



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANTONIO KLINGEM LEITE DE FREITAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ALANIL-GLUTAMINA NAS ALTERAÇÕES
DA PERMEABILIDADE INTESTINAL EM RATOS TREINADOS SUBMETIDOS A
UM EXERCÍCIO PROLONGADO E EXAUSTIVO DE NATAÇÃO**

FORTALEZA
2013

ANTONIO KLINGEM LEITE DE FREITAS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ALANIL-GLUTAMINA NAS ALTERAÇÕES DA
PERMEABILIDADE INTESTINAL EM RATOS TREINADOS SUBMETIDOS A UM
EXERCÍCIO PROLONGADO E EXAUSTIVO DE NATAÇÃO

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- F936e Freitas, Antonio Klingem Leite de.
Efeito da suplementação com alanil-glutamina nas alterações da permeabilidade intestinal em ratos treinados submetidos a um exercício prolongado e exaustivo de natação. / Antonio Klingem Leite de Freitas. – 2013.
79 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Farmacologia.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
1. Exercício. 2. Permeabilidade. 3. Ocludina. I. Título.

ANTONIO KLINGEM LEITE DE FREITAS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ALANIL-GLUTAMINA NAS ALTERAÇÕES DA
PERMEABILIDADE INTESTINAL EM RATOS TREINADOS SUBMETIDOS A UM
EXERCÍCIO PROLONGADO E EXAUSTIVO DE NATAÇÃO

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela constante força interior.

Ao meu Pai Antonio Mendes de Freitas que apesar de não estar mais conosco torce por mim em qualquer lugar que ele esteja.

A minha mãe Francisca Leite de Freitas, mulher guerreira e batalhadora.

A minha esposa Beatriz e ao meu filho Kaio Enzo que acompanharam desde o início dessa batalha, compartilhando junto comigo as minhas alegrias, angústias e tristezas principalmente durante estes momentos finais da dissertação.

Aos meus irmãos: Patrícia, Clemilson, Kiviane, Karina, Kênia e Kelly que mesmo de longe sempre torceram por mim.

Ao Prof^o Dr. Alexandre Havt, meu orientador, pela paciência de estar me orientando, principalmente com os programas de informática e pelo estímulo de me fazer seguir uma carreira acadêmica.

Ao Prof^o Dr. Armênio Aguiar dos Santos por ter cedido o laboratório para a realização desse trabalho.

Ao Prof^o Dr. Moisés Tolentino por ter me ensinado o protocolo de treinamento de natação com animais.

A Prof^a Dr^a Sandra Nunes por me ajudar no momento do sacrifício dos animais e na coleta dos tecidos.

A Prof^a Dr^a Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista e ao Prof^o Daniel Araújo Viana pela realização das análises histológicas..

Ao técnico do Laboratório Haroldo, um grande amigo que sempre me ajudou e ensinou algumas técnicas de laboratório.

Aos meus colegas Bruno Cidade e Camila que me ajudaram no treinamento dos animais.

Aos meus colegas de pós-graduação Mara Prata, Vinícius, Eudimar e Rosa por me ajudarem com a metodologia de Biologia Molecular.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O exercício prolongado e exaustivo induz uma disfunção da barreira intestinal. Vários estudos mostram que a suplementação com alanil-glutamina (A/G) melhora a proliferação das células intestinais e absorção de eletrólitos. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da suplementação com A/G na permeabilidade intestinal em ratos treinados após um exercício prolongado e exaustivo de natação. Utilizamos ratos Wistar, divididos em sete grupos: 1) Sedentário (S); 2) Sedentário A/G (S-A/G); 3) Treinado (T); 4) Treinado A/G (T-A/G); 5) Exaustão (E); 6) Exaustão A/G (E-A/G) e 7) Recuperado (R). Os animais dos grupos suplementados receberam o dipeptídeo A/G. Os animais foram treinados durante 12 semanas de natação. Na metodologia realizamos análises bioquímicas de pH, pCO₂, pO₂, SO₂, excesso de bases (BE), pelo método de gasometria e lactato e glicose. Analisamos a transcrição das junções firmes: ZO-1, Ocludina, Claudina-2 e PEPT-1 através de RT-PCR. A análise da permeabilidade intestinal foi realizada pelo método da ingestão de Lactulose/Manitol (L/M). Fizemos também análise histológica do duodeno, jejuno e íleo. O presente estudo foi aprovado pela CEPA-UFC, em protocolo de N° 13/13. Nossos resultados mostraram que pCO₂ e SO₂ foram aumentados nos grupos E e E-A/G, mas houve queda nos parâmetros de pH e BE para estes mesmos grupos. Encontramos queda dos índices de glicose e aumento das concentrações de lactato. Houve aumento significativo no percentual de excreção de lactulose nos grupos E e E-A/G em relação ao grupo S. Houve, no entanto, queda da excreção de lactulose com diferença estatística entre os grupos E e E-A/G, mostrando proteção da A/G frente ao aumento da permeabilidade intestinal promovida pelo exercício exaustivo. O percentual de excreção do manitol foi aumentado nos grupos E e E-A/G em relação ao grupo S. Entretanto, na análise da relação da permeabilidade dos dois carboidratos L/M observamos um aumento significativo no grupo E em relação ao grupo S. Contudo, houve diferença significativa entre os grupos E e E-A/G mostrando que a A/G conseguiu reverter os efeitos da atividade exaustiva na permeabilidade intestinal. Observamos aumento da ZO-1 e ocludina nos grupos S-A/G e T em relação a S. Houve também aumento de ZO-1 no grupo E em relação ao S. Porém, a A/G reverteu à transcrição destas junções firmes nos grupos T-A/G e E-A/G. A transcrição de claudina-2 foi reduzida no grupo S-A/G, mas obtivemos um aumento no grupo E em relação ao S e uma diminuição de E-A/G em relação ao E. Em relação ao PEPT-1, observamos aumento da transcrição nos grupos T e E em relação ao S. Contudo, a A/G reverteu à transcrição deste peptídeo no grupo E-A/G em relação ao E. Numa análise de 72 horas após o teste de exaustão encontramos valores para a permeabilidade intestinal

similares aos grupos sedentários. Concluimos que o exercício prolongado e exaustivo alterou a permeabilidade intestinal e a suplementação crônica com alanil-glutamina teve efeito protetor contra este aumento. O possível mecanismo da A/G no processo estudado refere-se a processos mecânicos de interação célula-célula (ZO-1 e ocludina) e/ou eletrolíticos (claudina-2).

Palavras chave: Exercício. Permeabilidade. Ocludina.

ABSTRACT

The prolonged and exhaustive exercise induces intestinal barrier dysfunction. Several studies show that supplementation with alanyl-glutamine (A/G) improves the cell proliferation intestinal and electrolyte absorption. The aim of our study was to investigate the effect of supplementation with A/G in the intestinal permeability in rats trained after prolonged exercise and exhaustive swimming. We used Wistar rats that were divided into seven groups: 1) Sedentary (S); 2) Sedentary A/G (S-A/G); 3) Trained (T); 4) Trained A/G (T-A/G); 5) Exhaustion (E); 6) Exhaustion A/G (E-A/G); 7) Recovered (R). The animal supplemented groups received the dipeptide A/G. The animals were trained for twelve weeks. In the methodology we performed biochemical analysis of pH, pCO₂, pO₂, SO₂, and bases excess (BE), by the method of gas analysis and lactate and glucose. We analyzed the transcription of tight junctions: ZO-1, Occludin, Claudin-2 and PEPT-1 by RT-PCR. The analysis of intestinal permeability was performed by the method of the ingestion of lactulose/mannitol (L/M). We also performed histological analysis of the duodenum, jejunum and ileum. This study was approved by the CEPA-UFC on Protocol N° 13/2013. Our results showed that SO₂ and pCO₂ were higher in groups E and E-A/G, but decreased the parameters pH and BE for these same groups. We found falling glucose levels and increased concentrations of lactate. A significant increase in the percentage of excretion of lactulose in groups E and E-A/G than in group S. There was, however, fall of excretion of lactulose with statistical difference between groups E and E-A/G, showing protection against the alanyl-glutamine increased intestinal permeability promoted by exhaustive exercise. The percentage of excretion of mannitol was increased in groups E and E-A/G than in group S. However, in the analysis of the excretion of both carbohydrates lactulose/mannitol we observed a significant increase in group E than in group S. However, there was significant difference between groups E and E-A/G showing that Ala/Gln was able to reverse the effects of exhaustive activity in intestinal permeability. We observed an increase in ZO-1 and occludin in groups S-A/G and T with respect to S. There was also an increase of ZO-1 in the E group compared to S. However, Ala/Gln reversed the transcription of these tight junctions in groups T-A/G and E-A/G. Transcription of claudin-2 was reduced in the S-A/G, but we obtained an increase in the E group compared to a decrease of S and E-A/G against E. Regarding the PEPT-1 we showed increased transcription in groups T and E in relation to S. However, the Ala/Gln reversed the transcript of this dipeptide in group E-A/G with respect to E. An analysis 72 hours after the exhaustion test values found for intestinal permeability similar to sedentary group. The prolonged and

exhaustive exercise altered intestinal permeability and chronic supplementation with Ala/Gln was protective against the increase. The possible mechanism of Ala/Gln refers to mechanical processes of cell-to-cell interaction (occludin and ZO-1) and/or electrolytic (claudin-2).

Keywords: Exercise. Permeability. Occludin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sistemas de energia e sua contribuição percentual para o rendimento (produção) total de energia durante o exercício.	13
Figura 2	Cascata dos efeitos fisiológicos causados pela redução do fluxo sanguíneo e o estresse térmico nas células epiteliais intestinais.	16
Figura 3	Função das junções firmes na barreira intestinal.	18
Figura 4	Localização funcional das junções firmes no espaço paracelular.	20
Figura 5	Epitélio intestinal mostrando a via paracelular e transcelular.	22
Figura 6	Síntese da glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase.	24
Figura 7	Degradação da glutamina catalisada pela enzima glutaminase.	24
Figura 8	Produção e utilização de glutamina pelos tecidos.	25
Figura 9	Protocolo experimental.	34
Figura 10	Protocolo experimental do grupo recuperado.	36
Figura 11	Tempo (minutos) de exaustão dos grupos exaustão (E) e exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G).	40
Figura 12	Concentração de lactato antes, durante e depois do teste de exaustão no grupo exaustão e exaustão suplementado com alanil-glutamina.	41
Figura 13	Concentração de glicose antes, durante e depois do teste de exaustão no grupo exaustão e no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina.	42
Figura 14	pH sanguíneo nos grupos experimentais.	44
Figura 15	PCO ₂ no sangue venoso nos grupos experimentais.	44
Figura 16	Concentração de HCO ₃ ⁻ no sangue venoso nos grupos.	45
Figura 17	PO ₂ no sangue venoso nos grupos experimentais.	45
Figura 18	Percentual de saturação de oxigênio (SO ₂) no sangue venoso nos grupos experimentais.	46
Figura 19	Excesso de bases no sangue venoso nos grupos experimentais.	46
Figura 20	Percentual de excreção de lactulose nos grupos experimentais.	48
Figura 21	Percentual de excreção de manitol nos grupos experimentais.	48

Figura 22	Relação da Taxa de excreção de lactulose/manitol nos grupos experimentais.	49
Figura 23	Percentual de excreção de lactulose em relação a diferentes momentos de treino e o período de recuperação (72 horas após teste exaustivo).	50
Figura 24	Percentual de excreção de manitol em relação a diferentes momentos de treino e o período de recuperação (72 horas após teste exaustivo).	51
Figura 25	Relação da excreção de lactulose/manitol em relação a diferentes momentos de treino e o período de recuperação (72 horas após teste exaustivo).	51
Figura 26	Expressão Relativa do mRNA da junção firme zona ocludens -1 (ZO-1).	53
Figura 27	Expressão Relativa do mRNA da junção firme ocludina.	54
Figura 28	Expressão Relativa do mRNA da junção firme claudina-2.	54
Figura 29	Expressão Relativa do mRNA cotransportador de H ⁺ /oligopeptídeo (PEPT-1).	55
Figura 30	Fotomiografia dos duodenos de ratos coradas pelo método de hematoxilina e eosina	57
Figura 31	Fotomiografia dos jejunos de ratos coradas pelo método de hematoxilina e eosina	58
Figura 32	Fotomiografia dos íleos de ratos coradas pelo método de hematoxilina e eosina	59

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Sequencias de iniciadores e condições de PCR	38
-----------------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O exercício físico	12
1.1.1 O exercício físico prolongado e exaustivo e o trato gastrointestinal	14
1.2 Permeabilidade intestinal	16
1.2.1 As junções firmes (<i>tight junctions</i> - TJs)	19
1.2.2 As ocludinas	19
1.2.3 As claudinas	20
1.2.4 As moléculas de adesão juncional (JAMs)	21
1.2.5 As zônulas de oclusão	21
1.2.6 Avaliação da permeabilidade intestinal pela lactulose e manitol	22
1.3 Glutamina	22
1.3.1 História, estrutura química, síntese e metabolismo	22
1.3.2 Transporte de glutamina e peptídeos no intestino	25
1.3.3 A glutamina e a alanil-glutamina	26
1.3.4 A glutamina e o exercício físico	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.2 Suplementação com alanil-glutamina	32
4.3 Treinamento aeróbio de natação	33
4.4 Medida do tempo de exaustão	34
4.5 Determinação da concentração de lactato e glicose antes, durante e depois do teste de exaustão	34
4.6 Análise dos parâmetros do equilíbrio ácido-base no sangue venoso	35
4.7 Protocolo do teste da permeabilidade intestinal	35
4.8 Avaliação da transcrição gênica	36
4.8.1 Extração do RNA total	36
4.8.2 Síntese de cDNA	37
4.8.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	37
4.9 Estudo histopatológico	38
4.10 Estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Medida do tempo de exaustão	40
5.2 Medida da concentração de lactato e glicose	40
5.3 Análise dos parâmetros do equilíbrio ácido-base no sangue venoso	42
5.4 Permeabilidade intestinal pelo método não invasivo do lactulose e manitol	47
5.5 Resultados da análise do teste de lactulose/manitol no grupo recuperado	49
5.6 Transcrição gênica	52
5.7 Análise histopatológica	55
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Exercício Físico

A relação entre o exercício físico e a saúde vem-se consolidando nos últimos anos. Em estudos clínicos, de ampla abordagem epidemiológica, foi demonstrado que a prática regular de exercício físico está associada à promoção da saúde e à prevenção de doenças crônico-degenerativas (LEANDRO *et al.*, 2007). Por outro lado, a atenção dada pelos serviços de saúde ao controle do sedentarismo através da prática regular de exercícios e a mudança dos padrões estéticos têm levado indivíduos a buscarem com o exercício físico, a redução da massa corporal, o aumento da massa muscular, além do tradicional condicionamento aeróbio (ROHLFS *et al.*, 2005).

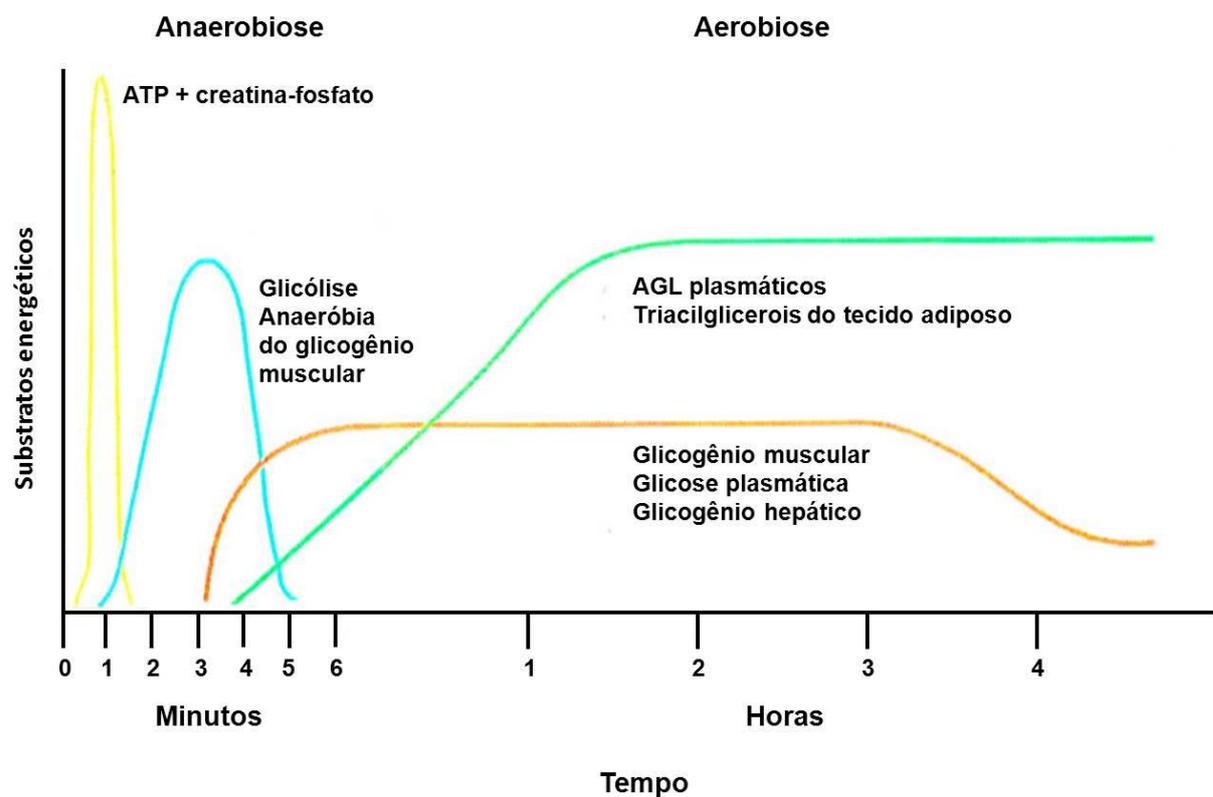
Exercício pode ser definido como qualquer atividade planejada e estruturada que leve a um aumento do gasto energético e da frequência cardíaca (GOMES *et al.* 2012). Brum e colaboradores (2004) definem exercício físico como atividade que retira o organismo de sua homeostase, pois implica no aumento instantâneo da demanda energética da musculatura exercitada e, conseqüentemente, do organismo como um todo. O exercício físico envolve grande consumo de trifosfato de adenosina (ATP), cuja magnitude depende da intensidade do trabalho a ser realizado (ROBERGS *et al.*, 2004; HOPPELER; BILLETER, 1991).

Já está bem estabelecido na literatura que os músculos esqueléticos possuem três sistemas de energia bastante eficientes e que possibilitam a síntese de moléculas de ATP que serão gastas durante contração muscular (BURKE *et al.*, 2006). Entre estes sistemas estão o anaeróbio alático (fosfogênicos), anaeróbio láctico (glicólise) e aeróbio (ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons) (Figura 1). Além disso, quanto maior a intensidade do exercício, maior a oxidação de glicose como substrato energético (MCARDLE *et al.*, 2011).

O desenvolvimento dos processos aeróbios ocorre gradualmente, podendo atingir o valor máximo nunca antes da faixa de 2 a 5 minutos após o início do trabalho. A capacidade de resistir à fadiga durante um tempo prolongado, no trabalho aeróbio, é determinada pela quantidade máxima de consumo do oxigênio ($VO_{2\text{ MÁX}}$) que, durante o trabalho muscular, pode ser absorvido do ar inspirado, transportado para os músculos em atividade e utilizados nos processos de oxidação. A correlação entre os substratos energéticos oxidados depende da intensidade do trabalho em percentagem do $VO_{2\text{ MÁX}}$. Na realização do trabalho menor que 50

a 60% do $VO_{2\text{MÁX}}$ e de duração até algumas horas, a parte substancial de energia é formada graças à oxidação de gorduras, no processo conhecido como β -oxidação (SILVEIRA *et al.*, 2011; MCARDLE *et al.*, 2011). Durante o trabalho com a intensidade superior a 70% do $VO_{2\text{MÁX}}$, os carboidratos constituem a fonte predominante de energia.

Figura 1. Sistemas de energia e sua contribuição percentual para o rendimento (produção) total de energia durante o exercício.



Fonte: CURI e PROCÓPIO, 2011.

O treinamento aeróbio produz adaptações bioquímicas que melhoram significativamente as capacidades funcionais relacionadas com a liberação, captação e utilização do oxigênio. Dentre as quais estão: o aumento da densidade mitocondrial, aumento da quantidade de capilares sanguíneos por fibra muscular, aumento do conteúdo de mioglobina, aumento da capacidade de oxidação dos lipídeos e dos carboidratos (HAWLEY; SPARGO, 2007; COFFEY; HAWLAY, 2007; MAUGHAN *et al.*, 2000).

O exercício anaeróbio é caracterizado por curtos períodos de esforço máximo, onde sua fonte de energia é fornecida a partir dos carboidratos, porém sem a utilização do oxigênio e com grande acúmulo de ácido láctico na circulação sanguínea (GOMES *et al.* 2012). Os

processos anaeróbios são as principais fontes de energia durante a realização do trabalho de grande intensidade e curta duração (MCARDLE *et al.*, 2011; MAUGHAN *et al.*, 2000). A glicólise anaeróbia atinge a potência máxima depois de aproximadamente 30 a 45 segundos após o início do trabalho. A potência do mecanismo anaeróbio glicolítico é menor do que a do fosfogênio. No entanto, graças à sua capacidade energética mais substancial, esse mecanismo constitui a principal fonte para manter o trabalho com duração máxima de 30 segundos até 2 a 5 minutos (MCARDLE *et al.*, 2011; MAUGHAN *et al.*, 2000).

Outro mecanismo importante é o sistema fosfogênico ou sistema anaeróbio alático, que está ligado à utilização dos fosfogênios, presentes nos músculos em atividade, principalmente do fosfocreatina. Este mecanismo possui maior potência e permite assegurar a energia aos músculos em atividade já nos primeiros segundos do trabalho. A capacidade do sistema fosfogênico é limitada pelas reservas de ATP e fosfo-creatina nos músculos e, devido a esse fato, é capaz de sustentar o trabalho com a potência máxima apenas durante 6 a 10 segundos. Porém, aos 30 segundos as reservas de fosfo-creatina praticamente se esgotam e não contribuem para a ressíntese de ATP (TORRES-LEAL; MARREIRO, 2008). Além disso, segundo Gomes e colaboradores (2012) outra diferença importante se refere ao exercício agudo e crônico. O exercício agudo caracteriza-se por apresentar temporariamente respostas metabólicas e cardiovasculares, com duração de alguns minutos ou várias horas. Já o exercício crônico caracteriza-se por uma adaptação metabólica e fisiológica em resposta a um treinamento.

