

## **TREINAMENTO AERÓBIO MODERADO ASSOCIADO A SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA ALTERAM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO MUSCULAR EM CAMUNDONGOS<sup>1</sup>**

**Analú Bender Dos Santos<sup>2</sup>, Eloisa Gabriela De Pelegrin Basso<sup>3</sup>, Maicon Machado Sulzbacher<sup>4</sup>, Renan Daniel Bueno Basso<sup>5</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>6</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>7</sup>.**

<sup>1</sup> Projeto de Iniciação Científica

<sup>2</sup> Acadêmica do curso de Educação Física - UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS – (DCVida)- Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

E-mail: analu.bender@gmail.com

<sup>3</sup> Acadêmica do curso de Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC/UNIJUI – Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF - DCVida

<sup>4</sup> Acadêmico do curso de Enfermagem - UNIJUI, Bolsista PIBIT/CNPQ -Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>5</sup> Acadêmico do curso de Educação Física - UNIJUI, Bolsista PROBIC/FAPERGS – (DCVida)- Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>6</sup> Professora do Departamento de Ciências da Vida (DCVida, Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS)- Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

<sup>7</sup> Professor do Departamento de Ciências da Vida (DCVida, Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS)- Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF-UNIJUI.

### Introdução

A suplementação com L-glutamina (Gln) é uma prática comum entre atletas e frequentadores de academias que buscam a melhora do seu desempenho. Fisiologicamente, este aminoácido é utilizado por diversas células como fonte de energia e, pelo sistema imune (linfócitos, monócitos/macrófagos e neutrófilos), para a replicação celular em quadros inflamatórios e infecciosos (BROSSMAN 2000; PHANVIJHITSIRI et al, 2006). A Gln também é um importante precursor na produção de amônia nos rins, para a manutenção do balanço ácido-base e da síntese de uréia hepática (PHANVIJHITSIRI et al, 2006). Além disso, este aminoácido é utilizado por diferentes tecidos para a síntese de glutathione reduzida (GSH) (CRUZAT et al, 2009), principal antioxidante celular não enzimático. O músculo esquelético em atividade aumenta a síntese de Gln e sua liberação para a circulação, elevando a glutaminemia, contribuindo para o sistema de defesa antioxidante e imune. De outro lado, o aumento do metabolismo muscular gera elevação da produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ex. OH<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), as quais podem promover danos celulares, por oxidação de moléculas lipídicas e proteicas teciduais, causando estresse oxidativo (EO) e consequente geração do resíduo malondialdeído (MDA) (PEREIRA, 1996). O exercício físico está, portanto, relacionado ao EO de duas maneiras: de um lado, elevando

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

o metabolismo oxidativo gerando uma maior formação de espécies reativa de oxigênio (ERO) e, de outro, aumentando a disponibilização de defesas antioxidantes (CRUZAT et al, 2007; SANTOS et al, 2013). No entanto, durante a realização de exercício exaustivo, o estresse metabólico intenso é capaz de diminuir a disponibilidade deste aminoácido, pela sua utilização como substrato metabólico intermediário do ciclo de Krebs, para a síntese de ATP, diminuindo a disponibilidade de Gln para o sistema de defesa antioxidante e imune (CRUZAT et al, 2009). A homeostase metabólica e a prevenção do dano oxidativo podem, portanto, depender da proporcionalidade entre o volume, intensidade e regularidade exercícios físicos e do balanço entre a produção de ERO e a disponibilidade de Gln para o sistema de defesa antioxidante. Neste sentido, a necessidade de suplementação com Gln pode ser dependente da intensidade do exercício. Resultados descritos por Santos e cols. (2013) demonstraram que a suplementação com Gln combinada ou não com treinamento aeróbio de intensidade moderada, foi capaz de melhorar a tolerância a glicose em camundongos; contudo, a combinação Gln+exercício causou maior produção de malondialdeído (MDA) no tecido muscular, indicando lipoperoxidação lipídica e, conseqüentemente, um possível efeito nocivo desta combinação. Os mesmos autores referem que a suplementação de Gln ocasionou também uma maior lipoperoxidação no tecido pancreático. Os danos oxidativos nos tecidos muscular e pancreático mencionados acima sugerem desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, gerando EO que, por sua vez, pode gerar um quadro pró-inflamatório. Neste contexto, a mensuração da expressão da proteína de choque térmico HSP70 (70 kDa-Heat Shock Protein) tecidual é de suma relevância, visto que esta proteína possui um importante papel anti-inflamatório e considerada uma proteína do estresse (FU, 1996). Assim, este trabalho visa dar continuidade às investigações acerca da implicação da suplementação com Gln sobre o perfil oxidativo em tecidos metabólicos e sobre a expressão de HSP70 no tecido muscular, em resposta ao treinamento físico aeróbio moderado, em modelo animal.

