholme (2001) reporta que no estresse, qualquer diminuição da disponibilidade de glutamina para as células imunes, pode explicar em parte o estado de imunosupressão.

O trato intestinal é um importante utilizador de glutamina, seja de origem dietética ou endógena (SOUBA et. al., 1990). Estudos indicam que no estresse a glutamina pode ser fundamental para a estrutura e função da mucosa intestinal (GIANNOTTI et. al.,1995) Atribuí-se parte dessa necessidade ao incremento de sua utilização como substrato respiratório em detrimento do menor uso de glicose (NASCIMENTO et.al., 2001). Em adição, este aminoácido é precursor essencial para a síntese de purinas e pirimidinas

(ARDAWI e NEWSHOLME, 1984; CURI et. al., 1999), e de enzimas em enterócitos. (NEWSHOLME et. al., 1987).

O consumo da glutamina, para os diversos fins, por linfócitos, macrófagos, neutrófilos, é tão ou mais importante que o da glicose (NEWSHOLME et. al.,1987; ARDAWI, 1988). Ensaios *in vitro* demonstraram que a glutaminase possui alta atividade nos órgãos linfóides (ARDAWI E NEWSHOLME, 1984; NEWSHOLME et. al., 1987). Entretanto, apenas 25% ou menos da glutamina é completamente oxidada nestas células (CURI et. al., 1999; ARDAWI, 1988), o que elucida que a glutamina não é somente utilizada na produção de energia.

A metabolização da glutamina pelas células imunes fornece substratos fundamentais na formação de proteínas, purinas, pirimidinas, glicosamina e NAD+ (ARDAWI, 1988; CURI et. al., 1999). Esse fluxo nas vias biossintéticas aumenta muito durante a síntese de DNA, RNA e lipídios (fosfolipídios, colesterol e triglicerídeos) (CURI et. al., 1998). Estas moléculas são necessárias à formação de nova membrana celular durante a atividade das células fagocitárias (NEWSHOLME et. al., 1987; CURI et. al., 1999), de citocinas (WELLS et. al., 1999; YAQOOB e CALDER, 1998) e de radicais peróxidos (PITHON-CURI et. al., 2002[a] PITHON-CURI et. al., 2002[b]).

Há uma relação direta entre concentração de glutamina, proliferação de linfócitos T (KEW et. al,. 1999; YAQOOB E CALDER, 1997) e taxa de fagocitose por macrófagos (CURI et. al., 1999; PARRY-BILLINGS et. al., 1990). A atividade enzimática e a taxa de utilização da glutamina mostraram-se particularmente elevadas durante a mitose em cultura de linfócitos do timo de ratos (YAQOOB E CALDER, 1997; NEWSHOLME et. al.,1987). Esta proliferação de linfócitos T *in vitro,* avaliada pela medida da incorporação de timidina radioativa ao DNA, é estimulada por adição de mitógenos; geralmente, concanavalina A ou

fitohemaglutinina (BRAND, 1985; ARDAWI, 1988). Concentrações de glutamina na ordem de 0,6 a 1,00 mM/l mostraram-se positivamente relacionadas com incremento da proliferação de linfócitos em humanos (PARRY-BILLLINGS et. al.,1990) e em ratos (YAQOOB E CALDER, 1997; KEW et. al.,1999). Em ordem similar de concentração da glutamina, ocorre também aumento na taxa de fagocitose por macrófagos peritoniais murinos (WELLS et. al., 1999). Assim, a fagocitose, a degranulação e a produção de citocinas por neutrófilos ou macrófagos mostram-se dependentes da disponibilidade de glutamina.

Há uma estreita relação entre produção de citocinas e a modulação da função imune, sendo estas dependentes da presença de glutamina. A adição de glutamina à dieta aumenta a produção por macrófagos do TNF-α, IL-1β e IL-6 (WELLS et.al., 1999). Contudo, a suplementação dietética de glutamina em ratos não parece afetar a produção de IFN-γ; IL-4 e IL-10, embora incremente a expressão de receptores para IL-2 (KEW et. al., 1999).

A defesa do organismo contra agentes patógenos também depende da produção de espécies de oxigênio reativo por fagócitos (CURI et. al.,1998; PITHON-CURI, 2002[a]).A síntese dos radicais-livres de oxigênio parece relacionar-se à disponibilidade de glutamina e glicose (GARCIA et. al., 1998; WALSH et. al., 1998[a]). Estes íons de oxigênio são oxidantes, microbicidas e mediadores da inflamação (MANHART et. al., 1998). A NADPH oxidase catalisa a reação de produção de superóxido (CURI et. al,. 1998). O suprimento de NADPH, fundamental para a enzima, deriva da via pentose-fosfato ou da via da glutamina (GARCIA et. al., 1998; PITHON-CURI, 2002[b]). Durante pinocitose ou fagocitose, o esqueleto carbônico da glicose ou o da glutamina, pode ser desviado para a síntese de lipídios, via formação de piruvato (CURI et. al. 1999); outrossim, pode ser destinado à

síntese de citocinas. Isto pode comprometer a formação de NADPH e, por conseguinte, as propriedades microbicidas das células fagocitárias (CURI et. al., 1998).

A partir dos achados acerca do metabolismo da glutamina nas células do sistema imune, tem-se destacado nas áreas de nutrição e imunidade, referências aos "imunonutrientes" ou "imunomoduladores" (FIELD et.al., 2000). Estes agentes agiriam como moduladores que atuariam incrementando a atividade das células imunes sob diversos aspectos funcionais.

Diversos estudos utilizando modelos animais (GIANNOTTI et. al., 1995; KEW et. al., 1999; WELLS et. al., 1999) e humanos (ZIEGLER et. al. 1992; PARRY-BILLINGS et. al., 1990; FURUKAWA et. al., 2000) têm fornecido suporte para o uso da glutamina como "imunonutriente" para prevenir ou tratar infecções durante estados de imunossupressão. No entanto, ainda permanece sob debate entre os pesquisadores qual a quantidade de glutamina ministrada, qual a via de administração que produz melhor efeito, que período de suplementação deve ser aconselhável e quais os parâmetros imunes mensurados que traduzem maior incremento do sistema imunológico.

Em adição, seu uso como suplemento sobre as taxas de infecção ou na função imunes de indivíduos saudáveis são ainda mais controversos. Uma das populações mais estudadas são os atletas, visto que estes freqüentemente encontram-se associados a estados de "overreachig" ou "overtraining", (WALSH et. al., 1998[b]) redução da concentração de glutamina plasmática após realização de variadas séries de exercício físico (ROHDE et. al. 1998) e aumento da susceptibilidade à infecções (WALSH et. al. 1998[b]).

Rohde et. al., 1998, demonstraram que suplementar atleta após exercício físico a 75% do VO_2máx abolia a redução da concentração plasmática de glutamina mas não surtia efeito

no declínio da atividade de células NK, no número de linfócitos circulantes ou na resposta proliferativa quando estimulados com fitohemaglutinina.

Porém, CASTELL E NEWSHOLME (1997) forneceram importantes evidências acerca do efeito profilático da suplementação de glutamina oral sobre a ocorrência de infecções em atletas. Do total de corredores de maratona e ultramaratona que receberam suplementação com glutamina, 81% dos atletas não apresentaram sintomas de infecção do trato respiratório enquanto no grupo placebo, apenas 49% não reportou sintomas de infecções.

Apesar dos resultados obtidos nos diversos estudos supracitados, as críticas acerca da glutamina com agente imunomodulador permanecem permeadas de intensos debates. Estas críticas advêm do fato de que o uso de fórmulas suplementares contendo outros nutrientes pode exercer ação sinérgica ou antagônica ao efeito esperado para o nutriente. Em adição, argumenta-se acerca dos parâmetros imunes e do tempo em que foram mensurados e o estado nutricional e emocional prévio do indivíduo. Portanto, a partir dos aspectos abordados sobre o exercício físico e o papel modulador da glutamina na função imunológica, este estudo propõe-se a verificar o efeito da suplementação com glutamina e do treinamento físico sobre perfis imunológicos de animais que serão ou não submetidos a estresse agudo de contenção.

JUSTIFICATIVA

2 – JUSTIFICATIVA

O estresse é uma das principais preocupações atuais como fator de risco para as mais diversas patologias da vida moderna, podendo induzir a imunodepressão e, por conseguinte, a maior susceptibilidade a doenças. Igualmente, a procura de estratégias que minimizem ou evitem as conseqüências do estresse na homeostase orgânica, em particular, sobre o funcionamento do sistema imune tem constituído interesse de pesquisa em diversas áreas correlatas como a medicina esportiva, a imunologia, e a nutrição.

A relação entre exercício físico e predisposição a doenças ou benefícios na resistência a infecções vem sendo especulado desde 1920 (CANNON, 1993). Porém, a versatilidade das atividades esportivas constitui fator de difícil controle na mensuração de seus efeitos benéficos ou adversos sobre parâmetros imunes. Atualmente já se tem bem estabelecido diversos efeitos sobre as células imunes decorrentes do exercício agudo segundo sua intensidade e duração. No entanto, os efeitos proporcionados pelo exercício crônico e sistemático ainda são menos conclusivos, mas supõe-se que este possa trazer benefícios para a atividade do sistema imune. É portanto uma área que merece intensa pesquisa. A glutamina como aminoácido não essencial, vem sendo advogado como imunonutriente desde a demonstração de sua importância para proliferação de linfócitos e outras funções das células imunocompetentes (ARDAWI NEWSHOLME, 1984). E de forma mais recente, seu uso vem sendo recomendado como fortalecedor do sistema imune para indivíduos imunodeprimidos (CALDER, 2000) ou submetidos a condições estressantes (CASTEL E NEWSHOLME, 1997). Portanto, a realização de estudos que procurem identificar fatores que contribuam para melhorar a atividade do sistema imunológico ou ainda que o protejam das eventuais conseqüências perniciosas advindas dos estados de estresse, podem trazer valiosas contribuições na aplicação de estratégias, tanto nutricionais como na área de educação física, de intervenção clínica ou epidemiológica.

HIPÓTESES

3 - HIPÓTESES

O estresse agudo de contenção em ratos adultos promove:

- Redução do número total de leucócitos circulantes
- Redução da taxa de fagocitose e da liberação de radical superóxido por macrófagos alveolares

O treinamento físico moderado de natação em ratos adultos promove:

- Nenhuma alteração sobre a série vermelha e branca do sangue
- Proteção à redução de leucócitos ocorrida após estresse agudo
- Aumento da taxa de fagocitose e da produção de radicais superóxido por macrófagos alveolares

A suplementação de glutamina em ratos adultos promove:

- Nenhuma alteração sobre a série vermelha e branca do sangue
- Proteção à redução de leucócitos ocorrida após estresse agudo
- Aumento da taxa de fagocitose por macrófagos e da produção de radicais superóxido por macrófagos alveolares.

OBJETIVOS

4 - OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 - Geral

- Investigar os efeitos do treinamento físico moderado e da suplementação com glutamina sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos ou não a estresse agudo na idade adulta.

4.2 - Específicos

Avaliar em ratos treinados ou não, suplementados ou não, estressados ou não:

- Alterações qualitativas e quantitativas nas séries vermelha e branca do sangue;
- A taxa de fagocitose por macrófagos alveolares;
- A liberação de radical superóxido em macrófagos alveolares;

METODOLOGIA

5 – METODOLOGIA

Esta pesquisa teve a aprovação prévia do Comitê de Ética em Experimentação Animal (Anexo-1)

5.1. Delineamento Experimental

Foram utilizados ratos albinos machos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais criados em biotério sob temperatura de 23 ± 2^0C e ciclo claro/escuro de 12 horas (claro - 6 às 18h; escuro - 18 às 6h) e mantidos em gaiolas coletivas (com o máximo de 6 animais) recebendo ração de manutenção (LABINA) (ver Tabela 1) e água *ad libitum* durante todo o período do experimento.

Tabela 1. Composição da dieta padrão LABINA (Purina do Brasil), utilizada na alimentação dos animais.

ENRIQUECIMENTO * **(Kg de ração)**		**ENRIQUECIMENTO** * **(Kg de ração)**		**NÍVEIS DE GARANTIA** * (%)	
				Umidade (máx)	13
Vitamina A	*20000UI*	Piridoxina	6mg		
Vitamina D_3	6000UI	Biotina	0,1mg	Proteína (mín)	23
		Colina			
Vitamina E	30UI		2000 mg	Extrato Etéreo (mín)	2.5%
Vitamina K	6mg	Manganês	50 mg	Matéria Fibrosa (máx)	9.0
		Iodo			
Vitamina B_{12}	10□g		2 mg	Matéria Mineral (máx)	8.0
Vitamina B_2	8mg	Ferro	65 mg	Cálcio (máx)	1.8
Pantotenato de Cálcio	24mg	Zinco	35 mg	Fósforo (mín)	
Niacina	95mg	Cobre	26 mg		
Tiamina	4mg	Antioxidante	100 mg		
Ácido Fólico	0.5mg				

*Composição da dieta segundo Purina do Brasil

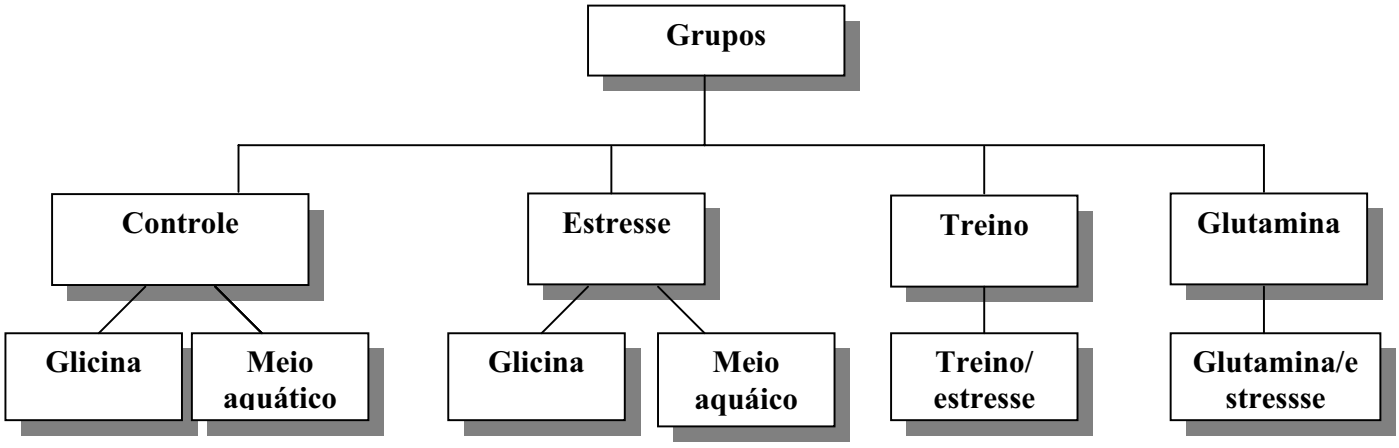
5.2. Grupos Experimentais

Os animais destinados à manipulação nutricional, eram mantidos em gaiolas coletivas, sem se submeterem a nenhuma intervenção até a idade de 85/90 dias de vida. Após esse período, dava-se inicio aos estudos com ou sem aplicação do estresse.

Animais destinados à manipulação do treinamento físico, após a idade de 60/65 dias de vida, eram subdivididos para realizarem treinamento de natação até 24 horas anteriores a inicialização dos estudos com ou sem aplicação do estresse.

Os grupos assim formados foram: controle, estresse, treino, treino/estresse, glutamina, glutamina/estresse (Quadro 1).

Quadro 1 - Organograma Geral da distribuição dos grupos



5.2.1.Segundo a manipulação nutricional

Administração via intraperitonial (*v. ip*.) de L-Glutamina

Entre 85 e 90 dias de idade, os grupos foram divididos segundo tenham ou não recebido a L-glutamina. Para os animais do grupo glutamina, foi administrado L-glutamina (figura 1) por *via intraperitonial,* na dose de 0,2g/kg/dia (peso corporal do animal) diluído

em água destilada,durante 10 dias consecutivos. A utilização do período de 10 dias de suplementação embasa-se em estudos prévios como o de Manhart et. al. 2001 e Ikeda et. al., 2003. Para os animais controle, foi administrado o aminoácido L-glicina (figura 2), por *via intraperitonial,* na dose de 0,4g/kg/dia (peso corporal do animal) de forma a manter as dietas em balanço nitrogenado (dietas isonitrogenadas).

A opção da dosagem de glutamina acima referida teve como base as quantidades utilizadas por Castell e Newsholme (1997) em atletas sadios após exercício físico agudo.

Fig 1- Aminoácido glutamina (GLN)

Fig 2- Aminoácido glicina (GLI)

5.2.2.Treinamento físico moderado

Os grupos que realizaram treinamento físico moderado (natação), tiveram tempo de esforço físico determinado em 45 min/dia e sobrecarga de até 3% do peso corporal, com características de exercício moderado segundo Gobatto et. al., 2001. A sobrecarga aplicada foi presa por uma liga à cauda do animal (figura 4). Utilizou-se um "tanque de natação", com capacidade de 100 litros e sistema de aquecimento dotado de termostato, para manter a água em temperatura entre 30^{o} e 32^{o} C [figura 3 (A) e (B)].

O protocolo de treinamento incluiu uma semana de adaptação ao esforço e 5 semanas subseqüentes de exercício de natação. Essa adaptação incluiu o aumento progressivo do tempo de natação durante 5 dias sem sobrecarga (1º dia=10 min, 2º dia=20 min; 3º dia=30 min; 4º dia=40 min e 5º dia=45 min). Após o período de adaptação, os animais foram submetidos ao treinamento aquático (figura 5) nadando 45 min/dia, cinco dias por semana, com incremento da intensidade do esforço (sobrecarga progressiva segundo o peso corporal -1ª semana=1%; 2ª semana=2%; 3ª semana=2%; 4ª semana=3% e 5ª semana=3%) durante cinco semanas consecutivas.

Para controle do estresse aquático, animais controles foram submetidos ao meio aquático em uma cuba com água com ±10 cm de profundidade (figura 6) por período de tempo igual ao dos animais que realizaram treinamento físico (45 min/dia, cinco dias por semana, durante cinco semanas). Para controle do estresse térmico, todos os animais após saírem da água, permaneciam por cerca de cinco a oito minutos em câmara de aquecimento (figura 7).

Figura 3A- " Tanque de natação" (visão externa)

Figura 3B- " Tanque de natação" (visão interna)

Fig 4- Colocação de sobrepeso na cauda

Fig 5- Rato em treinamento de natação

Fig 6- Ratos no controle de estresse aquático

Fig 7- Ratos em aquecimento pós-treino

5.2.3. Segundo o estado fisiológico

Após o término da suplementação ou do treinamento de natação, cada grupo experimental, era subdividido em animais submetidos ou não a estresse agudo por contenção. Para obtenção de estresse agudo, os animais foram colocados em cilindros de plástico PVC, com dimensões de 20 cm de comprimento e 8 cm de diâmetro, no qual se encaixa em duas outras partes anexas (figura 8), formando um tubo que o mantinha contido durante 40 minutos.

Fig 8 - Cilindro de contenção do animal

5.3. Parâmetros Hematológicos:

Imediatamente após o estresse, procedia-se ou a coleta de sangue periférico (figura 9A e 9B) ou aos procedimentos necessários para coleta do lavado bronco-alveolar (figura 10).

5.3.1. Procedimento de coleta do sangue

Para coleta do sangue, o animal era enclausurado por alguns segundos em uma câmara contendo algodão embebido em éter anestésico (Merck) até que fosse percebido o efeito anestésico. Uma vez anestesiado, o animal era retirado da câmara, realizando-se, em seguida, um pequeno corte com bisturi na extremidade de sua cauda (figura 9A).

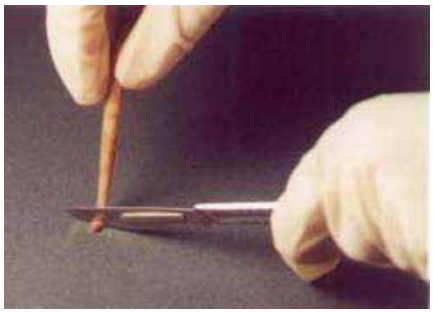


Figura 9 A – coleta do sangue periférico

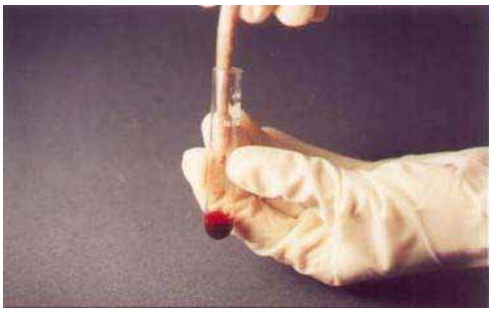


Figura 9B – obtenção do sangue periférico

As amostras de sangue então coletadas, eram distribuídas em tubos de ensaio. Para determinações de índices hematimétricos: hemoglobina, hematócrito, número total de hemácias e análise do leucograma (contagens total e diferencial de leucócitos), era extraído 0,5 ml de sangue e depositado em tubo de 5 ml previamente acrescido de uma gota (20 microlitros) de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diamino tetra acético a 3%) (figura B). Esta quantidade de sangue periférico destinou-se tanto aos estudos da série vermelha como da série branca do sangue. Assim, o total de animais para ambos os estudos, foram:

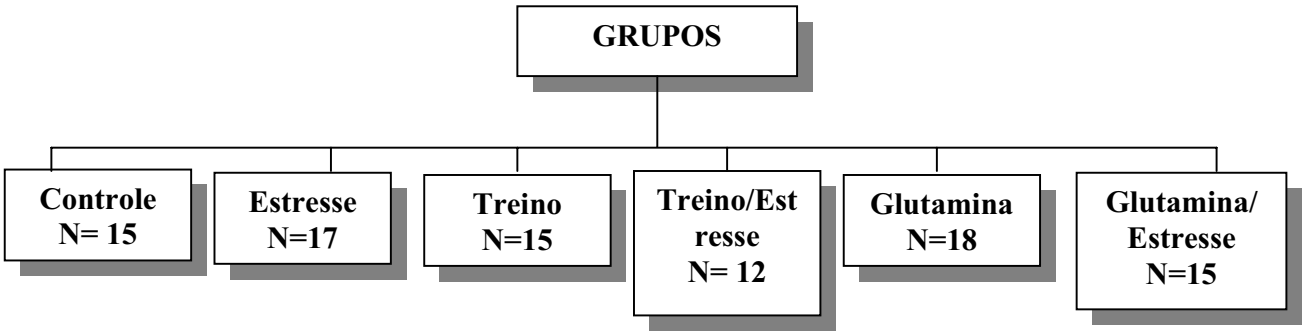
Controle (n=15), Estresse (n= 17), Treino (n= 15), Treino/Estresse (n= 13), Glutamina (n= 18) e Glutamina/Estresse (n= 16), totalizando ao final, 94 animais.

