



Função e apoptose do neutrófilo: modulação pela maturação sexual, exercício e suplementação com glutamina

Neutrophil function and apoptosis: modulation by sexual maturation, exercise and glutamine supplementation

LAGRANHA, C.J.; LIMA, T.M.; SENNA, S.M.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Função e apoptose do neutrófilo: modulação pela maturação sexual, exercício e suplementação com glutamina. **R. bras. Ci e Mov.** 2005; 13(1): 95-108.

RESUMO – O efeito de uma única sessão de exercício (a 85% da capacidade máxima) na função e apoptose de neutrófilos de ratos de 60 (imaturos sexualmente) e 90 (maduro sexualmente) dias foi estudado. Avaliou-se também o efeito da suplementação com glutamina (1g por kg de peso) na prevenção das alterações induzidas pelo exercício. As funções estudadas foram: capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para avaliar a morte de neutrófilos, os seguintes parâmetros foram determinados: integridade de membrana, condensação de cromatina, fragmentação de DNA, externalização de fosfatidilserina, potencial transmembrânico mitocondrial, expressão de genes anti-apoptóticos (bcl-xL), pró-apoptóticos (bax e bcl-xS) e caspase 3. A maturação sexual por si só reduziu a capacidade fagocitária, aumentou a expressão dos componentes (gp91, p47 e p22^{phox}) da NADPH-oxidase e aumentou a produção de óxido nítrico (NO). Além disso, a maturação sexual aumentou a proporção de células em apoptose, conforme observado pelo aumento na fragmentação de DNA e despolarização mitocondrial, redução na expressão de Bcl-xL e aumento da expressão de caspase 3. A sessão de exercício, reduziu a produção de NO e aumentou a expressão dos componentes da NADPH-oxidase nos neutrófilos de ratos de 90 dias. Em ratos de 60 dias, o exercício não alterou as funções dos neutrófilos (capacidade fagocitária, produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio - EROs). A sessão de exercício aumentou a proporção de neutrófilos em apoptose em ratos de 60 e 90 dias. A suplementação oral com glutamina aumentou a capacidade fagocitária e a produção de EROs nos neutrófilos de ratos de 60 dias e a expressão dos componentes da NADPH-oxidase nos neutrófilos de ratos de 90 dias. Além disso, a suplementação com glutamina reduziu o efeito do exercício na indução de apoptose nos neutrófilos dos ratos de 60 e 90 dias.

Palavras-chave: neutrófilo, maturação sexual, exercício agudo, glutamina, apoptose.

LAGRANHA, C.J.; LIMA, T.M.; SENNA, S.M.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Neutrophil function and apoptosis: modulation by sexual maturation, exercise and glutamine supplementation. **R. bras. Ci e Mov.** 2005; 13(1): 95-108.

ABSTRACT - The effect of a single session of intense exercise (85% maximal capacity) on apoptosis and function of neutrophils from 60 (sexually immature) and 90 (sexually mature) days-old rats was examined. The possible effect of glutamine supplementation (1 g per kg body weight) to prevent the changes induced by the exercise was also investigated. The functions studied were: phagocytic capacity, nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production. To evaluate the process of neutrophils death, the following parameters were determined: cell viability, chromatin condensation, DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization, mitochondrial transmembrane potential, expression of anti-apoptotic (bcl-xL) and pro-apoptotic (bax, bcl-xS and caspase 3) genes. The sexual maturation per se decreased the phagocytic capacity, raised the expression of the NADPH-oxidase components (gp91, p47 and p22^{phox}) and increased nitric oxide (NO) production. In addition, sexual maturation increased the proportion of

Cláudia J. Lagranha¹

Thais M. de Lima¹

Sueli M. Senna¹

Rui Curi¹

Tania C. Pithon-Curi²

¹ Laboratório de Fisiologia Celular,
Universidade de São Paulo-USP,
São Paulo, SP

² Universidade Metodista de Piracicaba, FACS,
Piracicaba, SP/Unicastelo, São Paulo, SP

Correspondências para:
Prof. Dra. Tania Cristina Pithon-Curi,
Departamento de Fisiologia e Biofísica,
Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas,
Av. Prof. Lineu Prestes 1524, 05508-900,
São Paulo, SP, Brasil.
Fone: 0055 (0xx11) 3091-7245,
FAX: 0055 (0xx11) 3091-7285,
E-mail: tcuri@fisio.icb.usp.br

Recebimento: 14/04/2004
Aceite: 15/10/2004



cells in apoptosis as indicated by the increase in DNA fragmentation, mitochondrial depolarization and in caspase expression, and a reduction in bcl-xL expression. The exercise session decreased NO production and increased the expression of the NADPH-oxidase components in neutrophils from 90 days old rats. In 60 days old rats, the exercise did not affect neutrophil functions studied: phagocytic capacity, NO and reactive oxygen species (ROS) production. The exercise raised the proportion of neutrophils in apoptosis in both 60 and 90 days-old rats. Oral glutamine supplementation raised the phagocytic capacity and reactive oxygen species (ROS) production in neutrophils from 90 days old rats. In addition, glutamine supplementation decreased the effect of exercise on the induction of apoptosis in neutrophils from both 60 and 90 days old rats.

Keywords: neutrophils, sexual maturation, acute exercise, glutamine, and apoptose.

Introdução

Os neutrófilos apresentam função importante na defesa do organismo. Uma vez na corrente sanguínea, essas células entram em apoptose em 8-10 horas. Portanto, a modulação da função do neutrófilo e da apoptose é de extrema importância.

Nesse estudo, estão apresentados dados da modulação da função e apoptose de neutrófilos pela maturação sexual, exercício e suplementação com glutamina.

Considerações sobre os neutrófilos

Os neutrófilos originam-se de células pluripotentes da medula óssea e, após sua formação, cerca de 90% da população permanece na medula óssea. Os neutrófilos representam cerca de 50 a 60% dos leucócitos totais circulantes (60).

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do organismo junto com os macrófagos. Apresentam a função de eliminar microorganismos invasores e em seguida morrem espontaneamente (46). São atraídos quimiotaxicamente por células secretoras (mastócitos e basófilos), bactérias e outros corpos estranhos para áreas de inflamação. Neste sítio, os neutrófilos fagocitam os microorganismos, recobertos ou não com complemento ou anticorpos específicos, são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (46,35,6).

A geração de ânion superóxido é o ponto inicial para a produção de outros agentes reativos inclusive aqueles derivados da

mieloperoxidase (MPO) (107). Após a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio com a eliminação dos patógenos, os neutrófilos morrem por apoptose. A apoptose é um tipo de morte celular que não gera perda de viabilidade e associação com processos inflamatório (55).