1.1.1 O exercício físico prolongado e exaustivo e o trato gastrintestinal

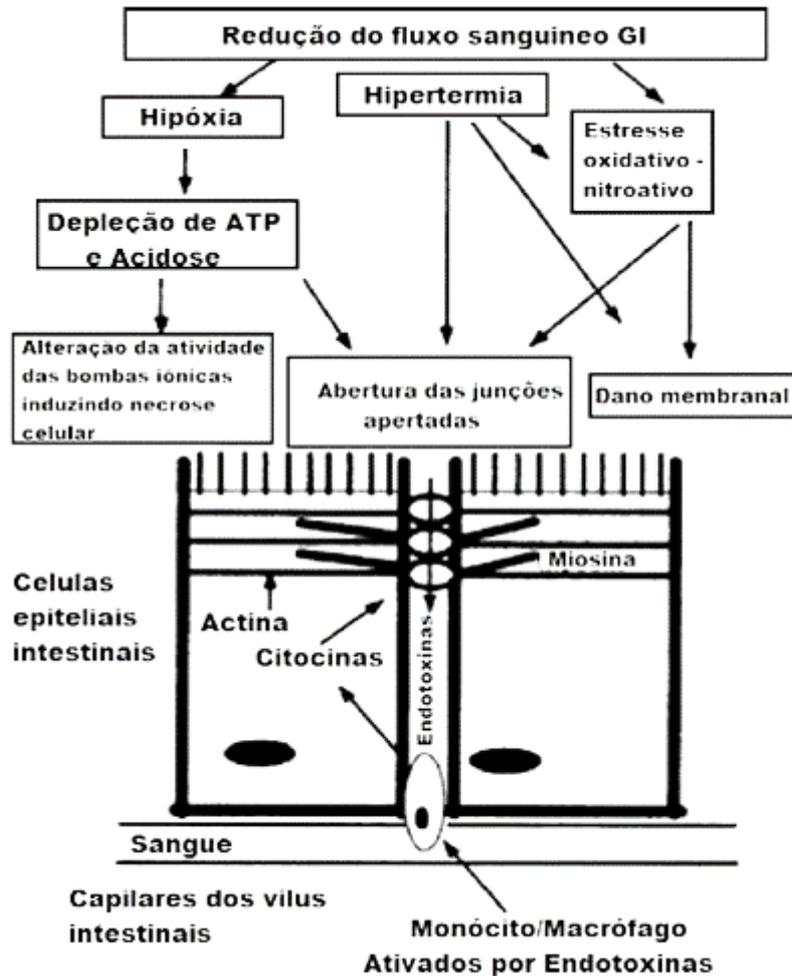
O exercício prolongado, em geral, é usado para definir intensidades de exercício que podem ser sustentadas por períodos de 30 a 180 minutos e que, na prática, são exercícios com intensidades entre 60% e 85% do $VO_{2\text{MÁX}}$ (MAUGHAN *et al.*, 2000; ROMANO; BORGES, 2007). Este tipo de exercício pode produzir um conjunto de manifestações fisiológicas que acarreta, como consequência, na diminuição da capacidade funcional de manter ou continuar o rendimento esperado. A este conjunto de manifestações os fisiologistas do exercício chamam de fadiga (ROHLFS *et al.*, 2005). O termo fadiga é definido como a incapacidade para manter o rendimento de potência, tanto em exercícios de resistência, como em estados de treinamento prolongado e excessivo (ROHLFS *et al.*, 2005). Durante o exercício exaustivo a concentração de H^+ é aumentada em virtude da produção de dióxido de carbono e da formação de lactato (MCARDLE *et al.*, 2011; JUEL *et al.*, 2003). Este lactato acumulado pode ser

removido pela oxidação muscular, principalmente originadas das fibras tipo II, e usado no fígado e rins para síntese da glicose, num processo denominado gliconeogênese, ou transportado para a corrente sanguínea e removido por outras células (JUEL *et al.*, 2003).

O exercício exaustivo pode também induzir lesões nas fibras musculares. Dentre os fatores propostos como responsáveis pelas lesões estão o estresse mecânico, distúrbio na homeostase do cálcio intracelular, alteração do pH e da temperatura corporal e resposta inflamatória (DA SILVA *et al.*, 2011). Além de afetar o sistema muscular, o exercício exaustivo pode provocar sintomas gastrintestinais (LIRA *et al.*, 2008). Estes sintomas incluem vômitos, náuseas, azia, cólica abdominal, sangramento nas fezes, constipação e diarreia. A etiologia dos sintomas é multifatorial e inclui a redução do fluxo sanguíneo intestinal, a liberação de hormônios gastrintestinais, o estresse mecânico sobre o trato gastrintestinal (TGI), a desidratação, os fatores psicológicos, a idade, o sexo, a dieta e o nível de treinamento do indivíduo (VAN NIEUWENHOVEN *et al.*, 2004; SIMRÉN, 2002; TER STEEGE; KOLKMAN, 2012).

Uma das possíveis hipóteses para as causas destes sintomas gastrintestinais é a redução do fluxo sanguíneo intestinal que ocorre devido à ação das catecolaminas sobre os receptores α -adrenérgicos, causando vasoconstrição dos leitos vasculares, e uma ativação do sistema renina-angiotensina, induzida pela hipovolemia, provocada pela desidratação decorrente do exercício (LIRA *et al.*, 2008). Outros efeitos também são causados pela diminuição do fluxo sanguíneo durante o exercício prolongado e exaustivo e o estresse térmico. Entre esses efeitos estão: alterações na homeostase hidroeletrolítica, hipóxia, acidose, depleção de ATP e estresse oxidativo (LAMBERT, 2004). Estes efeitos podem romper *tight junctions* (junções firmes) e causar danos ao enterócito, produzindo disfunção da barreira intestinal, aumentar a permeabilidade de moléculas indesejáveis e, provavelmente, incitar uma resposta inflamatória (FIGURA 02) (LAMBERT, 2009).

Figura 2 – Cascata dos efeitos fisiológicos causados pela redução do fluxo sanguíneo e o estresse térmico nas células epiteliais intestinais.



Fonte: (adaptado de LAMBERT, 2004).

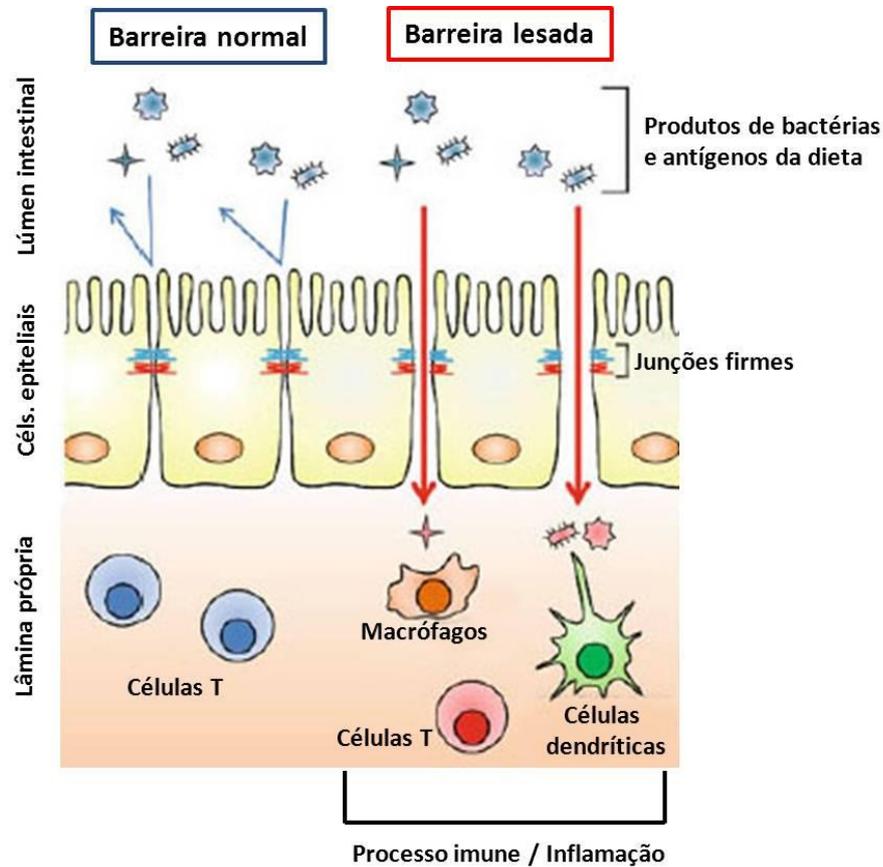
1.2 Permeabilidade intestinal

O epitélio intestinal apresenta diferentes propriedades, promovendo tanto a função de barreira quanto de transporte de substâncias existentes na luz intestinal (LIMA, 1998). O termo permeabilidade intestinal relaciona-se à função de barreira exercida pelo epitélio e se traduz pela propriedade que este epitélio apresenta em permitir a passagem de moléculas através do mecanismo de difusão não mediada, independente do gradiente de concentração ou de pressão e sem a assistência de um sistema carreador bioquímico passivo ou ativo (TRAVIS E MENZIES, 1992; TEXEIRA *et al.*, 2012). Somente substâncias com peso molecular maior

que 150 Daltons (Da) utilizam essa via de acesso à mucosa intestinal. Por consequência, tal conceito não se aplica às moléculas menores, como o sódio ou o cloreto, que utilizam sistemas carreadores para seu transporte. A este segundo processo denomina-se absorção (TRAVIS; MENZIES, 1992).

Sob determinados aspectos pode-se afirmar que a função de barreira exercida pelo epitélio intestinal é dinâmica, pois se altera temporariamente após um estresse hiperosmolar e também é afetada por drogas (LAMBERT *et al.*, 2007), doenças de Crohn e Celíaca (VILELA *et al.*, 2008), doenças diarreicas (LIMA; GUERRANT, 1992), citocinas (WANG *et al.*, 2006), obesidade (TEXEIRA *et al.*, 2012) e exercício físico exaustivo (ZUHL *et al.*, 2012). O resultado dessa alteração é uma maior permeação de toxinas para o lúmen intestinal, tal como o lipopolissacarídeo (LPS) – parte estrutural da parede celular de bactérias gram-negativas – aumentando os níveis de endotoxinas no sangue, que podem desencadear uma inflamação local ou obter acesso para circulação e induzir inflamação sistêmica através da liberação de citocinas (FIGURA 3) (TEXEIRA *et al.*, 2012).

Figura 3 – Função das junções firmes na barreira intestinal.



Fonte: (Adaptado de Suzuki, 2013).

As células intestinais possuem dois tipos de permeação: a via transcelular então envolvida na absorção e transportes de nutrientes, incluindo açúcares, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, minerais e vitaminas (SUZUKI, 2012). Como a membrana celular é impermeável, este processo é predominantemente mediado por transportadores específicos ou canais localizados na membrana apical e basolateral do enterócito (KIELA; GHISHA, 2009). A via paracelular está associada com o transporte no espaço intercelular entre as células epiteliais adjacentes sendo regulada por um complexo juncional apical, que é composto pelas junções firmes (TJs) e junções de aderência (AJs) (BAUM; GEORGIU, 2011).

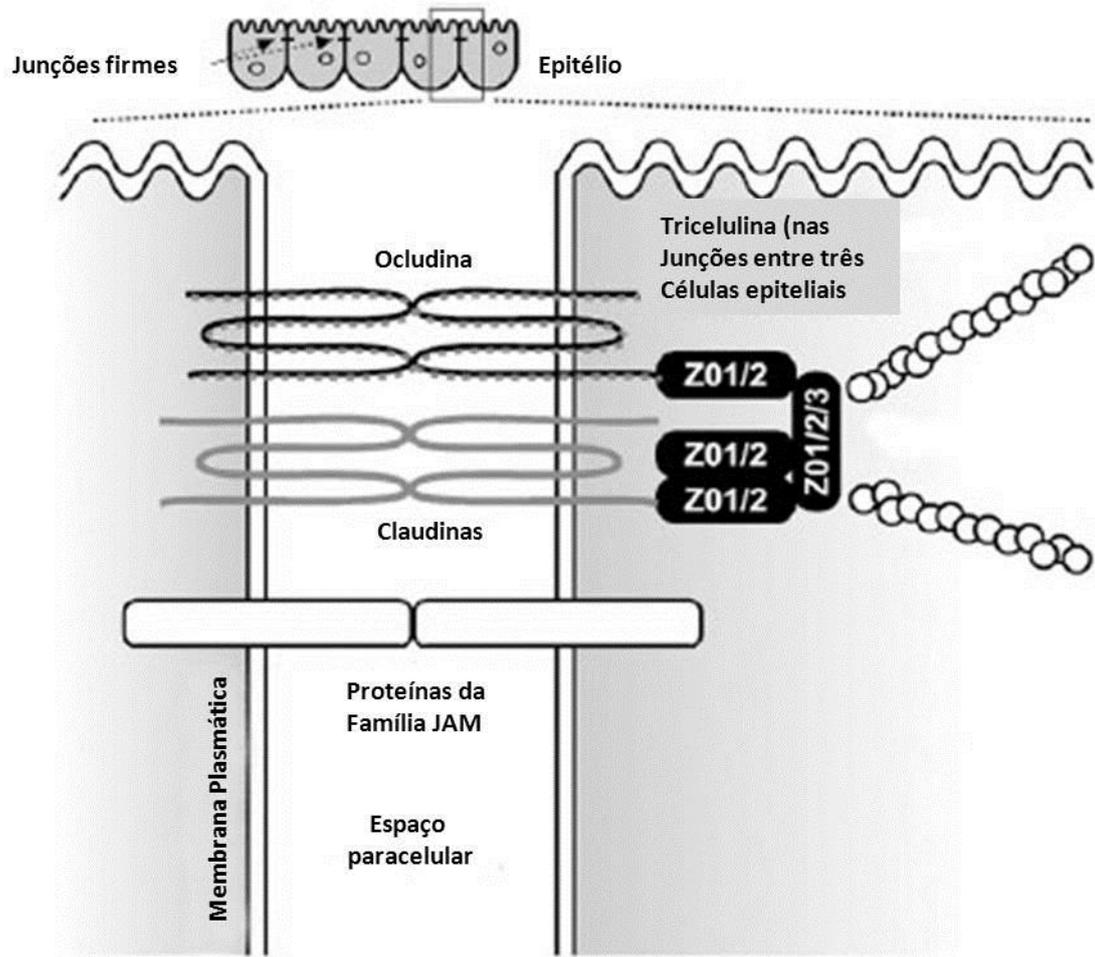
1.2.1 As junções firmes (*tight junctions* - TJs)

As TJs são compostas de diferentes complexos localizados na parte apical final das membranas laterais de células epiteliais intestinais. Elas regulam a passagem paracelular de íons, solutos e água, e também são conhecidas por atuar como uma barreira para manter a polaridade celular, bloqueando a livre difusão de proteínas e lipídeos entre o domínio apical e basolateral da membrana plasmática (SUZUKI, 2012). As TJs consistem em três proteínas integrais de membrana denominadas claudina, ocludina e moléculas de adesão juncional (JAMs) e um número de proteínas citoplasmáticas acessórias, incluindo as zônulas ocludens (ZO) ZO-1, ZO-2 e ZO-3, cingulina e outras proteínas guanilato quinase associadas à membrana (FIGURA 04) (SUZUKI, 2012; ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003). Estas proteínas acessórias conectam as proteínas de membrana ao citoesqueleto de actina para a manutenção da integridade estrutural e funcional do epitélio intestinal. A regulação da montagem, desmontagem e manutenção das TJs são influenciadas por vários estímulos fisiológicos e fisiopatológicos. Esta regulação envolve várias vias de sinalização, incluindo a proteína quinase C (PKC), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), miosina quinase de cadeia leve (MLCK) e família Rho de pequenas GTPases (ULLUWISHEWA *et al.*, 2011).

1.2.2 As ocludinas

As ocludinas foram as primeiras proteínas integrais a serem identificadas nas TJs das células epiteliais. Seu nome vem do latim “*occludere*” que significa passagem restrita (ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003). A ocludina é uma fosfoproteína de 65 kDa com quatro domínios transmembranais, ligados a dois *loops* extracelulares ricos em tirosina no domínio intracelular C-terminal e N-terminal (SUZUKI, 2012). Sua função deve ser vista mais em um contexto regulador do que como uma proteína estrutural importante no estabelecimento das propriedades da barreira. Seu domínio citoplasmático C-terminal fornece a conexão da ocludina com o citoesqueleto, assegurando uma alta resistência elétrica das monocamadas das células epiteliais e diminuição da permeabilidade paracelular (PERSIDSKY *et al.*, 2006).

Figura 04. Localização funcional das junções firmes no espaço paracelular.



Fonte: (adaptado de ULLUWISHEWA *et al.*, 2011).

1.2.3 As claudinas

O nome claudina vem do latim “*claudere*” que significa fechar. São proteínas integrais, de 20-27 kDa com quatro domínios transmembranais, dois *loops* extracelulares e domínios citoplasmáticos C-terminal e N-terminal com um *loop* intracelular curto (ANGELOW *et al.*, 2008; OVERGAARD *et al.*, 2011). Os *loops* extracelulares se interligam com claudinas adjacentes das células epiteliais intestinais, formando a vedação primária das TJs (LAL-NAG; MORIN, 2009). O principal papel das claudinas é a regulação da seletividade paracelular aos íons pequenos (FINDLEY; KOVAL, 2009).

As claudinas são uma família multigênica com pelo menos 24 membros em humanos e camundongos, e cada isoforma mostra uma única expressão padrão em tecidos e linhagens de

células. Em intestinos de ratos, claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 17 e 18 são detectadas ao nível da expressão dos genes, mas a expressão relativa de cada isoforma varia ao longo dos segmentos do intestino (SUZUKI, 2012). Em contraste com suas semelhanças estruturais, as claudinas executam diferentes funções e podem ser divididas em dois tipos: aqueles envolvidos na formação da barreira (diminuindo a permeabilidade paracelular) e os que desempenham um papel nos canais porosos (aumentando a permeabilidade paracelular) (SUZUKI, 2012). Para nosso conhecimento, nos intestinos, as claudinas 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 e 14 podem ser categorizadas como claudinas que formam a barreira, enquanto, as claudinas 2, 7, 12 e 15 são de formação de poros (SUZUKI, 2012).

1.2.4 As moléculas de adesão juncional (JAMs)

JAMs são proteínas que pertencem ao terceiro grupo de proteínas membranares que estão envolvidas na construção das TJs. São membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig) e apresentam peso molecular de aproximadamente 43 kDa (ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003). Três membros desta família (JAM-1, JAM-2 E JAM-3) já foram identificados e estruturalmente são constituídas por apenas um domínio transmembranar, um domínio extracelular N-terminal e pelo pequeno terminal carboxílico citoplasmático (SUZUKI, 2012). A região extracelular das JAMs consiste em dois domínios Ig-G. Estudos mostram que as JAMs podem contribuir para difusão livre de proteínas da dupla camada de lipídeo, sendo mais importante ainda com a restrição de passagem celular (leucócitos, monócitos, linfócitos, etc.) por meios das TJs entre as células endoteliais (ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2011).

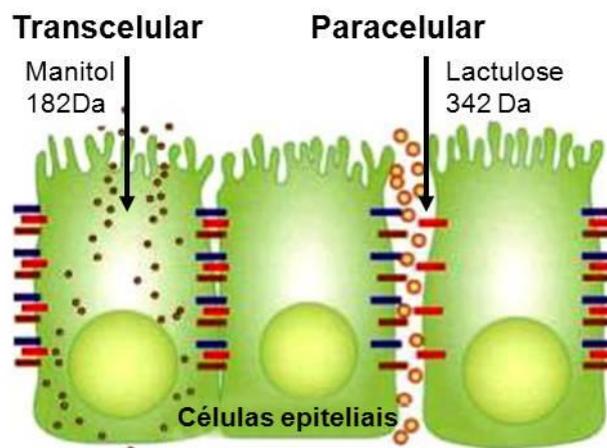
1.2.5 As zônulas de oclusão

As zônulas de oclusão foram as primeiras proteínas específicas identificadas das TJs e estas foram identificadas como, ZO-1 (~220 kDa), ZO-2 (~160 kDa) e ZO-3 (~130 kDa) (SUZUKI,2012; ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-MARISCAL *et al.*, 2003). São proteínas compostas por três domínios PDZ (PDZ-1, PDZ-2 e PDZ-3), um domínio SH3, e um domínio membranal associado à guanilato kinase (SUZUKI, 2012). Estes domínios são importantes por causa do seu papel no arranjo das proteínas, e conseqüentemente na integridade da membrana (ASSIMAKOPOULOS *et al.*, 2011) .

1.2.6 Avaliação da permeabilidade intestinal pela lactulose e manitol

Existem duas vias de permeação no epitélio intestinal saudável (LIMA, 1998). Na primeira, denominada de transcelular, as moléculas menores do que 0,4 nanômetros (nm), como é o caso do manitol e peso molecular de 182 Da, atravessam as membranas celulares através de pequenos poros aquosos (0,4 a 0,7nm), de alta incidência, presentes na membrana dos enterócitos (VOJDANI, 2013; TRAVIS; MENZIES, 1992). Na segunda, denominada paracelular, a passagem das moléculas ocorre entre as células. Isso acontece com as moléculas maiores do que 0,5nm, como a lactulose com peso molecular de 342 Da, que permeiam a mucosa intestinal através de canais maiores (6,5nm de raio), de baixa incidência, susceptíveis ao estresse hiperosmolar, presentes nas junções firmes (Figura 5) (VOJDANI, 2013; TRAVIS; MENZIES, 1992).

Figura 5. Epitélio intestinal mostrando a via paracelular e transcelular.



Fonte: Adaptado de VOJDANI, 2013.

1.3 A glutamina

1.3.1 História, estrutura química, síntese e metabolismo

Em 1873, Hlasiwetz e Harbemann foram os primeiros a considerar a glutamina como uma molécula com propriedades biologicamente importantes. Posteriormente, novas observações levaram os pesquisadores a pensar que a amônia encontrada em hidrolisados proteicos poderia ser o resultado da liberação de glutamina, bem como de asparagina (CRUZAT *et al.*, 2009). Em 1883, estudos realizados por Schulze e Bosshard mostraram uma grande concentração de glutamina livre em alguns tipos de plantas (HISCOCK; PEDERSEN,

2002). Em 1935, Krebs demonstrou pela primeira vez que células eram capazes de sintetizar ou metabolizar glutamina (KREBS, 1935). Nos anos 50, estudos realizados por Eagle e colaboradores mostraram que a glutamina era importante para o crescimento e manutenção celular e que a quantidade de glutamina encontrada em uma célula mantida em meio de cultura era muito maior de que qualquer outro aminoácido (HISCOCK; PEDERSEN, 2002). Com o desenvolvimento de novas técnicas científicas possibilitou a observação de diversos efeitos e mecanismos moleculares em que a glutamina estava envolvida. Atualmente, a literatura científica apresenta inúmeros trabalhos que demonstram os efeitos agudos e crônicos da suplementação com glutamina em situações catabólicas, tais como o câncer, HIV, dengues, sepses, cirurgias, exercícios físicos intensos, entre outros (CRUZAT *et al.*, 2009).

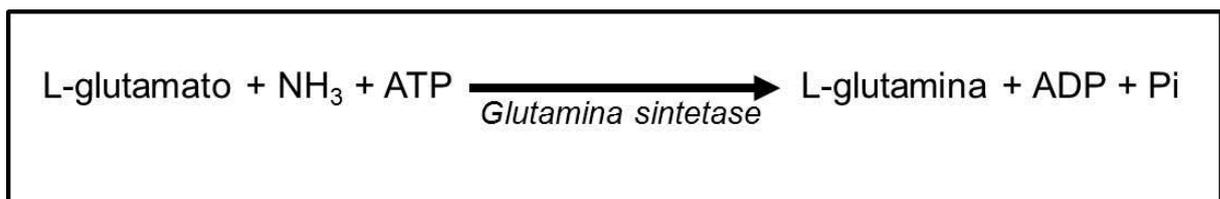
A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, com peso molecular de aproximadamente 146,15 kDa e pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo (CRUZAT *et al.*, 2009; LIMA, 1998). É classificada de acordo com o seu grupamento R como não carregada, mas é polar, o que lhe confere uma característica hidrofílica, além de apresentar hidrólização por ácidos ou bases (CRUZAT *et al.*, 2009).