Abaixo serão descritos os procedimentos específicos para determinação de cada estudo.

5.3.2. Análise da série vermelha – hemácias, hemoglobina e hematócrito

Encontra-se disposto no quadro abaixo(Quadro 2) a respectiva distribuição de animais e grupos formados para análise da série vermelha do sangue.

Quadro 2- Organograma referente à distribuição dos animais por grupo, para contagem da série vermelha



5.3.2.1. Contagem total de hemácias

Esse método consiste na determinação do número de hemácias por $1mm^3$ de sangue (LIMA et. al, 2001).

Para a contagem das hemácias, foi usada uma solução de PBS (Tampão fosfato de sódio) a 0,01M com pH=7.02, para manter a integridade das hemácias e, ao mesmo tempo, possibilitar a diluição para quantificação das mesmas.

As hemácias eram contadas à microscopia (Microscópio óptico, utilizando-se uma lente de aumento de 40x) de uma amostra de sangue cuidadosamente diluída: sangue em

PBS a 0,01M com pH=7.02, na proporção de 1:200 em uma câmara de volume conhecido (hemocitômetro ou Câmara de Neubauer - fig. 10)

Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula: Hm x 5 X 200 x 10, onde:

Hm = número total de hemácias contadas (em 1/5 de mm^2)

5 = fator de conversão para 1 mm^2

200 = fator de conversão da diluição utilizada

10 = fator de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina)

O resultado era obtido em número de células / ml ou mm^3 de sangue.

Onde:

n: número de eritrócitos contados nos cinco campos hachurados (figura 10)

5: fator de conversão para 1mm^2

200: fator de conversão da diluição utilizada

10: fator de conversão para 1mm^3

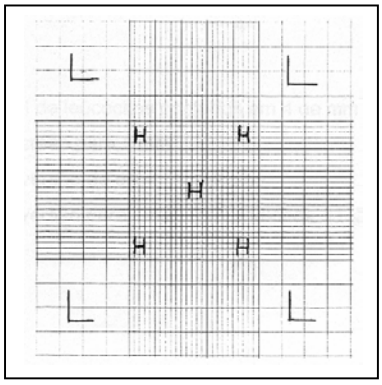


Fig 10- Hemocitômetro ou Câmara de Neubauer para contagem de hemácias

5.3.2.2. Determinação de Hemoglobina

Para a determinação dos valores de hemoglobina foi utilizado o método da cianometemoglobina. O princípio da técnica consiste em: extrusão da hemoglobina através da lise dos eritrócitos com solução hipotônica; formação do produto colorido cianometemoglobina, a partir da reação da hemoglobina com cianetos. A concentração da cianometemoglobina é proporcional a presença de hemoglobina; sendo, através da intensidade da cor (alaranjado), inferida por espectometria (HAINLINE, 1958).

Assim, imediatamente após a coleta, utilizando-se pipeta automática, eram retiradas amostras de 20µl de sangue em duplicata para a dosagem de hemoglobina. Cada amostra de sangue era colocada em tubo âmbar já contendo 5 ml da solução reagente (constituída de 9,43 mmoles de bicarbonato de sódio; 0,77 mmoles de cianureto de potássio; 0,61mmoles de ferrocianeto de potássio). O composto formado era homogeneizado e, posteriormente, mantido em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a formação de cianometemoglobina. Em seguida, eram realizadas as leituras de absorbância (DO) das amostras em espectrofotômetro Beckman DU-62, com filtro de 540 nm. A concentração de hemoglobina (Hb) em g/100ml foi obtida aplicando-se a seguinte fórmula: Hb = DO da amostra x FC (fator de calibração).

5.3.2.3. Determinação de Hematócrito

Os valores de hematócrito foram determinados pela técnica de micro-hematócrito. Esta consiste em determinar, em percentagem, a concentração de eritrócitos em um determinado volume de sangue não coagulado, mediante centrifugação em tubo microcapilar (TERUMO CORPORATION) (Mc GOVEN et. al., 1955).

O tubo microcapilar consiste de um cilindro de vidro, contendo heparina, de 75 mm de comprimento e aproximadamente 1,65 mm de diâmetro, apresentando uma marca aos 55 mm de uma das extremidades.

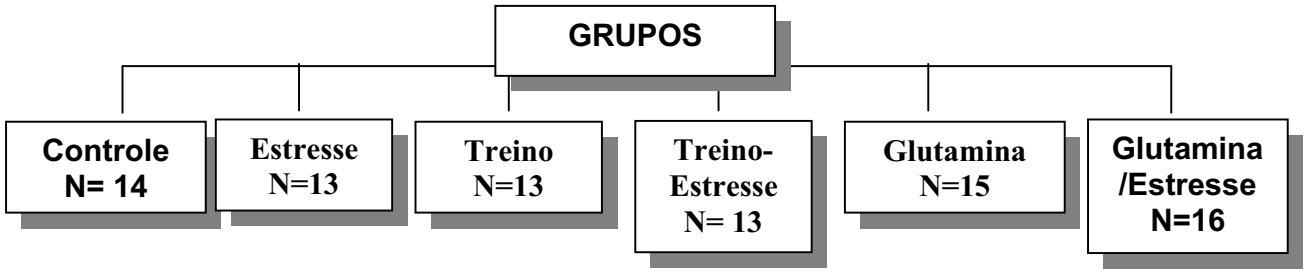
Procedeu-se desse modo: na amostra de sangue com anticoagulante era introduzida uma das extremidades do tubo microcapilar, estando este inclinado. O sangue então fluía por gravidade para o referido tubo até atingir sua marca. Em seguida, com o dedo indicador, o microcapilar era obturado para que o sangue não escoasse selando-se a outra extremidade do tubo com massa de modelar. O microcapilar contendo o sangue ficava em repouso por alguns minutos até que fosse observada a separação do soro e das células vermelhas. Posteriormente, o microcapilar era centrifugado em centrífuga para micro-hematócrito (Micro-capillary centrifuge, modelo MB - IEC) à uma velocidade de 3000 rpm durante 4 minutos.

O valor do hematócrito (porcentagem de células vermelhas no sangue) era obtido em leitor de microcapilar (International Microcapillary Reader - IEC)

5.4. Análise da série branca – Leucograma

Encontra-se disposto no quadro (Quadro 3) abaixo, os respectivos grupos formados para contagem total e diferencial de leucócitos.

Quadro 3- Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para contagem da série branca



5.4.1. Contagem total de leucócitos

Para contagem dos leucócitos era utilizada uma solução diluidora de leucócitos (solução de TURK). A solução de TURK consiste de ácido acético a 3% com a propriedade de destruir os eritrócitos e corar ligeiramente o núcleo dos leucócitos (LIMA et al., 2001).

Os leucócitos eram contados à microscopia (Microscópio óptico, utilizando-se uma lente de aumento de 40x) de uma amostra de sangue cuidadosamente diluída: 1:20 em solução de Turk, em uma câmara de volume conhecido (campo de hemocitômetro em Câmara de Neubauer). Em seguida, fazia-se a contagem de todos os leucócitos encontrados nos quadros marcados pela letra "L" na figura relativa ao hemocitômetro (figura 11).

O resultado era obtido utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos / mm}^3\text{ de sangue} = \frac{\text{Lc. x 20 x 10}}{4}$$

Onde:

Lc = número total de leucócitos contados em 4 de mm^2

4 = fator de conversão para 1 mm^3

20 = fator de conversão da diluição utilizada

10 = fator de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina)

Onde:

n: número de leucócitos contados nos 4 campos marcados em L

4: fator de conversão para 1mm^2

20: fator de conversão da diluição utilizada

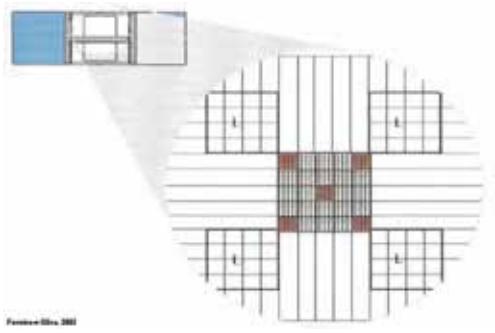


Fig 11- Hemocitômetro para contagem de leucócitos totais

5.4.2. Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos era realizada, utilizando-se a técnica do estiraço sangüíneo. Esta técnica permite que os elementos celulares do sangue espalhado em camada único sobre a superfície de uma lâmina, quando fixados e tratados por corantes especiais, adquiram morfologia e coloração adequadas para o estudo microscópico detalhado e preciso (LIMA et. al, 2001).

O preparo do estiraço consiste em colocar uma pequena gota de sangue sobre uma lâmina e com a ajuda de uma outra com inclinação de 45^0 em relação à primeira, aproximá-la da gota, permitindo que o sangue toque e espalhe-se pelo vértice do ângulo. Em seguida, deslizá-la com um movimento uniforme e para frente, mantendo a mesma angulação e o contato inicial entre as duas lâminas. Assim, a gota de sangue é distendida, formando uma película.

Para a coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. Este se baseia no método de coloração May-Grünwald-Giemsa e constitui um sistema de coloração diferencial dos elementos figurados do sangue, onde as estruturas celulares se coram nas mais diversos nuances entre o vermelho e o azul, permitindo a identificação e a diferenciação entre elas. O kit consiste de uma solução fixadora e duas soluções corantes.

Depois de seca, a lâmina era examinada ao Microscópio óptico com objetiva de 100x por imersão.

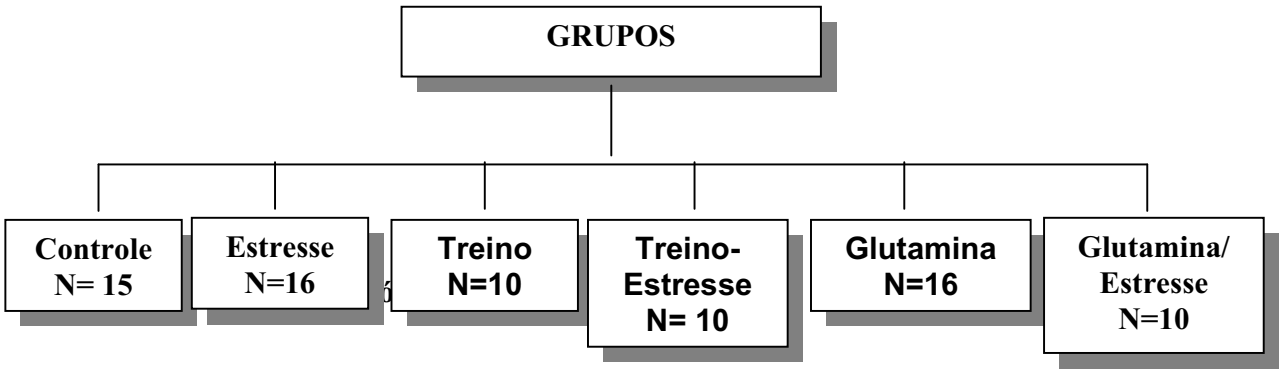
A leitura se dava no estiraço pela contagem de cem células fazendo-se movimentos de "zigue-zague" sobre a lâmina num único sentido. Os diferentes elementos eram contabilizados através da utilização de um contador eletrônico da marca Kacil com teclas correspondentes a cada tipo de célula. A partir dos dados obtidos eram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

5.5. Análise da atividade celular

Para análise da atividade celular (taxa de fagocitose e liberação de superóxido) foram utilizados macrófagos do lavado bronco-alveolar obtidos de ratos com idade entre 95 e 100 dias de vida, num total de 77 animais.

Os animais submeteram-se aos mesmos procedimentos (manipulação nutricional, treinamento e estresse), previamente descritos. Encontram-se distribuídos nos organogramas referentes à taxa de fagocitose (Quadro 4) e liberação de superóxido (Quadro 5).

Quadro 4- Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para contagem da taxa de fagocitose



Antes do procedimento cirúrgico, os animais eram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com cloralose a 0.5% e uretana a 12.5% na proporção de 1 ml por 100g de peso corporal do animal.

Os animais foram anestesiados 24 horas a seguir ao término dos procedimentos de natação e suplementação com glutamina, e, imediatamente após o estresse.

Com o animal anestesiado seguiam-se os procedimentos cirúrgicos de traqueostomia, colocando-se o animal numa superfície plana de parafina em posição dorsal e prendendo suas patas com agulhas ou prendedores.

Para limpeza da área a ser trabalhada, era utilizado álcool iodado. Após a limpeza, cortava-se a pele na porção média do pescoço do animal abrindo-se camadas de músculo e afastando-as até obter acesso à traquéia.

Fig 12- Ttraqueostomia

Fig 13- Lavado coletado

Fig 14- Lavado centrífugado

Com uma pequena pinça isolava-se e prendia-se a traquéia onde era feito um pequeno corte entre dois anéis da traquéia na parte superior. Após a abertura do orifício era inserida uma cânula de plástico acoplada a uma seringa contendo 2ml de soro fisiológico à temperatura ambiente (figura 12).

. Posteriormente fazia-se a introdução do líquido com movimentos de entrada e saída por 3 a 5 vezes. O material recolhido era colocado em tubo Falcon de 50ml (figura 13).

O procedimento de coleta do material era realizado até que se completasse cerca de 30 ml de lavado broncoalveolar, por rato. O material recolhido ficava armazenado em recipiente estéril e em banho de gelo, protegido da luz até que se iniciasse a próxima etapa.

5.5.1.Cultura dos macrófagos

Todo o procedimento com os macrófagos era realizado em capela de fluxo laminar objetivando não contaminar as culturas de células.

O lavado broncoalveolar recolhido era centrifugado a 1500rpm durante 10 minutos. Após essa etapa o precipitado que corresponde às células (figura 14), era ressuspendido com RPMI 1640 para lavagem e em seguida, as mesmas eram contadas.

A contagem dos macrófagos colhidos era realizada na 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. Esse corante é utilizado para avaliar a viabilidade e fazer ao mesmo tempo a contagem das células. Após obtenção do número de macrófagos recuperados, dividia-se esse total para realizar a taxa de fagocitose e a liberação de radical superóxido.

Após a contagem, as células eram ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 contendo soro fetal bovino à 3% e antibióticos (penicilina 100U/ml e estreptomicina (100 μg/ml), anfotericina B (0.25 μg/ml) (SIGMA) em uma densidade de $1x10^6$ células/ml. A

técnica utilizada para obtenção e estudo da taxa de fagocitose baseou-se no trabalho de Malagueño et. al. (1998).

5.5.2. Estudo da taxa de fagocitose

Anterior a contagem de macrófagos, era realizado o preparo e contagem dos fungos (Saccharomyces cerevisae.). Os fungos eram lavados duas vezes com Solução PBS; contados 10^7 células e em seguida misturados na suspensão de macrófagos ($1x10^6$/ml de meio de cultura completo, RPMI 1640) recuperados do lavado bronco-alveolar.

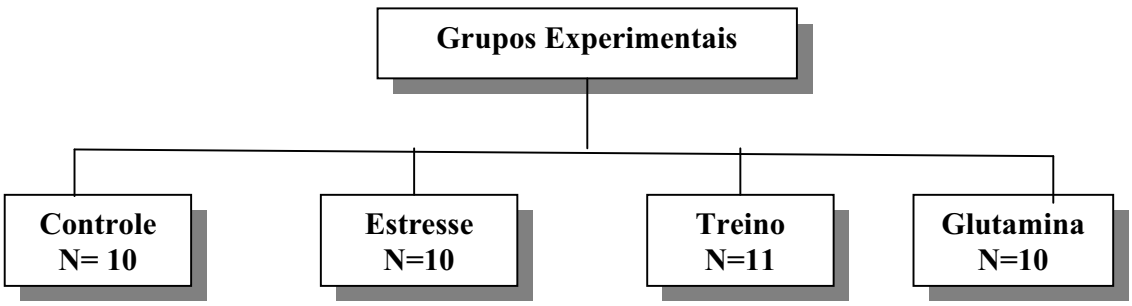
As células (macrófagos e fungos) eram então distribuídas em lâminas de microscopia óptica e incubados a 37ºC, em câmara (atmosfera) úmida durante 1 hora.

A seguir as lâminas eram lavadas com água destilada e secas em temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram o fungo em uma contagem total de 100 células.

5.5.3. Estudo da liberação de superóxido

Parte das células contadas era destinada à realização da liberação de radical superóxido por macrófagos. Os grupos formados para análise da liberação de radicais superóxido estão expressos no organograma abaixo (Quadro 4).

Quadro 5 Organograma referente à distribuição dos animais por grupos, para análise da liberação de superóxido



Como anteriormente descrito, após a ressuspensão do lavado em meio de cultura este era colocado em placa com poços de 35mm de diâmetro para cultura de célula (1ml/poço, 6 poços). Para adesão, as células foram mantidas na placa por 1h a 37^0C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2. As células não aderentes eram descartadas. A monocamada de células foi corada (Diff-Quik set, Baxter Dade AG, Düdinen, Switzerland) para avaliação da proporção de macrófagos.

Estando a proporção de macrófagos em torno de 95%, estas células eram incubadas por mais 1h em meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) com antibióticos e sem soro fetal bovino.

5.5.4. Determinação da liberação de superóxido

O ânion superóxido pode ser detectado pela sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. Para isso, neste estudo, utilizou-se o ferrocitocromo C (30 mg/ml em HBSS, 2.4x 10^{-3} M, Ferrocitocromo C de mitocôndria de cavalo, tipo VI, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO), porém este não é específico apenas para a redução do superóxido sendo necessária a utilização de uma enzima específica, a superóxido dismutase (enzima superóxido dismutase de eritrócitos bovinos - SOD, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO) contendo 3000 u/mg de proteína em solução final de 3 mg/ml em água destilada). (JOHNSTON , 1984).

Dois sistemas de análise descontínua foram utilizados com avaliação a cada 1 hora, durante um período de 2 horas.

Para o preparo destes sistemas foram utilizados macrófagos em cultura (2ml/poço com 10^6 células/ml de meio de cultura) sendo o primeiro sistema adicionado de SOD (controle negativo) e o segundo com soro (controle positivo). Estes eram mantidos em

incubadora com atmosfera úmida à 5% de CO_2 a 37^{o}C, por um tempo de 10 minutos para haver a ativação da enzima superóxido dismutase (SOD).

No primeiro sistema em que foi adicionado a SOD (utilizada para inibir a produção do radical superóxido formado e garantir a especificidade do experimento), o meio era acrescido de citocromo e PMA (13-acetato 12-miristato de forbol- PMA, SIGMA) preparado em solução concentrada de 3000μg/ml em dimetil sulfóxido de sódio (DMSO, SIGMA). O PMA utilizado para estimular as células, era diluído para uma concentração de 2μg/ml em 2,145 ml de Hanks (solução salina balanceada HBSS, GIBCO) e colocado nos poços da placa de cultura.

No segundo sistema contendo água destilada, também era adicionado citocromo C e PMA, sendo colocados nos poços e homogeneizados. Em seguida, as amostras de 600 μl eram retiradas concomitantemente de cada sistema e colocadas em tubos eppendorf. A primeira alíquota recolhida relativa ao tempo "zero" de cada sistema correspondia ao branco. A seguir, eram mantidas em banho de gelo para inibir a reação. A seguir, pelo período de 1 hora e mais 1 hora, amostras subseqüentes eram retiradas e o mesmo procedimento anteriormente descrito era realizado.

Determinação espectrofotométrica: Ao término da última coleta, as amostras eram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min à temperatura ambiente em microcentrífuga (25000g - rotor Ra-1M Kubota).

O sobrenadante era levado para determinação do grau de redução de ferro-citocromo C (proporcional à produção do radical superóxido) usando-se cubetas de 1 ml (quartzo) e espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para a faixa do vermelho (550nm).

O valor obtido era multiplicado por um valor constante obtido após conversão dos valores de absorbância em nanomoles de superóxido/min de acordo com a fórmula (superóxido) = 47,7 X valor de absorbância X volume coletado da amostra.

Os resultados finais eram expressos na primeira e segunda hora em nmoles/min de radical superóxido formado.

Cálculo - [O] = K x DO x Volume da amostra, sendo:

Nesse estudo a constante calculada para o volume final de 4,317 ml em cada poço era K = 205,49.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas análises (representadas em média ± erro padrão) necessárias ao estudo da série vermelha do sangue (hemácias, hemoglobina e hematócrito) foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA) para comparações entre os diferentes grupos. Quando a ANOVA revelava existência de diferença, era utilizado o Teste de TUKEY, a fim de identificar que grupos diferiam entre si.

Nas análises (representadas em mediana, valor mínimo e máximo), foi utilizado o Teste de KRUSKAL-WALLIS, seguido do Teste de DUNN quando os grupos diferiam.

A significância estatística foi considerada admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. Análise da série vermelha – estudo dos índices hematimétricos

Os resultados do número total de hemácias (nº de células $x10^6/mm^3$), valor de hemoglobina (g/dl) e hematócrito (%/mm^3) foram sempre expressos em média ± EP no texto e nas Tabelas 2 e3.

7.1.1. Hemácias (nº de células $x10^6/mm^3$)

Não houve diferença na comparação dos valores do número de hemácias entre os diferentes grupos: **estresse** (7,26 ± 0,28); **treino** (7,58 ± 0,67); **glutamina** (7,72 ± 0,51); **treino/estresse** (7,40 ± 0,35) e **glutamina/estresse** (6,98 ± 0,38) em relação ao **controle** (7,45 ± 0,44);

7.1.2. Hemoglobina (g/dl)

Não houve diferença na comparação dos valores do número de hemoglobina entre os diferentes grupos: **estresse** (13,06 ± 0,32); **treino** (14,08 ± 0,25); **glutamina** (13,71 ± 0,20); **treino/estresse** (13,76± 0,20) e **glutamina/estresse** (13,11± 0,29) em relação ao **controle** (13,85 ± 0,25).

7.1.3. Hematócrito (%/mm^3)

Não houve diferença na comparação dos valores do número de hemoglobina entre os diferentes grupos: **estresse** (40,68 ± 0,70); **treino** (42,12 ± 0,77); **glutamina** (43,67 ± 0,58); **treino/estresse** (43,91± 0,64) e **glutamina/estresse** (42,75 ± 0,82) em relação ao **controle** (41,86 ± 0,76).

Tabela 2 - Efeitos do treinamento e do estresse sobre a contagem total de hemácias, valores de hemoglobina e hematócrito de ratos adultos.

GRUPOS	Hemácias (céls.x10^6/mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%mm^3)
Controle (C)	7,45 ± 0,44	13,85 ± 0,25	41,86 ± 0,76
Estresse (E)	7,26 ± 0,28	13,06 ± 0,32	40,68 ± 0,70
Treino (T)	7,58 ± 0,67	14,08 ± 0,25	42,12 ± 0,77
Treino/Estresse (T/E)	7,40 ± 0,35	13,76± 0,20	43,91± 0,64

Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T) e Treino/Estresse (T/E). Os valores estão expressos em média (± EP). Os testes estatísticos foram ANOVA seguido do teste de TUKEY ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Efeitos da suplementação com glutamina e do estresse sobre a contagem total de hemácias, valores de hemoglobina e hematócrito de ratos adultos.