Resultados e discussão

Efeito da maturação na função e apoptose de neutrófilos

A maturação sexual em todos os mamíferos é o período no qual as gônadas quiescentes são ativadas por gonadotropinas hipofisárias, aumentando a secreção dos hormônios sexuais (10). É uma condição vinculada ao eixo hipotálamo-hipófise-gonadas e que tem interação com outros hormônios tais como hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), triiodotironina (T3), tiroxina (T4), hormônio estimulante da tireóide (TSH), hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) (49,4). Está também relacionada com o desenvolvimento de vários outros sistemas como: maturação esquelética, composição corporal, sistemas circulatório e hematopoiético (105,73,64).

A testosterona é responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características do sexo masculino. Além disso, aumenta a deposição de proteínas nos músculos, ossos e peles. No sistema hematopoiético, a testosterona aumenta a concentração de hemoglobinas e a massa de células vermelhas no sangue (32).





Além desses efeitos, a testosterona é também responsável pela modulação da resposta imune, atuando de forma a reduzir a atividade dos leucócitos (16). Como exemplo dessa modulação pela testosterona, McMURRAY *et al.* (71) demonstraram que em células Jurkat (linhagem humana de linfócitos T), a testosterona inibe a proliferação e aumenta a proporção de células na fase S/G(2)M do ciclo celular. Este efeito foi também observado em células Raji (linhagem humana de linfócitos B). Conforme ZANATO *et al.* (111), a concentração de testosterona é mais elevada (8 vezes) no plasma dos animais de 90 dias em comparação ao de 60 dias.

Em nosso estudo verificamos que a maturação sexual induz redução da capacidade fagocitária, e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. A maturação sexual também aumentou a produção de óxido nítrico com concomitante aumento na expressão da iNOS, enzima chave para a produção de óxido nítrico sem alterar a quantidade de proteína iNOS.

OLINESCU *et al.* (91) estudaram o efeito dos hormônios sexuais, testosterona e estrona, na capacidade fagocitária de neutrófilos de ratos. Esses autores verificaram que a testosterona em concentrações baixas (menor que 10^{-5} M) aumenta a capacidade fagocitária dessas células. Entretanto, em concentrações maiores, os hormônios sexuais (testosterona e estrona) diminuem a capacidade fagocitária de neutrófilos. Desta forma, a menor capacidade fagocitária dos neutrófilos de ratos de 90 dias pode ser devido ao efeito desse hormônio.

Verificamos que a expressão dos componentes do complexo da NADPH-oxidase (gp91^{phox}, p47^{phox} e p22^{phox}) é maior nos neutrófilos de ratos de 90 dias em relação aos de 60 dias (59). Essas alterações fazem parte dos eventos complexos que ocorrem na maturação sexual. FÜLOP *et al.* (27) verificaram que, em células de indivíduos maduros, a atividade da NADPH-oxidase estava aumentada em relação a jovens. Esses autores sugeriram que a maturação aumenta a atividade de proteínas (PKC) que, por sua vez, eleva a atividade da NADPH-oxidase.

Existem dois tipos de morte celular bem definidos: a apoptose e necrose. Essas apresentam características bem distintas, onde a necrose envolve processos inflamatórios. Na

apoptose, a célula é removida por células fagocíticas profissionais (macrófagos e neutrófilos) ou por aquelas que não são profissionais mas que podem atuar como tal em determinadas situações tais como as células mesangiais dos rins (56).

A apoptose pode ser ativada por duas vias distintas: a intrínseca e a extrínseca. Na via intrínseca, os agentes indutores da apoptose levam à formação do poro de transição de permeabilidade na mitocôndria (PTPC), que dispara o processo (56). O PTPC é basicamente formado pelo canal dependente de voltagem (VDAC) e pela adenina nucleotídeo translocase (ANT), além de diversas proteínas da família da Bcl-2. As células que sofrem apoptose apresentam alteração no potencial transmembrânico mitocondrial, que precede a ativação de caspases e endonucleases (70,93). Entre os agentes formadores de poro estão as espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, alta concentração de cálcio, ácidos graxos, toxinas, ligação de glicocorticóides, alterações nas concentrações de metabólitos essenciais (ATP, ADP, NADH, NADPH, creatina e carnitina) e de íons (como Mg^{2+} e prótons). Estes agentes causam despolarização mitocondrial que acarreta o vazamento de proteínas, como o citocromo c, AIF, pró-caspases 3 e 9, Smac/DIABLO e endonuclease G (55, 62,70).

Parte do vazamento ocorre por rompimento da membrana externa da mitocôndria, como consequência ocorre desequilíbrio osmótico. A matriz mitocondrial possui osmolaridade maior que o espaço intermembranoso e o citoplasma. A formação de um poro gera, portanto, um fluxo de água para a matriz. Devido ao fato da membrana interna mitocondrial ter maior superfície do que a membrana externa, há ruptura desta última facilitando o vazamento de proteínas (31). Este aumento de permeabilidade ocorre antes da fase avançada da apoptose que compreende ativação da cascata das caspases e de endonucleases (56,70).

Na apoptose induzida, por exemplo, por TNF-TNFR e Fas-Fas-ligante, há também participação da mitocôndria. A apoptose induzida por receptores de morte está associada com a pró-caspase 8. Uma vez ativada a caspase 8, esta pode clivar e ativar as caspases 6 e 3 e/ou pode clivar e ativar a proteína Bid, a qual migra para a mitocôndria e induz o vazamento

de citocromo c. Como descrito anteriormente, o citocromo c pode ativar Apaf, que ativa as caspases 9 e 3 e também a caspase 6. Assim, ambas as vias indutoras de apoptose comunicam-se permitindo a amplificação do sinal apoptótico (63). Ambas as vias intrínseca e extrínseca convergem para a ativação da caspase 3 (7,45).

Em nosso estudo não observamos diferença na integridade de membrana dos neutrófilos dos ratos de ambas as idades, o que é sugestivo de que a maturação sexual não aumenta a proporção dessas células em necrose (59). Por outro lado, verificamos que, nos ratos de 90 dias, há maior proporção de células com fragmentação de DNA e despolarização mitocondrial. Esses resultados estão de acordo com os achados de ALLGAIER *et al.* (2). Os autores verificaram que a apoptose em neutrófilos de indivíduos adultos era mais intensa do que em células de recém-nascidos. Os autores também sugeriram que essa diferença na apoptose era consequência de maior ativação e sinalização do receptor Fas.

