

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

Prof<sup>o</sup>. 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

Prof<sup>a</sup> Adjunta do Dep. de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde,

Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2004

Nascimento, Elizabeth do

Efeitos da L-Glutamina e/ou do treinamento físico sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos ou não a estresse agudo / Elizabeth do Nascimento. – Recife : O Autor, 2004.

103 folhas : il., fig., tab., quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Glutamina – Parâmetros imunológicos – Efeitos. 2. Ratos – Estresse agudo – Estudo experimental. 3. Natação – Ratos – Fagocitose – Avaliação. 4. Aminoácido (Glutamina) – Efeitos imunológicos. 5. Superóxido (Radical livre) – Avaliação (Estresse, natação e suplementação com glutamina). I. Título.

612.398.192 CDU (2.ed.)  
613.282 CDD (21.ed.)

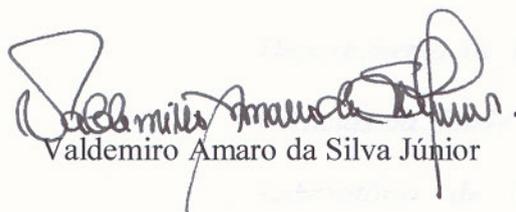
UFPE  
BC2004-164

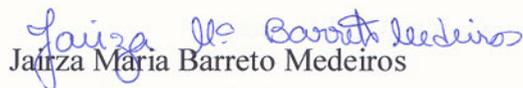
**Título:** Efeitos da L-Glutamina ou do treinamento físico moderado em ratos submetidos ou não a estresse agudo.

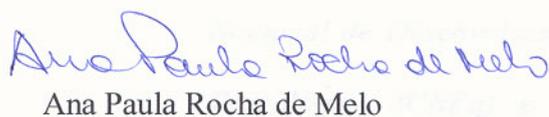
**Nome:** Elizabeth do Nascimento

**Tese aprovada em:** 06/04/2004

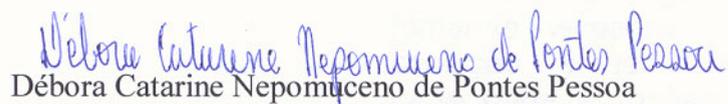
**Membros da Banca Examinadora**

  
Valdemiro Amaro da Silva Júnior

  
Jaíza Maria Barreto Medeiros

  
Ana Paula Rocha de Melo

  
Tânia Lucia Montenegro Stamford

  
Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

*Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naide 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 quer 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 CONSEQÜÊNCIA 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 despendido, 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 abdições e decisões necessárias, em fim, por todo o aprendizado que vivenciei para chegar até aqui.*

## ***AGRADECIMENTOS***

Em especial, ao meu orientador e amigo, Prof<sup>o</sup> 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 prof<sup>a</sup> 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 prof<sup>a</sup> 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 ABREVIACOES 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. Exerccio 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 hemcrito	49
5.3.2.1. Contagem total de hemácias	49
5.3.2.2. Determinação de Hemoglobina	51
5.3.2.3. Determinação de Hemcrito	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 (n de células x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	63
7.1.2. Hemoglobina (g/dl)	63
7.1.3. Hemcrito (%/mm <sup>3</sup> )	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 ABREVIACOES E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BAL	Lavado bronco alveolar
C	Controle
CD+	“Cluster of differentiation” – marcadores celulares
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
dl	Decilitro
DMSO	Dimetil sulfóxido de sódio
DO	Densidade tica
E	Estresse
EDTA	cido etileno diamino tetra acético
EP	Erro padrão
FC	Fator de calibração
FSH	Hormônio fliculo estimulante
g	Gramas
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.	Intraperitoneal
K	Constante para cálculo da liberação de superóxido
Kg	kilograma
Lc	Leucócitos

LH	Hormônio luteinizante
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeos fosfato (reduzida)
NK	Linfócitos Natural Killer (externadoras naturais)
nm	Nanômetro
°C	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 <sub>2</sub> máx	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  (B) Cuba de natação em visão de profundidade	46
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  (B). Obtenção do sangue periférico	48
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