GRUPOS	Hemácias (céls.x10^6/mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%mm^3)
Controle (C)	7,45 ± 0,44	13,85 ± 0,25	41,86 ± 0,76
Estresse (E)	7,26 ± 0,28	13,06 ± 0,32	40,68 ± 0,70
Glutamina(GLN)	7,72 ± 0,51	13,71 ± 0,20	43,67 ± 0,58
Glutamina/Estresse (GLN/E)	6,98 ± 0,38	13,11±0,29	42,75 ± 0,82

Grupos: Controle(C), Estresse(E), Glutamina (GLN) Glutamina/Estresse (GLN/E). Os valores estão expressos em média (± EP). Os testes estatísticos foram ANOVA seguido do teste de TUKEY ($p < 0,05$).

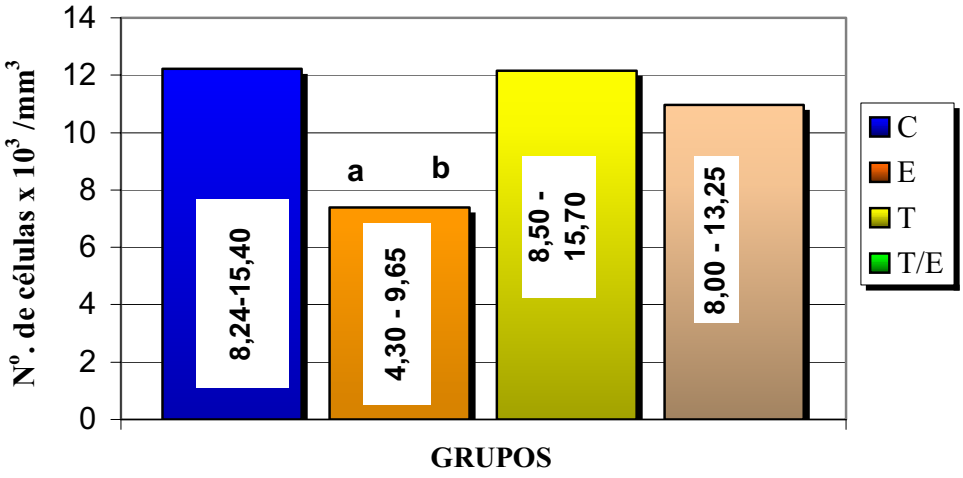
7.2. Análise da série branca - leucograma

7.2.1. Contagem total de leucócitos (nº de células x 10^3/mm3)

O número total de leucócitos, expressos em mediana, valor máximo e valor mínimo foram comparados entre os grupos segundo os tratamentos propostos.

O grupo **estresse** (7.400; 9.650—4.300) mostrou número total de leucócitos menor que os grupos: **controle** (12.225; 15.400—8.250) e grupo **treino estresse** (10.975; 8.000—13.250) (Figura G1).

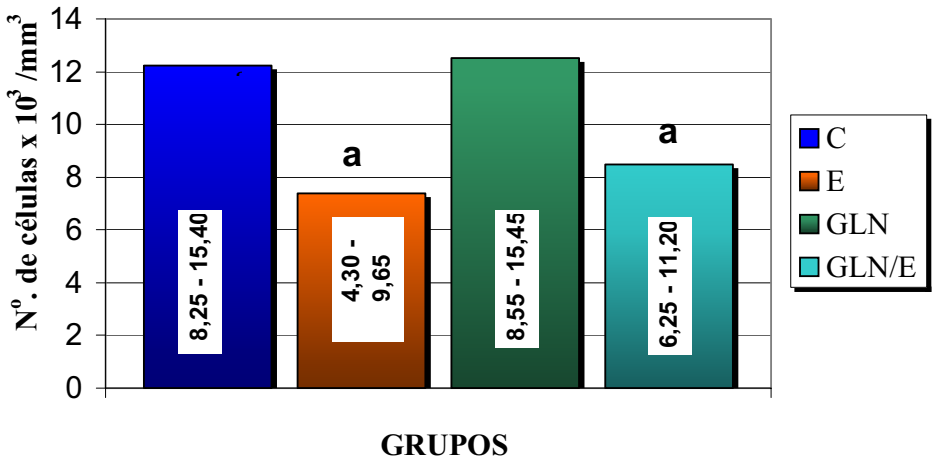
Figura G1-Efeito do estresse, e do treino sobre contagem total de leucócitos de ratos adultos.



Número total de leucócitos segundo o estresse, o treino e o treino/ estresse em ratos adultos. Grupos:Controle(C), Estresse (E), Treino (T), Treino/Estresse (T/E).Valores expressos em mediana e valores máximos e mínimos. Teste estatístico KRUSKAL-WALLIS seguido do teste de DUNN(a= 0,001 C X E; C X T; C X TE; b= 0,001 T/E X E).

A **Figura G2** demonstra a análise do número total de leucócitos segundo a suplementação com glutamina e a aplicação do estresse. O grupo **estresse** (7.400; 9.650—4.300) mostra valores de leucócitos menor que o grupo **controle** (12.225; 15.400—8.250) **.**

Figura G2= Efeito do estresse e da suplementação com glutamina em ratos suplementados sobre o número total de leucócitos de ratos adultos.



Grupos: Controle(C), Estresse (E), Glutamina, (GLN), Glutamina/Estresse (GLN/E). Valores expressos em mediana e valores máximos e mínimos. Teste estatístico KRUSKAL-WALLIS seguido do teste de DUNN (a = <0,001; C X E; C X GLN; C X GLN/E).

7.2.2. Contagem diferencial de leucócitos (%)

Os valores de segmentados ou neutrófilos e eosinófilos do grupo **estresse** (26.0: 17.0--38.0) mostraram-se mais elevados que o grupo **controle** (19.5: 10.0-38.0), e o grupo **glutamina/estresse** (21.0:14.0-32.0). (Tabela 5).

Os valores de linfócitos do grupo **estresse** (66.0; 63.00—68.75) apresentaram-se reduzidos em relação ao grupo **controle** (75.0; 70.0—78.0) e ao grupo **glutamina/estresse** (73.5; 67.5—77.0). (Tabela 4).

Os valores de leucócitos diferenciais dos grupos treino, glutamina, glutamina/estresse e treino/estresse, não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle.

Tabela 4- Efeito do estresse e do treinamento de natação sobre a contagem diferencial de leucócitos de animais adultos.

	LEUCÓCITOS DIFERENCIAIS (%)					
GRUPOS	**Monócito**	**Basófilo**	**Eosinófilo**	**Bastonete**	**Neutrófilo**	**Linfócito**
Controle (C)	**1.5 (1.0-5.0)**	**0.0 (0.0-0.0)**	**2.0 (0.0-4.0)**	**0.0 (0.0-0.0)**	**19.5 (10.0-38.0)**	**75.0 (66.0-88.0)**
Estresse (E)	**1.5 (0.0-4.0)**	**0.0 (0.0-0.0)**	**4.0 (1.0-10.0)**	**0.0 (0.0-0.0)**	**26.0* (25.8-34.0)**	**66.0 * (63.0-68.8)**
Treino (T)	**2.0 (1.0-7.0)**	**0.0 (0.0-0.0)**	**3.0 (0.0-7.0)**	**0.0 (0.0-3.0)**	**18.0 (15.0-33.0)**	**78.0 (69.3-80.3)**
Treino/Estresse(TE)	**1.0 (0.0-3.0)**	**0.0 (0.0-0.0)**	**2.5 (0.0-7.0)**	**0.0 (0.0-3.0)**	**22.0 (17.8-28.0)**	**73.0 (68.3-78.0)**

Grupos: Controles(C), Estresse (E), Treino (T), Treino/Estresse (TE).Os valores estão expressos em mediana, valores máximos e mínimos. Teste estatístico KRUSKAL-WALLIS, seguido do teste de DUNN. [* = indica diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,02$ para neutrófilos) e ($p < 0,001$ para linfócitos].

Tabela 5- Efeito do estresse e da suplementação com glutamina sobre a contagem diferencial de leucócitos (%) de animais adultos.

LEUCÓCITOS DIFERENCIAIS (%)						
GRUPOS	**Monócito**	**Basófilo**	**Eosinófilo**	**Bastonete**	**Neutrófilo**	**Linfócito**
C	**1.5**	**0.0**	**2.0**	**0.0**	**19.5**	**75.0**
	(1.0-5.0)	**(0.0-0.0)**	**(0.0-4.0)**	**(0.0-0.0)**	**(14.-24.0)**	**(70.0-78.0)**
E	**1.5**	**0.0**	**4.0***	**0.0**	**26.0 [a b]**	**66.5[a b]**
	(0.0-4.0)	**(0.0-0.0)**	**(1.0-10.0)**	**(0.0-0.0)**	**(25.8-34.0)**	**(63.0-68.5)**
GLN	**2.0**	**0.0**	**3.0**	**0.0**	**21.0**	**74.0**
	(0.0-7.0)	**(0.0-0.0)**	**(2.0-0.0**	**(0.0-3.0)**	**(17.03.0)**	**(72.0-80.0)**
GLN/E	**2.0**	**0.0**	**3.0**	**0.0**	**21.0**	**73.5.0**
	(0.0-5.0)	**(0.0-0.0)**	**(2.00-9.0)**	**(0.0-2.0)**	**(18.5-5.0)**	**(67.5-77.0)**

Grupos: Controle (C), Estresse (E), Glutamina (GLN), Glutamina/Estresse (GLN/E).Os valores estão expressos em mediana, valores máximos e mínimos.. Teste estatístico KRUSKAL-WALLIS, seguido do teste de DUNN. [a = diferença em relação ao grupo controle – C X E; C X GLN; C X GLN/E ($p < 0,02$ para eosinófilos); ($p < 0,002$ para neutrófilos); ($p < 0,001$ para linfócitos)] [b= diferença em relação ao grupo glutamina/estresse GLN/E X E].

7.3. Estudo da atividade celular – macrófagos alveolares

7.3.1.Taxa de fagocitose por macrófagos do lavado broncoalveolar

A taxa de fagocitose do lavado broncoalveolar (BAL) foi determinada através do percentual de células (macrófagos) que fagocitavam os fungos (Sacaromices cerevisae). Todos os grupos foram comparados através da ANOVA e quando apresentava diferença estatística, realizava-se o teste de TUKEY. Os resultados estão expressos em média (± EP).

A taxa de fagocitose dos animais submetidos a **estresse** (20,6 ± 0,9) apresentou menor valor que o grupo **controle** (27,7 ± 1.0) e o grupo **treino/estresse** (26.2 ± 1,1). Enquanto o grupo **treino** apresentou valores mais elevados que o grupo **controle**. (**Figura G3**).

Efeito do estresse e do treinamento sobre a taxa de fagocitose por macrófagos do lavado broncoalveolar de ratos adultos

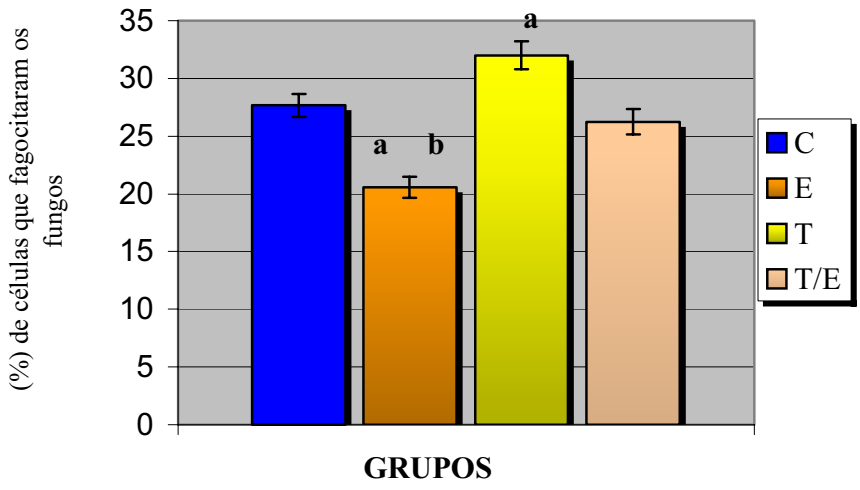


Figura G3 Grupos: Controle(C), Estresse(E), Treino(T), Treino/Estresses(T/E). Teste estatístico, ANOVA seguido de teste de TUKEY (a= 0,001 C X E; C X T; C X TE) (b= 0,001 TE X E).

Na **Figura G4** observa-se que tanto o grupo **estresse** (20.56 ± 3.60), quanto o grupo **glutamina/estresse (**21.8 ± 3.05) apresentaram menor taxa de fagocitose quando comparados ao grupo **controle** (27.67 ± 3.77).

Efeitos do estresse e da suplementação com glutamina sobre a taxa de fagocitose por macrófgos do lavado broncoalveolar de ratos adultos.

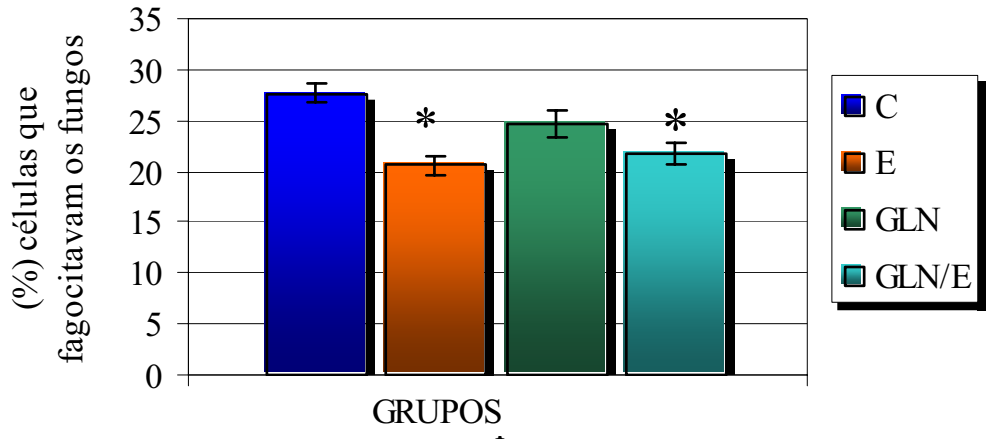


Figura G4- Grupos: Controle (C), Estresse (E), Glutamina (GLN), Glutamina/Estresse (GLN/E).Teste estatístico: ANOVA seguido do teste de TUKEY (*=0,001 C X E; C X T; C X TE) .

7.3. 2. Análise da liberação de superóxido (O_2^-) por macrófagos alveolares

Efeito da liberação de superóxido durante período de duas horas (2h). Os valores expressos em média ± EP em cada hora, demonstra diferença significativa para todos os grupos.

Efeito do estresse, do treinamento e da suplementação com glutamina sobre a produção de superóxido por macrófagos alveolares intergrupos durante a primeira e segunda hora após estimulação com PMA.

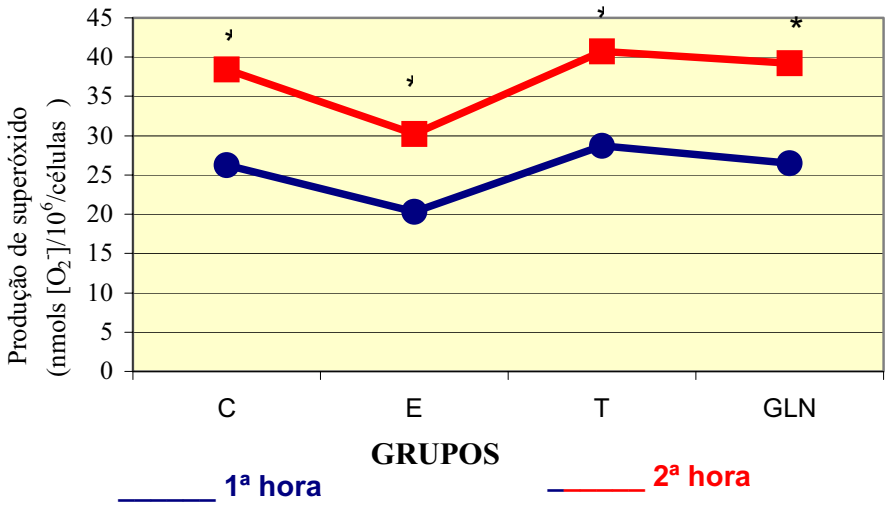


Figura G5 – Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T) Glutamina (GLN). Teste estatístico, ANOVA seguido de teste de TUKEY (*p<0,001= significância entre a produção de superóxido em todos os grupos segundo o tempo).

De acordo com os dados da Figura G6 verifica-se que o grupo estresse tanto na primeira hora (20.34 ± 1.40) quanto na segunda hora (30.23 ± 1.77) apresentou menor liberação de superóxido (p < 0,001) em relação ao grupo **controle** (26.22 ± 1.33 e38.44 ± 1,56) respectivamente na primeira e segunda hora.

.

Produção de superóxido por macrófagos alveolares segundo o estresse, o treinamento e a suplementação com glutamina durante a primeira e segunda hora após estimulação com PMA.

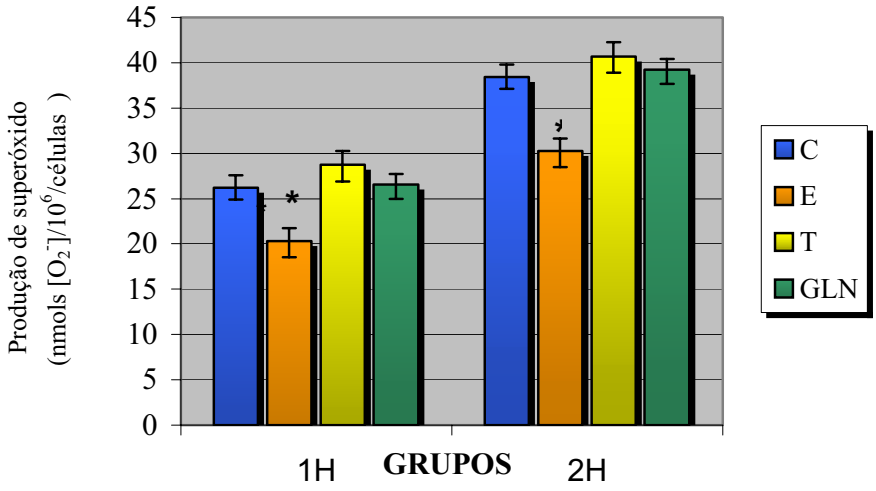


FIGURA G6 - Grupos: Controle (C), Estresse (E), Treino (T) Glutamina (GLN). Teste estatístico, ANOVA seguido de teste de TUKEY (*p<0,001).

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

A proposta deste estudo experimental foi principalmente avaliar as seguintes hipóteses: Primeira, o estresse psicológico agudo altera parâmetros imunes; segunda, o aparecimento das eventuais alterações, é impedido pela suplementação com glutamina ou por programa controlado de treinamento físico regular e moderado.

Assim, neste trabalho, demonstramos que o estresse agudo reduziu o número total de leucócitos periféricos com aumento no percentual de neutrófilos e eosinófilos e redução de linfócitos circulantes. Além disso, os animais estressados apresentaram redução na taxa de fagocitose e na liberação de radicais superóxido por macrófagos alveolares.

Valores hematimétricos traduzem informações acerca do número de células vermelhas circulantes, concentração de células vermelhas e de hemoglobina. Outrossim, a avaliação desses parâmetros pode fornecer valiosas informações sobre as influências que distintos tratamentos têm na circulação, no suprimento de sangue para os tecidos e, por conseguinte, no funcionamento orgânico As alterações na fluidez sanguínea e na concentração de hemoglobina podem ser indicadores de risco para trombose ou embolia e presença de anemia (NEUMANN et.al., 2000).

No presente estudo, o estresse de contenção não produziu alteração no número de hemácias, valor de hematócrito ou concentração de hemoglobina. Corroborando os nossos resultados, Queirós-Santos (2000) não detectaram diferenças nos índices hematimétricos submetendo ratos a estresse de contenção. Contudo, outros estudos apresentaram resultados distintos quanto às alterações hematimétricas. Assim, Katiukhin e Maslova (1984) observaram eritrocitose, sem alterações nos valores de hemoglobina ou do hematócrito, em ratos estressados por imobilização. Por outro lado, o estresse térmico em ratos promoveu aumento dos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito **(**VOGELAERE et. al,1990). Em atletas, Halson et. al. (2003) observaram aumento de hemoglobina e hematócrito após estresse físico. Estas divergências aparentes podem ser decorrentes da modalidade ou do tipo de estressor empregado, do tempo de coleta do sangue para realização dos testes hematimétricos, do estado prévio do indivíduo ou outras peculiaridades metodológicas como a comparação entre animais e humanos.

Segundo a literatura, as mudanças observadas nos níveis hematológicos são decorrentes do extravasamento transitório de plasma para os tecidos com subseqüente redução do volume plasmático (VOGELAERE, 1990; STEWART e MCKENZIE, 2002). A partir do cálculo do volume plasmático e dos valores de hematócrito e hemoglobina existem evidências que o volume de células vermelhas circulantes não se altera (STEWART e MCKENZIE, 2002). Ademais, postula-se que a hemoconcentração seja decorrente da modulação neuroendócrina (STEWART E MCKENZIE 2002). Contudo, ainda existem controvérsias entre os pesquisadores acerca dos mecanismos subjacentes que estariam modulando as mudanças transitórias processadas nos índices hematimétricos.

Os valores hematimétricos não se alteraram nos ratos submetidos ao treinamento de natação. Estes dados corroboram aqueles observados em atletas de elite por Biancotti et al.,

(1992). Contudo, valores elevados de hemácias, hemoglobina e hematócrito foram encontrados em atletas de natação (PELLICCIA et. al., 1987). Por outro lado, Boyadjiev e Taralov, (2000) verificaram redução de hemácias e hematócrito em atletas de natação. Mas, de forma similar aos nossos resultados, estudos anteriormente realizados com ratos treinados e submetidos a estresse físico, também não encontraram diferenças significativas nos índices hematimétricos (MACKINNON et. al., 1997) .

É importante ressaltar que parte das referencias supracitadas realizaram estudos em humanos e não em animais. Ademais, não se deve negligenciar as diferenças metodológicas relacionadas à duração, à intensidade, ao tipo do exercício físico, ao período de treino e ao estado nutricional.