A glutamina é classificada como um aminoácido não essencial pelo fato do organismo poder sintetizar de *novo*. Entretanto, essa classificação tem sido questionada, já que em certas situações críticas e catabólicas, tais como cirurgias, traumas e exercícios físicos exaustivos, a síntese de glutamina não supre a demanda exigida pelo organismo (BERTRAND *et al.*, 2012; WRAY *et al.*, 2002). A glutamina é o aminoácido mais abundante no plasma e no tecido muscular. Dos 80% dos aminoácidos livres contidos no meio intracelular, cerca de 60% desse *pool* corresponde à glutamina e no plasma humano a glutamina representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres, com concentrações que variam entre 0,5 a 0,9 mM (LANCHA JR. *et al.*, 2009; LIMA, 1998).

A glutamina é sintetizada pela glutamina sintetase (GS) citosólica a partir do glutamato em muitos tecidos. Mas é degradada pela glutaminase (GA) mitocondrial onde é utilizada em quantidades elevadas por outros tecidos que não a sintetizam (Figura 6 e 7) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Estas duas enzimas ATP-dependentes regulam o metabolismo da glutamina: a glutaminase, que converte a glutamina em glutamato e amônia, e a glutamina sintetase, que catalisa a reação em sentido contrário. O glutamato tem três possíveis rotas para converter-se em α -cetoglutarato; diretamente pela glutamato desidrogenase reagindo com piruvato; catalisado pela glutamina-piruvado aminotrasferase gerando assim alanina, ou com

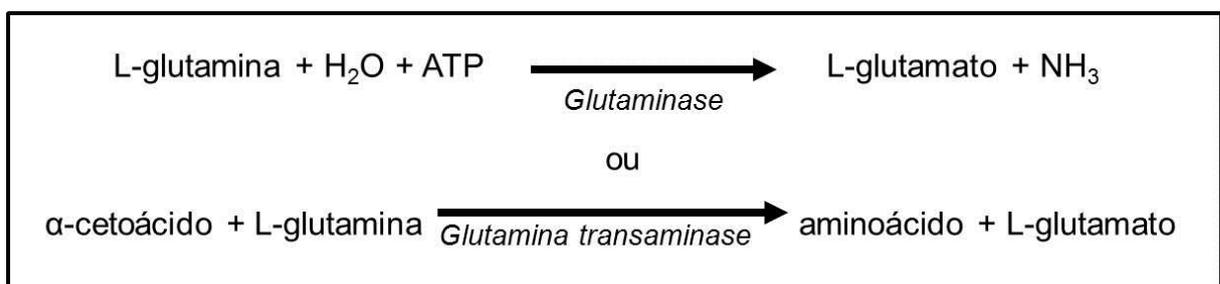
oxaloacetato; e catalisado pela enzima glutamato-aspartato transferase produzindo assim o aspartato (LABOW *et al.*, 2000). Dentre os órgãos envolvidos na síntese da glutamina, incluem-se o músculo esquelético, pulmões, fígado, cérebro e, possivelmente, o tecido adiposo, os quais contêm atividade da enzima glutamina sintetase, que catalisa a conversão de glutamina a partir de amônia e glutamato, na presença de ATP (Figura 8) (FONTANA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Por outro lado, tecidos que são consumidores primariamente de glutamina, como as células da mucosa intestinal, leucócitos e células do túbulo renal contêm elevada atividade da enzima glutaminase, responsável pela hidrólise da glutamina e sua conversão em glutamato e amônia. Sob certas condições, tal como reduzido aporte de carboidratos, o fígado pode torna-se um sítio consumidor de glutamina (WALSH *et al.*, 1998).

Figura 6. Síntese da glutamina catalisada pela enzima glutamina sintetase.



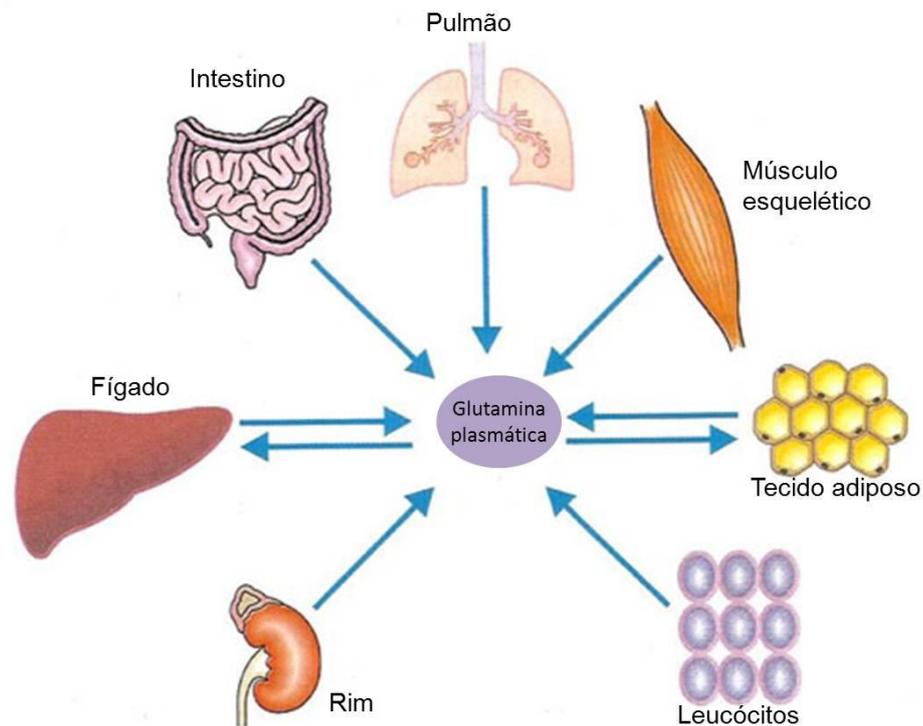
Fonte: Adaptado de LANCHÁ JR. *et al.*, 2009.

Figura 7. Degradação da glutamina catalisada pela enzima glutaminase.



Fonte: Adaptado de LANCHÁ JR. *et al.*, 2009.

Figura 8. Produção e utilização de glutamina pelos tecidos.



Fonte: Adaptado de CURI e PROCÓPIO, 2011.

1.3.2 Transporte de glutamina e peptídeos no intestino

O intestino delgado ocupa um papel central na absorção de nutrientes e, no lúmen, os aminoácidos são absorvidos pela borda em escova das células epiteliais do intestino por uma variedade de sistemas de transporte (SOUBA; COPERLAND, 1991). Além disso, o intestino delgado é o principal órgão de consumo de glutamina, devido em grande parte da ação da glutaminase encontrada em altas concentrações no jejuno e íleo (DUDRICK *et al.*, 1992; FAN *et al.*, 1998). O transporte de glutamina do espaço extracelular para o espaço intracelular é mediado por um transportador, o qual se liga ao substrato através do sítio ativo presente na proteína transportadora (LIMA, 1998). Não existe um transportador específico para a glutamina, mas há sistemas de transportadores que se ligam com a glutamina e aminoácidos estruturalmente relacionados (LIMA, 1998). Os aminoácidos livres são transportados nas membranas, apical e basolateral por mecanismos de transporte facilitado, não dependente de sódio, ou por mecanismos de transporte secundário ativo (dependente de sódio) (BRÖER, 2008). Os sistemas de transporte são classificados por letras e sinais que mostram a preferência destes sistemas para determinados aminoácidos. Desta forma, as letras maiúsculas

representariam sistemas Na^+ -dependente, enquanto as letras minúsculas referem-se a sistemas Na^+ -independentes (MAILLIARD *et al.*, 1995). O trabalho de Chrstesen estabeleceu três sistemas de transportes para aminoácidos neutros. Ele designou como o sistema L (preferência pela leucina e os aminoácidos mais hidrofóbicos), o sistema A (preferência pela alanina e outros aminoácidos hidrofílicos pequenos) e o sistema ASC (preferência pela alanina, serina e cisteína). Uma nomenclatura separada, que ele definiu de X para aniônica, Y para catiônica e Z para neutra), foi aplicado à sistemas de transporte mediados a aminoácidos catiônicos (sistema y^+) e aminoácidos aniônicos (sistema X_{AG}) (BRÖER, 2008).

Em relação à capacidade absorptiva de dipeptídeos, eles são mais absorvidos no intestino delgado proximal do que no intestino delgado distal. As peptidases citosólicas que também atuam sobre os dipeptídeos apresentam mais atividade na porção proximal do intestino delgado, local onde a capacidade absorptiva é bastante elevada. Porém, a capacidade absorptiva de aminoácidos é maior na porção distal do intestino delgado em relação ao intestino delgado proximal (ADIBI, 2003)

1.3.3 A glutamina e a alanil-glutamina

Como já citado anteriormente, são vários os efeitos benéficos da glutamina para o eficiente equilíbrio da manutenção da permeabilidade intestinal (aumento da imunoglobulina intestinal e redução da translocação bacteriana) e de algumas vias de regulação celular (quinases, estado redox, proliferação celular, apoptose e expressão das proteínas de choque térmico [HSP]). Mas algumas propriedades físicas da glutamina, tais como a sua instabilidade em soluções particularmente ácidas ou durante esterilização por calor, seu armazenamento prolongado que pode potencialmente hidrolisar-se a um neurotransmissor tóxico como o glutamato (glutamato monossódico) e, sua solubilidade limitada (35 g/L a 20°C), comprometem seu uso rotineiro em situações clínicas (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2003).

Essas limitações ao uso clínico da glutamina favoreceram o desenvolvimento de dipeptídeos com resíduos de glutamina, nas posições N-terminal ou C-terminal (L-alanil-glutamina, glicil-L-glutamina), por serem altamente solúveis em água, estáveis durante o processo de esterilização e armazenamento por mais de dois anos permitindo o seu uso em soluções de nutrição parental ou enteral (FÜRST, 2001). O dipeptídeo alanil-glutamina é mais estável, mais solúvel, mais bem tolerado e tem pelo menos o mesmo efeito que a glutamina na

reparação da mucosa intestinal *in vitro* (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2003), em animais (LIMA *et al.*, 2002) e humanos (BÜSHEN *et al.*, 2004).

1.3.4 A glutamina e o exercício físico

Durante o exercício, a oxidação dos aminoácidos não é a principal fonte de ATP. Entretanto, sua utilização pelos músculos é muito relevante para manter o fluxo de substratos no ciclo do ácido cítrico, em atividades de longa duração (ROSSI *et al.*, 2000). Exercícios prolongados demandam elevação do metabolismo dos aminoácidos, os quais contribuem significativamente para síntese de amônia, que pode ser liberada no plasma, na forma livre, ou ser utilizada na síntese dos aminoácidos alanina e glutamina, que são seus carreadores para os rins e para o fígado (CURI, 2000). No entanto, a realização de exercícios físicos pode promover alterações na concentração plasmática e tecidual de alguns aminoácidos, entre os quais estão a alanina, glutamina e glutamato (AGOSTINI; BIOLO, 2010). Tais alterações são, na sua maioria, dependentes da duração e intensidade da realização do exercício (HISCOCK; PEDERSEN, 2002). Em relação à glutamina, durante o exercício prolongado e exaustivo a concentração plasmática deste aminoácido encontra-se diminuída quando comparado ao exercício realizado em menor duração (AGOSTINI; BIOLO, 2010).

Em estudo realizado por Bergstrom *et al.* (1974) utilizando um exercício de intensidade a 70% do $VO_{2MÁX}$, foi observado um aumento do conteúdo muscular de glutamina nos primeiros dez minutos (de 18,9 para 33,6 mmol/L), seguido de diminuição com o decorrer do exercício. Em outro estudo, Rennie *et al.* (2006) observaram uma redução de 34% da concentração de glutamina muscular em humanos logo após uma sessão de exercício com duração de 225 minutos a 50% do $VO_{2MÁX}$ (de 21,6 para 14,3 mmol/L). Estes dois estudos sugerem que ocorre aumento na síntese de glutamina e, no decorrer do exercício, a concentração intracelular tende a diminuir. O aumento da síntese e da liberação de glutamina pelos músculos ocorre como um recurso para prevenir o acúmulo de amônia e intoxicação dos miócitos, durante o exercício (CURI, 2000).

A musculatura esquelética é, quantitativamente, o principal produtor de glutamina. Apesar de ter uma baixa atividade da enzima glutamina sintetase comparado a tecidos como cérebro, fígado e rins, a musculatura esquelética é responsável pela maior produção deste aminoácido, por representar 40% da massa corporal, contribuindo com aproximadamente 30% de toda a glutamina circulante, ou seja, 50 mmol/h, uma quantidade maior em relação a

qualquer outro aminoácido (WALSH *et al.*, 1998; LANCHA JR. *et al.*, 2009). No caso de traumas, queimaduras, estresse, atividade física intensa (estados catabólicos) e na acidose, o tecido muscular é capaz de aumentar a taxa de síntese e liberação de glutamina para corrente sanguínea, em resposta ao aumento da demanda por outros órgãos e tecidos (ROMANO; BORGES, 2007).

Em repouso, os diferentes tipos de fibras musculares apresentam diferentes concentrações de glutamina dependendo do estado nutricional e do grau de condicionamento físico. Os músculos apresentam quantidades mais elevadas de glutamina nas fibras do tipo I (oxidativas), do que nas fibras do tipo II (glicolíticas) (FONTANA *et al.*, 2003). A atividade mais elevada de GS e a maior disponibilidade de ATP para síntese de glutamina nessas fibras talvez expliquem a maior concentração desse aminoácido nas fibras oxidativas.

2 JUSTIFICATIVA

Tradicionalmente, as pesquisas envolvendo a fisiologia do exercício se concentram nas respostas e adaptações dos sistemas respiratório, cardiovascular e muscular, já que muitos dos benefícios relacionados à saúde e qualidade de vida com a prática regular de exercício são decorrentes de respostas e adaptações nestes três sistemas orgânicos. Por outro lado, o exercício também exerce influência sobre outros sistemas que não estão diretamente relacionados com sua execução, tais como, o sistema imunológico (SANTOS *et al.*, 2009) e o trato gastrintestinal (TGI) (CASEY *et al.*, 2005). Durante a realização da prática de exercícios físicos, ocorrem nos órgãos e sistemas uma redistribuição do volume sanguíneo em direção as áreas de maiores necessidades metabólicas, deixando outras com suprimento sanguíneo insuficiente. Isto afeta, dentre outros sistemas, o trato gastrintestinal, que frente às atividades mais intensas é submetido a uma situação isquêmica, fazendo com que cerca de 20-50% dos atletas reportem sintomas gastrintestinais como náuseas, vômitos, sangramento nas fezes, azia, câibras, diarreia (BROUNS; BECKERS, 1993). Neste contexto, o impacto do exercício sobre o TGI, apesar de pouco explorado, é uma área de grande interesse. Recentemente, entretanto, tal interesse tem sido focado sobre os potenciais benefícios do exercício físico sobre o TGI, tais como a diminuição da prevalência de câncer de cólon e constipação (PETERS *et al.*, 2001). Outro aspecto interessante e, pouco explorado, é o efeito do exercício sobre a reatividade intestinal.

A maioria dos trabalhos envolvidos com a suplementação com glutamina em atletas está relacionada com o efeito da mesma no sistema imunológico (HOLFFMAN *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2009; GLEESON, 2008; ROGERO *et al.*, 2002; GARCIA JUNIOR *et al.*, 2000). Durante o exercício prolongado e intenso, o sistema imune é influenciado pela diminuição da concentração plasmática de glutamina. Isso porque as células desse sistema (linfócitos, leucócitos e neutrófilos) utilizam esse aminoácido como substrato energético e como precursor para síntese de proteínas e de bases nitrogenadas (GLEESON, 2005). A glutamina é necessária para proliferação de células intestinais, absorção de fluidos e eletrólitos, bem como é essencial na regulação do balanço nitrogenado em estados normais e patológicos (FONTANA *et al.*, 2003). O TGI é o principal órgão de utilização de glutamina e, em especial, o intestino delgado (células de rápida renovação no organismo – os enterócitos).

Diante dos fatos aqui expostos, o presente estudo buscou avaliar o efeito da suplementação da alanil-glutamina sobre alguns aspectos relacionados à fisiologia do esforço

na permeabilidade intestinal em ratos treinados e submetidos a um exercício de natação de predominância aeróbio prolongado e exaustivo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos fisiológicos e moleculares do exercício prolongado e exaustivo de predominância aeróbia na presença e ausência da suplementação da alanil-glutamina sob a permeabilidade intestinal em ratos treinados e submetidos a exercício intenso de natação.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar alterações do equilíbrio ácido-base sanguíneos em ratos treinados submetidos ou não ao exercício exaustivo de natação na presença ou ausência de suplementação com alanil-glutamina.
- Avaliar a permeabilidade intestinal de ratos treinados submetidos ou não ao exercício exaustivo de natação na presença ou ausência de suplementação com alanil-glutamina, através do método não invasivo do lactulose - manitol.
- Identificar possíveis alterações histopatológicas no intestino delgado em ratos treinados submetidos ou não ao exercício exaustivo de natação na presença ou ausência de suplementação com alanil-glutamina.
- Avaliar as alterações na transcrição gênica de junções firmes e do transportador de dipeptídeo (PEPT-1) intestinal em ratos treinados submetidos ou não ao exercício exaustivo de natação na presença ou ausência de suplementação com alanil-glutamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente estudo foi realizado com ratos Wistar, adultos, machos, pesando em média 200 ± 20 gramas, cedidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), sob Protocolo N° 13/2013 da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos no Laboratório Escola Prof. Luiz Capelo da Universidade Federal do Ceará e alojados em gaiolas coletivas (quatro animais por gaiola) durante treze semanas, sob temperatura de 25 ± 2 °C e obedecendo a um ciclo de doze horas claro/escuro, recebendo ração e água *ad libitum*.

Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos de oito ratos (N= 8) conforme a descrição abaixo:

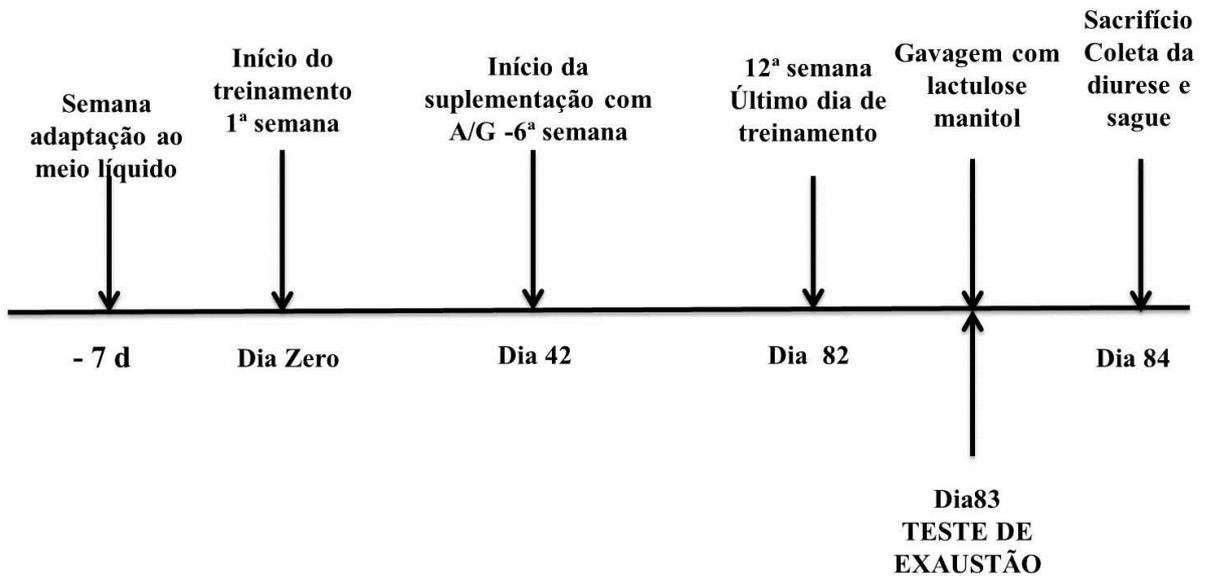
1. Grupo controle sedentário sem suplementação (S);
2. Grupo controle sedentário suplementado com L-alanil-L-glutamina (S-A/G);
3. Grupo treinado (cinquenta minutos) sem suplementação (T);
4. Grupo treinado (cinquenta minutos) suplementado com L-alanil-L-glutamina (T-A/G);
5. Grupo treinado com teste exaustão sem suplementação (E);
6. Grupo treinado com teste exaustão suplementado com L-alanil-L-glutamina (E-A/G);
7. Grupo treinado recuperado após teste de exaustão (R).

4.2 Suplementação com alanil-glutamina

Os animais dos grupos suplementados receberam o dipeptídeo L-alanil-L-glutamina (1,5 g/Kg de peso corporal/dia em um volume de 0,5 mL para cada 100g de peso corporal do rato), fabricado pela Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio Ltda. No período de quarenta e dois dias seguidos, ou seja, nas últimas seis semanas do protocolo, os animais dos grupos dois, quatro e seis receberam as suplementações por meio de sonda gástrica (gavagem). Os animais dos grupos um, três e cinco receberam o mesmo volume de água esterilizada por gavagem (ROGERO *et al.*, 2002).

4.3 Treinamento aeróbio de natação

O treinamento dos animais foi realizado em um sistema de natação em tanques de polietileno medindo 60 cm de diâmetro, 60 cm de altura com uma capacidade de 100L a uma temperatura de $30 \pm 3^\circ\text{C}$. Todo este treinamento foi realizado no Laboratório Escola Prof. Luiz Capelo da Universidade Federal do Ceará sob coordenação do Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos que, conjuntamente com o Prof. Dr. Moisés Tolentino Bento da Silva, vêm realizando estudos envolvendo o TGI e o exercício físico através do modelo de natação em ratos. Este foi o principal motivo da escolha deste modelo em nosso presente estudo, além também de ser um modelo mais econômico e fácil de ser utilizado comparado com a esteira. O treinamento foi dividido em duas fases: a primeira fase, ou adaptativa, foi realizada em cinco dias (segunda à sexta-feira), com sessões de dez, vinte, trinta, quarenta e cinquenta minutos, respectivamente. Esta fase consistia em adaptar os animais para se habituar ao meio líquido. Todos os grupos participaram desta fase. A segunda fase constituiu de doze semanas de treinamento diários (segunda à sexta-feira) de natação e somente os grupos treinado (T), treinado suplementado com alanil-glutamina (T-A/G), exaustão (E), exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) e recuperado (R) participaram desta fase, sendo de cinquenta minutos cada sessão de treinamento (SANT'ANNA, *et al.*, 2011; TEZINI, *et al.*, 2009). Ao longo das doze semanas o grupo sedentário (S) e grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G) ficaram dentro dos tanques contendo água (~5 cm de água ou até submersão das patas) por 10 minutos. Ao final das doze semanas de treinamento e após 24 horas da última sessão os animais dos grupos cinco, seis e sete (vide item 4.1) realizaram um teste de exaustão. A exaustão foi caracterizada no momento em que o animal apresentou durante o teste movimento corporal descoordenado, contorcido e não conseguia manter as narinas fora da água durante dez segundos (ROGERO *et al.*, 2002) (FIGURAS 9 e 10).

Figura 9. Protocolo experimental

4.4 Medida do tempo de exaustão

Para determinar o tempo de exaustão foi utilizado cronômetro (SW2018, modelo cronobio) para os grupos exaustão e exaustão suplementado com alanil-glutamina. O cronômetro foi acionado no momento em que o animal foi colocado na água e parado no momento em que o animal não conseguiu manter as narinas fora da água durante dez segundos (ROGERO *et al.*, 2002).

4.5 Determinação da concentração de lactato e glicose antes, durante e depois do teste de exaustão.

Para determinação da concentração de lactato e da glicose sanguínea antes, durante e após o teste de exaustão foi coletado uma gota de sangue (~ 25 µL) e transferido imediatamente para as fitas de lactato e glicose para leitura no aparelho Accutrend Plus, modelo Roche. Somente os grupos exaustão e exaustão suplementado com alanil-glutamina foram avaliados. A técnica utilizada para esse procedimento consistiu na realização de um pequeno corte na extremidade da cauda do rato e uma gota de sangue foi retirada e transferida às fitas para imediata leitura no equipamento mencionado acima.