#### Metodologia

Foram utilizados 28 camundongos Swiss (13 semanas, peso 36,9±2,8g), provenientes do biotério da UNIJUI, mantidos em condições ideais. Estes foram adaptados por 3 dias com 100µL de PBS (pH 7,4) (v.o.) e 1h depois submetidos a natação por 10min sem adição de carga. Os animais permaneceram sem manipulação por 72h e então divididos em 4 grupos: C (sedentário PBS, n=7); T (treinado PBS, n=8); G (sedentário Gln, n=7); TG (treinado Gln, n=6). Treinamento: aeróbico de intensidade moderada, durante 6 semanas, com carga inicial de 2% de seu peso corporal na 1ª semana e de 4% a partir da 2ª semana. As sessões iniciaram com a duração de 20 min, aumentando 10min/semana até alcançar 60min, realizado em tanques (13x14x30cm) com água (30±1°C) a 20cm de profundidade (grupos T e TG) (adaptado de HECK, 2011). Os grupos C e G foram mantidos em tanque com 2cm de água. Suplementação: Os grupos G e TG receberam L-glutamina (1g/Kg) v.o. (100µL/10g) diariamente, 1 hora antes da sessão de exercício (CRUZAT & TIRAPGUI, 2009). Os animais dos grupos C e T receberam PBS (pH 7,4). Morte: após 72 horas da última sessão de natação, os animais foram mortos por decaptação, para a coleta dos tecidos hepático, renal, adiposo,

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

pancreático e muscular para posteriores análises bioquímicas. Dosagem de proteína: a concentração de proteína dos tecidos foi determinada pelo método espectrofotométrico de Bradford, a 595nm, utilizando curva padrão de albumina (1mg/ml) (BRADFORD, 1976). Lipoperoxidação (TBARS): A determinação da lipoperoxidação foi realizada utilizando o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978), como medida dos parâmetros de estresse oxidativo, por espectrofotometria em 535 nm. (ZANCHI et al., 2008). Atividade enzimática: a atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi avaliada pelo método Marklund & Marklund (1974), a 420 nm. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada através da decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240nm de absorbância. Os resultados foram expressos em pmol/mg de proteínas (AEBI, 1984). Expressão de HSP70: por Western Blotting, eletroforese SDS-PAGE, com uso de anticorpo monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147) (1:1000), com segundo anticorpo contendo peroxidase (Sigma A9044), (HECK, 2011). Estatística: foi utilizado o programa Graph Pad 3.0. Os resultados foram expressos como médias +DP e analisados por ANOVA de uma via, com teste post-hoc de TUKEY, considerando nível de significância estatística o limite de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### Resultados e discussão

Este estudo revela que a suplementação com glutamina (Gln) associada ou não ao treinamento aeróbio moderado não causou alteração no perfil oxidativo no tecido hepático (fig. 1.1-A,B,C), pancreático (fig. 1.2-A,B,C), branco epididimal (fig. 1.3-A,B,C) e renal (fig. 1.4-A,B,C) nos parâmetros avaliados, ou seja, quanto à concentração de malondialdeído (MDA) e quanto a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

A combinação de glutamina + exercício (TG) causou maior concentração de MDA no músculo gastrocnêmio quando comparado aos animais que permaneceram em repouso, com e sem suplementação de glutamina (G e C, respectivamente), conforme ilustrado na fig. 2-A. A lipoperoxidação, mensurada pela elevação de MDA intracelular, indica dano oxidativo nos tecidos mencionados. Neste contexto, pode-se sugerir que a glutamina esteja sendo desviada de sua função no sistema de defesa para outra via, como por exemplo, utilização como substrato energético. Entretanto, observamos que no grupo de animais suplementados com glutamina e submetidos ao treinamento (TG) ocorreu aumento da atividade da enzima SOD (fig. 2-B) sem, contudo, termos observado resultado semelhante na atividade da enzima CAT, no músculo esquelético, como podemos ver na fig. 2-C. Estes resultados refletem o desbalanço entre a produção de ERO e a atividade do sistema antioxidante.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico  
Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