Neste estudo, a suplementação com glutamina também não alterou os valores hematimétricos. A sobrecarga aguda de glutamina provoca elevação tanto da concentração plasmática deste aminoácido quanto de sua concentração nas células vermelhas (VINAY et. al., 1985). A suplementação combinada de glutamina e outros aminoácidos (leucina, valina, isoleucina, arginina,) durante 90 dias melhorou a performance e aumentou o número de células vermelhas, dos valores de hemoglobina e dos índices de hematócrito de atletas (OHTANI et. al., 2001). Estudos mais detalhados sobre a dose e o período de suplementação com glutamina devem ainda ser realizados para avaliarem-se as eventuais mudanças hematimétricas.

No estudo do sangue periférico, além da análise fisiológica que as células vermelhas podem oferecer, foi avaliado outro grupo celular, o dos leucócitos. Neste trabalho, o estresse provocou leucopenia, neutrofilia e linfopenia. Assim nossos achados corroboram vários estudos prévios sobre o tema na literatura (SHU et. al., 1993; QUEIROS-SANTOS, 2000; ZAHOREC, 2001). Os leucócitos circulantes são considerados as unidades móveis

do sistema imune e expressam parte considerável do funcionamento imunológico (DHABAR, 2002). Assim, o número e a proporção dos leucócitos são representativos do estado de distribuição destas células no organismo e da ativação da imunidade (DHABHAR, 1995). A alteração periférica de leucócitos pode ser um indicador de alterações hemodinâmicas (KARGOTICH et.al., 1997; STEFANSKI et. al., 2003; NIELSEN, 2003), da modulação hormonal (McCARTHY et. al., 1991; DHABAR 2002;) ou da migração das células circulantes para outros tecidos (DHABHAR, 2002; STEFANSKI et. Al., 2003; ENGLER et. Al., 2004).

No estresse, a ativação do sistema nervoso simpático pode reduzir o fluxo sanguíneo para órgãos linfóides e estar associado a linfopenia (NIELSEN, 2003). Inicialmente a ativação do eixo simpático-adrenal parece ser mais sensível aos estressores do que o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (ELENKOV et.al.,1999). Assim, a resposta simpática é constatada mais rapidamente que à atribuída aos glicocorticóides (MCCARTHY et. al., 1991; BRENNER et. al., 1998).

A variação do movimento de leucócitos está relacionada aos efeitos dos hormônios; em particular, os do estresse como corticotropina, glicocorticóides, catecolaminas, hormônio do crescimento (ENGLER et. Al., 2003; DHABHAR**,** 2002; KARGOTICH et.al., 1997). A influência dos hormônios decorre da presença de receptores para eles em células do sistema imune e outras (BRENNER et. al., 1998; GAILLARD, 1994). Por exemplo, o aumento de leucócitos circulantes está associado ao incremento de concentrações séricas de catecolaminas (BRENNER et. al., 1998; ORTEGA , 1997). Já a neutrofilia e linfopenia parecem ser conseqüentes à secreção de glicocorticóides por efluxo de neutrófilos da medula para a circulação e por apoptose de linfócitos (MCCARTHY et. al., 1991; SAKAMI et. al., 2003). Outrossim, segundo Dhabar (2002), o deslocamento de células

periféricas para outros tecidos poderia também estar associada a aumento de resposta à hipersensibilidade cutânea tardia, exercendo importante efeito imunoprotetor.

No estresse do exercício, contudo, a proliferação de linfócitos e a atividade de células NK encontram-se reduzidas.(NIEMAN et. al., 1995[c]; NIELSEN, 2003) e atividade fagocítica elevada (ORTEGA et. al. 1996[c]; SU et. al., 2001). Assim, a natureza das alterações neuro-imuno-endócrinas decorrentes do estresse agudo parece preparar o organismo para combater uma situação adversa com incremento de algumas respostas em detrimento de outras.

De modo análogo ao estresse psicológico, o exercício físico apresenta alterações nos leucócitos circulantes (HALSON et. al., 2003; ALI et.al., 2003). Durante o exercício, há leucocitose, linfocitose e neutrofilia (NIELSEN, 2003; MALM et. al., 1999) com linfocitopenia e persistente neutrofilia pós-exercício (McCARTHY et. al., 1991; MALM et. al. 1999). Estas mudanças celulares periféricas são transitórias e retornam aos valores basais 24 horas após o término do esforço físico (ESPERSEN et. al., 1996; MACKINON, 2000). Em nosso estudo, a coleta de sangue periférico realizada 24 horas após o término da última sessão de treinamento, assegurou a ausência de quaisquer alterações agudas decorrentes da última sessão de exercício. Assim, observamos que o treinamento não modificou as concentrações circulantes de leucócitos totais ou diferenciais. Observações estas que corroboram a maior parte dos resultados encontrados na literatura (ESPERSEN et. al., 1996; MACKINON, 2000; KARGOTICH et. al., 1997; MUJIKA et. al., 1996)

Nossos resultados parecem indicar que o treinamento protegeu os animais do decréscimo de leucócitos usualmente observado após estresse psicológico. O treinamento regular e moderado parece ser eficaz em prevenir o decréscimo de linfócito T CD 4^+ após estresse físico (FU et. al., 2003). O treinamento físico parece levar ao aumento da atividade

de linfócitos NK (NIEMAN et. al., 1995[a]) e redução de infecções respiratórias (NIEMAN et. al., 1993). Em ratos idosos, o treinamento físico parece induzir produção de linfócitos T virgem (WOODS et. al., 2003). Outrossim, observou-se em ratos com tumor, aumento na proliferação de linfócitos não estimulados (BACUAU et. al., 2000).

A maior atividade de linfócitos decorrentes do treinamento parece estar associada à expressão de marcadores celulares: receptores para IL-2 e moléculas CD25. As proteínas do choque térmico (HSP) são mediadores da resposta ao estresse também presentes nos indivíduos sob treinamento moderado (CAMPISI et. al., 2003; FEHRENBACH e NORTHOFF, 2001). A presença dessas proteínas pode contribuir para aumentar a resistência ao estresse em organismos sob a influência de exercício físico (CAMPISI et. al., 2003). Outrossim, o treinamento também parece incrementar a via metabólica de utilização de substratos como glicose e glutamina por linfócitos e macrófagos (BACUAU et. al. 2000).

As alterações ocorridas nos parâmetros imunes de indivíduos submetidos ao exercício agudo, não se repetem quando este se torna contínuo **(**FEHRENBACH e NORTHOFF, 2001**)**. O treinamento parece atenuar a descarga hormonal, modificar a expressão de receptores e alterar a sensibilidade das células imunocompetentes (WOODS et. al., 2003; BRENNER et. al., 1998). Entretanto, pela natureza complexa do sistema imune e da diversidade dos tipos de exercícios físicos, estudos adicionais ainda são necessários para elucidar as vias subjacentes a esta modulação.

Em nosso estudo, a suplementação com glutamina não impediu a redução pós-estresse dos leucócitos periféricos. Todavia, parece ter evitado a ocorrência de neutrofilia e linfopenia.

A redução da concentração de glutamina plasmática durante o estresse diminui sua disponibilidade para a atividade das células imunocompetentes (NEWSHOLME, 2001). Sabe-se que redução dos níveis de glutamina plasmática pode ser um indício de imunodepressão (WALSH et. al., 1998[b] ; ZIEGLER, 2000). Além disso, a redução de glutamina plasmática pode reduzir a expressão de proteínas do choque térmico (HSP) que, como já mencionado, conferem tolerância celular aos efeitos do estresse (WEINGARTMANN et. al., 1999; OEHLER et. al., 2002). Em decorrência destas evidências, há a freqüente recomendação da adição de glutamina à dieta. Neste sentido, a suplementação dietética de glutamina parece aumentar a resposta proliferativa de linfócitos a mitógenos (KEW et. al., 1999), reduzir o crescimento de tumores em ratos (SHEWCHUK et. al., 1997) e melhorar o quadro de morbi-mortalidade em pacientes internados (CALDER, 2000; ZIEGLER, 2000).

A proteção a redução de linfócitos observada no nosso estudo após estresse, confirmou os achados de Castell e Newsholme (1997) com relação a taxa de $CD4^+$ /$CD8^+$ ao suplementarem atletas com glutamina pós-maratona. No entanto, Rohde et. al. (1998) ao suplementarem com glutamina bebidas ofertadas durante e após o treino não observaram proteção contra a linfopenia pós-exercício, porém constataram redução no aparecimento de subseqüentes infecções respiratórias. Em adição, os resultados referentes a menor neutrocitose em indivíduos sadios suplementados com glutamina após estresse físico foi anteriormente demonstrado por Krzywkowski et. al., 2001**.** No entanto, alguns estudos clínicos mostram que adicionar glutamina a dieta de indivíduos debilitados induz aumento em subpopulações linfocitárias (ZIEGLER et. al., 1992; MANHART et.al. 2001; PICCIRILLO et. al., 2003).

Parece, portanto que os efeitos da suplementação com glutamina na restauração das células imunocompetentes circulantes parecem ser mais bem evidenciados em indivíduos debilitados. É possível que seu papel como modulador da imunidade possa ser expresso em outros parâmetros imunes não mensurados neste estudo. É importante salientar que os estudos sobre os eventuais efeitos em diversos parâmetros biológicos da suplementação com glutamina são de comparação complexa. Eles apresentam diferenças metodológicas quanto a: dose, via de administração, período de administração e grau de comprometimento do estado físico e/ou nutricional desses indivíduos **(**FIELD et. al., 2000; LIN et. al., 2002).

Um dos aspectos mais interessantes do presente estudo foi a análise da atividade celular, mensurada através da taxa de fagocitose e da produção de ânion superóxido por macrófagos alveolares. Macrófagos atuam como células da defesa inata, responsáveis pelo processo de internalização e destruição de antígenos; eles são, por exemplo, altamente eficazes no combate, entre outras patologias, àquelas causadas por fungos (RODRIGUEZ-GALAN, 2003).

Neste estudo, nós demonstramos que o estresse psicológico agudo provoca a redução da fagocitose em macrófagos. Previamente foi observada redução da atividade fagocítica de macrófagos em ratos submetidos a estresse de hipotermia (SALMAN et. al., 2000). Os estresses crônicos, físicos ou psicológicos, também podem causar redução da atividade fagocítica de macrófagos (PALERMO-NETO et. al., 2003; RODRIGUEZ-GALAN et. al., 2003**)**.

Contudo, é importante salientar que o exercício físico, sob determinadas condições, por vezes considerado modelo de estresse, produz alterações distintas das observadas em outros modelos (WOODS et al., 2003; ORTEGA et. al., 1996[a]**).** Assim, o treinamento ou o exercício agudo pode incrementar a capacidade fagocítica (FORNER et. al., 1996;

ORTEGA et. al., 1997). Em ratos sob estresse físico, Ortega et. al. (1996) observaram aumento da fagocitose, mas redução da destruição de partículas fagocitadas. Os diversos resultados, por vezes contraditórios, estão influenciados por diferenças metodológicas, pela intensidade (SU et. al., 2001) e pela duração (SUGIURA et. al., 2001) do exercício físico empregado.

Nossos resultados mostraram um efeito protetor do treinamento sobre a redução pós-estresse da fagocitose, corroborando observações anteriores (JAPEL et. al., 1992; KIZAK et. al., 2000**)** de que o treinamento evita a redução da capacidade fagocítica em indivíduos sob estresse.

As mudanças decorrentes do exercício sobre a atividade fagocítica celular podem ser atribuídas às alterações da concentração plasmática de hormônios como prolactina (ORTEGA et. al., 1996[a]), hormônios da tireóide (FORNER et. al., 1996); corticosterona (ORTEGA et. al, 1996[c]), beta-endorfina (ORTEGA et. al., 1996[b]) e catecolaminas (SHILOV e ORLOVA, 2003). Outrossim, Kizaki et. al., (2000) demonstraram que o estresse aumenta a expressão de receptores que suprimem a atividade de macrófagos e que o treinamento de natação atenua a geração de partículas supressoras. Mecanismos implicados na modulação exercida pelo treinamento na atividade fagocítica incluem: mudanças na expressão fenotípica de macrófagos (WOODS et. al., 2003; KIZAKI et. al. 2003), na expressão em suas superfícies de moléculas fixadoras de antígenos (SU et. al., 2001) e a produção de citocinas (WOODS, 1997).

A grande maioria dos trabalhos sobre o importante papel da glutamina para a fagocitose advém de estudos *in vitro*. Estas pesquisas indicam que o processo de fagocitose é dependente de concentrações adequadas de glutamina (WALLACE e KEAST 1992; PARRY-BILLINGS et. al., 1990; OGLE et. al., 1994; FURUKAWA, 2000). Saito et. al.

(1999) demonstraram que a presença de glutamina em meio de cultura contendo neutrófilos aumenta sua capacidade de fagocitar bactérias. A síntese de citocinas estimulatórias (WALLACE E KEAST, 1992), a restauração da membrana celular de macrófagos (CURI et. al., 1999) e a expressão de proteínas de choque térmico (OEHLER et. al., 2002 WEINGARTMANN et. al., 1999) são processos dependentes de glutamina.

No presente estudo, a suplementação com glutamina parece não alterou o processo fagocítico , uma vez que não foi observado nenhum efeito protetor impedindo a redução da fagocitose pós-estresse. Outros estudos também não encontraram relação entre elevação dos níveis de glutamina e aumento da atividade fagocítica (OGLE et. al., 1994). Em murinos, a suplementação de dieta parenteral total com ou sem glutamina não induziu diferença na capacidade fagocítica de neutrófilos (IKEDA et. al., 2003). No entanto, estudos clínicos têm demonstrado que a fagocitose de neutrófilos de indivíduos pós-cirúrgicos depende da concentração de glutamina no meio de cultura (FURUKAWA et. al., 2000).

Os mecanismos de resposta biológica à suplementação de glutamina como as alterações do processo fagocítico são baseados em sua maioria em estudos *in vitro* e em ensaios clínicos com indivíduos debilitados. A ação *in vivo* da glutamina sobre a atividade celular pode ser influenciada por vários fatores, entre estes, hormonais exercendo efeito modulador (COSTA ROSA et. al., 1991).

Outro parâmetro indicativo da atividade celular do macrófago é sua capacidade de gerar diferentes espécies reativas de oxigênio: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, (KIZAKI et. al., 2000). A produção de ânion superóxido por células da imunidade inata é crucial para a defesa do indivíduo contra microorganismos (MANHART et. al., 1998).

Neste trabalho, também avaliamos a produção de ânion superóxido por macrófagos alveolares estimulados com PMA. Macrófagos estimulados com PMA liberam superóxido em função do tempo, por isso, monitoramos sua produção por 2 horas. A cinética desta função foi realizada previamente em nosso laboratório por De Castro et. al. (2000). Os resultados obtidos neste estudo demonstram aumento na liberação de ânion superóxido na 1ª e 2ª hora pelos macrófagos. O mais interessante é que o estresse reduz a liberação de superóxido por macrófagos.

Resultado similar foi verificado por De Castro et. al. (2000) em macrófagos alveolares de ratos sob estresse agudo de contenção. Billert et. al., (1998**)** encontraram diminuição da produção de superóxido em macrófagos alveolares estimulados com PMA em neutrófilos de indivíduos sob estresse catabólico.

Há uma capacidade potencial dos glicocorticóides em inibir a produção e por vezes, às ações, de uma variedade de mediadores intercelulares como os derivados do ácido aracdônico e as linfocinas (DE CASTRO et. al.,1995). Por outro lado**,** hormônios como prolactina, tiroxina, parecem exercer efeitos estimulantes (ORTEGA, 1996[b]). E, por vezes, é comuns a referência da concomitância de redução da fagocitose com o aumento da produção de superóxido (SALMAN et. al., 1999; ORTEGA et. al., 1996[c]). Assim, é uma perspectiva de nossos estudos esclarecer os mecanismos subjacentes à inter-relação entre os dois fenômenos (fagocitose e liberação de superóxido) em particular sob a influencia das variáveis estudadas.

O treinamento em nosso estudo apresentou uma tendência (não significante do ponto de vista estatístico) em incrementar a síntese de radical oxigênio. Estudos anteriores demonstraram tanto aumento (SUGIURA et. al., 2001) como redução da liberação de superoxido após exercício físico (ORTEGA, 1997). As explicações fisiológicas deste

mecanismo ainda não estão completamente elucidadas, mas postula-se alterações enzimáticas mudanças da expressão de receptores e mediadores inflamatórios (WOODS et. al., 1997) e a interação entre os hormônios liberados durante exercício físico (ORTEGA, 1997).

A participação da glutamina no processo de produção de ânion superóxido já foi evidenciada em experimentos *in vitro* (PITHON-CURI et. al., 2002[a]). A evidência que sustenta a importância da glutamina para a produção de superóxido, resulta, sobretudo da sua essencialidade na ação da NADPH oxidase, enzima fundamental na geração de espécies reativas de oxigênio (PITHON-CURI et. al., 2002[b]; GARCIA et. al., 1998). Alem disso, a glutamina é necessária para a expressão de receptores celulares (IKEDA et. al., 2003).

Neste estudo, não houve alteração da síntese de superóxido por macrófagos alveolares de ratos submetidos à suplementação com glutamina, apesar de também mostrarem tendência ao aumento da liberação. Em consonância com nossos achados, Oegle et. al., (1994) também não encontraram associação entre uso de glutamina, em humanos, e aumento da fagocitose. Em animais, Ikeda et. al. (2003) corroborando nossos achados, observaram que nutrição parenteral total suplementada com glutamina não acarretou aumento na produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos em murinos. No entanto, Furukawa et. al. (2000) demonstraram in vitro que a suplementação de glutamina para neutrófilos de pacientes pós-cirurgia produzia aumento na produção de superóxido. A necessidade de glutamina em cultura de células para geração de ânion superóxido por neutrófilos, já foi bem demonstrada (MANHART et. al., 2001; GARCIA et. al., 1998; PITHON- CURI, 2002[a]). Monócitos e macrófagos também parecem ser dependentes da disponibilidade de glutamina no meio de cultura para geração de anion superóxido. (WALLACE e KEAST, 1992).

Os estudos sobre o uso da glutamina *in vivo* e eventuais alterações de funções celulares ainda estão longe de serem totalmente esclarecedores. Há uma aparente contradição com a solidez das evidências produzidas pelos estudos *in vitro*. Portanto, estudos adicionais sobre o efeito *in vivo* da suplementação com a glutamina em processos como os fagocíticos em seres vivos, sobretudos sadios, devem prosseguir.

Nosso estudo corrobora a proposição compartilhada por vários pesquisadores: O treinamento moderado e regular parece ativar mecanismos imunológicos e proteger dos efeitos adversos do estresse. No que concerne ao papel da glutamina em organismos, os efeitos parecem depender de uma organização conjuntural do meio interno. A suplementação com glutamina parece exercer seus efeitos na dependência da higidez do organismo. Em estudos *in vitro* em comparação com aqueles *in vivo*, o controle das variáveis é muito mais apurado. Portanto, fenômenos biológicos que envolvem interações multivariadas como as neuro-imune-endócrinas constituem em si sistema de difícil elucidação. Muito já se avançou na compreensão dos fenômenos aqui descritos, todavia mais estudos complementares devem ser conduzidos para avaliar ou esclarecer aspectos que não foram aqui abordados.

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

- Os tratamentos realizados não modificaram os níveis hematimétricos.
- O estresse agudo promoveu deterioração de todos os parâmetros imunológicos analisados.
- O modelo do treinamento evitou a redução de leucócitos periféricos e a taxa de fagocitose ocorrida após estresse, mas não alterou a liberação de superóxido.
- A suplementação de glutamina não alterou liberação de superóxido nem induziu proteção à redução de leucócitos ou a taxa de fagocitose em ratos estressados. Porém, suprimiu a neutrocitose e linfopenia.
- Os achados indicam que a realização de exercícios moderados regulares fortalece alguns aspectos da resposta imune contra as reações adversas do estresse psicológico. No entanto, os efeitos da glutamina nas subpopulações celulares parecem ser diferentes de um efeito global. Assim, a suplementação com glutamina em indivíduos sadios não parece beneficiar o incremento da imunidade e conseqüente proteção contra reações deletérias do estresse agudo.

PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

O presente trabalho suscitou o interesse para investigações adicionais sobre o uso do treinamento moderado e da suplementação de glutamina em outras condições fisiológicas como:

- Desnutrição, senescência, adolescência e obesidade.
- Estresse crônico

Estas situações podem ser estudadas através da:

- Avaliação da liberação de outras espécies reativas de oxigênio
- Avaliação da adesividade celular.
- Avaliação da resposta imune humoral.
- Análise de subpopulações linfocitárias.
- Análise da secreção de citocinas.
- Análise da secreção hormonal.
- Avaliação da liberação de superóxido em animais treinados e estressados e em animais suplementados com glutamina e estressados.

BIBLIOGRAFIA

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI S. ULLAH F., JAN R. Effects of intensity and duration of exercise on differential leucocyte count. **Ayub Med Coll Abbotabad**. 15(1): 35-37, 2003.

ARDAWI M.S. and NEWSHOLME E.A. Intracellular localization and properties of phosphate-dependent glutaminase in rat mesenteric lymph nodes. **Biochem. J.** 217(1):289-296, 1984.

ARDAWI M.S. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. **Metabolism**. 37(1): 99-103, 1988.

BACUAU R.F.; BELMONTE M.A.; SEELAENDER M.C.; COSTA ROSA L.F. Effect of a moderate intensity exercise training protocolo n the metabolism of macrphage and lymphocytes of tumor-beraring rats. **Cell. Biochem. Funct.** 18(4): 249-258, 2000.

BIANCOTTI P.P.; CAROPRESO A.; DI VINCENZO G.C.; GANZIT G.P.;GRIBAUDO C.G. Hematological status in a group of male athletes of different sports**. J. Sports. Med. Phys. Fitness**. 32(1): 70-75, 1992.

BILLERT H; FISZER D; DROBNIK L; KURPISZ M. Influence of beta-endorphin on the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates by rabbit alveolar macrophages. **Gen. Pharmacol.** 31(3):393-397, 1998 .

BOYADJIEV N. and TARALOV Z. Red blood cell variables in highly trained pubescent athletes: a comparative analysis **Br. J. Sports Med.** 34(3):200-2004, 2000.

BRAND K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. **Biochem J.** 228 (2): 353-361, 1985.

BRENNER I.; SHEK P.N.; ZAMECNIK J.; SHEPHARD R.J.. Stress Hormones and the immunological responses to heat and exercise. **Int. J. Sports Med.** 10: 130-143, 1998.

BRUUNSGARD H.; GALBO H.; HALKJAER-KRISTENSEN J.; JOHANSEN TL; MAC LEAN D.A.; PEDERSEN B.K. Exercise-induced increase interleukin-6 is related to muscle damage. **J. Physiol**. 499: 833-841,1997.

CALDER P.C. and YAQOOB P. Glutamine and the immune system. **Amino Acids** 17: 227-241, 1999.

CALDER, P.C. More good news about glutamine. **Nutrition.** 16 (1): 71–73, 2000.