4.6 Análise dos parâmetros do equilíbrio ácido-base no sangue venoso

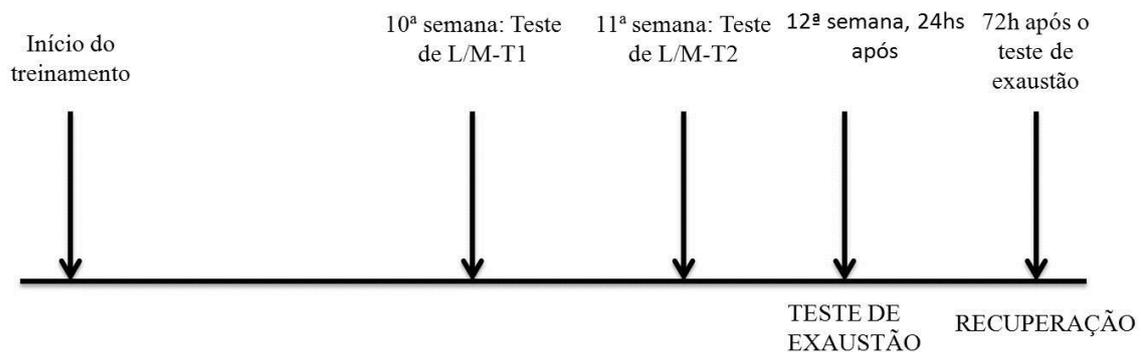
A bioquímica plasmática e avaliação dos gases sanguíneos são utilizadas para determinar o efeito do exercício sobre vários processos fisiológicos (SILVA *et al.*, 2009). O exercício exaustivo induz alterações metabólicas do tipo hemoconcentração e acidose, quantificadas por indicadores como hematócrito, osmolaridade, natremia, hemoglobina, albumina, pH, HCO_3^- , lactato, amônio, além de hormônios e neurotransmissores (PORTO *et al.*, 2006). No presente estudo avaliamos os seguintes parâmetros: o logaritmo negativo da atividade de íons hidrogênio (pH_v), a pressão parcial de dióxido de carbono (P_vCO_2), íon bicarbonato (HCO_3^-), o excesso de bases (BE), a pressão parcial de oxigênio (P_vO_2), a saturação de oxigênio ($\text{S}_{\text{atv}}\text{O}_2$). Todos estes parâmetros foram analisados em um equipamento de análise automática (cobas b 121/OMNIC, modelo Roche). Para análise destes parâmetros os animais de todos os grupos foram anestesiados com éter etílico para coleta de sangue pelo plexo orbital. Foram coletados 2 mL de sangue venoso em microtubos heparinizados para posterior análise no aparelho de análise automática. No grupo sedentário (S) e no grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G) a coleta de sangue foi realizada logo após as doze semanas do protocolo experimental. Nos grupos, treinado (T) e treinado suplementado com alanil-glutamina (T-A/G) a coleta foi realizada após a última sessão de treinamento depois das doze semanas. Nos grupos treinados e submetidos ao teste de exaustão (E e E-A/G), a coleta sanguínea foi realizada imediatamente após o teste de exaustão e também depois de doze semanas de treinamento

4.7 Protocolo do teste da permeabilidade intestinal

Todos os animais foram submetidos à análise da permeabilidade intestinal pelo método não invasivo do lactulose/manitol. Imediatamente após a última sessão de treinamento, ou seja, ao final das doze semanas, os animais dos grupos um, dois, três e quatro receberam, por gavagem, o volume de 2 mL de uma solução contendo lactulose (200 mg/ml) e manitol (50 mg/ml) (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). Os animais dos grupos cinco e seis, 24 horas após a última sessão de treinamento realizaram um teste de exaustão e receberam a mesma dose desta solução logo após o teste de exaustão. A seguir, todos os grupos animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas para a coleta da urina por vinte quatro horas. Em seguida, o volume da diurese foi devidamente registrado e 25 μL de clorexidina (40mg/ml) foram adicionados a cada amostra de urina coletada e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. As urinas coletadas foram descongeladas e centrifugadas para posterior análise da quantificação

dos açúcares previamente administrados através do HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) Cromatografia Líquida de Alta Pressão (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). Para avaliar permeabilidade intestinal durante o treinamento e após o tempo de 72 horas do teste de exaustão, realizamos quatro avaliações do método não invasivo do lactulose/manitol para o grupo denominado recuperado (Grupo7). Duas primeiras avaliações foram realizadas depois da última sessão de exercício da décima (T_1) e décima primeira semana de treinamento (T_2), a terceira avaliação realizada logo após o teste de exaustão (E), e a quarta avaliação realizada com 72 horas depois do teste de exaustão (R), pois, segundo Curi e Procópio (2011), este seria o tempo necessário para que o epitélio intestinal se encontre totalmente renovado. Antes da coleta definitiva da diurese, todos os grupos experimentais passaram por uma fase de adaptação na gaiola metabólica que consistiu de três dias com água e uma ração pobre em carboidratos (Rhooster-SP). Tal ração foi utilizada para evitar interferências na coluna aniônica do equipamento HPLC.

Figura 10. Protocolo experimental do grupo recuperado



4.8 Avaliação da transcrição gênica

4.8.1 Extração do RNA total

As amostras do tecido íleo (300mg) foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração. Foi feito um homogenato com trizol e, em seguida, a extração de RNA foi realizada com o Kit RNeasy Lipid Tissue Mini (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, $1\mu\text{L}$ de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, USA) com a finalidade de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

4.8.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação continha 1 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 1mg/µL e completado a reação com água livre de nucleases em volume suficiente para completar 20µL. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, USA) foi 25° C por 5 min., 42° C por 30 min., e 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.8.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Conforme a Tabela 1, foram avaliados na transcrição do mRNA os genes relacionados com as junções firmes (zônulas de oclusão-1, claudina-2, ocludina) e o gene do cotransportador H⁺/oligopeptídeo (PEPT-1) com o aparelho do iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA). O gene de referência utilizado foi o YWHAZ da fosfolipase A2 (Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta) (SUN *et al.*, 2007).

Para a reação foi utilizado 10 µL da Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nucleases para um volume final de 20µL. Todos os iniciadores utilizados e as condições da qPCR estão na Tabela 1. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de melting, realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (C_q ou C_t) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, USA) e os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia $2^{-\Delta\Delta CT}$, qual $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do grupo tratado}) / (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do controle})$ como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 1– Sequencias de iniciadores e condições de PCR para os genes avaliados (S: senso e A: antisenso)

Processo Relacionado	Genes	Sequencias dos iniciadores (5' - 3')	Produto (pb)	n° NCBI	Condições do PCR
	Zônulasde oclusão -1	S - CTCGCACGTATCACAAGCTGA AS - CCTCAGGATATGGCTCCTTCC	137	NM_001106266.1	
Junções firmes	Ocludina	S - AACAGCCCCCTAATGTGGAAG AS - GAGTAGGCCATTGGACTGTCG	112	NM_031329.2	
	Claudina-2	S - AGGACTTCCTGCTGACATCCA AS - TCCACCCACTACAGCCACTCT	154	NM_001106846.2	95°C - 20'' 60°C - 20'' 72°C - 45''
Transporte celularR	PEPT1	S - CCTGAAGAAGATGACCGTTGG AS - GCTGGGGAAGACTGGAAGAGT	103	NM_057121.1	
Referência	YWHAZ	S - GCTACTTGGCTGAGGTTGCT AS - TGCTGTGACTGGTCCACAAT	61	NM_013011.3	

4.9 Estudo histopatológico

Porções do duodeno, jejuno e íleo foram seccionadas transversalmente e armazenadas em cassetes histológicos e imersos em formol 10% tamponado por 48 horas. Logo após esse período os cassetes foram armazenados em álcool 70% até o processo de fixação. Depois da devida fixação dos tecidos o material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser então desidratado em concentrações crescentes de 70 a 100% de etanol. Após o processamento, realizou-se a inclusão dos materiais em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. Os blocos de parafina foram cortados em 5µm de espessura e colocados em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada pelo patologista Msc. Daniel de Araújo Viana e posteriormente registradas através de fotomicrografias.

Foram analisadas em microscópio óptico em diferentes aumentos de lente e, para a captura das imagens utilizou-se uma câmera de vídeo digital (Samsung®) acoplada ao microscópio, por onde ocorreu a digitalização das imagens.

4.10 Estatística

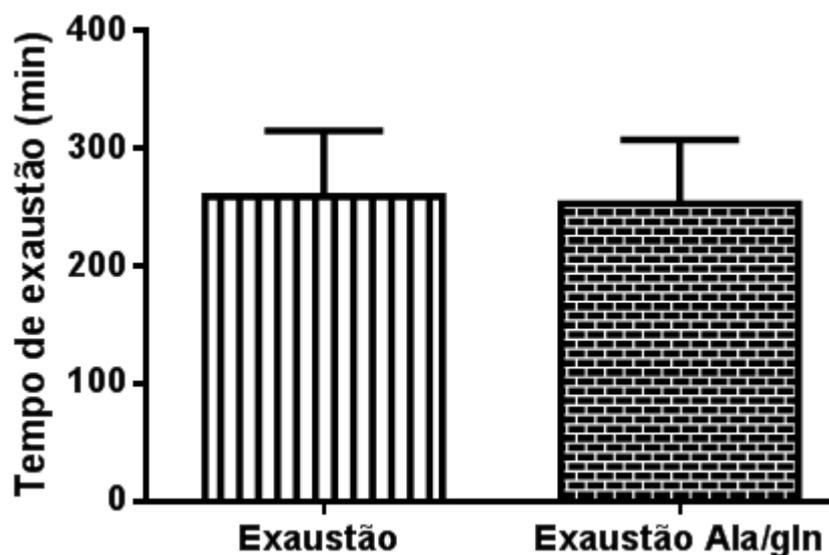
Todos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni como *post test*. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$. Quando a análise foi realizada entre dois grupos utilizamos teste T de Student com nível de significância para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Medida do tempo de exaustão

No presente estudo mensuramos o tempo de exaustão (fadiga) nos grupos exaustão (E) e exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) ($E = 259,0 \pm 22,84$; $E-A/G = 252,7 \pm 22,31$) (Figura 11). Observamos que não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 11 – Tempo (minutos) de exaustão dos grupos, exaustão (E) e exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G).



Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação da diferença estatística entre os grupos foi utilizado o teste “t” de Student.

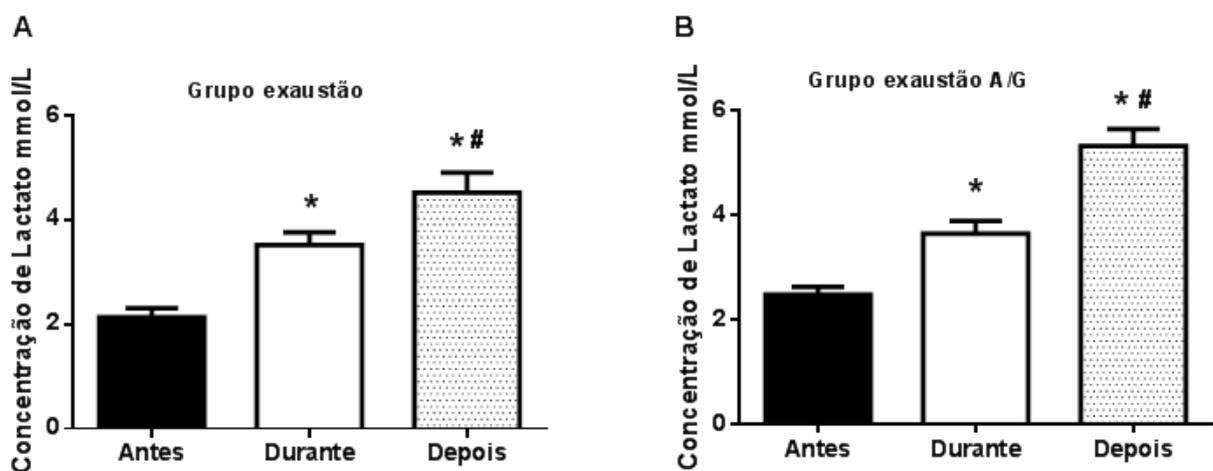
5.2 Medida da concentração de lactato e glicose

Avaliamos a concentração de lactato sanguíneo antes, durante e depois do teste de exaustão nos grupos exaustão (E) e exaustão suplementado com alanil-glutamina. No grupo exaustão observamos aumento significativo na concentração de lactato sanguíneo depois do teste de exaustão em relação à concentração de lactato antes da exaustão (Depois = $4,51 \pm 0,15$ mmol/L; Antes = $2,13 \pm 0,07$ mmol/L; $*p < 0,05$; $n=6$). Observamos também nesse mesmo grupo que houve aumento significativo na concentração de lactato sanguíneo depois do teste de exaustão em relação à concentração de lactato durante o teste (Depois = $4,51$ mmol/L $\pm 0,15$; Durante = $3,51 \pm 0,09$ mmol/L; $\#p < 0,05$; $n=6$) (Figura 12). O mesmo aumento da concentração de lactato sanguíneo ocorreu no grupo suplementado com alanil-

glutamina, ou seja, houve aumento significativo de lactato depois do teste de exaustão em relação a sua concentração antes do teste (Depois = $5,33 \pm 0,13$ mmol/L; Antes = $2,48 \pm 0,06$ mmol/L; * $p < 0,05$; n=6) e aumento significativo também de lactato depois do teste de exaustão em relação a sua concentração durante o teste (Depois = $5,33 \pm 0,13$ mmol/L; Durante = $3,65 \pm 0,09$ mmol/L; # $p < 0,05$; n=6) (Figura 12).

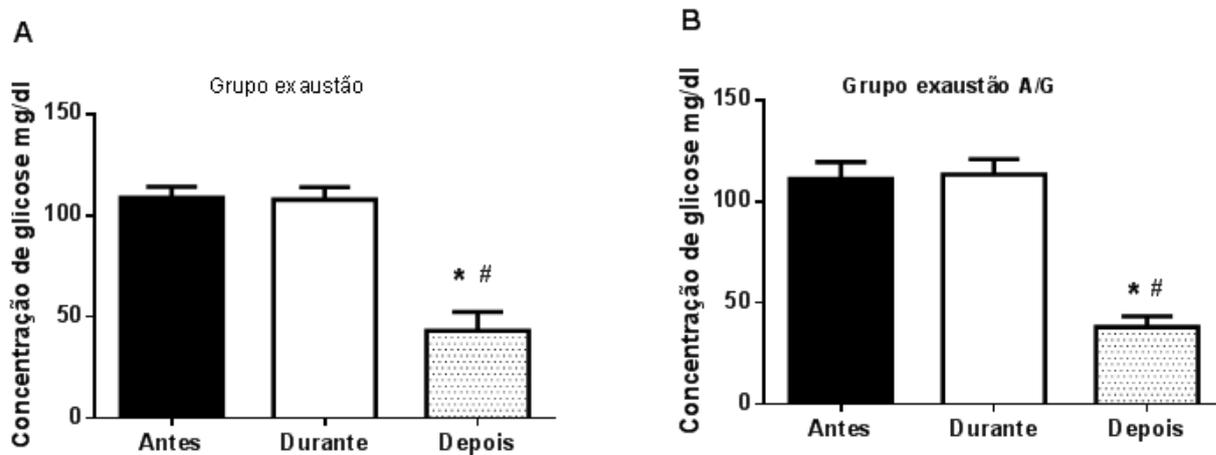
Nos grupos exaustão e exaustão suplementado com alanil-glutamina avaliamos a concentração de glicose antes, durante e depois do teste de exaustão. No grupo exaustão houve redução significativa da concentração de glicose depois do teste de exaustão em relação a sua concentração antes do teste de exaustão (Depois = $43,1 \pm 3,77$ mg/dL; Antes = $108,7 \pm 2,23$ mg/dL; * $p < 0,05$; n=6). Observamos também diferença significativa na diminuição da concentração glicose depois do teste de exaustão em relação a sua concentração durante o teste (Depois = $43,17 \pm 3,77$ mg/dL; Durante = $107,8 \pm 2,48$ mg/dL; # $p < 0,05$; n=6) (Figura 13). No grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina observamos redução significativa da glicose depois do teste de exaustão em relação a sua concentração antes do teste de exaustão (Depois = $38,0 \pm 2,17$ mg/dL; Antes = $111,0 \pm 3,46$ mg/dL; * $p < 0,05$; n=6). Houve também neste mesmo grupo diferença significativa na redução da glicose depois do teste de exaustão em relação à glicose aferida durante o teste (Depois = $38,0 \pm 2,17$ mg/dL; Durante = $113,2 \pm 3,10$ mg/dL; # $p < 0,05$; n=6) (Figura 13).

Figura 12 - Concentração de lactato antes, durante e depois do teste de exaustão nos grupos: exaustão (A) e exaustão suplementado com alanil-glutamina (B).



Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas antes, durante e depois o teste de exaustão foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com * $p < 0,05$ representando diferença estatística do lactato em relação ao período anterior ao teste (antes), e # $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação à concentração de lactato durante o teste de exaustão.

Figura 13 - Concentração da glicose antes, durante e depois do teste de exaustão nos grupos: exaustão (A) e exaustão suplementado com alanil-glutamina (B).



Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas antes, durante e depois do teste de exaustão foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com * $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação à concentração de glicose antes do teste de exaustão e # $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação à concentração da glicose durante o teste de exaustão.

5.3 Análise dos parâmetros do equilíbrio ácido-base no sangue venoso

Todos os grupos foram submetidos à análise dos parâmetros (pH_v , PvCO_2 , HCO_3^- , BE, P_vO_2 e S_{atvO_2}) no gasômetro. Observamos redução significativa de pH (Figura 14) no grupo exaustão (E) e aumento significativo do grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G) ambos em relação ao sedentário (S) : (S = $7,35 \pm 0,01$; S-A/G = $7,46 \pm 0,01$; E = $7,29 \pm 0,01$; n = 5; * $p < 0,05$). Também houve diferença significativa na diminuição de pH no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) e treinado alanil-glutamina (T-A/G) em relação ao grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G): (S-A/G = $7,46 \pm 0,006$; T-A/G = $7,31 \pm 0,01$ e E-A/G = $7,26 \pm 0,004$; n = 5; # $p < 0,05$). Houve também redução significativa do grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina em relação ao grupo treinado com alanil glutamina (T-A/G): (T-A/G = $7,31 \pm 0,01$ e E-A/G = $7,26 \pm 0,004$; n = 5; \$ $p < 0,05$)

Analisando a PvCO_2 (Figura 15) observamos que houve um aumento significativo no grupo exaustão (E) em relação ao grupo sedentário (S): (S = $40,4 \pm 1,44$; E = $50,9 \pm 1,17$; n = 5; * $p < 0,05$). Também houve diferença significativa no aumento da PvCO_2 no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) e treinado alanil-glutamina (T-A/G) em relação ao grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G): (S-A/G = $35,9 \pm 0,67$; T-A/G = $45,12 \pm 1,37$; E-A/G = $50,4 \pm 0,98$; n = 5; # $p < 0,05$). Observamos também diferença

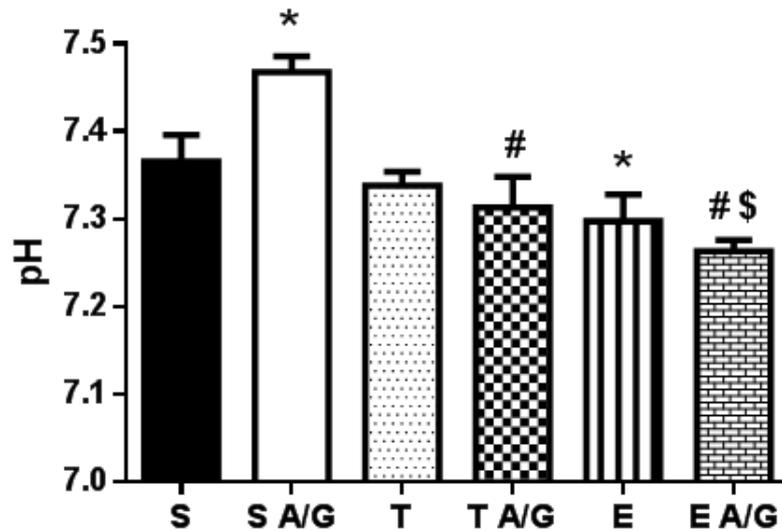
significativa da P_vCO_2 no grupo exaustão (E) em relação ao grupo treinado (T): (T = $45,58 \pm 1,03$; E = $50,94 \pm 1,17$; n = 5; $^{\&}p < 0,05$).

Em relação ao HCO_3^- (Figura 16), todos os grupos, sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G), treinado (T), treinado suplementado com A/G (T-A/G), exaustão (E) e exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) não obtiveram diferença estatística em relação ao grupo sedentário (S = $23,7 \pm 0,59$; S-A/G = $24,3 \pm 0,38$; T = $23,9 \pm 0,59$; T-A/G = $23,6 \pm 0,42$; E = $24,6 \pm 0,67$ e E-A/G = $24,98 \pm 0,77$; n=5). Também não houve diferença significativa de P_vO_2 (Figura 17) em todos os grupos analisados (S = $58,3 \pm 1,96$; S-A/G = $54,18 \pm 1,56$; T = $53,32 \pm 0,86$; T-A/G = $57,08 \pm 2,13$; E = $55,03 \pm 1,62$ e E-A/G = $56,78 \pm 2,37$; n=5).

Observamos redução significativa de $S_{atv}O_2$ (Figura 18) no grupo exaustão (E) em relação ao grupo sedentário (S): (S = $77,3 \pm 1,68$; E = $67,1 \pm 2,11$; n = 5; $^*p < 0,05$). Também houve diferença significativa na diminuição da $S_{atv}O_2$ no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) em relação ao grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G): (S-A/G = $77,8 \pm 1,50$; E-A/G = $60,08 \pm 2,37$; n = 5; $^{\#}p < 0,05$). Observamos também redução significativa de $S_{atv}O_2$ do grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina E-A/G em relação ao treinado suplementado com alanil-glutamina (T-A/G): (T-A/G = $73,78 \pm 1,05$; E-A/G = $60,08 \pm 2,37$; n = 5; $^{\$}p < 0,05$).

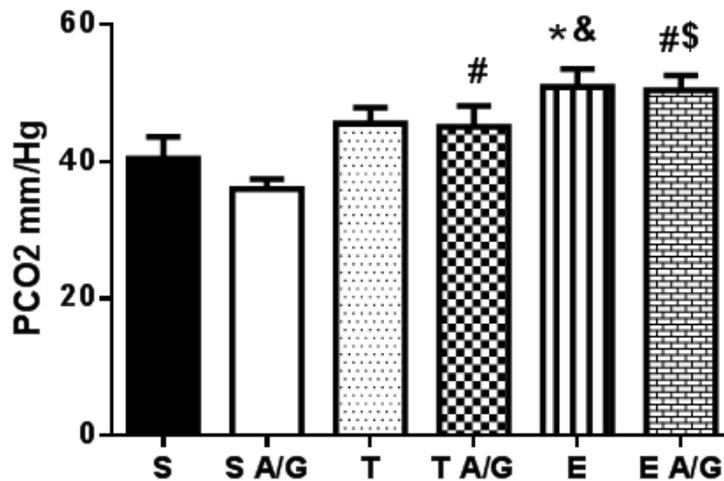
Em relação ao excesso de bases (Figura 19) observamos aumento significativo no grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G) em relação ao grupo sedentário (S): (S-A/G = $1,12 \pm 0,32$; S = $-1,28 \pm 0,49$; n = 5; $^*p < 0,05$). Também houve diferença significativa na diminuição do excesso de bases no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) e grupo treinado suplementado com alanil-glutamina (T-A/G) em relação ao grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G): (S-A/G = $1,12 \pm 0,32$; T-A/G = $-3,04 \pm 0,52$; E-A/G = $-4,6 \pm 0,62$; n = 5; $^{\#}p < 0,05$).