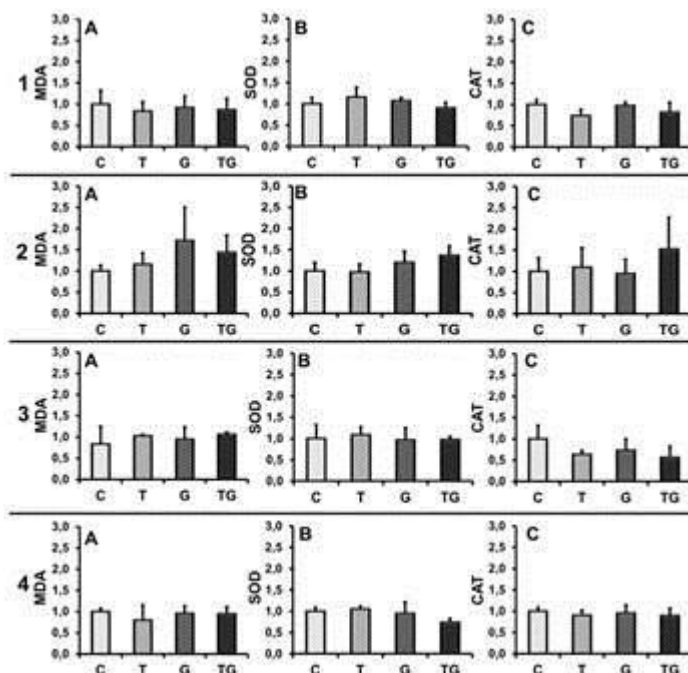


Figura 1

Figura 1. Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em camundongos após 6 semanas de tratamento de suplementação com l-glutamina e treinamento aeróbico moderado. Concentrações de MDA (A), atividade enzimática da SOD (B) e CAT (C), nos tecidos (1) hepático, (2) pancreático, (3) adiposo branco epididimal e (4) renal. Os valores foram expressos em média + DP, relativo ao grupo Controle. C, sedentário (n=7), T, treinado (n=8), G, sedentário suplementado com l-glutamina (n=7), TG, treinado suplementado com l-glutamina (n=6). Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. (A) (1 p=0,7683, 2 p=0,8092, 3 p=0,5565 e 4 p=0,8842). (B) (1 p=0,4212, 2 p=0,9887, 3 p=0,6281 e 4 p=0,7360). (C) (1 p=0,1745, 2 p=0,7266, 3 p=0,5376 e 4 p=0,3082).

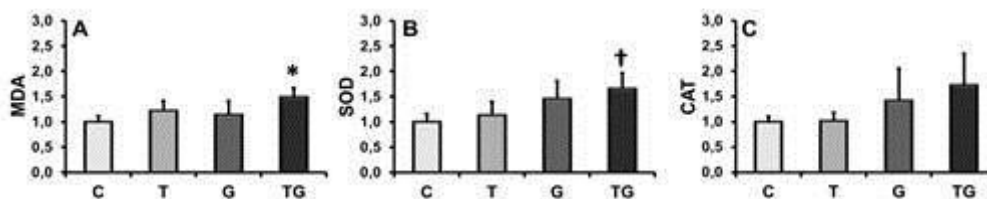


Figura 2

Figura 2. Avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo tecidual do músculo gastrocnêmio em camundongos após 6 semanas de tratamento de suplementação com l-glutamina e treinamento aeróbico moderado. Concentrações de MDA (A), atividade enzimática das enzimas SOD (B) e CAT (C). Os valores foram expressos em média + DP, relativo ao grupo Controle. C, sedentário (n=7), T, treinado (n=8), G, sedentário suplementado com l-glutamina (n=7), TG, treinado suplementado com l-glutamina (n=6). Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. (A) \* $p < 0,05$  em comparação com os grupos C e G, †  $p < 0,05$  em comparação com o grupo C e T, (C)  $p = 0,5376$ .

A SOD elimina o superóxido ( $O_2^-$ ) por dismutação, transformando-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que também ocasiona danos e precisa ser convertido em oxigênio ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ) pela ação da CAT, sendo que esta última manteve-se inalterada. O balanço homeostático entre a atividade das enzimas SOD e CAT é, portanto, necessário para que o  $O_2^-$  não gere danos ao organismo. Uma atividade superior da SOD em relação à CAT pode desencadear a formação do radical hidroxila ( $OH^-$ ) através das reações de FENTON. Este radical é extremamente danoso às membranas lipídicas além de ocasionar danos no DNA (RIEGEL, 2004).