CAMPISI J.; LEEM T.H.; FLESHNER M. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. Cell Stress Chaperones. **Fall.**8(3):272-286, 2003.

CANNON J.G.. Exercise and resistance to infection. **J. Appl. Physiol**. 74 (3): 973-981, 1993.

CASTEL L.M. and NEWSHOLME E.A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition.** 13:738-742,1997.

COSTA ROSA L.F, CURY Y., CURI R. Hormonal control of macrophage function and glutamine metabolism. **Biochem. Cell. Biol**. 69(4):309-312, 1991.

CURI R.; NEWSHOLME P.; PITHON-CURI T.C.; PIRES-DE-MELO M.; GARCIA C.; HOMEM-DE-BITTENCOURT P.I.J.R.; GUIMARÃES A.R.P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 32(1):15-21, 1999.

CURI T.C.; DE MELO M.P.; PALANCH A.C.; MIYASAKA C.K.; CURI R. Percentage of phagocytosis, production of O_2-H_2O_2 and NO and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. **Cell. Biochem. Funct.** 16: 43-49, 1998.

DE CASTRO, C.M.M.B.; BUREAU M.F; NAHORI M.A; DUMAREY C. H; VARGAFTIG B.B.; BACHELET M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A_2 activities in endotoxemic guinea pigs**. J. Appl. Physiol**. 79:1271-1277, 1995.

DE CASTRO C.M.M.B.; MANHAES DE CASTRO R.; QUEIRÓS SANTOS A.; COSTA JÁ; BRANDT CT. Estresse: interações neuroendócrinas e imunológicas. **An. Fac. Med. Univ.Fed. Pernamb**. 44(2): 132-137, 1999.

DE CASTRO C.M.M.B.; MANHAES DE CASTRO R.; MEDEIROS A.F.; QUEIRÓS-SANTOS A.; FERREIRA E SILVA W.T.; LIMA FILHO J.L. Effect of stress on the production of $\bar{O}^2$ in alveolar macrophages. **J. Neuroimmunology**. 108:68-72, 2000.

DHABHAR, F.S; MILLER; A.H; MCEWEN B.S; SPENCER R.L. Effects of stress on immune cell distribution- dynamics and hormonal mechanism. **J. Immun.;** 154: 5511-5527, 1995.

DHABAR F.S. Stress-induced augmentation of immune function – The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain Behaviou. and Immunity**. 16: 785-798, 2002.

ELENKOV I.J.; WEBSTER E.L.; TORPY D.J.; CHROUSOS G.P. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. **Ann. N. Y. Acd. Sci**. 876:1-11, 1999.

ENGLER H., BAILEY M.T., ENGLER A and SHERIDAN J.F. Effects of repeated social stress on leukocyte distribuition in bone marrow, peripheral blood and spleen. **J**. **Neuroimmunology**. 148(1-2): 106-115, 2004.

ESPERSEN G.T., ELBAEK A., SCHMIDT-OLSEN S., EJLERSEN E., VARMING K., GRUNNET N. Short-term changes in the immune system of elite swimmers under competition conditions. Different immunomodulation induced by various types of sport. **Scand. J. Med .Sci. Sports.;** 6(3): 156-63, 1996.

FEHRENBACH and NORTHOFF H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. **Exerc Immunol Rev**.;7:66-89, 2001.

FIELD C.J.; JOHNSON I.; PRATT V.C. Glutamine and arginine:immunonutrients for improved health. **Med. Sci. Sports. Exerc**. 32(7Suppl): 377-388, 2000.

FORNER M.A., BARRIGA C., ORTEGA E. Exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine **J. Appl. Physiol.;** 80(3): 899-903, 1996.

FU S.C.; QIN L.; LEUNG CK.; CHAN B.P.; CHAN K.M. Regular moderate exercise training prevents decrease of CD4+ T-lymphocytes induced by a single bout of strenuous exercise in mice. **Can. J. Appl. Physiol.;**:28(3): 370-381, 2003.

FURUKAWA S.; SAITO H.; INOUE T.; MATSUDA T; FUKATSU K.; HAN I.; IKEDA S.; HILDEMURA A. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. **Nutrition.** 16 (5): 323–329, 2000.

GAILLARD R.C. Neuroendocrine-Immune System interactions The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **TEM**. 5(7):303-309, 1994.

GARCIA C.; PITHON-CURI T. C.; DE LOURDES C. , FIRMANO M.; DE MELO M.P.; NEWSHOLME P.; CURI R. Effect of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. **Clin. Sci**. (Lond.) 96:549-555, 1998.

GARCIA JÚNIOR JR, PITHON-CURI T.C., CURI R. Conseqüências do exercício para o metabolismo da glutamina e função imune. **Rev. Bras. Med. Esporte.** 6(3): 99-107, 2000.

GIANOTTI L.; ALEXANDER J.W.; GENNARI R.; PYLES T.; BABCOCK G.F. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. **J. Parenter. Enteral Nutr**. 19 (1): 69-74, 1995.

GOBATTO C.A.; MELLO M.A.R; SIBUYA C.Y.; AZEVEDO J.R.M.; SANTOS L.A.; KOKUBUN E. Maximal lactate steady state in rats submited to swimming exercise. **Comp.Biochem.Physiol**.130: 21-27, 2001.

GRAY T.S. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 697: 53-60, 1993.

HAINLINE A.In: Standard methods of clinical. 117: 751, 1949.

HALSON S.L., LANCASTER G.I., JEUKENDRUP A.E., GLEESON M. Immunological responses to overreaching in cyclists. **Med. Sci. in Sports Exerc.** 35(5):854-861. **2003.**

HWANG J.J., CURTHOUYS N.P. Effect of acute alterations in acid-base balance on rat renal glutaminase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. **J. Biol.Chem.** 266: 9392-9396, 1991.

IKEDA S.; KUDSK KA.; LE T.; ZARZAUR B.L.; JOHNSON D.C. Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. **Shock.** 19(1): 50-54, 2003.

JAPEL M.; LOTZERICH H.; APPELL H.J. Physical exercise may improve macrophage phagocytic activity of tumor bearing mice. **In Vivo.** 6(2):215-218, 1992.

JOHNSTON Jr. R.B. Measurement of 02- secreted by monocytes and macrophages. **Methods in enzymology**, 105: 365- 369, 1984.

KARGOTICH S; KEAST D; GOODMAN C; CRAWFORD GP; MORTON AR; The influence of blood volume changes on leucocyte and lymphocyte subpopulations in elite swimmers following interval training of varying intensities **Int. J. Sports Med**.18 (5):373-380, 1997.

KATIUKHIN LN, MASLOVA MN Dynamics of changes in red blood in rats during acute immobilization. **Kosm. Biol. Aviakosm**. **Med**. 18(3): 43-47, 1984.

KEW S.; WELLS S.M.; YAQOOB P.; WALLACE F.A.; MILES E.A.; CALDER P.C. Dietary glutamine enhances murine T-Lymphocyte responsiveness. **J. Nutr**. 129 (8): 1524-1531, 1999.

KIZAKI T.; HAGA S.; SAKATA I.; OOKAWARA T.; SEGAWA M.; SAKURAI T.; IZAWA T.; OHNO H. Swimming training prevents generation of suppressor macrophages during acute cold stress. **Med. Sci. Sports Exerc**. 32(1): 143-8, 2000.

KRZYWKOWSKI K.; PEDERSEN E.W.; OSTROWSKI K.; KRISTENSE J.H.; BOZA J.; PEDERSEN B.K. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **Am J. Physiol**. 281 (4): C1259-1265, 2001.

KUWUAHIRA I.; KAMIYA U.; IWAMOTO T. Splenic contraction-induced reversible increase in hemoglobin concentration in intermittent hypoxia**. J. Appl. Physiol.** 37: 399-420, 1999.

LEANDRO C.G.; NASCIMENTO E.; MANHAES-DE-CASTRO R.; DUARTE J.A.; DECASTRO C.M.M.B. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. **Rev. Port. Cienc. Desp**. 2(5): 80-90, 2002.

LIMA D.A.; SOARES B.J.; GRECO J.B. GALIZZI J.; CANGADO J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica- técnica e interpretação**. 8ª. ed. Ed. Guanabara Koogan; São Paulo, 2001.

LIN M.T., S.; KUNGP S. ;YEH L.; LIN C.; . LIN T.H.; CHEN K.H.; LIA W. K.Y.; LEE P. H.; CHANG K.J.; CHEN W.J. The effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on nitrogen economy depends on severity of diseases in surgical patients. **Clinical Nutrition.** 21, (3): 213-218, 2002.

MACKINNON L. T. Chronic exercise training effects on immune function. **Med. Sci. Sports. Exerc.** Suppl. S369-S376, 2000.

MACKINNON L.T. ; HOOPER S.L. JONES S.; GORDON R.D.; BACHMANN A. W. Hormonal immunological and hematological responses to intensified training in elite swimmers. **Med. Sci. Sports Exerc**. 29(12): 1637-1645, 1997.

MALAGUENO E.; ALBUQUERQUE C.; DE CASTRO C.M.M.B. ; GADELHA M. INÁCIO-IRMÃO J.; SANTANA J.V. Effect of biomphalaria straminea plasma of biomphalaria glabrata hemolymph cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro**. vol 93, suppl 1: 301-302, 1998.

MALM C.; LENKEI R.; SJODIN B. Effects of eccentric exercise on the immune system in mem. **J. Appl. Physiol**. 86(2): 461-468, 1999.

MANHART N.; OISMULLER C.; LASSNIG A.; SPITTLER A.; SAUTNER T.; GOTZINGER P.; FUGGER R.; ROTH E. Receptor and non-receptor mediated formation of superoxide anion and hydrogen peroxide in neutrophils of intensive care patients. **Wien. Klin. Wochenschr**. 27:110(22):796-801, 1998.

MANHART V., VIERLINGER K., SPITTLER A.; BERGMEISTER H.; SAUTNER T.; ROTH E. Oral feeding with glutamine prevents lymphocyte and glutathione. **Ann. Surg**, 234 (1): 92-97, 2001.

MARGIS, R.; PICON P.; COSNER A.F.; SILVEIRA R.O. et.al. Stressfull life-events, stress and anxiety**. Rev. Psiquiatr. Rio Gd. Sul**. 25 (suppl.1),65-74, 2003.

MAX S.R.; MILL J.; MEAROW K.; KONAGAYA H., KONAGAYA Y., THOMAS J.W.; BANNER C.; VITKAVIC L. Dexamethasone regulates glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol**. 255 (3Pt1):E397-E403, 1988..

Mc GOVEN J.J.; JONES A.R.; STEINBERG A.G.; The hematocrit of capillary blood. New England Journal of Medicine, 253: 305, 1955.

MCCARTHY D.A.; GRANT M.; MARBUT M.; WATLING M.; WADE A.J.; MACDONALD I.; NICHOLSON S.; MELSOM R.D.; PERRY J.D. Brief exercise induces an immediate and a delayed leucocytosis **Br. J. Sports. Med**. 25(4): 191-195,1991.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BRUNSON, K. W. et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Res. Rev.** 23:79-113, 1997.

MELLO A.A.F.; MELLO M.F.; CARPENTER L.L; PRICE L.H. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis **Rev. Bras. Psiquiatr**.25 (4): 231-238, 2003.

MUHLBACHER F., KAPADIA C.R., COLPOYS M.F., SMITH RJ., WILMORE D.W. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** 247(1 Pt1): E75-E83, 1984.

MUJIKA I., CHATARD J.C., GEYSSANT A. .Effects of training and taper on blood leucocyte populations in competitive swimmers: relationships with cortisol and performance. **Int J Sports Med**. 17(3): 213-7, 1996.

NASCIMENTO E.; MANHAES DE CASTRO R.; DECASTRO C.M.M.B.; LEANDRO C.G. Pode a glutamina modular a imunidade? **AN. Fac. Med. Univ.Pernamb**. 46(1): 67-70, 2001.

NEUMANN J.K.; CHI D.S; FLEMING R. Hematological and immunological acute mental stress responses of people who are severely and profoundly mentally retarded **Res. Dev. Disabil**. 21(5):347-53, 2000.

NEWSHOLME E.A. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overstrained athletes. **Int. J. Sports Med.** 15 (3 Suppl); S142-S147, 1994.

NEWSHOLME E.A; NEWSHOLME P.; CURI R.; ARAWI M.S.M. A role for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. **Nutrition.** 4: 261-268, 1988.

NEWSHOLME P.; GORDON S.; NEWSHOLME E.A. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. **Biochem J.** 242 (3): 631-636, 1987.

NEWSHOLME P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? **J. Nutr**. 131 (9 suppl): 2515S-2522S; 2523S-2524S, 2001.

NIELSEN H.B. Lymphocyte responses to maximal exercise: a physiological perspective. **Sports Med**. 11(33):853-867, 2003.

NIEMAN D.C., HENSON G., GUSEWITCH et al Physical activity and immune function in eldery women. **Med.Sci. Sports Exerc**. 25:823-831, 1993.

NIEMAN D.C.; BRENDLE D.D.A;, HENSON. et.al. Immune function in athletes versus nonathlets**. Int J. Sports Med**. 16: 329-333, 1995[a].

NIEMAN D.C; BUCKELY K.S; HENSON D.A. et.al . Immune function in marathon runners versus sedentary controls. **Med. Sci. Sports. Exerc.** 27: 986-992, 1995[b].

NIEMAN D.C.; HENSON D.A.; SAMPSON C.S.; HERRING J.L.; SUTTLES J.; CONLEY M.; STONE M.H.; BUTTERWORTH D.E.; DAVIS J.M. The acute immune response to exhaustive resistance exercise. **Int. J. Sports. Med**.,16(5): 322-328, 1995[c].

OEHLER R.; PUSCH E.; DUNGEL P.; ZELLNER M.; ELIASEN M.M.; BRABEC M.; ROTH E. Glutamine depletion impairs cellular stress response in human leucocytes. **Br.J. Nutr**. Suppl , 87(1):S17-S21, 2002.

OGLE, C.K.; Ogle, J.D.; Mao, J.X. et al. Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils **J.Parenter. Enteral Nutr**. 18: 128–133, 1994..

OHTANI M.; MARUYAMA K.; SUGITA M.; KOBAYASHI K. Amino Acid Supplementation Affects Hematological and Biochemical Parameters in Elite Rugby Players **Bioscience.** Biotechnology, and Biochemistry. 65 (9), 1970-1976, 2001.

ORTEGA E., FORNER M.A, BARRIGA C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterona and prolactine as mediators. **J. Physiol** (Lond) 498:729-734, 1997.

ORTEGA E.; FORNER M.A.; BARRIGA C. Effect of prolactin on the in vitro phagocytic capacity of macrophages. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 19(2): 139-46 1996[a]

ORTEGA E.; FORNER M.A.; BARRIGA C. Effect of beta-endorfina on adherence, chemotaxis and phagocytosis of Cândida Albicans by peritoneal macrophages. **Comp. I munol Microbiol. Infect. Dis**. 19(4): 267-274,1996 [b]

ORTEGA E.; RODRIGUEZ M.J.; BARRIGA C.; FORNER M.A. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. **Int J Sports Med**. 17(2):149-55, 1996[c]

OSTROWSKI K.;ROHDE T.; ASP SL; SCHJERELING P.; PEDERSEN B.K. The cytokine balance and strenuous exercise: TNF-alpha, IL-2beta, IL-6, IL-ira, sTNF-r2 and Ill-10. **J. Physiol.** (Lond), 515: 287-291, 1999.

OTTAVIANI E. and FRANCESCHI C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. **Progress. Neurobiology.** 48:421-440, 1996.

OTTAWAY C.A., E HUSBAND A.J. The influence of neuroendocrine pathways on lumphocyte migration. **Immunol Today**. 15:511-517, 1994.

PALERMO-NETO J.; MASSOCO C.O.; ROBESPIERRE S.W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behav Immun**. 17(1):43-54, 2003.

PARRY-BILLINGS M.; EVANS J; CALDER P. C.; NEWSHOLME E.A. Does glutamine contribute to immunosupression after major burns? **Lancet**; 336 (8714): 523-525, 1990.

PEDERSEN B.K and HOFFMAN-GOEZ L Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiol Rev**. 80(3): 1055-1081, 2000.

PEDERSEN B.K TVEDE N., CHRISTENSEN L.D. KLARLUND K., KRAGBAI S., HALKJRKRISTENSE J. Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. **Int. J. Sports. Med**. 10:129-131, 1989.

PEDERSEN B.K.; BRUUNSGAARD H.; KLOKKER M.; KAPPEL M.; MACLEAN D.A.; NIELSEN H.B.; ROHDE T.; ULLUM H.; ZACHO M. Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. **Int. J. Sports. Med.** 18 (Suppl1):S2-7. 1997.

PELLICCIA A. and DI NUCCI G.B. Anemia in swimmers: fact or fiction? Study of hematologic and iron status in male and female top-level swimmers. **Int. J. Sports. Med.** 8(3): 227-30, 1987.

PERRIELLO G.; JORDE R.; NURJHAN N.; et al. Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: role of skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** 269 (3 Pt1): E443- E450, 1995.

PICCIRILLO NICOLA; MATTEIS S.; LAURENTI L.; CHIUSOLO P.; SORÀ F.; PITTIRUTI M.; RUTELLA S.; CICCONI S.; FIORINI A.; D'ONOFRIO G.; LEONE G.; SICA S. Glutamine-enriched parenteral nutrition after autologous peripheral blood stem cell transplantation: effects on immune reconstitution and mucositis. **Haematologica.** 88(2):192-200, 2003.

PITHON-CURI T. C; LEVADA A.C. LOPES L. R.; DOI S.Q; CURI R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47^{phox}, p22^{phox} and gp91^{phox} in rat neutrophils **Clinical Science.** 103:403–408, 2002[a]

PITHON-CURI T.C., TREZENA A.G., TAVARES-LIMA W., CURI R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. **Cell. Biochem. Funct**. 20(2): 81-86. 2002 [b]. .

PYNE DB, GLEESON M. Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. **Int. J. Sports. Med**. 19:S183-S194. 1998.

Queirós-Santos, A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em adulto. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 94p. 2000.

ROCHA, R.; PORTO, M.; MORELLI. ; GABRIEL Y.M. *et al*. Effect of environmental stress on blood pressure during the working journey **Rev. Saúde Pública,** 36 (5): 568-575, 2002.

RODRIGUEZ-GALAN M.C.; CORREA S.G., CEJAS H.; SOTOMAYOR C.E. Impaired activity of phagocytic cells in Candida albicans infection after exposure to chronic varied stress. **Neuroimmunomodulation**. 9(4): 193-202, 2001.

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 Exerc**. 30 (6): 856-62. 1998.

SAITO H.; FURUKAWA S.; MATSUDA T**.** Glutamine as an immunoenhancing nutrient **J. Parenter. Enteral. Nutr.** 23(5 Suppl):S59-61, 1999.

SAKAMI S.; NAKATA A.; YAMAMURA T.; KAWAMURA N. Psycological stress increases human T cell apoptosis in vitro. **Neuroimmunomodulation.** 10 (4): 224-231, 2003.

SALMAN H.; BERGMAN M. BESSLER H.; ALEXANDROVA S.; BEILIN B.; DJALDETTI M. Hypothermia affects the phagocytic activity of rat peritoneal macrophages. **Acta Physiol. Scand.** 168(3):431-436, 2000.

SALMAN H.; BERGMAN M.; BESSLER H.; WEISS J.; PUNSKY I.; DJALDETTI M. Effect of training on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from rats exposed to swim stress. **Acta Haematol.;** 102(4): 180-4. 1999.

SELYE H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. **Can. Med. Assoc. J**. 115 (1):53-56, 1976.
SELYE H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **J. Clin. Endocrinol.** 6:117-230, 1946.

SHEWCHUK LD ; BARRACOS VE; FIELD C. Dietry L-Glutamine supplemention reduces the growth of the Morris Hepatoma 7777 in exercise-traine and sedentary rats. **Amer. Soc. Nutr. Sci**.127(1): 158-166,1997.

SHILOV JI and ORLOVA EG. Role of adrenergic mechanisms in regulation of phagocytic cell functions in acute stress response. **Immunol. Lett.** 86(3):229-233, 2003.

SHU J.; STEVENSON J.R.; ZHOU X. Modulation of cellular immune responses by cold water swim stress in the rat. **Dev. Comp. Immunol**. Jul-Aug; 17(4): 357-71,1993.

SILBERMAN D.M.; AYELLI-EDGAR V.; ZORILLA-ZUBILETE M.; ZIEHER L.M.; GENARO A.M. Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. **Brain Behav. Immunol**. 18(1): 81-90, 2004.

SOUBA W.W.; HERSKOWITZ K.; SALLOUM R.M.; CHEN M.K.; AUSTGEN T.R. Gut glutamine metabolism. **J. Parer. Ent. Nutr**. 14: 45S-49S, 1990.

STEFANSKI V.; PESCHEL A.; REBER S. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. **J. Neuroimmunol.**. 138: 17-24, 2003.

STEWART I.B. and MCKENZIE D.C. The human spleen during physiological stress. **Sports Med**. 32(6): 363-369, 2002.

SU S.H.; CHEN H.I.; JEN C.J. .Severe exercise enhances phagocytosis by murine bronchoalveolar macrophages. **J. Leukoc. Biol.** 69 (1):75-80, 2001.

SUGIURA H.; SUGIURA H.; NISHIDA H.; INABA R.; MIRBOD S.M.; Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **J Appl Physiol**.90(3):789-794, 2001.

SUWANNEE U.; NOORBIBI K.; SAMI L. B.; ROBERT A.; SOICHI H.; Innate immunity and its role against infections. **Annals of allergy, asthma & immunology.** 88: 253-265, 2002.

TVEDE N.; STEENBERG J.; BASLUND J.; HALKJAER-KRISTENSEN PEDERSEN B.K. Cellulr immunity in highly trained elite racing cyclists during periods of training with high and low intensity **Scand J. Sci. Med Sport.** 3:163-166, 1991.

VINAY P.; KHOURY N.; SOOWAMBER M.; GOUGOUS A. Renal extraction of glutamine from plasma and whole blood: studies in dogs and rats. **Can J Physiol Pharmacol.** 63(7):886-892, 1985.

VOGELAERE P.; BRASSEUR M.; QUIRION A.; LECLERCQ R.; LAURENCELLE L.; BEKAERT S. Hematological variations at rest and during maximal and submaximal exercise in a cold (0 degree C) environment. **Int. J. Biom and Tecnol**.1990. 34(1):1-14 , 1990.

WALLACE C. & KEAST D. Glutamine and macrophage function. **Metabolism**. 41: (9)1016-1020, 1992

WALSH N.P,, BLANNIN A,K., ROBSON P,J., GLEESON M. Glutamine, exercise and immune function**. Sports. Med.** 26(3): 177-191, 1998[a].

WALSH N,P; BLANNIN A,K; CLARK A,M; COOK L,; ROBSON P,J,; GLEESON M,L. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, 77(5): 434-438, 1998[b].