HUBER *et al.* (40) demonstraram que a testosterona causa apoptose de linfócitos por redução da expressão de Bcl-2 (gene anti-apoptótico). Assim, possivelmente, a maior proporção de neutrófilos em apoptose nos ratos de 90 dias do que em células de animais de 60 dias ocorreu por elevação das

concentrações plasmáticas de testosterona. O efeito deste hormônio na redução da expressão de Bcl-2 levaria à abertura de poros de transição na mitocôndria, o que permitiria a ativação das caspases. A caspase 3 é a principal caspase executora do processo apoptótico e, conforme observado em nosso estudo, a expressão do RNAm da caspase 3 nos neutrófilos de ratos de 90 dias já se encontra bem mais elevada do que nas células dos ratos de 60 dias. LUO *et al.* (66) demonstraram que nos neutrófilos circulantes de crianças recém-nascidas, a expressão, o conteúdo da proteína e a atividade da caspase 3 estavam muito reduzidos. Os autores sugeriram que o RNAm e o conteúdo proteico da caspase 3 aumenta com a idade. Esse seria um evento regulador importante do processo de morte celular em decorrência da idade.

Efeito de uma única sessão de exercício na função e apoptose de neutrófilos

Muitos indivíduos, adultos ou crianças, normalmente não atletas, realizam sem condicionamento prévio, atividades físicas em intensidades que podem chegar a 70-90% de sua capacidade máxima. No nosso estudo, animais de 60 e 90 dias foram submetidos a um esforço físico intenso que chegou a 95% da capacidade máxima.

Tabela 1 - Resumo dos efeitos da maturação sexual em neutrófilos de ratos de 90 dias comparados aos neutrófilos de 60 dias.

Parâmetros avaliados	Neutrófilos de ratos de 90 dias
Fagocitose	↓
Expressão dos componentes da NADPH-oxidase	gp91 ^{phox} ↑
	p47 ^{phox} ↑
	p22 ^{phox} ↑
Produção de EROs	↑
Produção de óxido nítrico	↑
Expressão de iNOS	↑
Fragmentação de DNA	↑
Despolarização mitocondrial	↑
Expressão de bcl-xL	↓
Expressão de bax e bcl-xS	↓
	↓
Expressão de caspase 3	↑

NS - não houve diferença; ↓ redução significativa; ↑ aumento significativo.



MACHA *et al.* (67), avaliando a produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos de maratonistas, HACK *et al.* (34), avaliando a capacidade fagocitária também em neutrófilos de maratonistas, e KRAUSE *et al.* (53), avaliando a capacidade fagocitária, porém em neutrófilos de biatletas, demonstraram que a produção de peróxido de hidrogênio e a capacidade fagocitária dos neutrófilos estavam reduzidas após o exercício intenso. Entretanto, HACK *et al.* (33), avaliando a capacidade fagocitária em neutrófilos de triatletas, e PYNE *et al.* (100), avaliando também a capacidade fagocitária em neutrófilos porém de nadadores de elite, demonstraram que, após estes tipos de exercício intenso, a capacidade fagocitária dos neutrófilos não se alterava. Desta forma, é interessante notar que as respostas dos neutrófilos variam conforme o tipo de exercício e a intensidade com que o mesmo é realizado e a condição física do atleta.

Há vários relatos de indivíduos e atletas que, após grandes competições ou atividades físicas com intensidades elevadas, apresentam gripes e resfriados, e mesmo infecções (47). Para SMITH *et al.* (103,104), o exercício agudo intenso agrava a imunodeficiência e aumenta a susceptibilidade a infecções por reduzir a capacidade funcional de neutrófilos. Em nosso estudo, o exercício a 85% da capacidade máxima não afetou a capacidade fagocitária e a produção de ERO, em neutrófilos de ratos de 90 e de 60 dias. Contudo, o exercício modulou a expressão de alguns componentes da NADPH-oxidase. Com relação à $p47^{phox}$ e $gp91^{phox}$, o exercício aumentou a expressão nos neutrófilos de ratos de 90 dias, entretanto, o mesmo esforço físico reduziu a expressão do $p22^{phox}$ nos neutrófilos dos ratos de 90 dias.

O exercício não alterou a produção de óxido nítrico em neutrófilos de ratos de 60 dias. Entretanto, o conteúdo da proteína iNOS foi elevado. Já a expressão do RNA mensageiro da óxido nítrico sintase induzível também não se alterou. Conforme WOODS *et al.* (109), o treinamento crônico aumenta a quantidade de iNOS em macrófagos de camundongos jovens. Embora o conteúdo de proteína iNOS tenha sido aumentado pelo exercício não se observou elevação na produção do óxido nítrico. É interessante notar que embora a proteína estivesse aumentada a quantidade de RNA mensageiro não se alterou. Estes dados são

sugestivos de efeito pós-transcricional. Uma vez que o exercício pode ter reduzido a atividade de proteases.

Em oposição aos dados dos ratos de 60 dias, o exercício reduziu a produção de óxido nítrico em neutrófilos de animais de 90 dias. Segundo CUMMING (19), o exercício agudo usualmente aumenta os valores séricos de testosterona ao passo que no exercício crônico prolongado há redução na produção e liberação desse hormônio. CHAO *et al.* (16) demonstraram que a testosterona diminui a produção de óxido nítrico em macrófagos de ratos. Por outro lado, FRIEDL *et al.* (25) verificaram que esse hormônio inibe a expressão da iNOS de modo dose dependente. Dessa forma, o aumento na concentração plasmática de testosterona durante a maturação sexual e a associação deste ao efeito do exercício agudo no incremento dos valores desse hormônio podem ter reduzido a produção de óxido nítrico pelos neutrófilos. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer esses achados.

O exercício físico não causou necrose dos neutrófilos de ratos de 60 e 90 dias. Entretanto, aumentou a proporção de neutrófilos com condensação de cromatina e externalização de fosfatidilserina nos ratos de 60 e de 90 dias. Corroborando com nossos resultados, MOOREN *et al.* (76), em estudo realizado em linfócitos humanos submetidos ao exercício exaustivo, mostraram aumento na externalização de fosfatidilserina logo após o término da atividade.

A fragmentação de DNA apresentou-se elevada somente nos neutrófilos de ratos de 90 dias. O que está de acordo com os resultados encontrados por NIESS *et al.* (85,86) que verificaram, após exercício exaustivo, aumento na fragmentação de DNA em neutrófilos, linfócitos e monócitos humanos.

Como mencionado anteriormente, uma etapa fundamental da apoptose é a perda da polaridade mitocondrial. Verificamos que o exercício agudo aumenta a despolarização mitocondrial nos neutrófilos de ratos de 60 e 90 dias. De modo semelhante, HSU *et al.* (39) verificaram que o exercício físico acima de 60% do VO_{2max} induz fragmentação de DNA e redução no potencial transmembrânico mitocondrial de neutrófilos humanos. Entretanto, ainda não se sabe qual o mecanismo envolvido.

