

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSON MURILO RAMOS DE PAULA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E DO EXERCÍCIO FÍSICO INTERVALADO DE INTENSIDADE PROGRESSIVA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E IMUNITÁRIOS DE RATOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS

CURITIBA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSON MURILO RAMOS DE PAULA

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E DO
EXERCÍCIO FÍSICO INTERVALADO DE INTENSIDADE PROGRESSIVA SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E IMUNITÁRIOS DE RATOS EM DIFERENTES
FAIXAS ETÁRIAS

Dissertação apresentada como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em Fisiologia, no Curso
de Pós Graduação em Fisiologia, Departamento de
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Fabíola Iagher

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo A. Tanhoffer

CURITIBA

2017

**Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas**

Paula, Larisson Murilo Ramos de

Efeito da suplementação com óleo de fígado de tubarão e do exercício físico intervalado de intensidade progressiva sobre parâmetros metabólicos e imunitários de ratos em diferentes faixas etárias. / Larisson Murilo Ramos de Paula. – Curitiba, 2017.

72 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Fabíola Iagher

Co-orientador: Ricardo A. Tanhoffer

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Oleo de peixe 2. Exercícios físicos – Aspectos imunológicos 3. Treinamento intervalado I. Título II. Iagher, Fabíola III. Tanhoffer, Ricardo Antônio IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 574.1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de Larisson Murilo Ramos de Paula

Aos vinte e oito dias do mês de novembro do ano de dois mil e dezessete, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação do mestrando LARISSON MURILO RAMOS DE PAULA, intitulada "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO E DO EXERCÍCIO FÍSICO INTERVALADO DE INTENSIDADE PROGRESSIVA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E IMUNITÁRIOS DE RATOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS". A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora do candidato, Professora Doutora Fabíola Iagher. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Fabíola Iagher passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Anderson Ulbrich do departamento de Medicina da UFPR. Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Fabíola Iagher fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela "aprovação", habilitando-o ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Fabíola Iagher, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 28 de novembro de dois mil e dezessete.

Professor Doutor Anderson Ulbrich
UFPR- Membro Titular

Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Fabíola Iagher
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LARISSON MURILO RAMOS DE PAULA** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à aprovação do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de novembro de dois mil e dezessete.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
<i>Aprovado</i>	Professor Doutor Anderson Ulbrich UFPR - Membro Titular	<i>Anderson Z. Ulbrich</i>
<i>APROVADO</i>	Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias UFPR - Membro Titular	<i>Fernando A. Lavezzo Dias</i>
<i>Aprovado</i>	Professora Doutora Fabíola Iagher UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora	<i>Fabíola Iagher</i>

RESUMO

O Óleo de Fígado de Tubarão (OFT) é um nutracêutico conhecido por suas propriedades imunoestimulatórias. Paralelamente, estudos afirmam que o exercício físico é capaz de influenciar na atividade do sistema imunitário, especialmente o exercício intenso, cada vez mais procurado por pessoas de diferentes idades por poder ser realizado em curto período de tempo. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os parâmetros imunitários e metabólicos de animais de diferentes faixas etárias suplementados ou não com OFT e submetidos a exercício crônico intervalado de intensidade progressiva. Para isso, ratos Wistar machos de 90, 120, 180 e 210 dias de vida foram separados em quatro grupos (9 animais/grupo): S (sedentários e não suplementados), S+OFT (sedentários e suplementados com OFT, 1g/kg de peso corpóreo), Ex (exercitados e não suplementados), e Ex+OFT (exercitados e suplementados). Os animais dos grupos exercitados (Ex e Ex+OFT) foram submetidos a três sessões semanais de exercício intervalado de intensidade progressiva em esteira ergométrica adaptada para ratos, durante 8 semanas. Já os integrantes dos grupos suplementados (S+OFT e Ex+OFT) receberam diariamente OFT durante 8 semanas. Todos os animais foram eutanasiados 48h depois da última sessão de exercício, e foram coletados plasma para avaliação de glicemia, colesterolemia e triacilglicerolemia, neutrófilos do sangue, macrófagos da cavidade peritoneal e linfócitos de linfonodos mesentéricos. Observou-se que a suplementação com OFT ou o exercício foram capazes de reduzir glicemia e colesterolemia, sem interferir na triacilglicerolemia. A suplementação não alterou ou reduziu a funcionalidade de macrófagos e neutrófilos, enquanto que elevou a proliferação linfocitária em algumas das faixas etárias estudadas. Dependendo da faixa etária, o exercício: não alterou ou aumentou a funcionalidade de macrófagos; não alterou ou diminuiu a de neutrófilos, sendo observado aumento da capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio por essas células; e elevou a proliferação linfocitária apenas em animais de 210 dias. De forma geral, é possível afirmar que o exercício intervalado de intensidade progressiva não suprimiu a função imunitária no trabalho em pauta, promovendo elevação da funcionalidade de macrófagos e linfócitos T. A suplementação com OFT na dose escolhida não promoveu efeito estimulatório sobre as células da imunidade inata estudadas, mas sim sobre linfócitos. As respostas metabólicas e imunitárias variaram dependendo da faixa etária dos indivíduos.

Palavras-chave: óleo de fígado de tubarão, exercício físico, exercício crônico, imunidade.