WEINGARTMANN G,; OEHLER R,; DERKITS S.; OISMULLER C. HSP70 expression in granulocytes and lymphocytes of patients with polytrauma: comparison with plasma glutamine. **Clin Nutr**. 18(2):121-4,1999.

WELLS S.M.; KEW S.; YAQOOB P.; WALLACE F.A.; CALDER P.C. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. **Nutrition;** 15 (11-12): 881-884, 1999.

WOODS J.A; CEDDIA M.A; ZACK M.D; LOWDER T.W.; LU Q. Exercise training increases the naive to memory T cell ratio in old mice . **Brain Behav. Immun.** 2003, 17(5): 384-92, 2003.

WOODS J.A.;CEDIA M.A.; KOZAK C.; WOLTERS B.W. Effects of exercise on the macrophage MHC II response to inflammation**. Int J Sports Med** 18(6): 483-488, 1997.

YAQOOB P. and CALDER PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. **Nutrition**.; 13(7-8): 646-651. 1997.

YAQOOB P. and CALDER PC. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. **Cytokine**. 10(10): 790-794. 1998.

ZAHOREC R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. **Bratisl Lek Listy.** 102(1):5-14.2001.

ZIEGLER T. R., YOUNG L. S., BENFELL K., SCHELTINGA M., HORTOG K., BYE R., MORROW F. D., JACOBS D. O., SMITH R. J., ANTIN J. H. & WILMORE D. W. Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition following bone marrow transplantation: a double-blinded, randomized, controlled trial. **Ann. Intern. Med**. 116:821-828, 1992.

Ziegler T. R. Glutamine regulation of human immune cell function. **Nutrition.** 16:458-461, 2000.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Oficio n^0 028/2001
Ao: Prof. Raul Manhães de Castro
Depto de Nutrição
CCS – UFPE
Da: Comissão de Ética em Experimentação Animal do CCB-UFPE

Recife, 17 de julho de 2001

Prezado Professor

A Comissão de Ética em Experimentação Animal reuniu-se no dia 26 de junho às 14:00h e encaminhou para um dos membros o Protocolo Para Uso de Animais Experimentais referente ao seu projeto intitulado " NUTRIÇÃO PARENTERAL COM L-GLUTAMINA E TREINAMENTO FÍSICO: CONSEQUÊNCIAS SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM SITUAÇÃO DE ESTRESSE OU NÃO." Após cuidadosa leitura do referido texto, consideramos que na atual forma, o protocolo experimental proposto para manipulação e manutenção dos animais encontra-se de acordo com as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), principalmente no que diz respeito às doses anestésicas e à forma de eutanásia.

Levando em consideração a legislação em vigor (Lei 9.605 – art. 32 e Decreto lei 3.179–art 17), estamos conscientes de que a justificativa do projeto esclarece a impossibilidade de realizá-lo sem o sacrifício de alguns dos animais experimentais.

Diante do exposto, emitimos um parecer favorável à aprovação do protocolo proposto para a utilização dos animais.

Atenciosamente,

Profa. Belmira Lara da Silveira A. da Costa
Coordenadora da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações

Carol Leandro[1]
Elizabeth do Nascimento[2]
Raul Manhães-de-Castro[2]
José Alberto Duarte[1]
Célia M.M.B. de-Castro[1]

[1] *Laboratório de Bioquímica e Morfologia Experimental Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física Universidade do Porto, Portugal*
[2] *Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS) Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil*
[3] *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) Departamento de Medicina Tropical, CCS, UFPE, Brasil*

RESUMO

O exercício físico induz alterações transitórias no sistema imunológico. A intensidade, a duração e o tipo de exercício determinam as alterações ocorridas durante e após esforço. Na resposta aguda ao exercício, os sistemas imunológico e neuroendócrino interagem através de sinais moleculares na forma de hormonas, citocinas e neurotransmissores. Constata-se a existência de um verdadeiro sistema de inter e intra-comunicação que participa, como um todo, na coordenação, integração e regulação dos eventos durante o esforço físico. Neste artigo, são relatados estudos evidenciando a influência dos diferentes tipos de exercício físico sobre a concentração e a função de componentes do sistema imunológico. Serão ainda discutidos pontos relevantes da integração entre o sistema nervoso, o sistema endócrino e em particular o sistema imunológico durante o exercício físico.

Palavras-chave: Exercício físico; resposta imune; sistema nervoso; sistema endócrino; sistema imunológico.

ABSTRACT

Physical exercise and immune system: mechanisms and integration processes

Physical exercise induces temporary changes on the immune system. Exercise-induced changes in the immune system are dependent on the intensity, duration and type of physical exercise. In the acute phase response to physical exercise, the neuroendocrine and the immune systems interact through molecular signals in the form of cytokines, hormones, and neurotransmitters. Indeed, there is a system of intra and intercommunication that participates as a whole in the coordination, integration, and regulation of the body during physical effort. In this review, we will discuss some earlier studies which described the influences of different kinds of physical exercise on the concentration and the function of the components of the immune system. Furthermore, we will discuss important points of the interaction between the neuroendocrine and the immune systems during and after exercise.

Keywords: *Physical exercise; immune response; nervous system; endocrine system; immune system.*

INTRODUÇÃO

Já está bem definido que o exercício físico (EF), enquanto modelo mensurável de indução de stress, provoca alterações funcionais no sistema imunológico (SI)[7,32,35,74,80].

Diferentes tipos e cargas de EF podem provocar alterações distintas nos parâmetros imunes[35]. Alguns estudos vêm demonstrando que o EF moderado (<60% do $VO_{2máx}$) parece estar relacionado ao aumento da resposta dos mecanismos de defesa orgânica[6,13,37,65,69,79], enquanto que o EF mais intenso e prolongado (>65% do $VO_{2máx}$) ou o treino excessivo parecem enfraquecê-la[13,22,29,58,67].

Na base desta influência poderá estar a inter-relação existente entre o sistema nervoso (SN), o sistema endócrino (SE) e o SI[5]. De fato, durante a actividade física ocorre activação inicial do sistema nervoso simpático (SNS), que estimula a produção e a libertação de catecolaminas, hormonas e neurotransmissores relacionados ao stress[32]. Além disso, há também activação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que parece possuir uma relação intrínseca com as componentes do SI, não só pela presença de receptores hormonais em leucócitos, mas também pela relação anatómica observada entre os três sistemas[26,32].

Esta revisão tem por objectivo abordar os pontos relevantes da influência dos diferentes tipos de EF sobre a concentração e a funcionalidade de algumas componentes do SI. Para uma compreensão mais abrangente, serão relatados também estudos evidenciando a integração entre o SN, o SE e, em particular, o SI, observados durante o EF.

EXERCÍCIO FÍSICO E A IMUNIDADE

Diferentes tipos e cargas de EF podem provocar alterações distintas no SI[35]. Neste sentido, é importante conhecer como o exercício agudo (carga súbita de EF), moderado (entre 50 a 65% do $VO_{2máx}$) ou intenso (acima de 65% do $VO_{2máx}$) podem influenciar alguns parâmetros da imunidade tanto celular como humoral[13,35].

Um estudo pioneiro nessa área foi realizado no início do século XX (1902) por Larrabee (para refs. ver[57]), o qual verificou uma leucocitose em corredores a seguir uma maratona, decorrente, sobretudo, do aumento do número de neutrófilos na circulação. Contudo, a relação entre EF e SI tornou-se mais sóli da a partir de observações realizadas por pesquisadores acerca do aumento da incidência de infecções do trato respiratório superior (IRTS) em atletas após treinamentos intensos ou prolongados, e/ou competições exaustivas[29,42,56,77,80]. Os efeitos do EF sobre as componentes do SI são empiricamente conhecidos, apesar de só recentemente estarem a ser estudados os mecanismos subjacentes a estas influências.

De forma geral, o EF agudo provoca um aumento na concentração de leucócitos na circulação[45]. A leucocitose observada durante e após o exercício decorre principalmente do aumento da concentração de neutrófilos[35,45]. Este aumento parece resultar da migração de células do tecido endotelial para o sangue ou como parte da resposta inflamatória às lesões no tecido muscular[70, 45,84].

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) compreendem a sub-população de leucócitos de maior número na circulação[35]. Para desempenhar suas funções nos tecidos, os PMN migram na direção de partículas a serem ingeridas (quimiotaxia)[78]. Daí então podem reconhecer, aderir e engolfar muitos micróbios, bactérias e vírus (fagocitose) e descarregar o conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocíticos (desgranulação)[78]. Para além disso, os PMN são mediadores da lesão tecidual durante a inflamação, via libertação de espécies reactivas de oxigênio e outros factores tóxicos (actividade oxidativa)[79].

Os estudos sobre o efeito do EF moderado na função de PMN ainda são conflitantes. Muitos pesquisadores verificaram que o EF moderado parece auxiliar a quimiotaxia, a desgranulação e a actividade oxidativa dos PMN a seguir 1 hora de EF a 60% $VO_{2máx}$[39,50,60,83,85]. Entretanto, Pyne et al[79] encontraram uma diminuição na actividade oxidativa de PMN em atletas a seguir 40 minutos de EF aeróbico a 65% do $VO_{2máx}$. Um estudo verificou um aumento na actividade oxidativa de PMN tanto em atletas quanto em sujeitos não-treinados antes e a seguir 1 hora de EF aeróbico a 60% do $VO_{2máx}$[83]. Muns et al[49] verificaram um aumento da actividade fagocítica dos PMN em homens treinados 24 horas a seguir uma corrida de 20 km a 60% do $VO_{2máx}$. Por outro lado, Ortega et al[60] não encontraram alteração significativa na actividade fagocítica de PMN imediatamente a seguir 1 hora de bicicleta a 50% do $VO_{2máx}$ em

homens sedentários. A variabilidade do tempo de avaliação da função destas células a seguir o EF, o nível de aptidão física individual e os diferentes protocolos experimentais utilizados podem justificar os diversos resultados encontrados.

Contrariamente ao EF moderado, os estudos referentes à resposta funcional de PMN ao EF intenso parecem mais consistentes. Com excepção da actividade fagocítica e da desgranulação, as funções dos PMN parecem diminuir a seguir um EF intenso[86,102]. Alguns estudos verificaram que a capacidade oxidativa destas células é temporariamente atenuada durante uma carga aguda de EF intenso (>85% do $VO_{2máx}$) e no período de recuperação[28,78,81,83]. Pedersen e Bruunsgaard[72] relatam que a imunossupressão observada é apenas evidente quando o EF é intenso e de longa duração (60 min ou mais). Robson et al[82] compararam o efeito de um EF a 80% $VO_{2máx}$ (durante 1 hora) com um EF a 55% $VO_{2máx}$ (durante 3 horas) em indivíduos activos. Estes autores verificaram, contudo, que durante e a seguir o esforço houve um aumento similar na contagem de PMN nas duas intensidades[82]. Curiosamente, a diminuição da actividade oxidativa e anti-bactericida destas células foi mais pronunciada a seguir o EF moderado[82]. Assim, as alterações nas funções dos neutrófilos parecem ser dependentes não somente da intensidade, mas também da duração do esforço. Aliás, as alterações funcionais destas células em reposta a diferentes cargas de EF podem ser clinicamente significativas reflectindo um estado de stress ou imunossupressão associados ao EF, assim como um indicativo de *overtraining*.

Outra linhagem de células fagocíticas inclui os mononucleados: monócitos e macrófagos[102]. Os monócitos são células disponíveis no sangue periférico que continuamente se diferenciam em macrófagos após migrarem para os tecidos[102]. Os macrófagos estão presentes em vários tecidos, órgãos e cavidades[101]. O EF agudo, independente da intensidade e da duração, parece provocar uma monocitose temporária[21]. Por outro lado, a quantificação de macrófagos nos tecidos em resposta a um EF é relativamente inacessível em humanos[21].

Os fagócitos mononucleares são importantes células efectoras, altamente regulados por outras células (linfócitos T e B) e por mediadores químicos produzidos pelo SNS e pelo eixo HPA[101]. Estão envolvidos na fagocitose e na actividade microbicida e antitumoral, manifestam uma função celular acessória como apresentadores de antigénio e promovem o desenvolvimento da imunidade mediada por linfócito[100,102]. São também uma fonte de citocinas mediadoras das reacções inflamatórias e fisiopatológicas que acompanham a lesão celular[102]. Aspectos característicos dos macrófagos incluem a capacidade de aderência, a quimiotaxia, a produção de anião superóxido e a citotoxicidade[17,103]. Estas células também possuem a capacidade de manifestar efeitos pró e antiinflamatórios sobre a função de outros tipos celulares[103].

O stress provocado pelo EF parece ter um efeito estimulador na função de macrófagos[101]. Tanto o EF moderado como o intenso podem aumentar várias funções destas células incluindo a quimiotaxia, a aderência, a produção de anião superóxido, a taxa de metabolismo do nitrogénio, a actividade citotóxica e a capacidade fagocítica[21,53,62,98,99,102]. Os mecanismos subjacentes a estas respostas ainda permanecem desconhecidos, mas podem estar associados a factores neuroendócrinos[23,60,63,75,101]. Ademais, ainda são necessários estudos que investiguem a significância fisiológica das alterações funcionais destas células. Em animais, Woods et al[99] observaram que tanto uma corrida exaustiva num tapete (18-35 m/min, 5% de inclinação, durante 2-4 h) quanto uma moderada (18 m/min, 5% de inclinação, durante 30 min) podem provocar um aumento da citotoxicidade anti-tumoral de macrófagos peritoniais. Outro estudo observou um aumento no processo fagocítico de macrófagos peritoneais de ratos submetidos à natação até a exaustão ou submetidos ao treino (90 minutos de nado durante 20 dias)[20]. Entretanto, Davis et al[15] verificaram recentemente que um EF extenuante de longa duração (2.5-3.5 h) pode provocar diminuição na actividade anti-viral de macrófagos alveolares e aumentar a susceptibilidade de infecções em ratos. Woods et al[100] também verificaram que o EF muito intenso e de curta duração induziu a uma redução na capacidade de apresentação de antigénios por macrófagos peritoneais em camundongos. De forma geral, o EF provoca alterações nestas células, contudo o efeito modulador parece depender do parâmetro a ser avaliado, da

intensidade, do tipo e mais pronunciadamente da duração do exercício. Todavia, a localização tecidual específica do macrófago estudado parece ser mais determinante.

Nos tecidos também são encontradas outros tipos de células do SI[36]. Os linfócitos teciduais estão em equilíbrio dinâmico com aqueles do sangue e recirculam continuamente através de canais vasculares e linfáticos, de um órgão linfóide para o outro[36]. O aumento da concentração destas células durante o EF agudo, moderado ou intenso, decorre do recrutamento de todas as suas populações (células *natural killer* (NK), linfócitos T e linfócitos B) para o compartimento vascular, constituindo uma resposta altamente estereotipada[70,76]. Portanto, durante o exercício, é verificado um aumento de linfócitos em cerca de 50% a 100% em relação ao valor basal[76]. No período de recuperação (30 minutos após o exercício), a contagem de linfócitos diminui de 30% a 50% abaixo dos níveis pré-exercício, permanecendo assim durante 3 a 6 horas[76].

Dentre as populações de linfócitos, as células NK parecem ser as mais responsivas imediatamente a seguir uma carga súbita de EF[97]. As células NK são conhecidas por desencadearem defesa precoce contra certas infecções intracelulares[97]. Deste modo, elas participam da exterminação de células tumorais e células infectadas por vírus (actividade citolítica), sem necessidade prévia de imunização ou activação[97].

Exercícios de vários tipos, durações e intensidades induzem o recrutamento de células NK para o sangue, assim como provocam alterações na actividade citolítica destas células[37,73]. Tvede et al[93] estudaram a resposta das populações de linfócitos em ciclistas dinamarqueses durante 1 hora de EF em três diferentes intensidades de esforço (25, 50 e 75% do $VO_{2máx}$). Neste estudo, a linfocitose e posterior linfopenia foram observadas durante o EF a 50% e 75% do $VO_{2máx}$[93]. Foi ainda verificado que a actividade citolítica de células NK e da linfocina activadora de células NK (LAK) aumentou durante todas as instâncias de esforço e foi suprimida 2 horas pós-esforço apenas a seguir o EF a 75% do $VO_{2máx}$[93].

De fato, a seguir 1 ou 2 horas de EF intenso de longa duração (>75 % durante 1 hora), a concentração de células NK e a actividade citolítica diminuem em cerca de 25 - 40% do nível basal[37,73]. E esta redução pode prolongar-se por até 2 - 4 horas a seguir o EF[72,73]. Um estudo demonstrou que o EF exaustivo de força (*sets* de 10 repetições a 65% de 1-RM até a fadiga) em atletas treinados também provoca uma diminuição na função citolítica das células NK no período de recuperação (2 horas pós-esforço)[58]. Da mesma forma, alguns pesquisadores observaram uma diminuição da actividade citolítica destas células em atletas remadores submetidos a um EF muito intenso de curta duração (6 minutos)[55]. Neste sentido, a intensidade, mais do que a duração, parece ser responsável pelo grau de incremento de células NK na circulação e pelas alterações funcionais destas células. Vale salientar que a diminuição da actividade citolítica das células NK no período de recuperação pode suscetibilizar o indivíduo a infecções[35].

Durante um EF agudo ocorre também um aumento da concentração dos linfócitos T, seguido de uma diminuição no período de recuperação[76]. Os linfócitos T podem ser divididos em sub-populações de acordo com as moléculas antigénicas de superfície co-receptoras: células T auxiliares (CD4+) e células T citotóxicas ou supressoras (CD8+)[35]. As células T CD8+, entre outras funções, são responsáveis pela destruição de células infectadas por vírus ou de células tumorais[35]. As células T CD4+ actuam na libertação de LAK, além de interferirem na estimulação, proliferação e maturação de linfócitos B[35].

Um EF a 50% do $VO_{2máx}$ parece não alterar a concentração de células T CD4+ e T CD8+[40,76,91,92]. Um estudo não verificou modificação na percentagem de células T CD4+ e T CD8+ em 18 adultos jovens sedentários submetidos a cinco cargas repetidas de EF submáximo em cicloergómetro[31]. Contudo, alguns estudos têm observado que um EF a 75% do $VO_{2máx}$ tende a provocar uma diminuição na concentração de células T CD4+, sem alterar a concentração de células T CD8+[3,25,76]. Dessa forma, a proporção de CD4+/CD8+ diminui refletindo um maior aumento de células T CD8+[3]. E este aumento pode estar associado com estados de imunossupressão[3,25,76].

Um linfócito activado deve proliferar antes que sua prole se diferencie em células efectoras para a produção de linfócitos específicos em número suficiente

para combater uma infecção[76]. A duração e a intensidade do EF parecem ser determinantes na resposta proliferativa de linfócitos[76]. Em humanos, a resposta proliferativa de linfócitos T em resposta a um EF a 50% e 75% do $VO_{2máx}$ (durante 1 hora) parece diminuir no período de recuperação[91,93]. Contudo, durante e após um EF máximo de curta duração (6 minutos) não ocorreu alteração da resposta proliferativa de linfócitos[55]. Da mesma forma, não foi encontrado alteração na proliferação de linfócitos a seguir um EF de resistência de força[58]. Estes resultados decorrem, provavelmente, da presença de factores neuroendócrinos e de mediadores libertados por células imunes.
A seguir exercícios intensos de longa duração (ex. ciclismo, natação, maratona) ocorre uma diminuição em cerca de 70% na concentração salivar da imunoglobulina A (IgA) por várias horas pós-esforço[6,40].
As Ig são glucoproteínas secretadas por linfócitos B[76]. Elas combinam-se especificamente com a substância que induziu sua produção e formam o braço humoral da resposta imune[76]. A IgA constitui 10 a 15% do total de imunoglobulinas, sendo a principal classe de anticorpo das mucosas[6].
Alguns estudos relatam a não ocorrência de alterações na concentração salivar de IgA e de IgE, no soro, durante um exercício moderado[7,53,56,57].
Contrariamente, Blannin et al[6] encontraram baixas concentrações de IgA após uma corrida de 31 Km a 65% do $VO_{2máx}$. Outros estudos encontraram também uma diminuição na concentração de IgA, tanto na saliva quanto na mucosa nasal a seguir um EF intenso de longa duração[42,53,57]. Dessa forma, os pesquisadores estão a associar a coincidência desta redução com o aumento da prevalência de ITRS em atletas[56,57].
De fato, os estudos epidemiológicos relatam uma alta incidência de ITRS em maratonistas uma ou duas semanas a seguir uma prova ou um treinamento intenso[13,22,29,56]. Um estudo verificou que os sintomas de ITRS ocorridos em maratonistas foram na ordem de 33.3%, enquanto os ocorridos no grupo controle foram de 15.3%[77]. Embora os estudos revelem um aumento dos sintomas de ITRS a seguir um exercício intenso e de longa duração, não existem informações se esses sintomas são decorrentes do processo infeccioso em si, ou se são devidos a uma inflamação local ou sistémica causada pelo exercício[76].

Muitos aspectos da relação existente entre exercício físico e imunidade ainda não estão totalmente esclarecidos. Factores como: o período de avaliação da alteração e da resposta imunológica, o nível de aptidão física e nutricional do indivíduo, o estado psicológico, o *overtraining*, as condições climáticas e os precedentes alérgicos e inflamatórios no trato respiratório, merecem ser considerados[41]. Ademais, a natureza transitória das alterações observadas pode, simplesmente, refletir uma automodulação das células imunes em busca da homeostase.

EXERCÍCIO FÍSICO E A INTEGRAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS NERVOSO, ENDÓCRINO E IMUNE.

Durante e a seguir uma carga súbita de EF ocorrem alterações na concentração e na funcionalidade de células do SI[76]. Todavia, essas alterações não devem ser vistas isoladamente, mas como parte de uma complexa rede bidirecional de sistemas interligados[32,76].
Durante o exercício, é verificado um aumento nas concentrações de dopamina e noradrenalina a nível cerebral[7]. Em conseqüência, há secreção da hormona libertadora da corticotropina (CRH) a nível hipotalâmico[7]. A corticotropina (ACTH) e as b-endorfinas são então libertadas pela pituitária anterior[7]. A descarga de ACTH estimula o córtex adrenal a produzir glucocorticóides e aminas biogênicas[7]. De fato, a activação do SNS e os eventos seqüenciais do eixo HPA parecem possuir uma relação intrínseca com as componentes do SI, não só pela presença de receptores hormonais em leucócitos, mas também pela relação anatômica observada entre os três sistemas[26,68].
As células do SI parecem possuir receptores para as b-endorfinas, catecolaminas, cortisol, hormona do crescimento (GH) e diversos outros mediadores envolvidos na reação ao stress[7,26,68].
Em resposta tanto a um EF prolongado e intenso (>70% do VO_{2max}) quanto a um exercício de curta duração e muito intenso (>85% do VO_{2max}) ocorre um aumento das concentrações de b-endorfinas na circulação[76,96]. É interessante notar que os leucócitos expressam receptores para as ß-endorfinas[26]. Esta constatação levanta a hipótese de uma possível influência desses mediadores na função de células do SI durante o exercício. Estudos com humanos sugerem que as b-endorfinas podem diminuir a produção de imunoglobulinas[14,45]. Recentemente foi verificado

em ratos que as b-endorfinas inibem a proliferação de linfócitos e parecem estar envolvidas no aumento da quimiotaxia e da fagocitose de macrófagos peritoneais[14,61]. Da mesma forma, parece aumentar a actividade citolítica de células NK durante o stress crônico, mas não o recrutamento destas células para circulação[76,96].