Além da despolarização mitocondrial com consequente liberação de citocromo c e ativação de caspases, o processo apoptótico também ocorre por alteração na expressão de proteínas reguladoras da apoptose tais como: bax e bcl-xS (pró-apoptóticos); bcl-xL e bcl-2 (anti-apoptóticos) (55). Em nosso estudo, o exercício reduziu a expressão de bcl-xL nos neutrófilos de ratos de 90 dias. Além disso, o exercício aumentou a expressão das proteínas pró-apoptóticas bax e bcl-xS (favorecedoras da formação de poros na membrana mitocondrial) nos neutrófilos de ratos de 90 dias, mas reduziu a expressão de dessas proteínas nos neutrófilos de ratos de 60 dias. Assim, a maior proporção de neutrófilos em apoptose nos ratos de 90 dias induzida pelo exercício, pode ser consequência da alteração na expressão das proteínas bcl-xL, bax ou bcl-xS. Já para os neutrófilos de ratos de 60 dias, a maior proporção de células em apoptose, conforme verificamos por despolarização da mitocôndria, externalização de fosfatidilserina e condensação de cromatina, não é devido à alteração na expressão das proteínas bcl-xL, bax ou bcl-xS.

Como mencionado anteriormente, a caspase 3 é ativada após a liberação de proteínas (citocromo c, AIF, Smac/diablo) do interior da mitocôndria. Nos neutrófilos de ratos de 60 dias, as proteínas bcl-xL, bcl-xS e bax não parecem desempenhar papel importante no processo de apoptose induzido

pelo exercício agudo. Contudo, a expressão da caspase 3 foi aumentada pelo exercício nos neutrófilos dos ratos de 60 dias. Já nas células dos ratos de 90 dias, o exercício agudo diminuiu a expressão de bcl-xL e aumentou de bcl-xS, bax e da caspase 3. Dessa forma, o exercício induz apoptose em neutrófilos por mecanismos distintos conforme a idade dos animais. O significado dos nossos achados para as alterações funcionais dos neutrófilos durante a atividade física permanece para ser esclarecido.

Efeito da suplementação oral com glutamina na função e apoptose de neutrófilos após uma única sessão de exercício

A glutamina está presente em muitas proteínas é o aminoácido mais abundante no plasma e nos tecidos. Não é considerado um aminoácido essencial por que pode ser sintetizada pelo organismo. Contudo, em algumas condições traumáticas (como câncer ou esforço físico intenso), a concentração intracelular e do plasma desse aminoácido diminui em até 50% (58). Assim, quando a demanda é maior que a produção, estabelece-se um quadro de deficiência de glutamina. Por essa razão, este aminoácido foi reclassificado como “condicionalmente essencial” (103). Em todas as células, a glutamina é o doador de átomos de nitrogênio durante a síntese de purinas, pirimidinas e amino-açúcares (20).

Tabela 2 - Resumo dos efeitos do exercício agudo em neutrófilos de ratos de 90 e 60 dias.

Parâmetros avaliados	Efeito do exerc. em NØ de ratos de 60 dias	Efeito do exerc. em NØ de ratos de 90 dias
Expressão dos componentes da NADPH-oxidase	gp91 ^{phox} NS	↑
	p47 ^{phox} NS	↑
	p22 ^{phox} NS	↓
Produção de óxido nítrico	NS	↓
Proteína da iNOS	↑	NS
Condensação de cromatina	↑	↑
Fragmentação de DNA	NS	↑
Externalização de Fosfatidilserina	↑	↑
Despolarização mitocondrial	↑	↑
Expressão de bcl-xL	↑	↓
Expressão de	bcl-xS ↓	↑
	bax ↓	↑
Expressão de caspase 3	↑	↑

NS - sem diferença; ↓ redução significativa; ↑ aumento significativo.



A taxa de utilização de glutamina pelos neutrófilos é similar ou até mesmo maior do que a de glicose. A utilização desse aminoácido por neutrófilos de ratos em uma hora de incubação a 37°C é de 12,8 nmol por minuto por miligrama de proteínas. A glutamina é convertida em glutamato, amônia, aspartato, alanina e lactato, e uma proporção pequena é oxidada a CO₂ (95,96).

FURUKAWA et al. (28,29) demonstraram que a suplementação com glutamina reverte a diminuição da atividade bactericida, melhorando a capacidade oxidativa e a capacidade fagocitária dos neutrófilos de pacientes pós-operados que apresentavam redução na concentração plasmática desse aminoácido. IKEDA et al. (41) verificaram que a suplementação com glutamina aumenta a capacidade fagocitária de neutrófilos de ratos que receberam nutrição parenteral após serem submetidos à peritonite química. Em nosso estudo, a suplementação aumentou a capacidade fagocitária e a produção de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos de ratos de 90 dias em repouso e exercitados. Segundo MOINARD et al. (75), glutamina e arginina são capazes de modular a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos de ratos estressados (condição induzida por redução de alimento e injeção de dexametazona). Esses dados são sugestivos de que apesar do estresse causado a glutamina é capaz de modular a produção de espécies reativas de oxigênio.

A suplementação com glutamina aumentou a expressão de gp91^{phox}, p22^{phox} e p47^{phox}, componentes da NADPH-oxidase, nos neutrófilos de ratos de 60 e 90 dias. Esses dados corroboram com resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo (99). Neste estudo, foi demonstrado que a glutamina aumenta a expressão dos componentes da NADPH-oxidase em neutrófilos de ratos em cultura, além de estimular a produção de ânion superóxido.

A suplementação com glutamina também aumentou a expressão da iNOS, sem alterar a produção de óxido nítrico e a quantidade da proteína iNOS nos neutrófilos de ratos exercitados de 90 dias. Esses dados vêm de acordo com os achados de MURPHY & NEWSHOLME (79) que mostraram que a produção de nitrito (sem arginina extracelular) estava reduzida em macrófagos e monócitos em cultura com a presença do inibidor de

glutaminase, 6-diazo 5-oxo norleucine, sugerindo a importância da glutamina para a produção de óxido nítrico.

NUNN et al. (90), estudando neutrófilos humanos em fase inicial de apoptose, verificaram que as concentrações de lactato e glutamina estavam reduzidas em 45% e que as de arginina, glicina, alanina, aspartato e glutamato não apresentavam alteração. PITHON-CURI et al. (98) verificaram que a glutamina previne parcialmente a ocorrência de apoptose em neutrófilos de ratos por manter o potencial transmembrânico mitocondrial. Esses dados reforçam os nossos achados, de que a glutamina retarda a ocorrência do processo apoptótico em neutrófilos.

A suplementação com glutamina reduziu a fragmentação de DNA, a externalização de fosfatidilserina e a despolarização mitocondrial nos neutrófilos de ratos exercitados de 90 dias. Entretanto, esse aminoácido não foi capaz de abolir a despolarização da mitocôndria induzida pelo exercício nos neutrófilos dos ratos de 90 dias. Além disso, a suplementação com glutamina reduziu a condensação de cromatina, a fragmentação de DNA, a externalização de fosfatidilserina e a despolarização mitocondrial nos neutrófilos de ratos exercitados de 60 dias. Esses resultados são sugestivos de que o efeito anti apoptótico da glutamina no processo de morte de neutrófilos de ratos induzido pelo exercício não ocorre de forma total. Entretanto, tem um importante efeito redutor da morte celular induzida pelo processo apoptótico.