Figura 14– pH sanguíneo nos grupos experimentais.



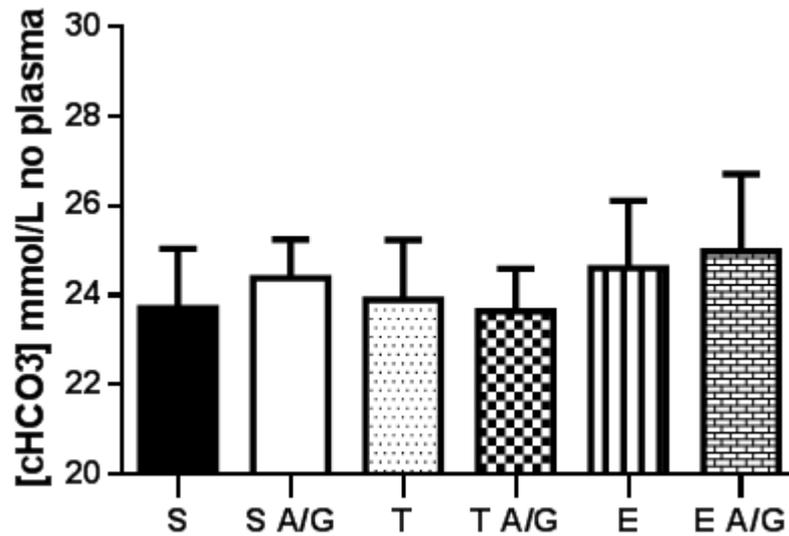
S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G= treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S; e # $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S-A/G e \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T-A/G.

Figura 15 – PCO₂ no sangue venoso nos grupos experimentais.



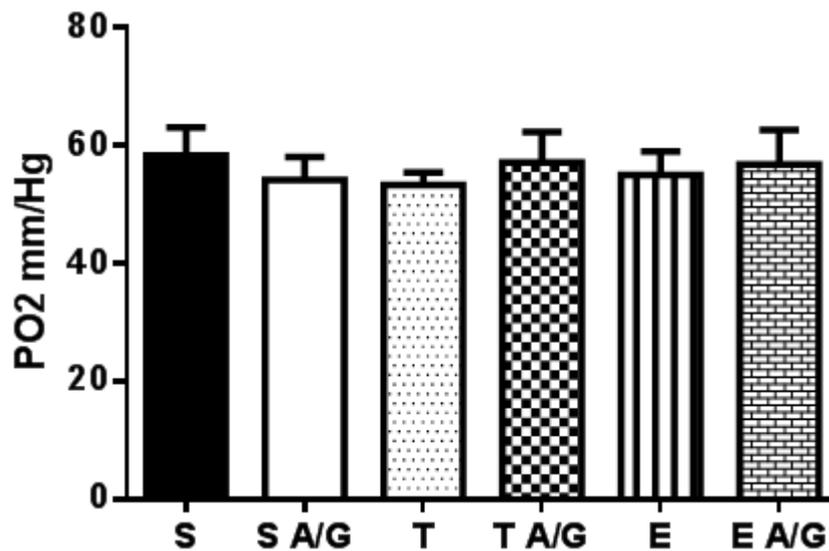
S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S; # $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S-A/G; \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T-A/G e & $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T.

Figura 16 – Concentração de HCO_3^- no sangue venoso nos grupos.



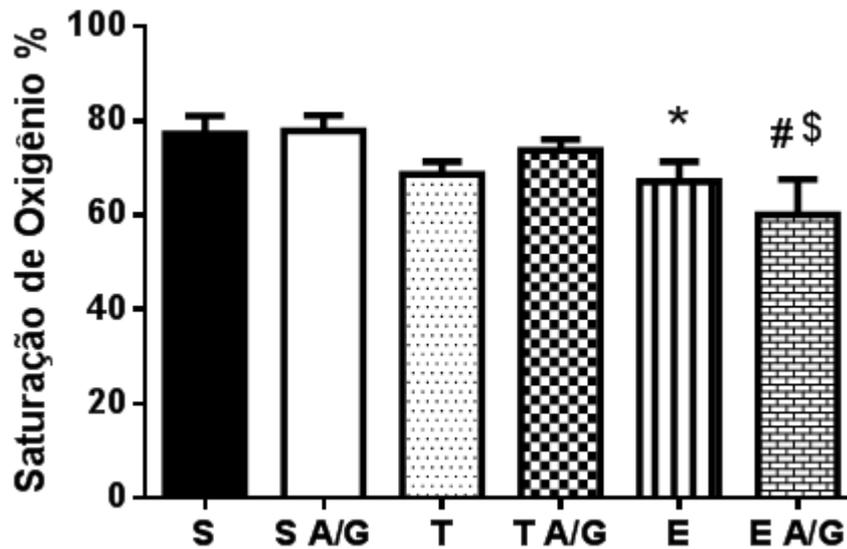
S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni.

Figura 17 – PO_2 no sangue venoso nos grupos experimentais.



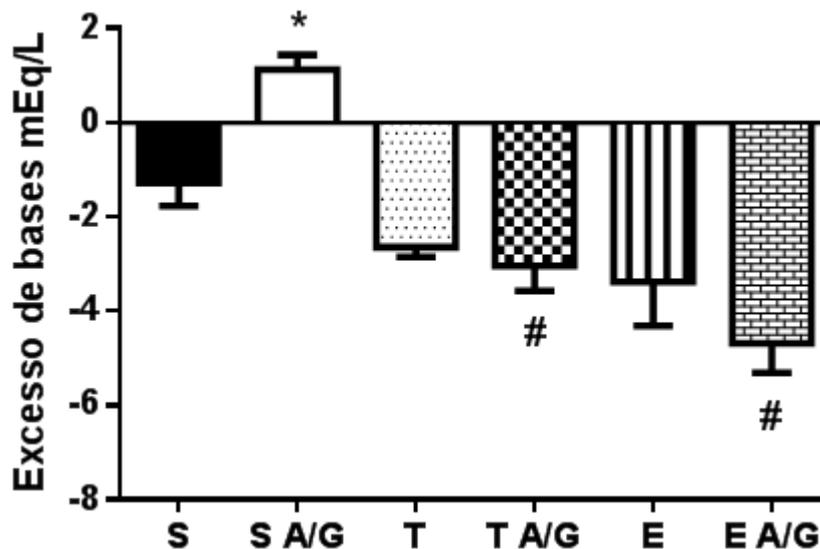
S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni.

Figura 18 – Percentual de saturação de oxigênio (SO₂) no sangue venoso nos grupos experimentais.



S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S; e # $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S-A/G e \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T-A/G.

Figura 19 – Excesso de bases no sangue venoso nos grupos experimentais.



S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S e # $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S-A/G.

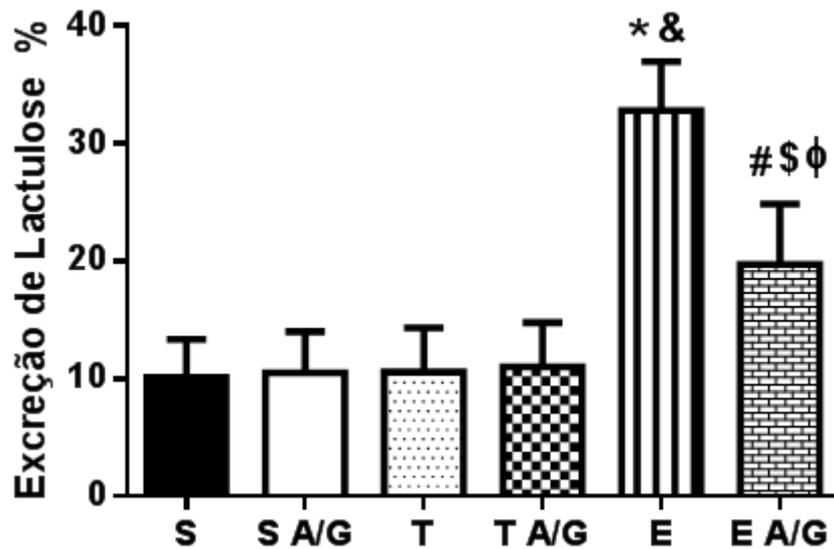
5.4 Permeabilidade intestinal pelo método não invasivo do lactulose e manitol

Todos os grupos foram submetidos à análise da permeabilidade intestinal pelo método não invasivo do lactulose/manitol. Observamos aumento significativo no percentual de excreção de lactulose no grupo exaustão (E) em relação ao grupo sedentário (S): (S = $10,12 \pm 1,43$; E = $32,83 \pm 1,84$; n = 5; * $p < 0,05$). Também houve diferença significativa no aumento do percentual de lactulose do grupo exaustão (E) em relação ao grupo treinado (T): (E = $32,83 \pm 1,84$; T = $10,59 \pm 1,67$; n = 5, & $p < 0,05$). Observamos também diferença significativa no aumento do percentual de lactulose no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina (E-A/G) em relação ao grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (S-A/G): (E-A/G = $19,73 \pm 2,29$; S-A/G = $10,50 \pm 1,57$; n = 5, # $p < 0,05$). Houve aumento também no percentual de excreção de lactulose no grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina em relação ao grupo treinado suplementado com alanil-glutamina (T-A/G): (E-A/G = $19,73 \pm 2,29$; T-A/G = $11,03 \pm 1,68$; n = 5, \$ $p < 0,05$). Houve, no entanto, queda da excreção de lactulose com diferença estatística entre os grupos E e E-A/G, mostrando proteção da alanil-glutamina sob a permeabilidade do lactulose (E = $32,83 \pm 1,84$ %; E-A/G = $19,73 \pm 2,29$ %; n=5, $\phi p < 0,05$) (Figura 20).

Pela análise de manitol, observamos aumento significativo no percentual deste carboidrato no grupo E em relação ao grupo S (S = $18,85 \pm 1,89$; E = $45,49 \pm 2,29$; n = 5, * $p < 0,05$) Em adição, houve diferença significativa em relação entre os grupos T e E (T = $27,47 \pm 2,25$; E = $45,49 \pm 2,29$; n=5, & $p < 0,05$). Houve também diferença significante no aumento de percentual de excreção de manitol no grupo E-A/G em relação ao grupo S-A/G: (S-A/G = $18,9 \pm 1,72$; E-A/G = $45,07 \pm 3,46$; n = 5, # $p < 0,05$). Também houve aumento da excreção de percentual de manitol no grupo E-A/G em relação ao grupo T-A/G: (E-A/G = $45,07 \pm 3,46$; T-A/G = $27,36 \pm 1,90$; n = 5, \$ $p < 0,05$) (Figura 21).

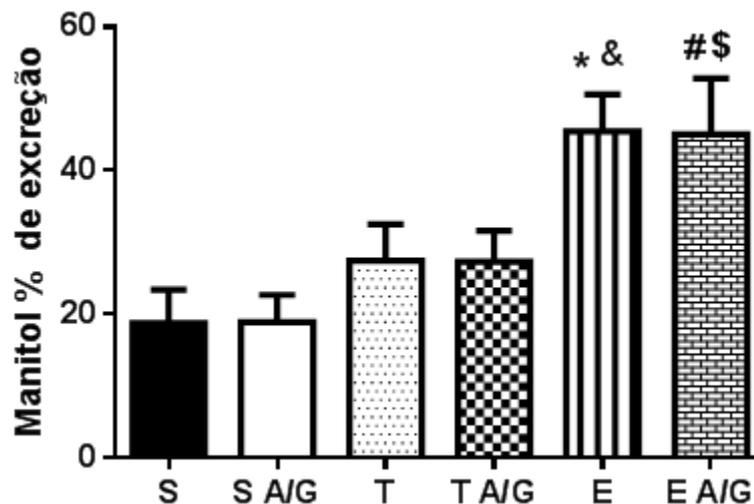
Entretanto, na análise da relação da permeabilidade dos dois carboidratos lactulose/manitol (L/M) observamos um aumento significativo no grupo de exaustão (E) em relação ao grupo sedentário (S) (S = $0,48 \pm 0,05$; E = $0,75 \pm$; n=5, * $p < 0,05$). Nenhum outro grupo experimental apresentou diferença significativa em relação ao grupo sedentário (S = $0,48 \pm 0,05$; S-A/G = $0,47 \pm 0,02$; T = $0,56 \pm 0,05$; T-A/G = $0,58 \pm 0,04$). Contudo, houve diferença significativa entre os grupos E e E-A/G (E = $0,75 \pm 0,05$; E-A/G = $0,52 \pm 0,02$; n=5; $\phi p < 0,05$) mostrando, mais uma vez, que a alanil-glutamina conseguiu reverter os efeitos da atividade exaustiva na permeabilidade intestinal. (Figura 22).

Figura 20 – Percentual de excreção de lactulose nos grupos experimentais.



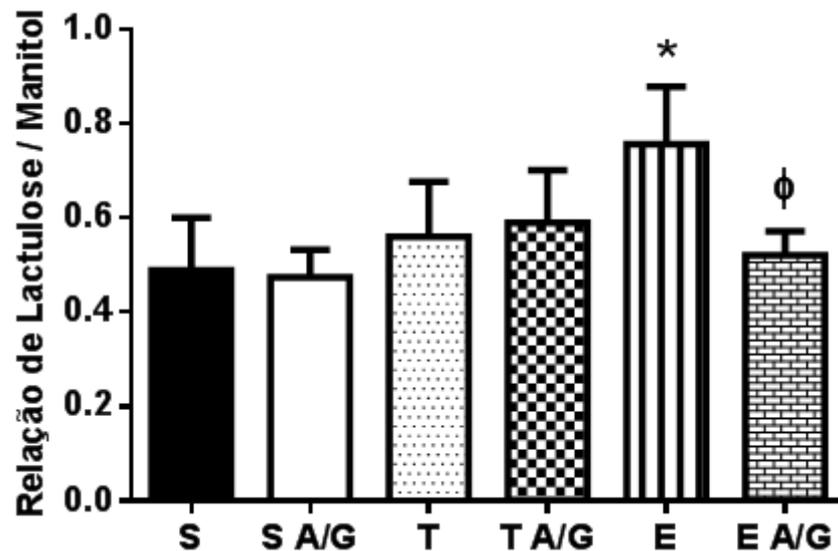
S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo S; # $p < 0,05$ representa a diferença estatística em relação ao grupo E-A/G; \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T-A/G e & $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T e &phi $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo E.

Figura 21 - Percentual de excreção de manitol nos grupos experimentais.



S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com * $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S; # $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo E-A/G; \$ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T-A/G e & $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T.

Figura 22 – Relação da Taxa de excreção de lactulose/manitol nos grupos experimentais.



S = Sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com * $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S e ^φ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo E.

5.5 Análise do teste de lactulose/manitol no grupo recuperado

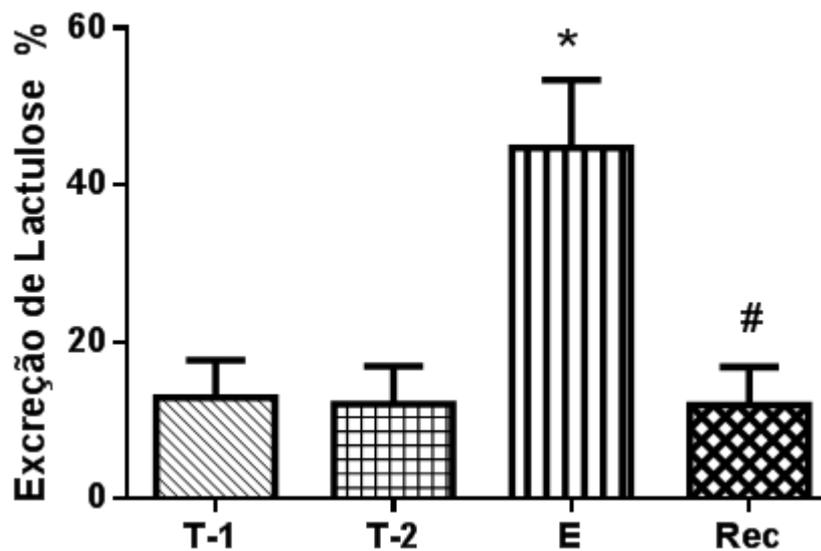
Para investigar a hipótese de que o aumento da permeabilidade intestinal causada pelo exercício prolongado e exaustivo seria apenas um efeito temporário, realizamos o teste de permeabilidade intestinal em um mesmo grupo de ratos (Recuperado) em momentos distintos assim designados: 1. Sessão de treino um (T_1), sessão de treino dois (T_2), teste exaustivo (E) e recuperação (R) como descrito na metodologia do item 4.8. Em relação ao lactulose (Figura 23) observamos aumento significativo no percentual de excreção de lactulose no momento da exaustão (E) em relação aos momentos sessão de treino um (T_1) e sessão de treino dois (T_2): ($T_1 = 12,91 \pm 2,14$ %; $T_2 = 12,07 \pm 2,16$ %; $E = 44,73 \pm 3,88$ %; $n = 5$; * $p < 0,05$). Houve, no entanto, queda da excreção do percentual de lactulose com diferença estatística entre os momentos exaustão (E) e recuperação (R), mostrando o efeito temporário da permeabilidade ao lactulose ($E = 44,73 \pm 3,88$ %; $R = 11,95 \pm 2,18$ %; $n = 5$, # $p < 0,05$).

Em relação ao manitol (Figura 24) observamos que também houve aumento significativo no percentual de excreção desse carboidrato no momento da exaustão (E) em relação aos momentos sessão de treino um (T_1) e sessão de treino dois (T_2): ($T_1 = 12,75 \pm 2,71$ %; $T_2 = 15,26 \pm 3,54$ %; $E = 36,52 \pm 4,89$ %; $n = 5$; * $p < 0,05$). Observamos, porém, que

houve redução da excreção do percentual de manitol com diferença estatística entre os momentos exaustão (E) e recuperação (R) ($E = 36,52 \pm 4,89 \%$; $R = 13,43 \pm 2,93 \%$; $n=5$, $\#p<0,05$).

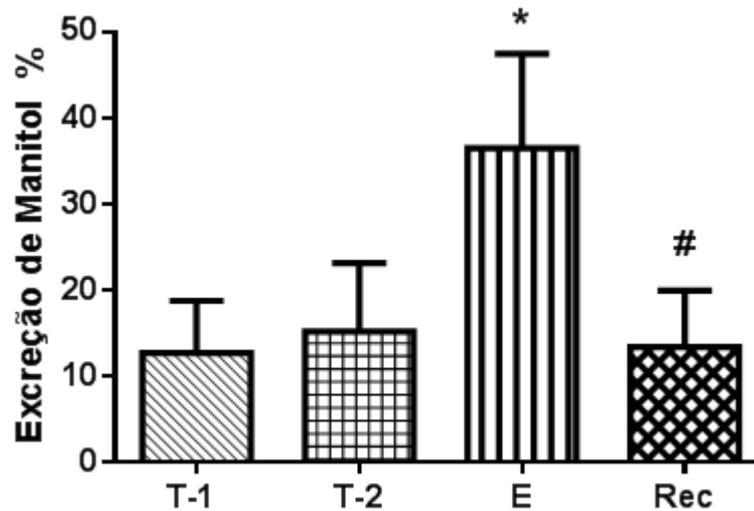
Contudo, na análise da relação da permeabilidade dos dois carboidratos lactulose/manitol (L/M) observamos na figura 25 um aumento significativo no momento da exaustão (E) em relação aos momentos sessão de treino um (T_1) e sessão de treino dois (T_2): ($T_1 = 0,64 \pm 0,07$; $T_2 = 0,59 \pm 0,03$; $E = 0,99 \pm 0,67$; $n= 5$; $*p<0,05$). No entanto, houve diferença significativa entre os momentos exaustão (E) e recuperação (R) ($E = 0,99 \pm 0,07$; $R = 0,62 \pm 0,03$; $n=5$, $\#p<0,05$).

Figura 23 – Percentual de excreção de lactulose em relação a diferentes momentos de treino e o período de recuperação (72 horas após teste exaustivo).



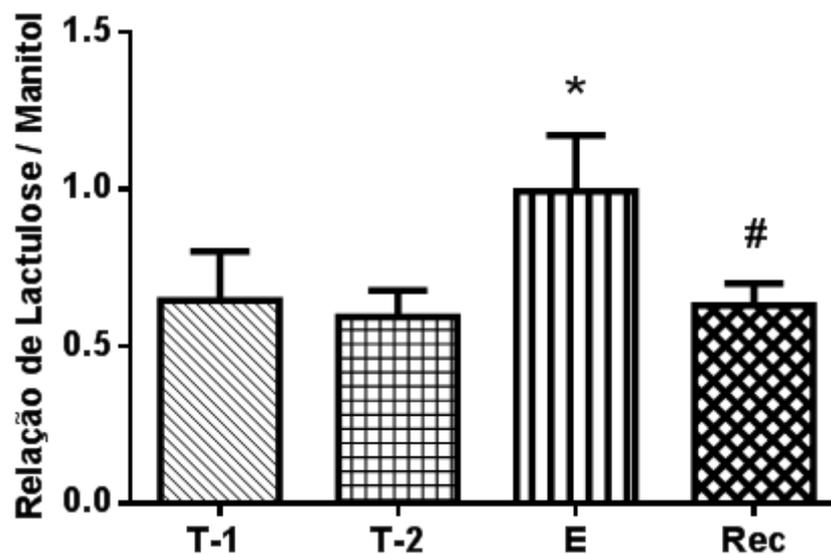
T_1 = sessão de treino um 1; T_2 = sessão de treino dois; E = Exaustão e R = recuperação. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os quatros momentos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde $*p<0,05$ representa a diferença estatística do momento E em relação aos momentos T_1 e T_2 ; e $\#p<0,05$ representa a diferença estatística entre o momento R em relação ao momento E.

Figura 24 – Percentual de excreção de manitol em relação a diferentes momentos de treino e o período de recuperação (72 horas após teste exaustivo).



T₁ = sessão de treino um 1; T₂ = sessão de treino dois; E = Exaustão e R = recuperação. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os quatros momentos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística do momento E em relação aos momentos T₁ e T₂; e # $p < 0,05$ representa a diferença estatística entre o momento R em relação ao momento E.

Figura 25 – Relação da excreção de lactulose/manitol em relação a diferentes momentos de treino e o período de recuperação (72 horas após teste exaustivo).



T₁ = sessão de treino um 1; T₂ = sessão de treino dois; E = Exaustão e R = recuperação. Dados expressos por média e erro padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre os quatros momentos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni onde * $p < 0,05$ representa a diferença estatística do momento E em relação aos momentos T₁ e T₂; e # $p < 0,05$ representa a diferença estatística entre o momento R em relação ao momento E.