O recrutamento de PMN e das populações de linfócitos para o compartimento vascular durante o EF parece ser mediado pela adrenalina, e em menor grau pela noradrenalina[69]. Durante o EF, a adrenalina e a noradrenalina são libertadas da medula adrenal e a noradrenalina dos terminais nervosos simpáticos[69,76]. A concentração sanguínea desses mediadores aumenta linearmente com a duração do exercício e exponencialmente com a intensidade do mesmo[76].

A expressão de b-receptores nas diferentes células imunes fornece a base molecular para acção das catecolaminas[5,30,38]. Contudo, a densidade de receptores adrenérgicos e a eficiência do sistema de transdução AMPc diferem nos vários tipos de células imunocompetentes[5,26,68,94]. Os PMN e as células NK parecem apresentar maior número de receptores em comparação a outras células imunes[26]. Neste sentido, é provável que a resposta imediata destas células aos efeitos do EF agudo, moderado ou intenso, decorra do efeito modulador das catecolaminas[90].

Quando o exercício se prolonga, prossegue o aumento da concentração de PMN e linfócitos devido, provavelmente, a elevação das concentrações de cortisol no plasma[69]. O cortisol, em pequenas quantidades, melhora a função imune, visto que um dos papéis deste hormônio no SI é o de estimular a migração de células da medula para a circulação, assim como, dos linfonodos para os tecidos lesionados[7].

Contudo, o aumento da concentração de cortisol no sangue pode causar linfocitopenia, monocitopenia e neutrofilia em humanos[76]. Esta hormona inibe a migração de células inflamatórias para locais lesionados, proliferação de linfócitos, e é inibidora da função de macrófagos e limitadora da actividade das células NK[34,74,90,101]. Para além disso, parece induzir baixa na regulação de receptores de linfócitos T e aumentar a taxa de catabolismo, reduzindo as reservas de aminoácidos que são necessários para proliferação de linfócitos B e síntese de imunoglobulina[51,54,71]. Alguns estudos relatam ainda, que EF intenso de longa duração parece induzir a apoptose de linfócitos decorrente do aumento dos níveis de cortisol[43]. Portanto, os efeitos do aumento da concentração do cortisol podem estar relacionados à imunossupressão evidenciada após treinamentos exaustivos ou EF intensos e de longa duração.

Ainda relacionado com a intensidade do esforço, a GH é também libertada da pituitária anterior durante o EF[7]. Nos mononucleares pode-se verificar receptores para a GH[76]. É interessante notar que em resposta ao stress físico, a GH quando combinada com a adrenalina provoca neutrofilia[7]. Contudo, parece não atuar no recrutamento de linfócitos para a circulação[72].

As células imunocompetentes parecem, portanto, possuir não só receptores hormonais, mas também a capacidade para produzir e secretar algumas hormonas e neuropeptídeos[26]. De forma idêntica ao que acontece em células da pituitária, a produção destes peptídeos por células do SI respondem, na maioria dos casos, a factores inibitórios ou estimuladores do hipotálamo, bem como a hormonas envolvidas na regulação do *feedback* negativo[26,34]. Entretanto, a quantidade de hormonas e neuropeptídeos produzidos pelas células do SI é pequena, sugerindo que estas substâncias actuam de forma parácrina e autócrina[16,34].

O braço recíproco da relação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune é constituído por mensageiros libertados das células imunes activadas, chamados citocinas[17,47].

As citocinas são pequenas proteínas solúveis secretadas por leucócitos, e outras células, e que têm por função modular a resposta imune[17]. A resposta local para uma infecção ou tecido lesionado envolve a produção desses mediadores que vão facilitar o influxo dos vários tipos de leucócitos para a região atingida[26,47]. Para além da sua acção mediadora no SI, as citocinas podem também actuar no SN e SE, modificando as suas funções[26,17,47]. Assim, o estímulo induz as células do SI a produzirem citocinas que, em resposta, parecem actuar nos três níveis: hipotalâmico, pituitário e adrenal[47]. De forma idêntica, os diferentes tipos de células do SN (neurónios, astrócitos e microglóbulos) também sintetizam citocinas e/ou respondem a elas[26,47]. A lista de citocinas é longa e inclui uma variedade de moléculas cuja origem, estrutura e função têm sido revisadas.

De forma geral, o EF agudo intenso afecta a produção tecidual e sistémica de citocinas, especificamente as interleucinas (IL) e o factor de necrose tumoral (TNF), assemelhando-se à resposta inflamatória a algum trauma ou infecção[47,67].

Particularmente os EF excêntricos, os EF muito intensos de curta duração (>100% $VO_{2máx}$) ou os intensos de longa duração (>80% $VO_{2máx}$ por mais de 60 min) provocam alterações metabólicas (redução da saturação da hemoglobina arterial e um aumento na temperatura corporal) e lesões musculares[1,11,19,24,66]. A hipoxemia e as lesões teciduais associadas a estes tipos de exercício induzem a alterações na resposta imune com libertação de citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-1, a IL-6 e o TNF-a[10,12,27,65,67]. Entretanto, mais estudos são necessários para afirmar se essas alterações contribuem para imunomodulação relacionada ao exercício.

Neste sentido, a concentração plasmática de IL-1 parece aumentar significativamente em resposta tanto a um EF de longa duração a 60% do $VO_{2máx}$, quanto a um EF de curta duração a 75% do $VO_{2máx}$[11,27]. Da mesma forma, um estudo verificou um aumento de IL-1 a seguir um EF de resistência de força excêntrico (4x10 repetições a 100% -1RM)[87]. A IL-1 é produzida em resposta à infecção nos tecidos periféricos por monócitos e macrófagos e no cérebro por microgliócitos e astrócitos[47]. É suposto que a IL-1 opere como sinal aferente, estimulando o hipotálamo a libertar CRH[5]. A sua administração aumenta consideravelmente as concentrações de ACTH no plasma, constituindo-se como um importante estimulador do eixo HPA[4,26]. A IL-1 estimula a activação de linfócitos T e induz a proliferação de células[47]. Assim, o aumento da concentração desta citocina pode estar associado à resposta proliferativa de linfócitos T a seguir uma carga súbita de EF.

Outro potente mediador da resposta orgânica de fase aguda é a IL-6[47]. Esta citocina é produzida por várias células imunes (linfócitos e monócitos) e por células não-imunes (condrócitos, astrócitos e células gliais)[16]. A sua administração aumenta a produção de ACTH pela pituitária, estimulando o córtex adrenal a libertar glucocorticóides[20]. A IL-6 funciona como um factor co-estimulador da activação de linfócitos T em resposta a um antigénio e é fundamental para maturação de linfócitos B[2]. De forma geral, o EF associado a lesões musculares induz um aumento transitório na concentração de IL-6 no plasma[18,33]. Um estudo observou um aumento de IL-6 (29 vezes acima do valor basal) durante 2.5 horas de tapete ergométrico a 75% do $VO_{2máx}$[88]. Em homens sedentários foi relatado um aumento dos níveis de IL-6 a seguir um EF a 75% do $VO_{2máx}$ por 60 min[93]. Moldoveanu et al[46] verificaram um aumento desta citocina (18 vezes acima do valor basal) em jovens atletas submetidos a 3 horas de EF a 65% do $VO_{2máx}$. Outro estudo também verificou um aumento de IL-6 no plasma a seguir um EF de força excêntrico (100% de 1RM)[87]. A magnitude da resposta depende da intensidade, do tipo e da duração do esforço. Todavia parece não estar associada ao nível de aptidão física individual.

Muitos dos papéis fisiológicos do TNF-a assemelham-se àqueles da IL-1 e da IL-6[47]. O TNF-a é produzido por linfócitos T, células de Kuppfer, células neurais e células endoteliais, contudo, os fagócitos mononucleares são os principais produtores de TNF-a[47]. A presença desta citocina também está associada ao aumento nos níveis de ACTH no sangue[16]. O TNF-a induz a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, promovendo, assim, a migração de leucócitos para os locais de inflamação[47]. Apesar de existir alguma controvérsia devido ao período de avaliação dessa citocina no plasma, muitos investigadores encontraram um aumento de TNF-a a seguir 2 – 3 horas de um EF intenso de longa duração (ex maratona, ciclismo)[8,19,32,64]. Um estudo verificou um aumento de TNF-a em resposta a 2 horas de ciclismo a 60% do $VO_{2máx}$[8]. Outro estudo observou um aumento de 90% a seguir 3 horas de um EF aeróbico a 65% do $VO_{2máx}$[46]. Assim, a resposta desta citocina a um EF parece ser influenciada pela intensidade e duração do esforço. Todavia, mais estudos são necessários na avaliação do papel fisiológico do aumento da concentração de TNF-a em resposta a um EF.

Muitas áreas da imunologia do exercício ainda não estão totalmente elucidadas, incluindo o padrão da resposta imunológica do exercício agudo em outros tecidos que não o sangue; a integração entre o músculo esquelético e as células imunes; e, se, as mudanças neuroendócrinas são transitórias após frequentes séries de EF agudos ou se refletem adaptações hormonais persistentes que também estão presentes durante o repouso.

CONCLUSÕES

Inúmeros estudos têm evidenciado alterações na concentração e na função de algumas componentes do SI provocadas pelo exercício físico. As evidências disponíveis demonstram que o EF tem efeitos modulatórios importantes sobre a dinâmica de células imunes e, possivelmente, sobre sua função.

Os factores neuroendócrinos que actuam na redistribuição de células e a libertação de citocinas em resposta ao exercício físico parecem mediar a relação entre o SI e o EF.

Apesar dos aspectos multifactoriais e das lacunas ainda existentes, essa nova área de investigação a "imunologia do desporto" vem se desenvolvendo nos últimos anos. O grande desafio dos investigadores, portanto, seria estabelecer um modelo baseado na intensidade, na duração, na freqüência e nos diferentes tipos de esforço físico de forma a instituir o binômio exercício/saúde.

CORRESPONDÊNCIA

Dra. Célia M.M.B. de Castro
LIKA – Departamento de Medicina Tropical – CCS
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Campus Universitário s/n Cidade Universitária
Recife-Pernambuco
Brasil CEP 50670-901
ccastro@lika.ufpe

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armstrong RB, Ogilive RW, Schwane JA (1983). Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 54 (1): 80-93
2. Baumann H, Gauldie J (1994). The acute phase response. *Immunol Today* 15: 74-80
3. Berk LS, Nieman DC, Tan SA (1989). Maximal exercise modifies lymphocytes and subpopulations T helper and T suppressor and ratio in man. *Med Sci Sports Exercise* 19:S43-S44
4. Besedovski HO, Del Rey A, Sorkin, E, Dinarello CA (1986). Immunoregulatory feedback between interleukina-1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 223, 625-654
5. Blalock JE (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 15: 504-511
6. Blannin, AK, Robson PJ, Walsh NP, Clark AM, Glennon L., Gleeson M. (1998). The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. *Int J Sports Med*. 19: 547-552
7. Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, and Shephard RJ (1998). Stress Hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med* 10: 130-143
8. Brenner IK, Natale VM, Vasiliou P, Moldoveanu AI, Shek PN, Shephard RJ (1999). Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*: 80(5):452-60
9. Brines R, Hoffman-Goetz L, and Pedersen BK (1996). Can you exercise to make your immune system fitter? *Immunol Today* 17: 252-254
10. Bruunsgard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, Mac Lean DA, and Pedersen BK (1997). Exercise-induced increase interleukin-6 is related to muscle damage. *J Physiol* 499: 833-841
11. Bury TB, Luis R, Radermaker MF, Pirnay F (1996). Blood mononuclear cells mobilization and cytokine secretion during prolonged exercises. *Int J Sports Med* 17: 156-160
12. Cannon JG, Fielding RA, Fiataroni MA, Orencole SF, Dinarello CA, Evans WJ (1989). Increased interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol*. 257: R451-R455
13. Cannon JG (1993). Exercise and resistance to infection. *J Appl Physiol* 74: 973-981.
14. Carlson SL, Brooks WH, Roszman TL (1989). Neurotransmitter-lynphocyte interactions: dual receptor modulation of lymphocyte proliferation and camp production. *J Neuroimmunol*. 24: 155-162
15. Davis JM, Kohut ML, Hertler-Colbert M, Jackson DA, Ghaffar A, Mayer EP (1997). Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol* 83:1461-1466
16. De Castro CB, Manhães-de-Castro R, Queirós A, Costa JA., Brandt CT (1999). Estresse: Interações neuroendócrinas e imunológicas. *Anais Faculd de Med CCS - UFPE*. 44 (2): 132 – 137
17. De Castro CB., Manhães-de-Castro R, Medeiros AF, Queirós A, Ferreira WT, Lima Filho JL. (2000) Effect of stress on the production of O_2^- in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol*. 108 (1) 68 - 72
18. Drenth JPH, VanUun SHM, Van Deuren M, Pesman GJ, Van der Ven Jongekrug J, Van der Meer JW (1995). Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but down regulates *ex vivo* TNF-a and IL-1b production. *J Appl Physiol*. 79: 1497-1503

19. Dufaux B, Order U. (1989). Plasma elastase-a1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor, and soluble interleukine-2-receptor after prolonged exercise. *Int. J Sports Med.* 10:434-438
20. Ferrandez MD, De la Fuente M (1999). Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand* 166(1):47-53
21. Field CJ, Gougeon R, and Marliss EB. (1991). Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J Appl Physiol* 71: 1089-1097
22. Fitzgerald L. (1991). Overtraining increases the susceptibility to infection. *Int J Sports Med* 12: 55-58.
23. Forner A, Barriga C, and Ortega E. (1996). Exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine. *J Appl Physiol.* 80:899-903
24. Fridén J, Sjostrom M, Ekblom B. (1983). Myofibrilar damage following intense eccentric exercise in man. *Int. J. Sports Med* 4: 170-176
25. Fry RW, Morton AR, Crawford GP, Keast D (1992). Cell numbers and *in vitro* responses of leukocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol* 64:218-227
26. Gaillard RC (1994). Neuroendocrine-Immune system interactions. The Immune-hypotalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endoc Metabol (TEM)* 7(5):303-309
27. Haahr PM, Pedersen BK, Fomsgaard A, Tvede N, Diamant M, Klarlund K, Halkjaer-Kristensen J, Bendtzen K (1991). Effect of physical exercise on *in vitro* production of interleukin 1, interleukine 6, tumor necrosis factor-a, interleukin 2 and interferon-g. *Int J Sports Med.* 12: 223-227.
28. Hack V, Strobel G, Rau JP, and Weicker H. (1992). The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. *Eur J Appl Physiol* 65: 520-524
29. Heath G W, Ford E.S; Craven T.E, Macera CA, Jackson K.L, Pate R.R. (1991). Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Med Sci Sports Exercise* 23: 152-157
30. Hellstrand K, Hermodsson S, Strannegard O. (1985). Evidence for beta-adrenorecpetor-mediated of human natural killer cells. *Immunopharmacology.* 134: 4095-4099
31. Hoffman-Goetz L, Simpson JR, Cipp N, Arumugam Y, and Houston ME. (1990). Lymphocyte subset responses to repeated submaximal exercise in men. *J Appl Physiol* 68: 1069-1074
32. Hoffman-Goetz L and Pedersen BK (1994). Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Imunol Today* 15(8): 382-387
33. Jones, DA, Newnhan DJ, Round JM and Toifree SEJ (1986). Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *Am J Physiol* 375: 453-448.
34. Jonhson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, and Gold PW. (1992). Mechanism of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 16:115-130
35. Keast D, Cameron K, Morton AR. Exercise and the immune response (1988). *Sports Med* 5: 248-267
36. Kendall A, Hoffman-Goetz L, Houston M., MacNeil B, Arumugam Y. (1990). Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration, and subject fitness effects. *J. Appl. Physiol* 69: 251-260
37. Klokker M, Kjaer M, Secher NH, Hanel B, Worm L, Kappel M, Pedersen BK (1995). Natural killer cell response to exercise in humans: effect of hypoxia and epidural anesthesia. *J Appl Physiol* 78: 709-716
38. Landmann R, Muller FB, Perini CH, Wesp M, Erne P, Buhler FR (1984). Changes of immune-regulatory cells induced by psychological and physical stress: relation to catecholamines. *Clin Exp Immunol* 58: 127-135
39. Macha M, Shlafer M, Kluger MJ (1990). Human neutrophil hydrogen peroxide generation following physical exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 30:412-419
40. Mackinnon LT, Chick TW, Vanas A, Tomasi TB (1987). The effect of exercise on secretary and natural immunity. *Adv Exp Med Biol* 216: 869-876
41. Mackinnon LT (1998). Future directions in exercise and immunology: regulation and integration. *Int. J. Sports. Med.*; 19: S205-S211
42. Mackinnon LT and Hooper S. (1994). Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. *Int J Sports Med 15 suppl:* S179-S183
43. Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, and Chuturgoon A. (1998). High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* 19: 366-370
44. Mathews PM, Froelich CJ, Sibbit WL Jr, Bankhurst AD (1983). Enhancement of natural citotoxicity by beta-endorphin. *immunopharmacology* 1301658-1662.
45. McCarthy DA e Dale MM (1988). The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 6: 333-363.
46. Moldeveanu AI, Shephard RJ, Shek PN (2000). Prolonged exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1b, IL-6, and TNF-a in circulation mononuclear cells. *J Appl Physiolo* 89:1499-1504
47. Moldeveanu AI, Shephard RJ, Shek PN (2001). The cytokyne response to physical activity and training. *Sports Med.* 31 (2): 115-144
48. Morgan EL, McClurg MR, Janda JA (1990). Suppression of human B lymphocyte activation by beta-endorphin. *J Neuroimmunology* 28: 209-217
49. Muns G (1994). Effect of long-distance running on polymorphonuclear neutrophil phagocytic function of the upper airways. *Int J Sports Med* 15(2):96-9
50. Muns G, Rubinstein I, Singer P (1996). Neutrophil chemotactic activity is increased in nasal secretions of long-distance runners. *Int J Sports Med* 17(1):56-9
51. Nascimento E, Manhães-de-Castro R, De Castro CB, Leandro CG (2001). Pode a glutamina modular a imunidade? *Anais Faculd de Med CCS – UFPE.* 46: 67-70
52. Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Schmitt RL, Bailey EM, Warren BJ, Utter A, Davis JM. (1997). Carbohydrate and cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol.* 82: 1662-1667
53. Nehlsen-Cannarella SL (1998). Cellular responses to moderate and heavy exercise. *Can J. Physiol Pharmacol* 76 (5): 485-489
54. Newsholme EA (1991). Biochemical mechanism to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. *Int J Sports Med* 15: (suppl 3): S142-S147
55. Nielsen HB, Secher NH, Kappel M, Hanel B, Pedersen BK (1996). Lymphocyte, NK and LAK cell responses to maximal exercise. *Int J Sports Med* 17: 60-65
56. Nieman D C, Johanssen LM, Lee JW, Arabatzis K. (1990a). Infections episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness* 30: 316-328

57. Nieman DC, Nehlsen CSL, Markoff PA, Balk Lamberton AJ, Yang H Chritton DB, Lee JE Arabatzis K. (1990b). The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med* 11: 467-473
58. Nieman DC, Henson DA, Sampson CS, Herring JL, Suttles J, Conley M, Stone MH, Butterworth DE, Davis JM (1995). The acute immune response to exhaustive resistence exercise. *Int J Sports med* 16:322-328
59. Nieman DC (2000). Is infection risk linked to exercise workload? *Med Sci Sports Exerc* 32(7):S406-411
60. Ortega E, Barriga C, De la Fuente M (1993). Study of the phagocytic function of neutrophils from sedentary men after acute moderate exercise. *Eur J Appl Physiol* 66:60-64
61. Ortega E, Forner MA, Barriga C (1996). Effect of beta-endorphin on adherence, chemotaxis and phagocytosis of Candida Albicans by peritoneal macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19(4):267-74
62. Ortega E, Forner A, and Barriga C. (1997). Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactine as mediators. *J Physiol (Lond)* 498:729-734
63. Ortega E, Forner MA, Garcia JJ, Rodriguez AB, Barriga C. (1999). Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem* 201(1-2):41-7
64. Ostrowski K, Hermann C, Bangash A, Schjerling P, Nielsen JN, and Pedersen BK. (1998a). A trauma-life elevation in plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol (Lond)* 508: 949-953
65. Ostrowski K, Rhode T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. (1998b). Evidence that IL-6 is produced in skeletal muscle during intense long-term muscle activity. *J Physiol (Lond)* 508: 904-906
66. Ostrowski K, Rhode T, Asp S. (1998c). The sequential release of cytokines in strenuous exercise. *Int J Sports Med.* 19:Suplpl. 3: S216-217
67. Ostrowski K, Rhode T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. (1999). The cytokine balance and strenuous exercise: TNF-alpha, IL-2beta, IL-6, IL-1ra, sTNF-r2, and IL-10. *J Physiol (Lond)* 515: 287-291
68. Ottaviani E, Franceschi C (1996). The neuroimunology stress from invertebrates to man. *Progr Neurobiol.* 48: 421-440
69. Ottaway CA and Husband AJ. (1994). The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today* 15: 511-517
70. Pannen BH and Robotham JL. (1995). The acute-phase response. *Ne Horizons* 3: 183-197
71. Parry-Bilings M, Budgett R, Koutedakis Y, Blomstrand E, Brooks S, Williams C, Calder P , Pilling S, Baigrie R, Newsholme EA. (1992). Plasma amino acid concentration in the overtaining system: possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exercise* 24: 1353-1358
72. Pedersen BK, Bruunsgaard H.(1995). How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Med* 19:193-400
73. Pedersen BK, Tvede N, Christensen LD, Klarlund K, Kragbak S, Halkjrkristensen J. (1989). Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int J Sports Med* 10: 129-131
74. Pedersen BK, Kappel M, Klokker M, Nielsen HB, and Secher NH. (1994). The immune system during exposure to extreme physiologic conditions. *Int J Sports Med* 15 *Suppl*: S116-S121
75. Pedersen BK, Bruunsgaard H, Klokker M, Kappel M, MacLean DA, Nielsen HB, Rohde T, Ullum H, and Zacho M. (1997). Exercise-induced immunomodulation: possible roles of neuroendocrine factors and metabolic factors. *Int J Sports Med* 18 *Suppl*: S2-S7
76. Pedersen KB e Hoffman-Goetz L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 80 (3): 1055-1081
77. Peters EM and Bateman ED (1983) Ultra marathon running and upper respiratory tract infections: An epidemiological survey. *South African Med J* 64, 582-584
78. Pyne DB (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med* 17(4):245-58
79. Pyne DB, Baker MS, Smith JA, Telford RD, Weidemann MJ (1996). Exercise and the neutrophil oxidative burst: biological and experimental variability. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74(6):564-71
80. Pyne D.B e Gleeson M. (1998). Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *Int J Sports Med* 19: 138-194
81. Pyne DB, Smith JA, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ.(2000) Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J Sci Med Sport* 3(1):44-54
82. Robson PJ, Blannin AK, Walsh NP, Castell LM, Gleeson M (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on *in vitro* neutrophil function in male athletes. *Int J Sports Med* 20: 128-135
83. Smith JA, Telford RD, Mason IB, and Weidemann MJ. (1990). Exercise, training and neutrophil microbicial activity. *In J Sports Med* 11: 179-187
84. Smith LL. (1991). Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exercise* 23: 542-551
85. Smith JA, Gray AB, Pyne DB, Baker MS, Telford RD, and Weideman MJ. (1996). Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. *Am J Physiol* 270: R838-R845
86. Smith JA, Pyne DB (1997) Exercise, training, and neutrophil function. *Exerc Immunol Rev*;3:96-116
87. Smith LL, Anwar A, Fragen M, Rananto C, Johnson R, Holbert D (2000). Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol* : 82(1-2):61-7
88. Steensberg A, Toft AD, Schjerling P, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. (2001). Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinephrine. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(3):C1001-1004
89. Sternfeld B. (1992). Cancer and the protective effect of physical activity: the epidemiological evidence. *Med Sci Sports Exerc.* 24: 1195-1209
90. Tonnesen E, Christensen NJ, and Pedersen BK (1987). Natural Killer cell activity during cortisol and adrenaline infusion in healthy volunteers. *Eur J Clin Invest* 17: 497-503
91. Tvede N, Pedersen BK, Hansen FR, Bendix T, Christensen LD, Galbo H and Halkjaer-Kristensen J. (1989). Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulations and in vitro proliferative responses. *Scand. J. Immunol* 29: 383-389