CHANG et al. (15), estudando a apoptose induzida pelo receptor de morte (Fas) e seu ligante (FasL) em linfócitos humanos, verificaram que o metabolismo de glutamina desacelera a progressão do processo apoptótico por manter o equilíbrio redox celular ($\text{NAD}^+/\text{NADH}_2 = \text{NADP}^+/\text{NADPH}_2$) e por elevação da concentração de glutatona. Em nosso estudo, a suplementação com glutamina reduziu a expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-xL) nos neutrófilos dos ratos de 60 dias. Nas células dos ratos de 90 dias, contudo, a glutamina aumentou o conteúdo de RNAm dessa proteína. Além disso, nos animais de 3 meses de idade a suplementação com glutamina reduziu o conteúdo de RNAm das proteínas pró-apoptóticas (Bcl-xS e Bax).

**Tabela 3** - Resumo dos efeitos da suplementação com glutamina em neutrófilos de ratos em repouso de 90 e 60 dias.

Parâmetros avaliados	60 dias	90 dias
Fagocitose	NS	↑
Produção de espécie reativa de oxigênio	NS	↑
Expressão da NADPH-oxidase	gp91 ^{phox} ↑	↑
	p47 ^{phox} ↑	↑
	p22 ^{phox} ↑	↑
Expressão da iNOS	↑	↑
Proteína da iNOS	↓	NS
Condensação de cromatina	↓	NS
Fragmentação de DNA	↓	↓
Externalização de Fosfatidilserina	↓	↓
Despolarização mitocondrial	↓	↓
Expressão de bcl-xL (anti-apoptótico)	↓	↑
Expressão de genes pró-apoptóticos	bcl-xS ↓	↓
	bax ↓	↓
Expressão de caspase 3	↓	↓

NS - sem diferença; ↓ redução significativa; ↑ aumento significativo.

Tabela 4 - Resumo dos efeitos da suplementação com glutamina em neutrófilos de ratos exercitados de 90 e 60 dias.

Parâmetros avaliados	60 dias	90 dias
Fagocitose	NS	↑
Produção de espécies reativas de oxigênio	NS	↑
Expressão dos componentes da NADPH-oxidase	gp91 ^{phox} ↑	↑
	p47 ^{phox} ↑	↑
	p22 ^{phox} ↑	↑
Produção de óxido nítrico	NS	↑
Expressão da iNOS	↑	↑
Proteína da iNOS	↓	NS
Condensação de cromatina	↓	↓
Fragmentação de DNA	↓	↓
Externalização de Fosfatidilserina	↓	↓
Expressão de bcl-xL	↓	↑
Expressão de genes pró-apoptóticos	bcl-xS ↓	↓
	bax ↓	↓
Expressão de caspase 3	↓	↓

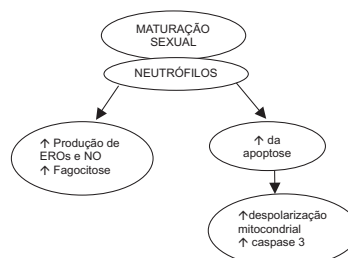
NS - sem diferença; ↓ redução significativa; ↑ aumento significativo.



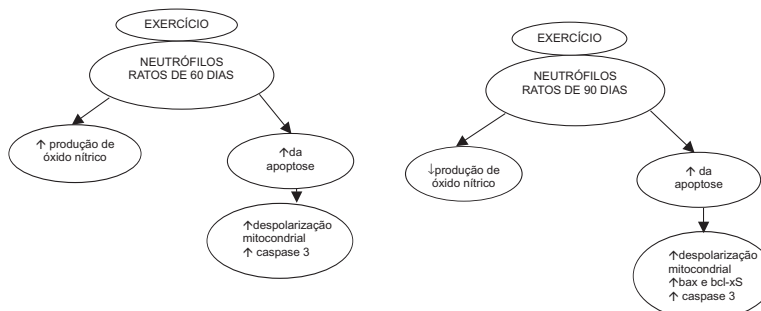
Esses achados são sugestivos de que a glutamina protege a célula contra a apoptose induzida pelo exercício, por mecanismo que parece envolver redução na expressão de caspase 3.

Conclusões

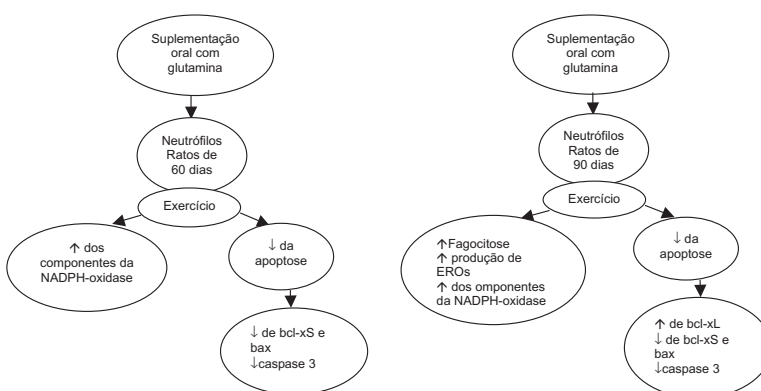
A maturação sexual em ratos machos reduz em neutrófilos a capacidade fagocitária, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, aumenta a proporção de células em apoptose (por mecanismo que envolve despolarização mitocondrial e caspase 3).



Uma única sessão de exercício a 85% da capacidade máxima aumenta nos neutrófilos de ratos de 60 dias a produção de óxido nítrico e a apoptose (por mecanismo que envolve despolarização mitocondrial e aumento de caspase 3). A mesma intensidade e o mesmo tipo de exercício em ratos de 90 dias reduz a produção de óxido nítrico, e aumenta a apoptose (por mecanismo que envolve despolarização mitocondrial, aumento de bax e bcl-xS e aumento de caspase 3).



A suplementação oral com glutamina aumenta nos neutrófilos dos ratos exercitados de 60 dias a expressão dos componentes da NADPH-oxidase e reduz a apoptose (por mecanismo que envolve redução de bax e bcl-xS e redução de caspase 3). A suplementação oral com glutamina aumenta nos neutrófilos dos ratos exercitados de 90 dias a capacidade fagocitária, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a expressão dos componentes da NADPH-oxidase. Além disso, diminui a apoptose (por mecanismo que envolve aumento de bcl-xL, redução de bax e bcl-xS e redução de caspase 3).