As alterações na concentração de MDA e da atividade da SOD no grupo TG, podem estar relacionadas a um quadro de estresse oxidativo (EO) no tecido muscular, gerando estresse celular, que causa aumento na expressão de HSP 70. Não observamos, entretanto, aumento da expressão desta proteína de estresse no músculo gastrocnêmio. Tendo em vista que a HSP70 é conhecida como chaperona, pois participa do dobramento e translocação de proteínas através de membranas, e também auxilia na resposta inflamatória celular, os resultados obtidos sugerem que não houve estresse celular capaz de aumentar a expressão de HSP70.

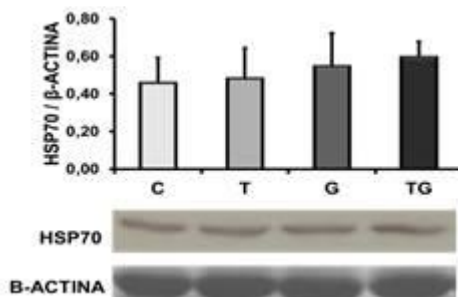


Figura 3



**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

Figura 3. Expressão de HSP70 no músculo gastrocnêmio em camundongos após 6 semanas de tratamento de suplementação com l-glutamina e treinamento aeróbio moderado. Os valores foram expressos em média + DP. n=5 em todos os grupos. Análise estatística por Anova de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey. P = 0,4317.

#### Conclusão

A suplementação com L-glutamina associada ao exercício causa dano oxidativo lipídico muscular, não obstante a maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) neste tecido. Contudo, não foi detectada alteração na expressão da proteína de defesa contra o estresse, a HSP70. Os resultados deste trabalho sugerem a pertinência de avaliação da relação custo-benefício do uso de suplementação com glutamina durante a realização de exercícios aeróbicos moderados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Exercício Aeróbio Moderado; Dano Oxidativo; Glutamina.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v.105, p.121. 1984.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, p.248-54., 1976.
- BROSSMAN, J. T. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *American Society for Nutritional Sciences*, p. 988S-990S, 2000.
- BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, v.52, p.302-309. 1978.
- CRUZAT, V. F. et al. Aspectos Atuais sobre Estresse Oxidativo, Exercícios Físicos e Suplementação. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. São Paulo, v. 13, n. 5, p. 336-342, 2007.
- CRUZAT, V. F., et al. Glutamine Biochemical, Metabolic, Molecular Aspects and Supplementation. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 15, p. 392-397, 2009.
- CRUZAT VF, TIRAPEGUI J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition*. 25, p. 428-35, 2009.
- FU, H. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381,p.571-579. 1996.
- HECK, T. G. et al. HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain? *Cell Biochemistry and Function*, 2011, Published Online 4 March in Wiley Online Library, 215-226.
- MARKLUND, S.; MARKLUNG, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v.47, p.469-474, 1974.
- ODEGAARD, M. L. et al. The mitochondrial 2-oxoglutarate carrier is part of a metabolic pathway that mediates glucose- and glutamine-stimulated insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, nº 22, p. 16530-16537, 2010.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXII Seminário de Iniciação Científica

PHANVIJHITSIRI, K. et al. Heat induction of heat shock protein 25 requires cellular glutamine in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 291, p. 290-299, 2006.

PEREIRA, B. Radicais Livres de Oxigênio e sua Importância para a Funcionalidade Imunológica. *Revista Motriz*. V. 2, n. 2, p. 71-80 1996.

RIEGEL, R.E. Os radicais livres. In: *Bioquímica*. 4ed. - São Leopoldo: Ed Unisinos, p. 507-534, 2004.

SANTOS, A. B. et al. Dano Oxidativo Muscular após Teste de Esforço em Modelo de Natação para Ratos Wistar. *Anais: 2º Congresso Internacional em Saúde: Meio Ambiente e Saúde*. Ijuí. 2013.

ZANCHI, A.C. et al. Chronic Nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) Induces Brain Lipid Peroxidation and Behavioral Changes in Rats. *Inhalation Toxicology*, 20:795–800, 2008.