92. Tvede N, Steensberg J, Baslund B, Halkjaer-Kristensen J, and Pedersen BK (1991). Cellular immunity in highly trained elite racing cyclist during periods of training with high and low intensity. *Scand J Med Sci Sports*1: 163-166
93. Tvede N, Kappel M, Halkjaer-Kristensen J, Galbo H, and Pedersen BK. (1993). The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukina-2 production. *Int J Sports med* 14: 275-282
94. Tvede N, Kappel M, Krarlund K, Duhn S, Halkjaer-Kristensen J, Kjaer M, Galbo H, and Pedersen BK. (1994) Evidence that the effect of bicycle exercise on blood mononuclear cell proliferative response and subsets is mediated by epinephrine. *Int J Sports med* 15: 100-104
95. Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J, and Pedersen BK. (1994). Bycicle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1alpha, IL-1beta, IL-6, or TNF-alpha pre m-RNA in BMNC. *J Apll Physiol* 77: 93-97
96. Van Den Bergh P, Rozing J, and Nagelkerken L. (1993). Identification of two moieties of beta-endorphin with opposing effects on rat T-cell proliferation. *Immunology* 79:18-23
97. Whiteside TL, and Herberman RB. (1989). The role of natural killer cells in human disease. *Clin Immunol Immunophatol* 53: 1-23
98. Woods JA, Davis JM, Mayer EP, Ghaffar A, Pate RR. (1993). Exercise increases inflammatory macrophage antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* 75(2):879-86
99. Woods JA, Davis JM, Kohut ML, Mayer EP, Ghaffar A, and Pate RR. (1994). Effects of exercise on macrophage activation for antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* 76: 2177-2185
100. Woods JA, Ceddia MA, Kozak C, Wolters BW (1997). Effects of exercise on the macrophage MHC II response to inflammation. *Int J Sports Med* 18(6):483-8
101. Woods JA (1999). Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int J Sports Med* 20 (5): 322-327
102. Woods JA, Davis JM, Smith JA, Nieman DC (1999). Exercise and cellular innate immune function. *Med Sci Sports Exerc.* 31(1): 57-76
103. Woods J, Lu Q, Ceddia MA, Lowder T (2000). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Int J Sports Med* 21 S1:S24-30

PODE A GLUTAMINA MODULAR A IMUNIDADE?

Elizabeth do Nascimento[1]
Raul Manhães de Castro[2]
Célia M.M. Barbosa de Castro[3]
Carol Góis Leandro[4]

Nascimento E, Manhães de Castro R, de Castro CMMB, Leandro CG. Pode a glutamina modular a imunidade? An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife, 46(1), p.67-70, 2001.

RESUMO: Dentre os diversos nutrientes pesquisados, denominados "imunomoduladores" ou "imunonutrientes", tem-se ressaltado o papel da glutamina, que é um aminoácido não essencial, sintetizado pelo organismo em quantidades suficientes nos estados fisiológicos. Possui relevante participação em numerosas vias metabólicas, sobretudo, as relacionadas com a homeostase orgânica. Entretanto, estados hipercatabólicos, como o estresse, encontram-se associados ao aumento da demanda orgânica de glutamina. Nesta revisão, serão discutidos o papel metabólico da glutamina e as implicações de sua disponibilidade no funcionamento das células imunes.

UNITERMOS: Glutamina; Imunidade; Imunonutriente.

INTRODUÇÃO

Proteínas são os principais elementos plásticos que compõem a célula, participando do seu crescimento, reparo e funcionamento. As proteínas são formadas por seqüências de aminoácidos. A deficiência ou falta de um deles, pode limitar ou interromper a síntese da estrutura protéica. Alguns aminoácidos não podem ser produzidos pelo corpo ou o são em quantidades insuficientes. São denominados "essenciais", fazendo-se necessário o seu suprimento. A grande maioria dos outros aminoácidos pode ser sintetizada a partir de intermediários metabólicos, sendo por conseguinte, considerados "não essenciais". Alguns destes ainda são "condicionalmente essenciais", em estados nos quais a necessidade ultrapassa a síntese endógena.

É importante a relação entre disponibilidade de aminoácidos ou outros substratos metabólicos, e o bom funcionamento do sistema de defesa do organismo. Estados hipercatabólicos são observados durante o exercício exaustivo ou prolongado, nas pós-cirurgias, no transplante de medula óssea e em outras situações de comprometimento do estado fisiológico ou nutricional. Associados ao aumento catabólico, é relevante considerar a constante ocorrência de redução do funcionamento das células imunes[1] e, por vezes, manifestação de quadro infeccioso[2,3].

Consideráveis esforços vêm sendo realizados na identificação de substâncias capazes de melhorar a resposta imune[4], os "imunonutrientes". A imunonutrição constitui um novo campo de investigação em nutrição. Atualmente, tem se dado muita atenção à influência dos imunonutrientes na fase inflamatória aguda, em particular, do trato intestinal.

O sistema imune é essencial na prevenção e limitação de infecções, bem como em todo processo que envolva reparo e recuperação de injúrias[5]. Todavia, a adequada atividade e função imune depende do fornecimento apropriado de substratos metabólicos. Vários destes são derivados de glicose e glutamina[6]. Sob condições fisiológicas, a glutamina é sintetizada pelo organismo em quantidades suficientes. Contudo, no hipercatabolismo a glutamina é reconhecida como aminoácido "condicionalmente essencial", e tem despertado interesse dos pesquisadores por sua capacidade de interferir no funcionamento de componentes do sistema imune[5,6,7].

Assim, o objetivo desta breve revisão é abordar aspectos relevantes do metabolismo da glutamina associados à homeostase. Serão apresentadas evidências experimentais que tratam da influência da glutamina sobre a função imune.

1 - Mestre em Saúde Pública - USP
2 - Prof. Adjunto do Depto. de Nutrição - CCS, UFPE
3 - Profa. Adjunta do Depto. de Medicina Tropical - CCS, UFPE
4 - Mestre em Ciências do Desporto - FCDEF - Universidade do Porto - Portugal

Correspondência: Elizabeth do Nascimento
Rua Santana de Castro, 10 - Encruzilhada
Recife - PE - CEP 52030-040
E-mail: nlizteth@bol.com.br

Tecidos e metabolismo da glutamina:

A glutamina participa de numerosas vias metabólicas[8,9], sendo um aminoácido neutro produzido por diversos tecidos corporais, preferencialmente, músculo esquelético, cérebro, fígado, rins[8]. Nestes tecidos, a síntese relaciona-se diretamente a presença da glutamina sintetase, enzima amplamente distribuída no organismo[8,9].

Já a degradação da glutamina ocorre sobretudo nos rins, fígado, linfonodos, trato intestinal e leucócitos, aos quais, torna-se imprescindível a ação da enzima glutaminase. Intestino, fígado, rins, e tecidos linfáticos utilizam glutamina em quantidades bastantes elevadas para finalidades distintas.

O consumo de glutamina pelas células intestinais relaciona-se tanto ao seu papel no metabolismo energético como sua participação estrutural. Taxas de utilização da glutamina, tão ou mais altas que a da glicose, ocorrem em colonócitos[6]. Outrossim, células imunes, presentes na mucosa intestinal (placa de Peyer), também utilizam glutamina em elevadas quantidades[6].

O fígado, apesar de conter glutamina sintetase e glutaminase, não é grande produtor ou consumidor de glutamina. No hepatócito, a desaminação com formação de uréia parece ser mais relevante[9]. O esqueleto carbônico então liberado é utilizado no fornecimento de energia (oxidação via Ciclo de Krebs) ou transformado em outros compostos: lipídios, aminoácidos e, principalmente, glicose. Portanto, no fígado, o uso da glutamina relaciona-se sobretudo à síntese da uréia e da neoglicogênese. Este processo, a partir da glutamina, parece ser tão ou mais importante quanto aquele, a partir da alanina[10].

A utilização renal de glutamina relaciona-se diretamente ao hipercatabolismo[11]. A metabolização de grandes quantidades de proteínas pode desencadear quadro de acidose, um estímulo à protéólise. A redução do pH sangüíneo resulta em sobrecarga renal no tamponamento e eliminação de íons H^+, com requerimento adicional de glutamina[12]. No rim, o grupo amina da glutamina é removido e conjugado aos íons hidrogênios em excesso, os quais serão eliminados como íons amônio.

Excluindo-se a taurina, a glutamina é o aminoácido livre mais abundante no músculo esquelético e no plasma. A concentração de glutamina é cerca de 19,5mM/l por peso úmido de músculo, e de 0.6mM/l, no plasma de humanos adultos. Visto que a maior parte da glutamina dietética (50% ou mais) é captada e utilizada pelas células intestinais, a manutenção de suas taxas deve ser suprida pela produção endógena.

Há ampla distribuição da glutamina sintetase nos diversos tecidos. Contudo, por constituir-se na maior parte da massa corporal, o tecido muscular contém a maior quantidade da enzima[8]. Assim, o músculo esquelético é o principal órgão implicado na regulação da síntese[9], do estoque[13] e da liberação de glutamina para a circulação[9,14]. A manutenção da concentração da glutamina no plasma e dentro das células é função do metabolismo intramuscular.

A participação ubiquitária da glutamina no organismo é forte indício de sua importância funcional. Ressalte-se o papel regulador do músculo esquelético no "turnover" da glutamina. Demandas energéticas altas caracterizam-se por alterações do metabolismo da glutamina e por grandes repercussões no músculo[15].

Estresse e glutamina

Freqüentemente, associam-se às situações estressantes, aumentos nas concentrações de hormônios "catabólicos ou do estresse" (ex.:CRH, ACTH, glicocorticóides, catecolaminas, etc). A descarga desses hormônios na circulação exacerba a neoglicogênese, causando degradação protéica acompanhada de padrão específico de liberação de aminoácidos para o sangue. Dos aminoácidos mobilizados do meio intra para o extracelular, em resposta ao estresse, a glutamina figura entre os primeiros [9]. A mobilização da glutamina provavelmente está associada à regulação que os glicocorticóides parecem exercer sobre a atividade da glutamina sintetase[16], e sobre o aumento da liberação de glutamina pelo músculo esquelético[9]. Ademais, o estresse parece causar aumento da captação da glutamina pelos rins, fígado e intestino[11].

Redução da massa muscular, presença de balanço nitrogenado negativo[9] e, por conseguinte, perda de peso, são expressões das mudanças ocasionadas pelo estresse no metabolismo muscular. Intensa saída de glutamina intramuscular para o meio extracelular pode levar a redução dos estoques celulares e conseqüente estímulo à proteólise[15]. Esta tem por objetivo restaurar a glutamina a partir da degradação de outros aminoácidos; sobretudo, os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina)[11,16]. Outrossim, na atividade muscular intensa, a leucina, isoleucina, valina, glutamato, aspartato e asparagina são utilizados ou para oxidação, ou para formação de intermediários do ciclo de Krebs, ou para a síntese de glutamina ou alanina.

Paralelo ao efluxo de glutamina do músculo esquelético para a circulação e ao seu maior transporte para órgãos viscerais, observa-se a diminuição dos seus níveis

plasmáticos[9] e incremento da susceptibilidade à infecções. Portanto, as mudanças metabólicas ocorridas no estresse, parecem possuir estreitas relações com o metabolismo da glutamina no músculo e com a função do sistema imune. Newsholme[17] reporta que, no estresse, qualquer diminuição da disponibilidade de glutamina para as células imunes pode explicar em parte o estado de imunossupressão.

Elos entre a glutamina e células do sistema imune

O consumo da glutamina, para os diversos fins, por linfócitos, macrófagos, neutrófilos, é tão ou mais importante que o da glicose[17]. Ensaios *in vitro* demonstraram que a glutaminase possui alta atividade nos órgãos linfóides[8,13]. Entretanto, apenas 25% ou menos da glutamina é completamente oxidada nestas células[6,18]. Portanto, a glutamina não é somente utilizada na produção de energia. Estudos *in vitro* demonstraram que os principais catabólitos intermediários da via oxidativa da glutamina, em linfócitos[6,18] e macrófagos, são o glutamato, aspartato, lactato, amônia, alanina e piruvato. Estas substâncias exercem variado papel funcional no organismo. A magnitude do consumo de glutamina por linfócitos, macrófagos, neutrófilos[19], reflete-se na medida dos metabólitos finais e na atividade catalítica de enzimas-chave relacionadas ao metabolismo intracelular.

A metabolização da glutamina pelas células imunes fornece substratos fundamentais na formação de proteínas, purinas, pirimidinas, glicosamina e NAD+[6, 15,17]. Esse fluxo nas vias biossintéticas aumenta muito durante a síntese de DNA, RNA e lipídios (fosfolipídios, colesterol e triglicerídeos)[5]. Estas moléculas são necessárias à formação de nova membrana celular durante a atividade das células fagocitárias[17], de citocinas[20] e de ânions superóxido[5].

Há uma relação direta entre concentração de glutamina, proliferação de linfócitos T[21,22] e taxa de fagocitose por macrófagos[21]. A atividade enzimática[23] e a taxa de utilização da glutamina[6] mostraram-se particularmente elevadas durante a mitose em cultura de linfócitos do timo de ratos. Esta proliferação de linfócitos T *in vitro*, avaliada pela medida da incorporação de timidina radioativa ao DNA, é estimulada por adição de mitógenos; geralmente, concanavalina A ou fito-hemaglutinina[5]. Concentrações de glutamina na ordem de 0,6 a 1,00 mM/l mostraram-se positivamente relacionadas com incremento da proliferação de linfócitos em humanos[23] e em ratos[22]. Na mesma ordem de concentração da glutamina, ocorre também aumento na taxa de fagocitose por macrófagos peritoniais murinos[21,22].

A alta atividade da glutaminase, verificada em macrófagos peritoneais[15] e neutrófilos isolados de ratos, se relaciona provavelmente à fagocitose, secreção de proteínas, citocinas e restauração da membrana celular[20,24]. Outrossim, a expressão de várias moléculas de superfície celular e de interação entre células mostra-se dependente da concentração de glutamina no meio[20,24]. Assim, a fagocitose, a deagranulação e a produção de citocinas por neutrófilos[19,23] ou macrófagos[24] também mostram-se dependentes da disponibilidade de glutamina[19].

Dentre as citocinas, mediadores químicos entre as células[20], destaca-se o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas (IL)[8,20]. O TNF possui diversas funções: age mediando a imunidade natural e adquirida; estimula o funcionamento de linfócitos T e B; ativa neutrófilos, monócitos e macrófagos; auto-regula a produção de moléculas de superfície, e inicia a produção de citocinas inflamatórias como as IL-1 e IL-6[8]. Entre as interleucinas, a IL-1 também age estimulando a proliferação de linfócitos T e B e regulando a liberação de outras citocinas como IL-2 e IL-6, mediadoras da resposta imunológica.

Há uma estreita relação entre produção de citocinas e a modulação da função imune, sendo estas dependentes da presença de glutamina. A adição de glutamina à dieta aumenta a produção por macrófagos do TNF-a, IL-1b e IL-6[20]. Contudo, a suplementação dietética de glutamina em ratos não parece afetar a produção de IFN-g; IL-4 e IL-10, embora haja expressão de receptores para IL-2[7].

A defesa do organismo contra agentes patógenos também depende da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e macrófagos[27]. A síntese dos radicais-livres de oxigênio parece relacionar-se à disponibilidade de glutamina e glicose[5,19]. Estes íons de oxigênio são oxidantes, microbicidas e mediadores da inflamação[19]. A NADPH oxidase[27] catalisa a reação de produção de superóxido. O suprimento de NADPH, fundamental para a enzima[5], deriva da via pentose-fosfato ou da via da glutamina[17]. Durante pinocitose ou fagocitose, o esqueleto carbônico da glicose ou o da glutamina, pode ser desviado para a síntese de lipídios, via formação de piruvato[28]; outrossim, pode ser destinado à síntese de citocinas. Isto pode comprometer a formação de NADPH e, por conseguinte, as propriedades microbicidas das células fagocitárias[18].

Nos últimos anos, têm se acumulado evidências que permitem entender a implicação dos aminoácidos nas várias vias metabólicas. Isto tem sobremaneira contribuido para aplicabilidade terapêutica dos efeitos da suplementação de aminoácidos sobre a função do sistema imune na defesa do organismo.

Nascimento E, Manhães de Castro R, de Castro CMMB, Leandro CG. Can the glutamine modulate the immunity? An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife, 46(1), p.67-70, 2001.

ABSTRACT: Among several researched nutrients, the so-called "immunomodulatory" or "immunonutrients.", the role of glutamine has been pointed out. The glutamine is an amino acid non-essential, and it is synthesized in enough amounts by the organism in physiologic states. In addition, its participation is important in numerous metabolic pathways, especially, that related with the organic homeostase. However, hipercatabolic states, as the stress, are associated with the increase of the glutamine uptake. In this review, will be discussed the metabolic role of the glutamine and its implications on the availability in the function of the immune cells.

KEYWORDS: Glutamine; Immunity; Immunonutrient.

REFERÊNCIAS

1. Koyama K, Kaya M, Tsujia J, Hori S. Effects of decreased plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1998; 77: 25-31.
2. Gianotti L, Alexander JW, Gennari R, Pyles T, Babcock GF. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. JPEN J Parenter Enteral Nutr 1995; 19: 69-74.
3. Heath GW, Ford ES, Craven TE, Macera CA, Jackson KL, PATE RR. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. Med Sci Sports Exerc 1991; 23: 152-157.
4. Wu G, Meininger CJ, Knabe DA, Bazer FW, Rhods JM. Arginine nutrition in development, health and disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2000; 3: 59-66.
5. Curi R, Newsholme P, Curi-Pithon TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt PIJR, Guimarães ARP. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. Braz J Med Biol Res 1999; 32:15-21.
6. Ardawi MS e Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. Biochem J 1983; 212: 835-842.
7. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-Lymphocyte responsiveness. J Nutr 1999; 129: 1524-1531.
8. Calder PC e Yaqoob P. Glutamine and the immune system. Amino Acids. 1999; 17: 227-241.
9. Muhlbacher F, Kapadia CR, Coipoys MF, Smith RJ, Wilmore DW. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. Am J Physiol. 1984; 247: 75-83.
10. Perriello G; Jorde R, Nurjhan N, et al. Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: role of skeletal muscle. Am J Physiol 1995; 269 : 443- 450.
11. Walsh NP; Blannin AK, Clark AM; Cook L, Robson PJ, Gleeson ML. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1998; 77: 434-438.
12. Welbourne TC, Joshi S. Interorgan glutamine metabolism during acidosis. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 1990; 14: 77S-85S.
13. Castell LM, Newsholme EA. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. Nutrition 1997; 13: 738-742.
14. Newsholme EA, Parry-Billings M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. JPEN. J Parent Enteral Nutr 1990; 14: 63S-67S.
15. Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. Biochem J 1987; 242: 631-636.
16. Max SR, Mill J, Mearow K, Konagya M. Dexamethasone regulates glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. Am J Physiol 1988, 255: 397-402.
17. Newsholme EA. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overstrained athletes. Int J Sports Med 1994; 15; S142-S147.
18. Ardawi MS. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. Metabolism1988; 37: 99-103.
19. Curi TC, De Melo MP, Palanch AC, Miyasaka CK, Curi R. Percentage of phagocytosis, production of O_2-H_2O_2 and NO and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. Cell Biochem Funct 1998; 16: 43-9.
20. Murphy C, Newsolme P. Macrophage-mediated lysis of a beta-cell line, tumor necrosis factor-alpha release from bacillus Calmette-Guerin (BCG)-activated murine macrophages and interleukin-8 release from human monocytes are dependent on extracellular glutamine concentration and glutamine metabolism. Clin Sci. 1999; 96: 89-97.
21. Parry-Billings M, Evans J, Calder P C, Newsholme EA. Does glutamine contribute to immunosupression after major burns? Lancet 1990; 336: 523-525.
22. Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. Nutrition 1997; 13: 646-651.
23. Brand K . Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. Biochem J 1985; 228: 353-361.
24. Yaqoob P, Calder PC. Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability. Cytokine1998; 10: 790-794.
25. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. Immunol Today 1992; 13: 169-172.
26. Wells SM, Kew S, Yaqoob P, Wallce FA, Calder PC. Dietary glutamine enhances cytokine production by murine macrophages. Nutrition 1999; 15: 881-884.
27. Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. Braz J Med Biol Res. 1997; 30: 141-155.
28. Newsholme P, Costa Rosa LF, Newsholme EA, Curi R. The importance of fuel metabolism to macrophage function. Cell. Biochem Funct 1996; 14: 1-10.