Referências Bibliográficas

1. AKGUL, C.; MOULDING, D.A.; EDWARDS, S.W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Letters**. **487**: 318-322, 2001.
2. ALLGAIER, B.; SHI, M.; LUO, D.; KOENIG, J.M. Spontaneous and Fas-mediated apoptosis are diminished in umbilical cord blood neutrophils. **J. Leukoc. Biol.** **64(3)**:331-336.
3. ALVARADO-KRISTENSSON, M.; PÖRN-ARES, M.I.; GRETHE, S.; SMITH, D.; ZHENG, L.; ANDERSSON, T. p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophils apoptosis. **FASEB J.** **16**:129-131, 2002.
4. AMIEL, S.A.; CAPRIO, S.; SHERWIN, R.S. Insulin resistance of puberty: a defect restricted to peripheral glucose metabolism. **J Clin Endocrinol Metab.** **72**:277-282,1991.
5. AVDI, N.J.; MALCOLM, K.C.; NICK, J.A.; WORTHEN, G.S A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. **J Biol Chem.**; **277(43)**:40687-40696, 2002.
6. BABIOR, B.M. NADPH oxidase: An update. **Blood** **93**:1464-1476, 1999.
7. BAETU, T. M. & HISCOTT, J. On the TRAIL to apoptosis. **Cytokine Growth Factor Rev** **13**:199-207, 2002.
8. BELLÓ-KLEIN, A.; LAGRANHA, C.J.; BOCK, P.; BARP, J.; ARAÚJO, A.S.R.; LLESUY, S.; BELLÓ, A.A; KHAPER, N.; SINGAL, P.K. Submaximal exercise training in postnatal rats: hemodynamic and oxidative stress changes. **Exp. Clin Cardiol.** **5(3)**: 149-153, 2000.
9. BOECK, G. Current Status of Flow Cytometry in Cell and Molecular Biology. **Int Rev Cytol**, **204**:239-298, 2001.
10. BOGIN B. Adolescence in evolutionary perspective. **Acta Paediatr Suppl.** **406**:29-35, 1994
11. BRADFORD, M.M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** **72**:248-254, 1976.
12. CAI, J.; YANG, J.; JONES, D.P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochim. Biophys. Acta.** **1366**:139-149, 1998.
13. CASTELL, L.M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition.** **18**:371-375,2002.
14. CASTELL, L. M.; NEWSHOLME, E. A. Does glutamine have a role in reducing infection in athletes? **Eur J Appl Physiol**, **73**: 488-490,1996.
15. CHANG, W.K.; YANG, K.D.; CHUANG, H.; JAN, J.J.; SHAO, M.F. Glutamine protects activated T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. **Clinical Immunol.** **104**:151-160,2002.
16. CHAO, T.C.; VAN ALTEN, P.J.; WALTER, R.J. Steroid sex hormone and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. **Am J Reprod Immunol.** **32(1)**: 43-52, 1994.
17. CLARK, R.A. Activation of the neutrophils respiratory burst oxidase. **Infect Dis.** **179**:S309-317,1999.
18. CONCORDET, J. P. & FERRY, A. Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise). **Am J Physiol**, **265**: C626-C629,1993.
19. CUMMING D. Influence of aerobic versus anaerobic exercise on male reproductive hormones. **Clin J Sport Med.** **6(2)**:141-150, 1996.
20. CURI, R. Considerações preliminares. In **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. 1º ed.: 15-16, 2000.
21. CURI, R. & NEWSHOLME, E. A. The effect of adenine nucleotides on the rate fate of glutamine utilization by incubated mitochondria isolated from rat mesenteric lymph nodes. **Mol Cel Biochem**, **86**:71-76,1989.
22. CURI, R; NEWSHOLME, P; PITHON-CURI, T.C.; PIRES DE MELO, M. P; GARCIA, C.; HOMEM DE BITTENCOURT JR, P.I.; GUIMARÃES, A. R. P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Braz J Med Biol Res**, **32**: 15-21, 1999.
23. DAHLGREN, C. & KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J. Immunol. Meth.** **232**:3-14,1999.

24. FRIDOVICH I. The Biology of Oxygen Radicals. **Science** **201**:875-880, 1980.
25. FRIEDL, R.; BRUNNER, M.; MOESLINGER, T.; SPIECKERMANN, P.G. Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. **Life Sci.** **68(4)**:417-429, 2000.
26. FRIMAN, G. E. & WESSLEN, L. Infections and exercise in high-performance athletes. **Immunol. and Cell Biol.** **78**:510-522,2000.
27. FÜLOP, T.; VARGA, Z.; NAGY, J.T.; FORIS, G. Studies on opsonized zymozan, FMLP, carbachol, PMA and A23187 stimulated respiratory burst of human PMNLs. **Biochim. Int.** **17(3)**:419-426,1988.
28. FURUKAWA, S.; SAITO, H.; INOUE, T.; MATSUDA, T.; FUKATSU, K.; HAN, I.; IKEDA, S.; HIDEMURA, A. Supplemental glutamine augments phagocytosis and reactive oxygen intermediate production by neutrophils and monocytes from postoperative patients in vitro. **Nutrition** **16(5)**:323-329, 2000.
29. FURUKAWA, S.; SAITO, H.; FUKATSU, K. Glutamine –enhanced bacterial killing by neutrophils from post-operative patients. **Nutrition** **13**:853-863, 1997.
30. GARCIA, C.; PITHON-CURI, T.C.; DE LOURDES FIRMANO, M.; PIRES DE MELO, M.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. **Clin Sci (Lond)** **96(6)**:549-555,1999.
31. GREEN, D. R. & REED, J. C. Mitochondria and apoptosis: **Science** **281**: 1309-1312, 1998.
32. GRUMBACH, M.M. & STYNE, D.M. Puberty: Ontogeny, Neuroendocrinology, physiology and disorders. In **Willians Textbook of Endocrinol** **9th ed.** 1509-1625,1998.
33. HACK, V.; STROBEL, G.; RAU, J.P.; WEICKER, H. The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.** **65(6)**:520-524, 1992.
34. HACK, V. PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. **J Appl Physiol.****77(4)**:1731-1735,1994.
35. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine.
36. Third edition, 1998.
37. HEALY, D.A.; WATSON, R.W.G.; NEWSHOLME, P. Glucose, but not glutamine, protects against spontaneous and anti-Fas antibody-induced apoptosis in human neutrophils. **Clinical Science**, **103**: 179-189,2002.
38. HISCOCK, N. & PEDERSEN, B.K. Exercise-induced immunodepression-plasma glutamine is not the link. **J. Appl Physiol.** **93**:813-822,2002.
39. HSU, T.; KONG, C.; LU, F.; CHENG, H.; TSAI, K. Leukocyte mitochondrial alterations after aerobic exercise in trained human subjects. **Med Sci Sports Exerc** **34(3)**: 438-442,2002.
40. HUBER, S.A.; KUPPERMAN, J.; NEWELL, M.K. Estradiol prevents and testosterone promotes Fas-dependent apoptosis in CD4+ Th2 cells by altering Bcl 2 expression. **Lupus** **8(5)**:384-387, 1999.
41. IKEDA, S.; KUDSK, K.A.; LE, T.; ZARZAUR, B.L.; JOHNSON, C.D. Glutamine improves impaired cellular exudation and polymorphonuclear neutrophil phagocytosis induced by total parenteral nutrition after glycogen-induced murine peritonitis. **Shock** **19(1)**:50-54, 2003.
42. ISRAELS, L.G. & ISRAELS, E.D. Apoptosis. **Stem Cells.** **17**:306-313,1999.
43. IZGÜT-UYSAL, V.N.; AGAÇ, A.; KARADOĞAN, I.; DERIN, N.; Effects of L-carnitine on neutrophils functions in aged rats. **Mech Ageing and Dev.** **124**:341-347, 2003.
44. JI LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc.** **25(2)**:225-231, 1993.
45. JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery: **Trends Genet** **18**: 142-149, 2002.
46. JUNQUEIRA & CARNEIRO. Células do sangue. In: **Histologia Básica**. Guanabara Koogan : 191-204,1995.
47. KEAST, D.; HARPER, W.; FRY, R.W.; MORTON, A.R. Depression of plasma glutamine concentration after exercise stress and its possible influence on the immune system. **Med J Aust** **162(1)**: 15-18,1995.
48. KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.** **26**: 239-257,1972.