5.6 Transcrição gênica

Avaliamos a transcrição relativa das junções firmes zônulas de oclusão-1, ocludina e claudina-2. Observamos que a expressão relativa de zônulas de oclusão-1 e ocludina apresentaram padrão similar de alterações. A suplementação de alanil glutamina em animais sedentários (S-A/G) e o treinamento (T) induziram aumento significativo em relação aos animais que não executaram exercício (S) ($S_{z_{o-1}} = 1,40 \pm 0,56$; $S_{occludina} = 1,25 \pm 0,50$; $S-A/G_{z_{o-1}} = 10,04 \pm 0,93$; $S-A/G_{occludina} = 4,10 \pm 0,70$; $T_{z_{o-1}} = 9,44 \pm 1,58$; $T_{occludina} = 4,87 \pm 0,87$). O mesmo aumento significativo pôde ser visto entre os animais que executaram exercício exaustivo na transcrição de zônulas de oclusão-1 ($S_{z_{o-1}} = 1,40 \pm 0,56$; $E_{z_{o-1}} = 6,77 \pm 1,07$). Contudo, houve apenas uma tendência ao aumento quando avaliamos a expressão do mRNA de ocludina-2 no grupo exaustivo em relação ao grupo sedentário (Figuras 26 e 27).

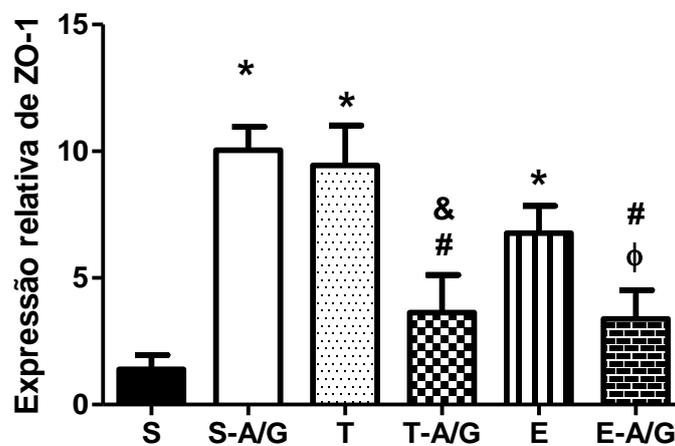
Outras similaridades foram observadas entre a expressão relativa de zônulas de oclusão-1 e ocludina. A suplementação com alanil glutamina nos grupos de animais treinados e exaustivos (T-A/G e E-A/G) reverteu significativamente os aumentos das transcrições relativas de zônulas de oclusão-1 e ocludina encontrados entre os grupos T e E ($T_{z_{o-1}} = 9,44 \pm 1,58$; $T-A/G_{z_{o-1}} = 3,63 \pm 1,49$; $T_{occludina} = 4,87 \pm 0,87$; $T-A/G_{occludina} = 1,05 \pm 0,64$; $E_{z_{o-1}} = 6,77 \pm 1,07$; $E-A/G_{z_{o-1}} = 3,38 \pm 1,14$; $E_{occludina} = 2,51 \pm 0,23$; $E-A/G_{z_{o-1}} = 0,71 \pm 0,23$) (Figuras 26 e 27).

Analisamos também a expressão relativa da junção firme claudina-2. Observamos uma diminuição significativa da transcrição relativa deste mRNA no grupo sedentário que recebeu a suplementação de alanil-glutamina (S-A/G) e um aumento significativo no grupo de animais que executaram exercício exaustivo (E) ($S = 1,27 \pm 0,27$; $S-A/G = 0,34 \pm 0,08$; $E = 3,46 \pm 0,62$) em relação ao grupo sedentário (S). Da mesma forma como descrito para as outras junções firmes a suplementação com alanil glutamina reverteu o aumento observado no grupo exaustivo ($E = 3,46 \pm 0,62$; $E-A/G = 1,58 \pm 0,48$) (Figura 28).

Como a suplementação deste trabalho foi com um dipeptídeo, analisamos a transcrição gênica do cotransportador H^+ /oligopeptídeo encontrado tanto no intestino como nos rins denominado PEPT-1. Tanto a suplementação com alanil glutamina no grupo sedentário (S-A/G) assim como nos animais treinados (T) e nos animais treinados que foram submetidos ao exercício exaustivo (E) observamos um aumento significativo da expressão relativa do mRNA de PEPT-1 em relação ao grupo que não foi submetido a qualquer tratamento (S) ($S = 1,03$

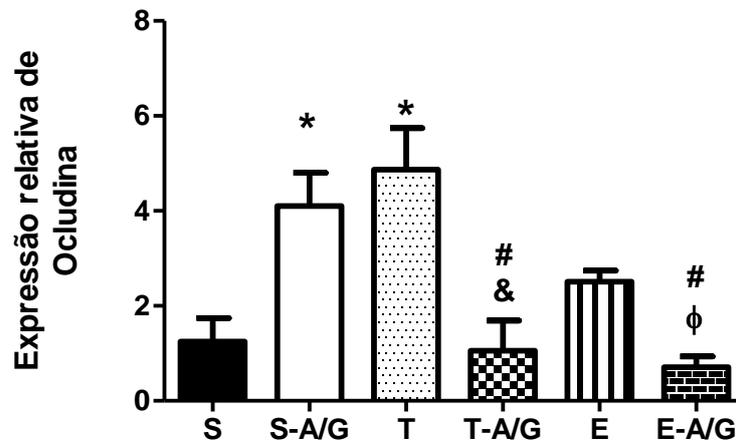
$\pm 0,14$; S-A/G = $4,93 \pm 0,87$; T = $4,99 \pm 0,93$; E = $3,87 \pm 0,60$). Contudo, quando a alanil glutamina foi suplementada nos animais que se submeteram ao exercício exaustivo (E-A/G) a alanil-glutamina reverteu significativamente o aumento da transcrição do mRNA de PEPT-1 observado para os animais treinados com teste de exaustão (E). Uma mesma tendência de queda foi observada entre os animais treinados e os animais treinados que receberam a suplementação com alanil-glutamina. Porém, essa queda não foi significativa (Figura 29).

Figura 26. Expressão Relativa do mRNA da junção firme zônulas de oclusão -1 (ZO-1).



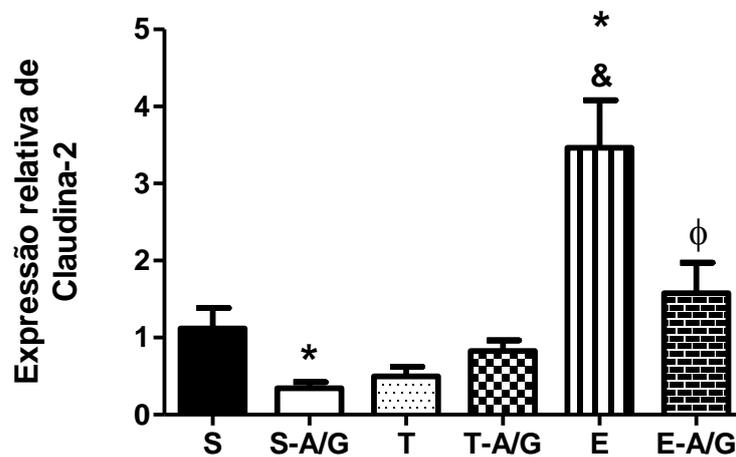
Os dados expressam a média \pm E.P.M para a transcrição relativa de zônulas de oclusão-1. S = sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com * $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S; # $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo S-A/G; & $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T; e ϕ $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo E.

Figura 27. Expressão relativa do mRNA da junção firme ocludina.



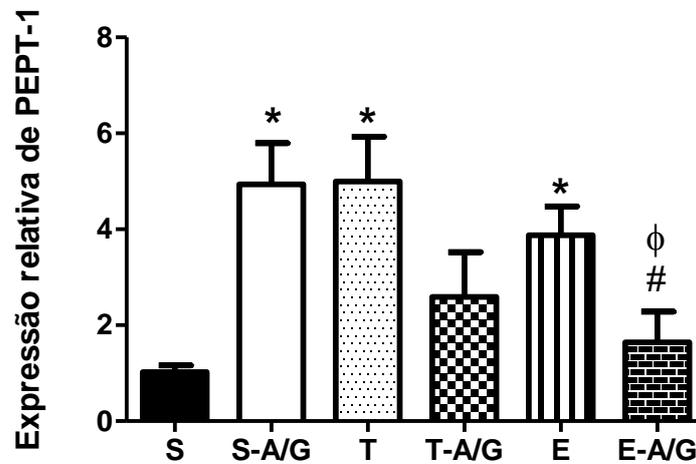
Os dados expressam a média \pm E.P.M para a transcrição relativa de ocludina. S = sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com $*p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S; $\#p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo S-A/G; $\&p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T; e $\phi p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo E.

Figura 28. Expressão relativa do mRNA da junção firme claudina-2.



Os dados expressam a média \pm E.P.M para a transcrição relativa de claudina-2. S = sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com $*p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S; $\&p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo T; e $\phi p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo E.

Figura 29. Expressão relativa do mRNA do cotransportador de H⁺/oligopeptídeo (PEPT-1).



Os dados expressam a média \pm E.P.M para a transcrição relativa de PEPT-1. S = sedentário; S-A/G = sedentário suplementado com alanil-glutamina; T = treinado; T-A/G = treinado suplementado com alanil-glutamina; E = exaustão e E-A/G = exaustão suplementado com alanil-glutamina. Para determinação das diferenças estatísticas entre os grupos foi utilizado ANOVA, com pós-teste de Bonferroni com * $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S; # $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo S-A/G; e ϕ $p < 0,05$ representando diferença estatística em relação ao grupo E.

5.7 Análise histopatológica

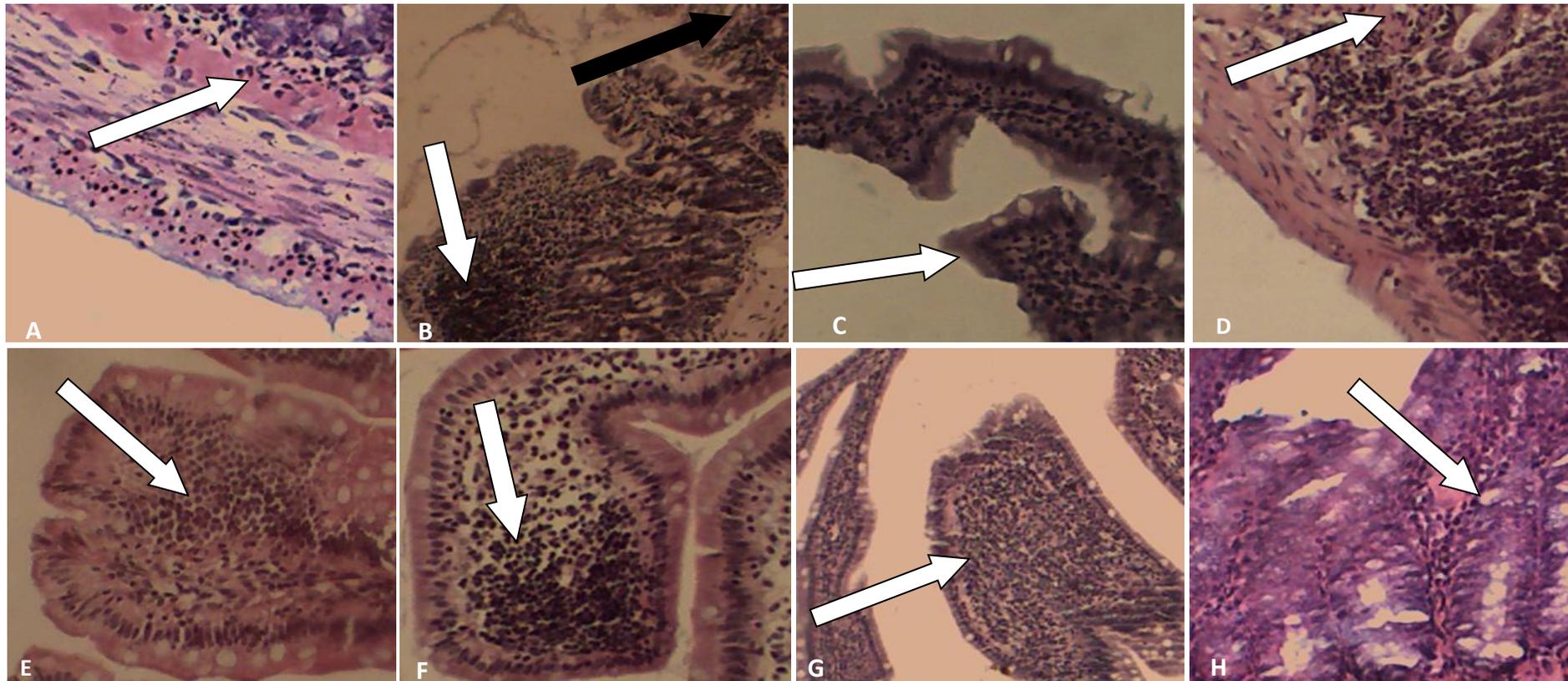
A análise histopatológica foi realizada para as três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) em todos os grupos avaliados, com exceção para o grupo denominado recuperado. Micrografias representativas dos achados histopatológicos podem ser vistas nas figuras 30, 31 e 32.

De acordo com o laudo realizado pelo patologista Prof. M.Sc. Daniel de Araújo Viana, não houve alterações arquiteturais nos órgãos examinados ou qualquer indício de citotoxicidade nos grupos sedentário e sedentário suplementado. Os únicos achados histológicos marcantes nestes grupos foram discreta presença de processo inflamatório linfocítico e, somente nos íleos, uma aparente redução ou achatamento do pregueado mucoso e hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino (gut-associated lymphoid tissue – GALT).

Os animais dos grupos treinados, suplementados ou não com alanil-glutamina, apresentaram em todas as porções do intestino um discreto processo inflamatório crônico linfoplasmocitário com moderada hiperplasia de GALT, e discreto edema. Contudo todas as porções do intestino delgado apresentaram achatamento das vilosidades com algumas zônulas de necrose encontradas especialmente nos íleos.

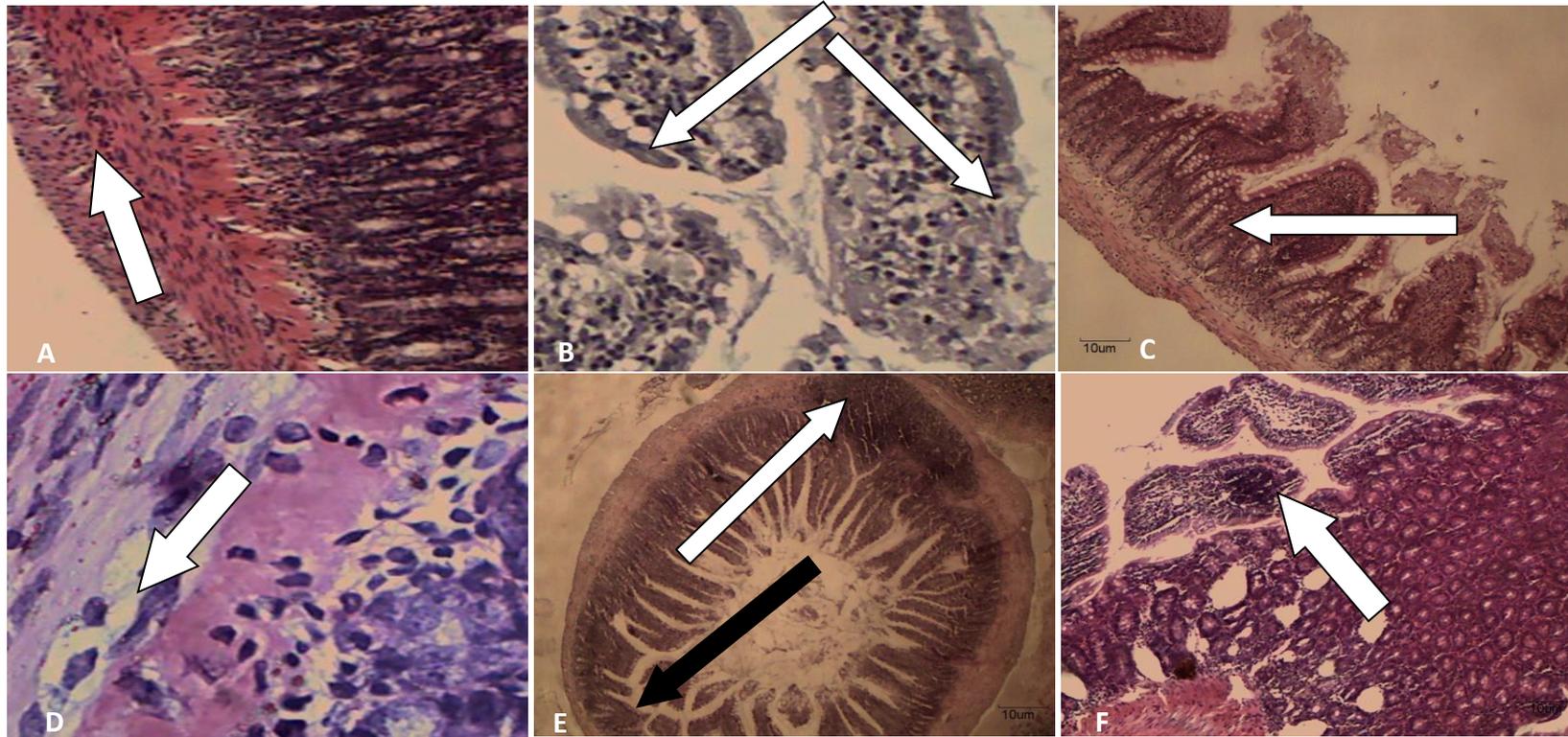
Os animais que foram submetidos ao teste exaustivo, na presença ou ausência de alanil-glutamina também não apresentaram quaisquer alterações arquiteturais ou indício de citotoxicidade. Porém, apresentaram discreta dilatação dos vasos linfáticos, moderada infiltração de células linfocíticas, moderada hiperplasia do GALT. Contudo, não apresentaram achatamento do pregueado mucoso.

Figura 30 - Fotomicrografia de duodenos de rato coradas pelo método de hematoxilina eosina.



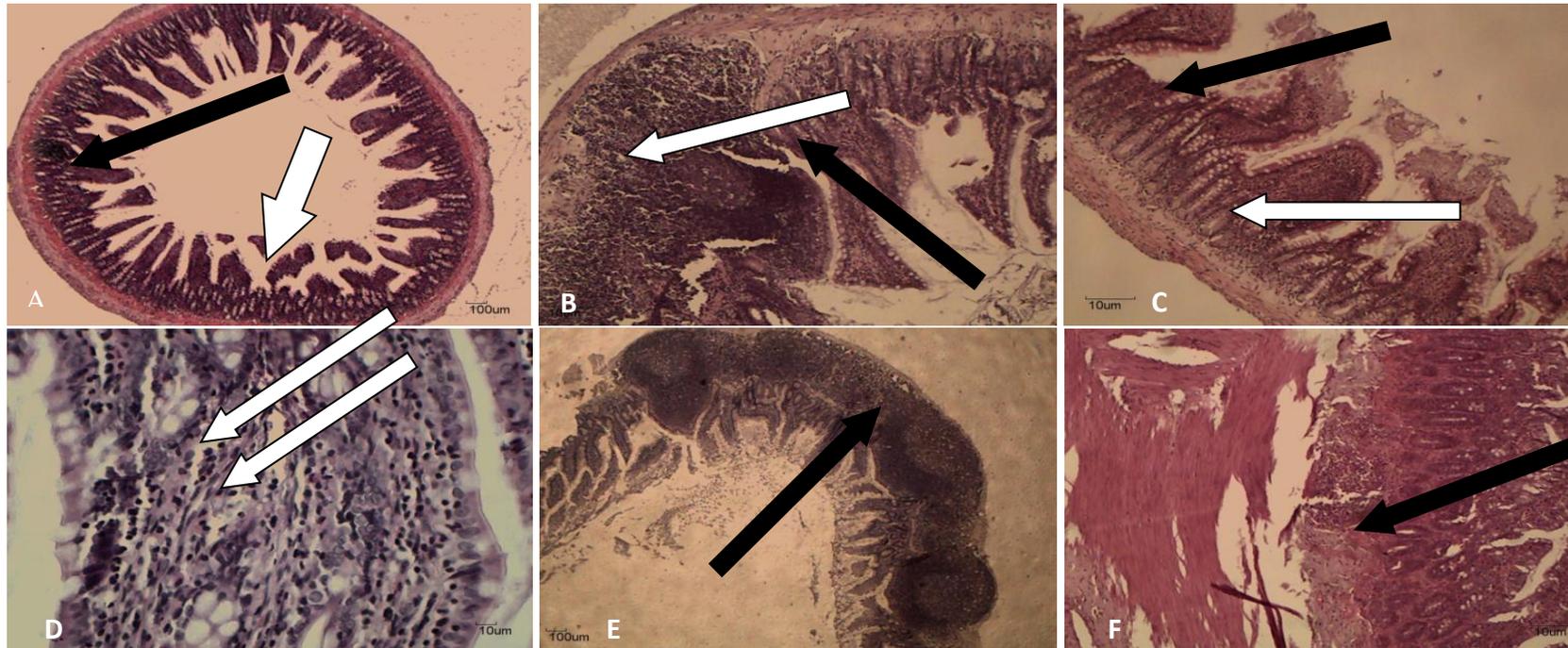
Registro em Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam. A = grupo sedentário (200x); B e C = grupos treinados (400x); D = grupo exercício exaustivo (200x); E = grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (400x); F (200x) e G (100x) = grupos treinados suplementados com alanil-glutamina; e H = grupo treinado submetido ao exercício exaustivo suplementado com alanil-glutamina (200x). Setas brancas em A, D, E e H indicam processo inflamatório linfocítico leve. Setas brancas em B e F indicam hiperplasia do GALT. Setas brancas em C e G indicam achatamento do pregueado mucoso. Seta preta em B indica necrose do pregueado da mucosa (vilosidade) com processo inflamatório crônico.

Figura 31 - Fotomicrografia de jejuno de rato coradas pelo método de hematoxilina eosina.



Registro em Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam. A = grupo sedentário (100x); B = grupo treinado (200x); C = grupo treinado submetido ao exercício exaustivo (200x); D = grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (200x); E = grupo treinado suplementado com alanil-glutamina (40x); F = grupo treinado submetido ao exercício exaustivo suplementado com alanil-glutamina (200x). Setas brancas em A, D, C indicam processo inflamatório linfocítico leve. Setas brancas em B indicam edema e infiltrado linfocítico crônico. Setas brancas em E e F indicam hiperplasia de GALT. Seta preta em E indica necrose apical das volosidades.

Figura 32 - Fotomicrografia de íleos de rato coradas pelo método de hematoxilina eosina.



Registro em Microscópio Óptico Trinocular Motic, Software Moticam. A = grupo sedentário (40x); B = grupo treinado (100x); C = grupo treinado submetido ao exercício exaustivo (100x); D = grupo sedentário suplementado com alanil-glutamina (400x); E = grupo treinado suplementado com alanil-glutamina (40x); F = grupo treinado submetido ao exercício exaustivo suplementado com alanil-glutamina (100x). Setas brancas em, D, B e C indicam processo inflamatório linfocítico crônico. Seta preta em A, E e F indicam hiperplasia de GALT. Seta preta em B indica necrose das vilosidades

6 DISCUSÃO

Em inúmeros trabalhos da área de Fisiologia, o termo fadiga vem sendo definido como a “incapacidade para manter o rendimento de potência”, tanto em exercícios de resistência, como em estados de treinamento excessivo. O exercício prolongado, neste caso, pode ser considerado como um tipo de exercício excessivo, porque são exercícios contínuos, sustentados por períodos longos de tempo (> 90 min) e com intensidade abaixo de 85% do VO_2 MÁX (ROMANO; BORGES, 2007). No presente estudo investigamos nos grupos exaustão e grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina a concentração sanguínea de glicose, lactato e dos gases sanguíneos como parâmetros bioquímicos que estão envolvidos durante o exercício muscular prolongado.