49. KIESS, W.; MEIDERT, A.; DRESSENDORFER, R.A. Salivary cortisol levels throughout childhood and adolescence: relation with age, pubertal stage, and weight. **Pediatr Res.** **37**:502-506,1995.
50. KILPATRICK, L.E.; LEE, J.Y.; HAINES, K.M.; CAMPBELL, D.E.; SULLIVAN, K.E.; KORCHAK, H.M. A role for PKC δ and PI3-Kinase in TNF α mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophils. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** **283**: C47-C57,2002.
51. KOWALCHUCK, J. M.; CURI, R.; NEWSHOLME, E. A. Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. **Biochem J.** **249**: 705-708, 1988.
52. KOWATARI, K.; UMEDA, T.; SHIMOYAMA, T.; NAKAJI, S.; YAMAMOTO, Y.; SUGAWARA, K. Exercise training and energy restriction decrease neutrophils phagocytic activity in judoists. **Med. Sci. Sports Exerc.** **33**:519-524, 2001.
53. KRAUSE, R. Effect of vitamin C on neutrophil function after high-intensity exercise. **Eur J Clin Invest.** **31**(3):258-263,2001.
54. KREBS, H. A. Glutamine metabolism in the animal body. In Mora, J. Palacios, R (ed); **Glutamine: Metabolism Enzymology and Regulation.** 1980.
55. KROEMER G. The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. **Cell Death Differ.** **5**:547,1998.
56. KROEMER, G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. **Biochimie** **84**:103-104, 2002.
57. KYRIAKIS, J.M. & AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.** **81**:807-886,2001.
58. LACEY, J.M. & WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr Rev** **48**:297-308,1990.
59. LAGRANHA, C.J.; SENNA, S.M.; DE LIMA, T.M.; SILVA, E.P.; DOI, S.Q.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. **Med. Sci Sports Exerc.** **36**(2):210-7, 2004.
60. LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. Leukocytes - The phagocytic and immunologic systems. **Wintrobe's Clinical Hematology**:223-257,1993.
61. LEHMANN, M.; DIMEO, F.; HEINZ, N.; GASTMANN, U.; TREIS, N.; STEINACKER, J.M.; KEUL, J.; KAJEWSKI, R.; HAUSSINGER, D. Serum amino acid concentrations in nine athletes before and after the 1993 Colmar ultra triathlon. **Int J Sports Med** **16**(3): 155-159,1995.
62. LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A. L.; QIAN, T.; TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R. A.; CASCIO, W. E.; BRADHAM, C. A.; BRENNER, D. A.; HERMAN, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta** **1366**:177-196, 1998.
63. LI, K.; LI, Y.; SHELTON, J. M.; RICHARDSON, J. A.; SPENCER, E.; CHEN, Z. J.; WANG, X.; WILLIAMS, R. S. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. **Cell** **101**:389-399, 2000.
64. LIKER, H.R.; BARNES, K.M.; CONITE, F. Blood pressure and body size in precocious puberty. **Acta Paediatr Scand.** **77**:294-298,1988.
65. LIPSCHITZ, D.A. & UDUPA, K.B. Influence of aging and protein deficiency on neutrophil function. **J. Gerontol.** **41**(6):690-694, 1986
66. LUO, D.; SCHOWENGERDT, K.O.Jr.; STEGNER, J.J.; MAY, W.S.Jr.; KOENIG, J.M. Decreased functional caspase-3 expression in umbilical cord blood neutrophils is linked to delayed apoptosis. **Pediatric Res.** **53**(5):859-864, 2003.
67. MACHA, M.; SHLAFFER, M.; KLUGER, M.J. Human neutrophil hydrogen peroxide generation following physical exercise. **J Sports Med Phys Fitness.** **30**(4):412-419,1990.
68. MARS, M.; WESTON, A.; NAICKER, V.; CHUTURGOON, A. High intensity exercise: A cause of lymphocyte apoptosis **Biochim. Biophys Res. Comm.** **249**: 366-370,1998.
69. MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Radic. Biol. Med.** **31**:911-922, 2001.
70. MAYER, B. & OBERBAUER, R. Mitochondrial regulation of apoptosis. **News Physiol Sci** **18**: 89-94, 2003.
71. McMURRAY, R.W.; SUWANNAROJ, S.; NDEBELE, K.; JENKINS, J.K. Differential effects of sex steroids on T and B cells: modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. **Pathobiology** **69**(1):44-58,2001.