Estudos mostram que a disponibilidade de carboidrato (CHO) como substrato para ressíntese de ATP dentro do músculo esquelético em contração e a função do sistema nervoso central são críticos para o desempenho de exercício submáximo prolongado (> 90 minutos) e exercício intermitente de alta intensidade, tendo um papel permissivo no desempenho em trabalhos de curta duração e alta intensidade (BURKE; HAWLEY, 2006). A importância da disponibilidade de carboidrato é demonstrada pela observação de que a fadiga durante exercício prolongado é frequentemente associada com a depleção dos estoques de glicogênio muscular, hipoglicemia ou ambos (COGGAN; COYLE, 1991). A falta de CHO resulta em redução nos níveis de piruvato. O piruvato é um substrato para a formação de Acetil-CoA e para reações que fornecem intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, e é necessário para oxidação contínua de ácidos graxos livres (AGL) e aminoácidos. Portanto, uma estratégia para retardar o início da depleção de CHO antes e durante o exercício (COGGAN; COYLE, 1991; BURKE; HAWLEY, 2006). Um recente estudo demonstrou em exercícios de baixa intensidade (63 % do VO_2 MÁX) com duração bem prolongada (180 min), que a suplementação de CHO pode aumentar a taxa de oxidação da glicose e poupar o glicogênio muscular (STELLINGWERFF *et.al.*, 2007). Tal procedimento aumenta rapidamente a concentração de glicose no sangue e preserva a taxa de oxidação posterior do CHO no exercício (COGGAN; COYLE, 1991), embora a ingestão de CHO durante o exercício diminua a liberação de glicose hepática (hipoglicemia de rebote) (MACARDLE *et. al.*, 2011). Nossos resultados em são condizentes com a literatura porque mostram que a concentração de glicose sanguínea nos grupos submetidos ao teste de exaustão (E e E-A/G) foram reduzidas depois do teste. Estes dados significam que a redução de glicose durante o exercício pode ser considerado um parâmetro bioquímico para avaliar a exaustão durante um exercício prolongado. Em relação

ao tempo, estes dados citados também confirmam que a suplementação com alanil-glutamina não interferiu no desempenho dos dois grupos submetidos ao teste de exaustão. Em nosso estudo postulamos a hipótese de que o grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina poderiam ter um maior desempenho durante o teste de exaustão, isto porque durante a exaustão ocorria depleção de CHO e, para manter os níveis de glicose sanguínea, o fígado e os rins utilizariam o lactato e aminoácidos como substrato (gliconeogênese). No entanto, no grupo de exaustão e grupo suplementado com alanil-glutamina não houve diferença em relação ao tempo de atingir a exaustão, significando que a suplementação não interferiu na *performance* dos ratos submetidos ao exercício intenso de natação.

De todos os possíveis aspectos relacionados com o exercício exaustivo, o acúmulo de lactato e íons H^+ provenientes do metabolismo anaeróbico, são com certeza os mais difundidos, como principais causadores da fadiga muscular (CAPUTO *et al.*, 2009). Todo trabalho muscular, mesmo o prolongado e de intensidade moderada (submáximo), geram lactato sanguíneo que, captado pelo fígado, será convertido em glicose no fígado (ciclo de Cori) a um custo de ATP superior e a uma velocidade inferior àquela formada a partir da glicogenólise hepática. Além do equilíbrio carbônico, esse processo é eficiente no tamponamento dos íons H^+ (ácido láctico) pelo fígado a um alto custo de oxigênio. Portanto, o processo de gliconeogênese hepática (a partir do lactato) é também influenciado pela aerobiose (CYRINO; BURINI, 1997). Assim, os exercícios de intensidade moderada causam ligeiro aumento nas concentrações de lactato. Ao contrário, os exercícios de alta intensidade e curta duração causam acentuada redução no pH (COSTILL *et al.*, 1984) associada à elevação dos íons H^+ e lactato. Desta forma, o íon H^+ é apontado como o principal causador da queda do desempenho e da fadiga nestes exercícios (IBANEZ *et al.*, 1995). No entanto, a visão de que o acúmulo de lactato e íons H^+ teriam um efeito negativo sobre o rendimento está sendo desafiada por recentes achados através de procedimentos experimentais realizados em fibras musculares isoladas. (PEDERSEN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2001). Estes estudos têm demonstrado que o acúmulo destes metabólitos pode aumentar a força de contração, diminuindo a inibição no processo de excitação-contracção causado, provavelmente, pelo acúmulo de K^+ extracelular. Isto é, quando o ácido láctico foi infundido na fibra fadigada contribuiu para que esta voltasse a responder aos estímulos elétricos (PEDERSEN *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2001). No entanto, uma falha na ativação muscular pode ser facilmente demonstrada durante contrações induzidas eletricamente em laboratório, ao contrário do exercício voluntário, no qual este comportamento não tem sido comumente observado. Desta forma, muitos pesquisadores têm questionado estes novos achados, sugerindo que eles seriam inicialmente válidos somente

para condições experimentais usadas, não sendo possível uma transferência desses achados para condições normais de exercício, utilizando grandes grupos musculares como, por exemplo, a corrida (CAPUTO *et al.*, 2009). Em nossos resultados, o lactato medido antes, durante e depois do teste de exaustão estão de acordo com os dados citados na literatura. Nos grupos dos ratos treinados e submetidos ao teste de exaustão houve em ligeiro aumento da concentração de lactato durante e depois do teste em relação à concentração de lactato mensurada antes (basal) do teste. Estes dados significam que estes mesmos grupos estavam em processo de fadiga.

Durante o exercício exaustivo a concentração de H^+ é aumentada em virtude da produção de CO_2 e da formação de lactato (JUEL *et al.*, 2003). O aumento da concentração de H^+ pode comprometer a realização do exercício físico por reduzir a capacidade da célula muscular em produzir ATP, inibindo as enzimas limitadoras de velocidade envolvidas na produção aeróbia e anaeróbia de ATP (EDWARDS, 1983). Os íons H^+ também competem com os íons Ca^{2+} pelos sítios de ligação da troponina e, dessa forma, impedem o processo contrátil (EDWARDS, 1983). Consequentemente, a fadiga é anunciada e a capacidade do músculo manter contração fica comprometida (ROHLFS *et al.*, 2005).

O objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos causados pelo exercício prolongado e exaustivo na permeabilidade intestinal e, para comprovar que os animais que foram submetidos ao teste de exaustão estavam mesmo em processo de fadiga realizamos o procedimento da gasometria (pH_V , $PvCO_2$, HCO_3^- , BE, PvO_2 e $S_{atv}O_2$) de todos os grupos e depois comparamos os resultados obtidos. Em relação à concentração de pH observamos uma redução significativa dos grupos que realizaram o teste de exaustão em relação ao grupos sedentário e sedentário suplementado com alanil-glutamina. Entretanto, com a $PvCO_2$ observamos que houve um aumento com os mesmos grupos analisados. Segundo Curi e Procópio (2011), o acúmulo de CO_2 aumenta a quantidade de íons livres no sangue. Logo, o pH tende a cair, produzindo acidose. Como a causa dessa acidose é a acumulação de CO_2 devido à ineficiência do mecanismo respiratório, a acidose produzida é denominada acidose respiratória.

Ao analisarmos a concentração de HCO_3^- observamos que não houve diferença entre todos os grupos avaliados, mas em relação ao excesso de bases houve uma diferença significativa entre os grupos que realizaram o teste de exaustão em relação aos grupos sedentário e sedentário suplementado com alanil-glutamina. Segundo Porth (2004) o íon HCO_3^- é um regulador metabólico, e, quando há excesso de H^+ livres, o HCO_3^- combina-se ao H^+ em excesso e forma H_2CO_2 que por sua vez se decompõe em CO_2 e água. O excesso de

CO₂ é eliminado pelo mecanismo respiratório e a água é eliminada pelos rins. O excesso ou déficit de bases medem o nível dos sistemas-tampões do sangue. Um excesso de base indica alcalose metabólica e um déficit de base, acidose metabólica. Curiosamente, observamos que os animais sedentários suplementados com alanil-glutamina tiveram um aumento significativo do pH sanguíneo assim como tiveram resultado positivo para o excesso de bases, indicando um excesso de bases na sangue. De acordo com a literatura, a glutamina é um aminoácido importante no equilíbrio ácido básico, especialmente no rim, onde age como tampão para o excesso de H⁺, auxiliando na excreção da amônia. Além disso, durante a oxidação do esqueleto carbônico da glutamina há produção de bicarbonato (ROWBOTTOM *et. al.*, 1996). Desta forma, possivelmente, o excesso de glutamina suplementada nos animais que não executavam qualquer exercício, ao ser oxidada, promoveria um excesso de produção de bicarbonato. Mesmo que essa produção pudesse ocorrer também nos animais dos grupos em treinamento, sugerimos que esse aumento da produção de bicarbonato nesses grupos fosse usado para tamponar a acidez promovida pelo exercício. Porém, esta hipótese não foi devidamente comprovada já que os índices de bicarbonato não foram influenciados em nenhum dos grupos experimentais, pois o erro padrão entre os animais interferiu na análise estatística. Talvez um maior número de testes possa comprovar tal hipótese.

Em relação a PO₂ não observamos diferença significava entre todos os grupos analisados, diferentemente da SO₂ em que houve uma redução significativa nos grupos submetidos ao teste de exaustão em relação aos grupos sedentário e sedentário suplementado com alanil-glutamina. Segundo a literatura científica, quando a P_vO₂ no sangue venoso está abaixo dos valores de 35-40 mmHg significa que a extração de oxigênio pelos tecidos esta aumentada (Porth, 2004). Em resumo, pelos dados observados e, analisando todos os resultados da gasometria, sugerimos que os grupos submetidos ao teste de exaustão estavam provavelmente no processo de acidose metabólica não recompensada pelo sistema respiratório, ou seja, fadigado em relação aos grupos sedentário e sedentário suplementado com alanil-glutamina.

O exercício predominantemente aeróbio e de longa duração, como aquele executado por maratonistas, triatletas e ciclistas, pode provocar sintomas gastrintestinais, tais como diarreia, cólicas, sangramento nas fezes e vontade de defecar (LIRA *et al.*, 2008). A maioria dos trabalhos afirma que de 20 a 50% da população praticante de esportes de longa duração apresenta pelo menos um destes sintomas (GIL *et al.*, 1998). Durante a realização da prática de exercícios físicos, ocorrem nos órgãos e sistemas uma redistribuição do volume sanguíneo em direção às áreas de maior necessidade metabólica, deixando outras com suprimento

sanguíneo insuficiente, o que afeta a permeabilidade intestinal que, frente a atividades mais intensas, é submetido a uma situação reduzida de perfusão (BROUNS *et al.*, 1993). Não somente o fluxo sanguíneo reduzido durante o exercício, mas também o estresse térmico pode influenciar no aumento da permeabilidade da barreira intestinal. Em um estudo realizado por Pals *et al.* (1997) utilizando lactulose (L) e ramnose (R) como marcador molecular para avaliar a permeabilidade intestinal em corredores em diferentes intensidades (40%, 60% e 80% do VO_2 MÁX) e em repouso, eles demonstraram que o exercício a 80% do VO_2 MÁX aumentou o percentual de excreção do lactulose e a relação L/R em comparação ao percentual de excreção de lactulose em repouso e em intensidades de 40 e 60%. Esse estudo demonstrou que o exercício com intensidade de 80% do VO_2 MÁX foi capaz de aumentar a permeabilidade intestinal. Em um estudo mais recente, Marchbank *et al.* investigaram os efeitos do colostro bovino sobre a permeabilidade intestinal em corredores submetidos a exercício com intensidade de 80% do VO_2 MÁX, utilizando também os mesmos marcadores do estudo anterior. Estes autores também demonstraram aumento da permeabilidade intestinal em corredores se exercitando a 80% do VO_2 MÁX.

Para reverter ou proteger contra estes efeitos, as pesquisas científicas têm investigado e sugerido a utilização de suplementos dietéticos que pudessem supra-regular as proteínas de choque térmico (HSPs) e, assim, proteger as junções firmes de agentes estressores, tais como a doença inflamatória do intestino e o exercício (ZUHL *et al.*, 2012). As HSPs são moléculas intracelulares da família das chaperonas que auxiliam na manutenção celular e síntese de proteína (ZUHL *et al.*, 2012). Quando a célula é exposta a algum de tipo de estresse, são desencadeadas respostas intracelulares, com o objetivo de proteger a célula de uma possível lesão. Essas respostas tem início com a redução transitória da síntese de proteínas consideradas não vitais, seguida por aumento na transcrição, tradução e expressão de genes específicos que levam ao aumento na concentração das HSPs (WISCHMEYER, 2002). As HSPs são consideradas essenciais no processo de recuperação celular. Evidências experimentais indicam que o aumento da disponibilidade de glutamina às células pode aumentar a expressão das HSPs, o que mantém a capacidade da célula em resistir lesões (SANDERS; KON, 1991). Em um estudo realizado por Wischmeyer *et al.* (1997) foi demonstrado que a glutamina teve um efeito protetor quando adicionada em meio à cultura de células intestinais de ratos submetidos a lesões do tipo oxidativo.

A glutamina é um importante substrato celular não somente por ser um aminoácido, mas por também ser fonte de energia – de nitrogênio e de carbono – para a síntese de outras moléculas. É um percussor de síntese de nucleotídeos, tais como ATP, purinas, pirimidinas e

outros aminoácidos (FONTANA *et al.*, 2003). A oxidação da glutamina pode gerar ATP para recuperação celular e, em verdade, a glutamina é o principal combustível respiratório de algumas células, tais como os enterócitos e linfócitos (MILLER, 1999). A quantidade total de energia celular derivada da glutamina depende da extensão de sua oxidação e da taxa de sua utilização. Em um estudo realizado com animais exercitados e submetidos a teste de exaustão Rogero *et al.* (2002) observaram que a suplementação crônica com alanil-glutamina promoveu maior concentração de glutamina nos músculos sóleo e gastrocnêmico imediatamente após o teste de exaustão em relação aos grupos controle e suplementado com glutamina livre. Esses estudos *in vivo* demonstram que a utilização de glutamina na forma de alanil-glutamina pode vir a ser uma interessante alternativa nutricional para o fornecimento de glutamina via oral ao organismo, tanto em situações de repouso quanto em situações de estresse metabólico, como em exercícios físicos intensos e prolongados. Não podemos nos esquecer da modulação hormonal principalmente do cortisol, que durante o exercício encontra-se elevado, aumentando a atividade da glutaminase nos enterócitos intestinais, estimulando o aumento da degradação e utilização da glutamina nessas células (MILLER, 1999). O cortisol também provoca aumento de proteólise em outros tecidos e estimula a liberação de glutamina pelo músculo esquelético. Embora essa resposta adaptativa forneça assistência para ajudar a manter a integridade da barreira, o estresse prolongado diminui a glutamina no músculo esquelético e, conseqüentemente, privaria os enterócitos (que estão usando mais glutamina em seu estado estressado) de fornecimento vital de glutamina (MILLER, 1999).

Nosso estudo está de acordo com os dados apresentados pela literatura em relação ao percentual de excreção do lactulose. Mostramos que o exercício prolongado e exaustivo aumentou a permeabilidade intestinal. Este aumento aconteceu provavelmente pelo fluxo sanguíneo reduzido e o estresse térmico que alteraram a homeostase da célula intestinal causando hipóxia, acidose, depleção de ATP e estresse oxidativo, aumentando a permeabilidade de moléculas indesejáveis e incitando uma resposta inflamatória. Em relação ao grupo exaustão suplementado com alanil-glutamina observamos que a suplementação reduziu o efeito causado pelo exercício prolongado e exaustivo na permeabilidade intestinal. Sugerimos que esse efeito tenha ocorrido provavelmente devido aos efeitos benéficos causados pela glutamina na célula intestinal, principalmente durante a suplementação crônica onde, segundo a literatura, ocorre aumento na concentração de glutamina no sangue, fornecendo substrato para a síntese de ATP no enterócito. Aumentos nos níveis de expressão

das HSPs e diminuição de espécies reativas de oxigênio causado pela suplementação de glutamina também poderiam estar contribuindo para esta redução do aumento permeabilidade.

Em relação à excreção do manitol observamos que o exercício prolongado e exaustivo provocou um aumento significativo nos grupos submetidos ao teste de exaustão. Sabemos que a quantidade de manitol recuperada na urina nos deu uma indicação da área de superfície de absorção do intestino delgado, por ser absorvido passivamente através da mucosa. Se neste experimento o manitol estivesse diminuído provavelmente a área de absorção intestinal estaria reduzida ou lesada. Se este percentual não estivesse alterado poderíamos considerar que a integridade da barreira intestinal estava normal, ou seja, igual ao controle. Como neste experimento houve uma maior excreção de manitol, podemos supor uma maior absorção transepitelial passiva sem perda da área de absorção. Uma possível explicação para este efeito seria a concentração da dose de alanil-glutamina administrada neste experimento. Segundo Lima e colaboradores (2007) uma dose acima de 50 mM de glutamina não seria capaz de estimular a proliferação de células intestinais em cultura. Como utilizamos uma concentração de 138 mM de alanil-glutamina, essa dose provavelmente teria influenciado negativamente na modulação de células pluripotentes no processo de renovação celular (proliferação). Sugerimos que esse efeito aumentado do manitol seja um mecanismo compensatório utilizado pela célula intestinal como forma de manter um aporte adequado de energia, já que durante o exercício ocorreu no TGI uma diminuição do aporte de nutrientes devido ao fluxo sanguíneo reduzido. Vale salientar que esta mesma concentração de alanil-glutamina foi empregada no grupo sedentário suplementado. Porém, neste último grupo o transporte paracelular de manitol pela célula intestinal não foi significativamente diferente dos animais dos grupos sedentários não suplementados. Isso mostra que o efeito do aumento do transporte de manitol foi exercido pelo exercício exaustivo.

Demonstramos também neste estudo que esse efeito causado pelo exercício prolongado e exaustivo na permeabilidade intestinal é temporário, ou seja, 72 horas após o teste de exaustão a permeabilidade foi restabelecida.

Analizamos ainda neste trabalho a transcrição de algumas junções firmes como zônulas de oclusão-1 (ZO-1), claudina2 e ocludina. Estudos têm demonstrado que a privação de glutamina diminui a expressão das junções firmes ocludina, ZO-1 e claudina-1 nas células Caco-2 (LI; NEU, 2008). Em outro estudo Beutheu *et al.* (2013) observaram que a glutamina e arginina aumentaram a expressão das junções firmes ocludina e ZO-1 em células intestinais Caco-2 submetidas ao tratamento com o metotrexato. Estes achados demonstraram que a glutamina e arginina foram capazes de modular a expressão das proteínas de junções firmes.

No presente estudo observamos que a expressão de ZO-1 e ocludina apresentaram padrões similares de alteração. Nossos resultados mostraram que a suplementação com alanil-glutamina em animais sedentários aumentou a expressão tanto da ZO-1, como da ocludina.

Em relação aos outros grupos estudados para estas mesmas junções firmes relatamos em uma sessão anterior que durante o exercício físico ocorre, no trato gastrointestinal, uma redução do fluxo sanguíneo. Segundo Casey *et al.* (2005) esta isquemia é definida como uma adaptação do exercício, que redireciona o fluxo sanguíneo para os músculos ativos e para a vasculatura pulmonar. Em relação ao aumento da transcrição destas junções firmes no grupo treinado e exaustivo, sugerimos que este aumento ocorreu provavelmente devido as adaptações provocadas pelo exercício, ou seja, durante estas doze semanas de treinamento o trato gastrointestinal destes animais se adaptaram a este ambiente isquêmico, promovendo alterações moleculares na fisiologia celular da célula intestinal, fazendo com que ocorresse aumento da expressão de RNAm desses genes. Nos grupos T-A/G e E- A/G observamos uma redução destas proteínas mostrando que alanil-glutamina reverteu o aumento da transcrição do RNAm destas proteínas.

Propriedades da junção firme Claudina-2 foram reveladas em experimentos usando células MDCK de rim canino. Nestas células, o aumento da expressão proteica de claudina-2 resultou na redução da resistência elétrica transepitelial (TER) e um aumento na seletividade de cátions (FURUSE *et al.*, 2001). Em um estudo realizado por ZHANG *et al.* (2013), usando a bactéria Salmonela como modelo de colite em ratos e células epiteliais de cólon em cultura, eles observaram que a colonização patogênica por Salmonela aumentou significativamente os níveis de proteína e RNAm da claudina-2 no intestino, demonstrando que esta proteína estava envolvida na redução da TER e no aumento da permeabilidade. Em nosso estudo observamos uma queda da transcrição de claudina -2 nos animais sedentários e suplementados com A/G e um aumento significativo na expressão do RNAm da claudina-2 no grupo E em relação aos grupos S e T. Estes dados reforçam nossos resultados obtidos com o teste de L/M na permeabilidade intestinal, principalmente em relação ao lactulose, já que houve um aumento significativo da excreção desse açúcar no grupo E. Sugerimos que o exercício prolongado e exaustivo esteja modulando esta junção firme e que ela provavelmente esteja reduzindo TER e aumentando a permeabilidade paracelular. Porém, em relação ao grupo E-A/G observamos uma redução significativa do RNAm da claudina-2 em relação ao grupo E, demonstrando que a alanil-glutamina reduziu provavelmente este efeito provocado pela claudina-2 mantendo a TER.

A reversão observada para a expressão de claudina-2 também foi observada para ZO-1 e ocludina. Esses dados podem sugerir que a alanil-glutamina exerça efeitos distintos nessas proteínas. O efeito protetor para ZO-1 e ocludina esteja provavelmente relacionado com uma ação mecânica, impedindo o afastamento entre as células e, conseqüentemente, mantendo a permeabilidade intestinal. Porém, talvez o efeito da alanil-glutamina sobre a expressão da claudina-2 esteja relacionado com uma função eletrolítica, quanto menor a expressão de claudina-2 menor seria o transporte de cátions para o meio paracelular e, conseqüente redução da permeabilidade.

A presença do PEPT-1 representa a principal via de absorção dos produtos finais da digestão de proteínas, permitindo que dipeptídeos sejam transportados para a mucosa intestinal. Em estudos realizados por Nüssl *et al.* (2011) eles investigaram a importância do PEPT-1 na absorção total de aminoácidos em plasma de camundongos com e sem falta do transportador PEPT-1. Eles observaram neste estudo que os níveis de aminoácidos totais no plasma estavam aumentados nos camundongos com a falta deste transportador comparado com os camundongos com o transportador, sugerindo a importância deste transportador na absorção destes dipeptídeos. Em outro estudo realizado por Thamocharan *et al.* (1999) foi demonstrado que a expressão de PEPT-1 foi aumentada em ratos submetidos ao breve jejum comparado com os ratos em estado alimentado. Neste estudo observamos aumentos na expressão do RNAm do PEPT-1 no grupo S-A/G, demonstrando a importância deste transportador na absorção da alanil-glutamina nesse grupo. Desta forma, um maior aporte de dipeptídeos na alimentação estimularia a célula intestinal a aumentar o transportador destes componentes. Entretanto, os grupos T e E também estimularam a transcrição deste transportador. Isso poderia ser explicado, possivelmente, pelo processo adaptativo provocado pelo exercício. Se a célula necessita de energia para funcionar e o exercício consome essa energia, aumentar a expressão deste transportador ajudaria a célula a aumentar o aporte nutricional dos enterócitos. Porém, esse processo adaptativo pode ser desnecessário se a célula intestinal tem aporte suplementado de nutriente, no caso deste trabalho, a suplementação com o dipeptídeo A/G. Talvez por isso tenhamos observado a redução da expressão do PEPT-1 quando a A/G foi suplementada.

A análise histopatológica de todos os grupos demonstrou, especialmente nos grupos treinados e treinados com teste exaustivo, a presença de células inflamatórias em todas as porções do intestino. Inclusive, pudemos observar também hiperplasia do tecido linfóide associado ao intestino (*gut-associated lymphoid tissue* – GALT). Todo este processo

inflamatório pode estar relacionado com a isquemia promovida pelo exercício no TGI (CASEY *et al.*, 2005). Porém, de acordo com nossos achados a alanil-glutamina não interferiu nesse processo. Entretanto, os resultados histopatológicos, de certa forma, foram contraditórios em relação com nossos achados da excreção do manitol. Observamos especialmente nos grupos treinados, na presença ou ausência da suplementação com alanil-glutamina, um achatamento do pregueado mucoso. Esta observação poderia nos indicar uma diminuição da área de absorção e conseqüentemente uma diminuição da excreção do manitol. Porém, observamos aumento da excreção do manitol exclusivamente nos grupos que executaram o teste exaustivo. Talvez, uma análise quantitativa mais acurada de todas as lâminas histológicas poderia explicar essa contradição.

7 CONCLUSÕES

- A suplementação com alanil-glutamina reverteu o aumento da permeabilidade intestinal paracelular causada pelo exercício prolongado e exaustivo provavelmente por um mecanismo mecânico exercido nas junções firmes Occludina e ZO-1, que estariam envolvidas no processo de aproximação/afastamento entre os enterócitos, e eletrolítico, observado pela inibição da expressão de claudina-2 responsável pelo aumento da resistência transepitelial e dos poros seletivos para cátions;
- A alanil-glutamina não interferiu no equilíbrio ácido-base nos grupos submetidos ao exercício, mas promoveu alcalose nos animais sedentários suplementados;
- O efeito do aumento de permeabilidade intestinal durante o exercício foi temporário.

REFERÊNCIAS

- ADIBI, S. A. Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 285, p. G779-788, 2003.
- AGOSTINI, F.; BIOLO, G. Effect of physical activity on glutamine metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic.Care.**, v. 13, p. 58-64, 2010.
- ANGELOW, S.; AHLSTROM, R.; YU, A. S. L. Biology of claudins. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 295, p. F867-F876, 2008.
- ASSIMAKOPOULOS, S. F.; PAPAGEORGIOU, I.; CHARONIS, A. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. **World J. Gastrointest. Pathophysiol.**, v. 15, n. 2(6), p. 23-137, December 2011.
- BRUM, P. C.; FORJAZ, C. L. M.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C. E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, São Paulo, v.18, p.21-31, ago. 2004.
- BAUM, B.; GEORGIOU, M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment maintenance and remodeling. **J. Cell. Biol.**, v. 192, n. 6, p. 907-917, 2011.
- BERGSTRÖM, J.; FURST, P.; NOREE, L.O. AND VINNARS, E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. **J Appl. Physiol.**,v. 36, p.693-697,1997.
- BERTRAND, J.; GOICHON, A.; DÉCHELOTTE, P.; COËFFIEER, M. Regulation of intestinal protein metabolism by amino acids. **Amino Acids.**, v.15, May 2012.
- BEUTHEU, S.; GHOUZALI, I.; GALAS, L.; DÉCHELOTTE, P.; COËFFIER, M. Glutamine and arginine improve permeability and tight junctions protein expression in methotrexate-treated Caco-2 cells. **Clinical Nutrition**, 2013.
- BRÖER, STEFAN. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 249-286, 2008.
- BROUNS, F.; BECKERS, E. Is the gut an athletic organ? Digestion, absorption and exercise. **Sports Med.**, v. 15, n.4, p. 242-57, 1993.
- BURKE, L. M.; HAWLEY, J. A. Fat and carbohydrate for exercise. **Curr. Poin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 9, p.476-481, 2006
- BURKE, L. M.; LOUKCKS, A. B.; BROAD, N. Energy and carbohydrate for training and recovery. **Journal of Sports Sciences**, v. 24, n.7, p. 675-685, July 2006.
- BUSHEN, O.Y.; DAVENPORT, J.A.; LIMA, A. B.; PISCITELLI, S. C.; UZGIRIS, A. J.; SILVA, T. M.; LEITE, R.; KOSEK, M.; DILLINGHAM, R. G.; GIRÃO, A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; Diarrhea and reduced levels of antiretroviral drugs; improvement with glutamine or alanyl-glutamine in a randomized controlled trial in northeast Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v.38, n.12, p.1764-1770, 2004

CAPUTO, F.; OLIVEIRA, M. F. M.; GRECO, C. C. E DENADAI, B. S. Exercício aeróbio: aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índice de desempenho. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, v. 11, n.1, p. 94-102, 2009.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; BUSHEN, O. Y.; BRITO, G. A. C.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Glutamine analogues as adjunctivetherapy for infections diarrhea. **Current Infections Disease Reports.**, v. 5, p.114-119, 2003.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, I. P. F.; ARAÚJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G. H. P.; BRITO, G. A. C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S. M. N.; SANTOS, F. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal barrier function and secretion methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 1. P. 65-72, 2004.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; FUJII, J.; BRITO, G. A.; ALCÂNTARA, C.; ÓRIA, R. B.; LIMA, A. A.; OBRIG, T.; GUERRANT, R. L. Caspase and bid involvement in clostridium difficile toxin-A induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. **Infect. Immun.**, v. 74, p.81-7, 2006.

CASEY, E.; MISTRY, D. J.; MACKNIGHT, J. M.. Training room management of medical conditions: Sports Gastroenterology. **Clin. Sports Med.**, v. 24, p. 525-540, 2005.

COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports Med.**, v. 37, n.9, p.737-763, 2007.

COGGAN, A. R.; COYLE, E. F. Carbohydrate ingestion during prolonged exercise: effects on metabolism and performance. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 19, p. 1-40, 1991.

COSTIL, D. L.; VERSTAPPEN, F.; KUIPER, H.; JANSEN, E.; FINK, W. Acid-base balance during repeated bouts of exercise: influence of HCO₃. **Int. J. Sports Med.**, v. 5, n.5, p. 228-31, oct. 1984.

CRUZAT, V. F.; PETRY, E. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: Aspectos Bioquímicos, Metabólicos, Moleculares e Suplementação. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 15, n.5, set./out. 2009.

CYRINO, E. S.; BURINI, R. C. Modulação nutricional da fadiga. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v. 2, n.2, p. 67-74, 1997.

CURI, R. Glutamina e exercício. In: CURI, R. **Glutamina – Metabolismo e Aplicações Clínicas e no Esporte**. São Paulo: Sprint, 2000. P. 243-252.

CURI, R.; PROCÓPIO, J. **Fisiologia Básica**. Guanabara Koogan, 2011.

DA SILVA, E.; MALDONADO, I. R. S. C.; DA MATA, S. L. P.; MAIA, G. C.; BOZI, L. H. M.; DA SILVA, K. A.; CASTRO, C. A.; NATALI, A. J. Treinamento em natação com baixa intensidade não protege músculo esquelético contra lesões induzidas por exercício exaustivo em ratos. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.17, n.3, maio/jun. 2011.

DUDRICK, P. S.; SALLOUM, R. M.; COPELAND, E. M.; SOUBA, W.W. The early response of jejunal brush border glutamine transporter to endotoxemia. **Journal of Surgical Research.**, v. 52, p.372-377, 1992.

EDWARDS, R. H. T. Biochemical bases of fatigue in exercise performance: Catastrophe theory of muscular fatigue. **Biochemistry of exercise**, 1983.

FAN, M. Z.; ADEOLA, O.; MCBURNEY, M. I.; CHEESEMAN, C. I. Kinetic analysis of L-glutamine transport into porcine jejunal enterocyte brush-border membrane vesicles. **Comparative Biochemistry and Physiology.**, Part A. 121, p.411-422, 1998.

FINDLEY, M. K.; KOVAL, M. Regulation and roles for claudin-family tight junctions proteins. **IUBMB Life. April**, v. 61, n.4, p.431-437, 2009.

FONTANA, K. E.; VALDES, H.; BALDISSERA. Glutamina como suplemento ergogênico. **R. Bras. Ci. E Mov. Brasília**, v. 11, n. 3, p. 91-96, jul./set. 2003.

FÜRST, PETER. New developments in glutamine delivery. **American society for Nutritional Sciences**, 2001.

FURUSE, M.; FURUSE, K.; SASAKI, H.; TSUKITA, S. Conversion of Zonula Occidentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby Canine Kidney I cells. **The Journal of Cell Biology**,v. 153, n.2, p. 263-272, 2001.

GARCIA-JÚNIOR, J. R.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. Consequências do exercício para o metabolismo da glutamina e função imuni. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 6, n.3, maio/jun. 2000.

GLEESON, M. Interrelation ship between physical activity and Branched-Chain amino acids. **American Society for Nutritional Sciences**, 2008.

GLEESON, M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. **The Journal of Nutrition**, 2008.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. Oxidants, Antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reative species. **Oxidative Medicine and Celular Longevity**, v. 12, 2012.

GONZLALEZ-MARICAL, L.; BETANZOS, A.; NAVA, P.; JARAMILLO, B. E. Tight junctions proteins. **Progress in Biophysios& Molecular Biology**, v.81, p.1-44, 2003.

GIL, S. M.; YAZAKI, E.; EVANS, D. F. Aetiology of running-related gastrointestinal dysfunction. How far is the finishing line ? **Sports Med.**, v. 26, p.365-78, 1998.

HAWLEY, J. A.; SPARGO, F. J. Metabolic adaptations to marathon training and Racing. **Sports Med.**, v. 37, n.4, 5, p.328-331, 2007.

HISCOCK, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise-induced immunodepression – plasma glutamine is not the link. **J. Appl. Physiol.**, v.93, p.813-822, 2002.

- HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N. A.; KANG, J.; RASHTI, S. L.; KELLY, N.; GONZALEZ, A. M.; STEC, M.; ANDERSON, S.; BAILEY, B. L.; YAMAMOTO, L. M.; HOM, L. L.; KUPCHAK, B. R.; FAIGENBAUM, A. D.; MARESH, C. M. Examination of the efficacy of acute L-alanyl-L-glutamina ingestion during hydration stress in endurance exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 7, n.8, 2010.
- HOPPELER, H.; BILLETER, R. Conditions for oxygen and substrate transport in muscles in exercising mammals. **J. Exp. Biol.**, v. 160, p.263-283, 1991.
- IBANEZ, J.; PULLINEN, T.; GOROSTIAGA, E.; POSTIGO, A.; MERO, A. Blood lactate and ammonia in short term anaerobic work following induced alkalosis. **J. Sports Med. Phys. Fitness.**, v. 35, n.3, p.187-93, sep.1995.
- JUEL, C.; KLARSKOV, C.; NIELSEN, J. J.; KRUSTRUP, P.; MOHR, M.; BANGSBO, J. Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. **Am. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286, p. E-245-251, 2004.
- LABOW, B. I.; SOUBA, W.W. Glutamine. **World J. Surg.**, v. 24, p.1503-1513, 2000.
- LAL-NAG, M.; MORIN, P. The Claudins. **Genome Biology.**, v. 10, p.235, 2009.
- LAMBERT, G. P. Role of gastrointestinal permeability in exertional heatstroke. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, n. 4, p. 185-190, 2004.
- LAMBERT, G. P.; BOYLAN, M.; LAVENTURE, J. P.; BULL, A.; LANSPA, S. Effect os aspirin and ibuprofen on gastrointestinal permeability during exercise. **Int. J. Sports Med.**, v. 28, p. 722-726, 2007.
- LAMBERT, G. P. Stress-induzido gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. **J. Anim.**, v. 87, p.E101-E108, 2009.
- LANCHA JR., A. H.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; ROGERI, P. S. **Suplementação Nutricional no Esporte**. Guanabara Koogan, 2009.
- LEANDRO, C. G.; CASTRO, R. M.; NASCIMENTO, E.; PITHON-CURI, T. C.; CURTI, R. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 13, n.5, set./out. 2007.
- LI, N.; NEU, J. Glutamine deprivation alters intestinal tight junctions via PI3-K/AkT mediated pathway in Caco-2 cells. **The Journal of Nutrition**, 2009.
- LIMA, A. A. M. **Glutamina e alanil-glutamina: síntese química, efeito no transporte de água, eletrólitos e permeabilidade intestinal**. 1998. 238f. Tese (doutorado).-- Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 1998.
- LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in children: Epidemiologic, rick factors, pathophysiology, nutritional impact and management. **Epidemiol. Rev.**, v. 14, p.222-242, 1992.

LIMA, A. A.; CARVALHO, G. H.; FIGUEIREDO, A. A.; GIFONNI, A. R.; SOARES, A. M.; SILVA, E. A.; GUERRANT, R. L. Effects of an alanyl-glutamine based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, v.2, n.18, p.458-62, 2002.

LIMA, N. L.; SOARES, A. M.; MOTA, R. M. S.; MONTEIRO, H. S. A.; GUERRANT, R. A.; LIMA, A. A. M. Wasting and intestinal barrier function children taking alanil-glutamine supplement enteral formula. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 44, p. 365-374, 2007.

LIRA, C. A. B.; VANCINI, R. L.; DA SILVA, A. C.; NOVAILHETAS, V. L. A. Efeitos do exercício físico sobre o trato gastrointestinal. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 14, n.1, jan./fev. 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)). **Method.**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Ion transport in the intestine. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p.87-91, 2009.

KREBS, H. A. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochemical Laboratory**, Cambridge, Jun, 1935.

MAGNUS, SIMRÉN. Physical activity and the gastrointestinal tract. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 10, 2002.

MAILLIARD, M. E.; STEVENS, B. R.; MANN, G. E. Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. **Gastroenterology**, v. 108, p.888-910, 1995.

MAUGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENNHAF, P. L. **Bioquímica do exercício e treinamento**. Manole, 2000.

MARCHBANK, T.; DAVISON, G.; OAKES, J. R.; GHATEI, M. A.; PATTERSON, M.; MILLER, A. L. Therapeutic Considerations of L-Glutamine: A Review of the Literature. **Alternative Medicine Review**, v. 4, n. 4, 1999.

MOYER, M. P.; PLAYFORD, R. J. The nutraceutical bovine colostrum truncates the increase in gut permeability caused by heavy exercise in athletes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 300, p.G477-G484, 2011.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do Exercício e desempenho humano**. Sétima Edição. Guanabara Koogan, 2011.

NÄSSL, A. M.; ALIAGA, I. R.; FENSELAU, H.; MARTH, M. K.; KOTTRA, G.; DANIEL, H. Amino acid absorption and homeostasis in mice lacking the intestinal peptide transporter PEPT-1. **Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.301, p.G128-G137, 2011.

NIELSEN, O. B.; PAOLI, F.; OVERGAARD, K. Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 536, n.1, p.161-166, 2001.

- OLIVEIRA, G. P.; DIAS, C. M.; PELOSI, P.; ROCCO, P. R. M. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n.2, p. 417-430, 2010.
- OVERGAARD, C. E.; DAUGHERTY, B. L.; MITCHELL, L. A.; KOVAL, M. Claudins: Control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 5, 2011.
- PEDERSEN, T. H.; NIELSEN, O. B.; LAMB, G. D.; STEPHENSON, D. G. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. **Science**, v.305, 2004.
- PALS, K. L.; CHANG, RAY-TAI; RYAN, A. J.; GISOLFI, C. V. Effect of running intensity on intestinal permeability. **J. Appl. Physiol.**, v. 82, p.571-576, 1997.
- PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S. H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G. D. Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 1, p.223-236, 2006.
- PETERS, H. P.; DE VRIES, W. R.; VAN BERGE-HENEGOUWEN, G. P.; AKKERMANS, L. M. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. **Gut.**, v. 48, p.435-9, 2001.
- PORTH, C. M.; **Fisiopatologia**. Sexta Edição. Guanabara Koogan, 2004.
- PORTO, M.; ORSATTI, F. L.; BERGE-SANTOS, M. D.; BURINI, R. C. Impacto do exercício muscular exaustivo sobre indicadores sanguíneos em praticantes de musculação. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, v. 10, n.3, p.230-236, 1995.
- POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício-Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 5. ed. Manole, 2005.
- RENNIE, M. J.; BOHE, J.; SMITH, K.; WACKERHAGE, H.; GREENHAFF, P. Branched-Chain amino acids as fuels and anabolic signals in human muscle. **American Society for Nutrition**, 2006.
- ROCCI, L.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre exercício físico, fadiga e nutrição. **Rev. Paul. de Educ. Fís.**, São Paulo, v. 13, n.1, p.67-82, jan./jun. 1999.
- ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, p.R502-R516, 2004.
- ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J.; PEDROSA, R. G.; CASTRO, I. A. de; PIRES, I. S. O.; OLIVEIRA, A. A. M.; SALGADO, M. M.; PINTO, A. R.; UEDA, M.. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, out./dez. 2002.

- ROMANO, L.; BORGES, I. P. A suplementação de glutamina não reverte a imunossupressão induzida pelo exercício. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, São Paulo, v.1, n.1, p.65-78, jan./fev. 2007.
- ROHFS, I. C. P. M.; MARA, L. S.; LIMA, W. C.; CARVALHO, T.. Relação da síndrome do excesso de treinamento com estresse, fadiga e serotonina. **Rev. Bras. Med. Esporte**. 11, n. 6, nov./dez. 2005.
- ROWBOTTOM, G. D.; KEAST, D.; MORTON, R. A. The emerging Role of Glutamine as an Indicator of Exercise Stress and Overtraining. **Sport Med.**, v. 21, n. 2, p. 80-97, 1996.
- SANDRES, M. M.; KON, C. Glutamine is a power full effector of heat shock protein expression in drosophila Kc cells. **Am. J. Cell Physiol.**, v. 146, p. 180-90, 1991.
- SANT'ANNA, J. E.; PEREIRA, M. G. A. G.; DA SILVA, V. J. D.; DAMBRÓS, C.; COSTA-NETO, C. M.; SOUZA, H. C. D. Effect of the duration of daily aerobic physical training on cardiac autonomic adaptations. **Autonomic Neuroscience Basic and clinical**, v.159, p.32-37, 2011.
- SANTOS, R. V. T.; BASSIT, R. A.; CAPERUTO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. B. P. The effect of creatine supplementation upon inflammatory and muscle soreness markers after a 30 Km race. **Life Sciences**, v. 75, p.1917-1924, 2004.
- SILVA, M. A. G.; MARTINS, L. M. W.; ALBERNAZ, R. M.; QUEIROZ-NETO, A.; LACERDA-NETO, J. C. Determinação de eletrólitos, gases sanguíneos, osmolalidade, hematócrito, hemoglobina, base titulável e *anion gap* no sangue venoso de equinos destreinados submetidos a exercício máximo e submáximo em esteira rolante. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 5, p. 1021-1027, 2009.
- SILVEIRA, L. R.; PINHEIRO, C. H. J.; ZOPPI, C. C.; HIRABARA, S. M.; VITZEL, .; BASSIT, R. A.; LEANDRO, C. G.; BARBOSA, M. R.; SAMPAIO, I. H.; MELO, I. H. P.; FIAMONCINI, J.; CARNEIRO, E. M.; CURI, R. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55/5, 2011.
- SOUBA, W. W.; COPELAND, E. M. Cytokine modulation of Na⁺ dependent glutamine transport across the brush border membrane of monolayers of human intestinal Caco-2 cells. **Ann. Surg.**, May 1992.
- STELLINGWERFF, T.; BOON, H.; GIJSEN, A. P.; STEGEN, J. H. C. H.; KUIPERS, H.; VAN LOON, L. J. C. Carbohydrate supplementation during prolonged cycling exercise spares muscle glycogen but does not affect intra myocellular lipid use. **Eur. J. Physiol.**, v.454, p.635-647, 2007.
- SUN, J. H.; NAN, L. H.; GAO, C. R.; WANG, Y. Y. Validation of reference genes for estimating wound age in contused rat skeletal muscle by quantitative real-time PCR. **Int. J. Legal Med.**, v. 126, n. 1, p. 113-20, 2012.
- SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 70, p.631-659, 2013.

TER STEEGE, R. W. F.; KOLKMAN, J. J. Review article: The pathophysiology and management of gastrointestinal symptoms during physical, and the role of splanchnic blood flow. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 35, p.516-528, 2012.

TEZINI, G. C. S. V.; SIVEIRA, L. C. R.; VILLA-CLÉ, P. G.; JACINTO, C. P.; DI SACCO, T.H.; SOUZA, H. C. D. The effect of aerobic physical training on cardiac autonomic control of rats submitted to ovariectomy. **The Journal of The North American Menopause Society**, v. 16, n. 1, p. 110/116, 2009.

TEXEIRA, T. F. S.; COLLADO, M. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; BRESSAN, J.; PELUZIO, M. C. G. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. **Nutrition Research**, v. 32, p.637-647, 2012.

THAMOTHARAN, M.; BAWANI, S. Z.; ZHOU, X.; ADIBI, S. A. Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (PEPT-1) after a brief fast. **Metabolism**, v. 48, n. 6 (Jun), p. 681-684, 1999.

TORRES-LEAL, F. L.; MARREIRO, D. N. Considerações sobre a participação da creatina no desempenho físico. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, v.10, n.3, p.294-300, 2008.

TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clinical Science**, v. 82, p.471-488, 1992.

ULLUWISHEWA, D.; ANDERSON, R. C.; MCNABB, W. C.; MOUGHAN, P. J.; WELLS, J. M.; ROY, N. C. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **The Journal of Nutrition**, v. 23, march 2011.

VAN NIEUWENHOVEN, M. A.; BROUNS, E. F. AND BRUMMER, R. J. M. Gastrointestinal profile of symptomatic athletes at res and during physical exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 91, p.429-434, 2004.

VILELA, E. G.; TORRES, H. O. G.; FERRARI, M. L. A.; LIMA, A. S.; CUNHA, A. S. Gut permeability to lactulose and mannitol differs in treated Crohn's disease and celiac disease patients and healthy subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p.1105-1109, 2008.

VOJDANI, A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. **Alternative Therapies**, v.19, n.1, jan./fev. 2013.

WALSH, N. P.; BLANNIN, A. K.; ROBSON, P. J.; GLEESON, M. Glutamine, exercise and immune function. **Sports Med.**,v. 26, n.3, p.177-191, set.1998.

WANG, F.; SCHWARZ, B. T.; GRAHAM, W. V.; WANG, Y.; SU, L.; CLAYBURGH, D. R.; ABRAHAM, C.; TURNER, J. R. INF- γ -Induced TNFR2 Expression is required for TNF-Dependent Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. **Gastroenterology**, v. 131, p.1153-1163, 2006.

WISCHMEYER, P. E.; MUSCH, M. W.; MADONNA, M. B.; THISTED, R.; CHANG, E. B. Glutamine protects intestinal cells: role of inducible HSP 70. **Am. J. Physiol. Gastrointes. Liver Physiol.**, v. 272, p. 879-84, 1997.

WISCHMEYER, P. E.; Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition**, v. 18, p.225-8, 2002.

WRAY, C. J.; JOSHUA, M. V.; HASSELGREN, PER-OLOF. Catabolic response to stress and potential benefits nutrition support. **Nutrition**, v.18, p. 971-977, 2002.

ZHANG, Y.; WU, S.; XIA, Y.; SUN, J. Salmonella infection Up-regulates the leaky protein claudin-2 in intestinal epithelial cells. **Plos One.**, v. 8, 2013.

ZUHL, M.; SCHNEIDER, S.; LANPHERE, K.; CONN, C.; DOKLADNY, K.; MOSELEY, P. Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. **Br. J. Sports Med.**, p.1-9, 2012.