72. MEYER, T. Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. **Med Sci Sports Exerc** **33**(4):549-555,2001.
73. MODESTI, P.A.; PELA, I.; CECIONI, I. Changes in blood pressure reactivity and 24 hours blood pressure profile occurring at puberty. **Angiology** **45**:443-450,1994.
74. MOHACSI, A.; FÜLOP, T.; KOZLOVSKY, B.; SERES, I.; LEÖVEY, A.; Superoxide anion production and intracellular free calcium levels in resting and stimulated polymorphonuclear leukocytes aobtained from healthy and arteriosclerotic subjects of various ages. **Clin. Biochem.** **25**:285-288, 1992.
75. MOINARD, C.; CALDEFIE-CHEZET, E.; WALRAND, S.; VASSON, M.P.; CYNOBER, L. Evidence that glutamine modulates respiratory burst in stressed rat polymorphonuclear cells through its metabolism into arginine. **Br J Nutr.****88**(6):689-695,2002.
76. MOOREN, F.C.; BLÖMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M.M.; VÖLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **J. Appl. Physiol.** **93**:147-153,2002.
77. MOOREN, F. C.; LECHTERMANN, A.; FROMME, A.; THORWESTEN, L.; VÖLKER, K. Alterations in intracellular calcium signaling of lymphocytes after exhaustive exercise. **Med Sci Sports Exerc**, **33**(3):242-248, 2001.
78. MORASKA, A.; DEAK, T.; SPENCER, R. L.; ROTH, D.; FLESHNER, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **Am J Physiol.** **279**: 1321-1329, 2000.
79. MURPHY, C. & NEWSHOLME, P. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. **Clinical Science** **95**: 397–407, 1998.
80. MUSTAFA, A.; MARNILA, P.; LILIUS, E.M.; HÄNNINEN, O.; SEM, C.K. Glutathione-dependent modulation of exhausting exercise-induced changes in neutrophil function of rats. **Eur J Appl Physiol.** **74**(4): 342-347, 1996.
81. NEWSHOLME, E.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CHALLONER, D.E.; ARDWI, M. A role for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. **Nutrition** **4**:256-261,1988.
82. NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C.; MURPHY, C. J.; GARCIA, C.; PIRES DE MELO, M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages, and neutrophils: its importance in health and disease. **J Nutr Biochem.** **10**: 316-324, 1999.
83. NEWSHOLME, P.; PROCOPIO, J.; LIMA, M.M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochem. Func.** **21**:1–9, 2003.
84. NIELSEN, H.B. Lymphocyte, NK and LAK Cell Responses to Maximal Exercise. **Int J Sports Med.****17**:60-65, 1996.
85. NIESS, A.M.; HARTMANN, A.; GRUNERT-FUCHS, M.; POCH, B.; SPEIT, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **Int. J. Sports Med.** **17**: 397-403,1996.
86. NIESS, A.M.; BAUMANN, M.; ROECKER, K.; HORSTMANN, T.; MAYER, F.; DICKHUTH, H.H. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. **J. Sports Med. Phys. Fitness** **38**:111-115, 1998.
87. NIEMAN, D.C. Is infection risk linked to exercise workload? **Med Sci Sports Exerc**, **32**: S406-411,2000.
88. NIEMAN, D.C.& PEDERSEN, B. K. Exercise and Immune Function. **Recent Developments. Sports Med.** **27**(2): 73-80, 1999.
89. NIEMAN, D.C. Immune response to heavy exertion. **J. Appl. Physiol.** **82**:1385-1394,1997.
90. NUNN, A. V.; BARNARD, M. L.; BHAKOO, K.; MURRAY, J.; CHILVERS, E. J.; BELL, J. D. Characterisation of secondary metabolites associated with neutrophil apoptosis. **FEBS Lett.** **392**:295-298, 1996.
91. OLINESCU, R.; HERTOGHE, J.; SAVOIU, D.; MATACHESCU, C.; NITA, S. Steroid hormones may modulate the chemiluminescence emission produced by polymorphonuclear leukocytes. **Rom J Intern Med.** **32**(1):37-46, 1994.
92. PEDERSEN, B. K. & HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the Immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiol Rev**, **80**(3): 1055-1081, 2000.
93. PEDERSEN, P. L., Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. **J Bioenerg Biomembr** **31**: 291-304, 1999.

94. PHANEUF, S. & LEEUWENBURGH, C. Apoptosis and exercise. **Med Sci Sports Exerc** **33(3)**: 393-396,2001.
95. PITHON-CURI, T. C.; MELO, M. P.; AZEVEDO, R. B.; ZORN, T. M. T.; CURI, R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **Am J Physiol**, **273 (4 Pt 1)**: C1124-1129, 1997.
96. PITHON-CURI, T.C.; DE MELO, M.P.; PALANCH, A.C.; MIYASAKA, C.K.; CURI, R. Percentage of phagocytosis, production of O₂·⁻, H₂O₂ and NO, and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. **Cell Biochem Func**, **16**:43-49 1998.
97. PITHON-CURI, T.C. & CURI, R. Metabolismo de Glutamina e sua Implicação no Processo de Apoptose em Neutrófilos de Ratos. In **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. 1º ed. Sprint, 2000.
98. PITHON-CURI, T.C.; SCHUMAKER, I.R.; FREITAS, J. J.; LAGRANHA, C. J.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **Am J Physiol-Cell Physiol**. **284**:1355-1361, 2003.
99. PITHON-CURI, T.C.; LEVADA, A.C.; LOPES, L.R.; DOI, S.Q.; CURI, R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47^{phox}, p22^{phox} and gp91^{phox} in rat neutrophils. **Clinical Science**, **103**:403-408, 2002.
100. PYNE, D.B. Effects of an intensive 12-wk training program by elite swimmers on neutrophil oxidative activity. **Med Sci Sports Exerc**. **27(4)**:536-542,1995.
101. ROHDE, T.; MacLEAN, D. A.; PEDERSEN, B. K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Med Sci Sports Exerc**. **30(6)**: 856-862, 1998.
102. SINGH, A.; FAILLA, M. L.; DEUSTER, P. A. Exercise- induced changes in immune function: effects of zinc supplementation. **J Appl Physiol**. **76(6)**: 2298-2303, 1994.
103. SMITH, R.J. & WILMORE, D.W. Glutamine nutrition and requirements. **J Parenter Enteral Nutr** **14**: 94S-99S, 1990.
104. SMITH, J. A.; TELFORD, R. D.; MASON, I. B.; WEIDEMANN, M. J. Exercise training and neutrophils microbicidal activity. **Int. J. Sport Med**. **11**:179-187, 1990.
105. WEAVER, C.M.; PEACOCK, M.; MARTIN, B.R. Calcium retention estimated from indicators of skeletal status in adolescent girls and young women. **Am J Clin Nutr**. **64**:67-70,1996.
106. WILMORE, J. H & COSTILL, D. L. In: **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. 2º ed, Editora Manole, 2001.
107. WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**. **80**:617-653, 2000.
108. WYLLIE, A.H.; KERR, J.FR.; CURRIE, A.R. Cell death: The significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol**. **68**, 251-306,1980.
109. WOODS, J.A.; LU, Q.; CEDDIA, M.A.; LOWDER, T. Exercise-induced modulation of macrofage function. **Immunol Cell Biol**. **78**:545-553, 2000.
110. YAMADA, M.; SUZUKI, K.; KUDO, S.; TOTSUKA, M.; SIMOYAMA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Effect of exhaustive exercise on human neutrophils in athletes. **Luminescence** **15(1)**: 15-20, 2000.
111. ZANATO, V.F.; MARTINS, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; PETENUSCI, S.O.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Sexual development of male Wistar rats. **Brazilian J. Med Biol. Res**. **27**:1273-1280,1994.