ABSTRACT

Shark Liver Oil (SLO) is a nutraceutical known for its immunostimulatory properties. At the same time, studies indicate that physical exercise is capable of influencing the activity of the immune system, especially the intense exercise, increasingly sought after by people of different ages because it can be performed in a short period of time. In this sense, the present work aims to evaluate the immunity and metabolic parameters of animals of different age groups supplemented or not with SLO and submitted to chronic interval exercise of progressive intensity. For this, male Wistar rats of 90, 120, 180 and 210 days of life were separated into four groups (9 animals/group): S (sedentary and not supplemented), S + SLO (sedentary and supplemented with SLO, 1g/kg of body weight), Ex (exercised and not supplemented), and Ex + SLO (exercised and supplemented). The animals of the exercised groups (Ex and Ex + SLO) underwent three weekly sessions of interval exercise of progressive intensity on treadmill adapted for rats, during 8 weeks. The members of the supplemented groups (S + SLO and Ex + SLO) received SLO daily for 8 weeks. All animals were euthanized 48 hours after the last exercise session, and plasma was collected for evaluation of blood glucose, cholesterolemia and triacylglycerolemia. Blood neutrophils, peritoneal cavity macrophages and lymphocytes of mesenteric lymph nodes were also collected. It was observed that SLO supplementation or exercise were able to reduce glycemia and cholesterolemia, without interfering with triacylglycerol levels. The supplementation did not alter or reduce the functionality of macrophages and neutrophils, while it increased lymphocyte proliferation in some of the studied age groups. Depending on the age group, exercise: did not alter or increase macrophage functionality; did not alter or decrease neutrophils functionality, being observed an increase in the production capacity of reactive oxygen species by these cells; and increased lymphocyte proliferation only in the group aged 210 days. In general, it is possible to affirm that the interval exercise of progressive intensity did not suppress the immune function in this work, promoting elevation of the functionality of macrophages and T lymphocytes. The supplementation with SLO at the chosen dose did not promote stimulating effect on the innate immunity cells studied, but on lymphocytes. Metabolic and immune responses varied depending on the age range of individuals.

Key words: Shark liver oil, physical exercise, chronic exercise, immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo das intervenções realizadas com cada conjunto etário de animais (90, 120, 180 e 210 dias) no intervalo de 9 semanas.....	25
Figura 2: (A) Evolução da massa corporal ao longo das 8 semanas de tratamento, com intervenção iniciada aos 90 dias de vida. (B) Gráfico da área sob a curva.....	31
Figura 3: (A) Evolução da massa corporal ao longo das 8 semanas de tratamento, com intervenção iniciada aos 120 dias de vida. (B) Gráfico da área sob a curva.....	32
Figura 4: (A) Evolução da massa corporal ao longo das 8 semanas de tratamento, com intervenção iniciada aos 180 dias de vida. (B) Gráfico da área sob a curva.....	33
Figura 5: (A) Evolução da massa corporal ao longo das 8 semanas de tratamento, com intervenção iniciada aos 210 dias de vida. (B) Gráfico da área sob a curva.....	34
Figura 6: Glicemia em jejum de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....	35
Figura 7: Colesterolemia em jejum de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....	36
Figura 8: Triacilglicerolemia em jejum de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....	37
Figura 9: Atividade fagocitária de macrófagos de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....	38
Figura 10: Capacidade de retenção lisossomal de macrófagos de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....	39
Figura 11: Atividade fagocitária de neutrófilos de ratos com intervenção iniciada aos 120 (A) e 210 (B) dias de vida.....	40
Figura 12: Produção de peróxido de hidrogênio de neutrófilos de ratos com intervenção iniciada aos 120 (A) e 210 (B) dias de vida.....	41
Figura 13: Produção de ânion superóxido de neutrófilos de ratos com intervenção iniciada aos 120 (A) e 210 (B) dias de vida.....	42

Figura 14: Proliferação linfocitária após 24 horas de estímulo com concanavalina A de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....43

Figura 15: Proliferação linfocitária após 48 horas de estímulo com concanavalina A de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....44

Figura 16: Proliferação linfocitária após 72 horas de estímulo com concanavalina A de ratos com intervenção iniciada aos 90 (A), 120 (B), 180 (C) e 210 (D) dias de vida.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%FCM: Porcentagem de Frequência Cardíaca Máxima

AB: Antibiótico

ACSM: American College of Sports Medicine

AHA: American Heart Association

AKG: Alquilgliceról

APCs: Células Apresentadoras de Antígenos

ConA: Concanavalina A

DAG: Diacilglicerol

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

IgG: Imunoglobulina G

IL- Interleucina

HIIT: High Intensity Interval Training

HIIRT: High Intensity Interval Resistance Training

Kd: Constante de dissociação

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

NBT: Nitroblue Tetrazolium

NK: Natural Killer

OFT: Óleo de Fígado de Tubarão

PBS: Tampão Fosfato Salino

PKC: Proteína Quinase C

PMA: Phorbol Myristate Acetate

PMAPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids

Rpm: Rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RRPs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

Th: Célula T auxiliar

TNF-alfa: Fator de Necrose Tumoral alfa

URTI: Upper Respiratory Tract Infections

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO	13
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO	15
1.3 SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO FÍSICO.....	17
1.4 OBJETIVO GERAL	23
1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2 MÉTODOS	24
2.1 TIPO DE ESTUDO	24
2.2 ANIMAIS	24
2.3 DESENHO EXPERIMENTAL	24
2.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS	25
2.5 GLICEMIA, COLESTEROLEMIA E TRIGLICERIDEMIA	27
2.6 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DE DEFESA	27
2.7 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS...	28
2.8 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS	30
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3 RESULTADOS	31
3.1 MASSA CORPORAL.....	31
3.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	34
3.2.1 Glicemia em jejum	34
3.2.2 Colesterolemia	35
3.2.3 Triacilglicerolemia	36
3.3 FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS	37
3.3.1 Atividade fagocitária	37
3.3.2 Capacidade de retenção lisossomal	38
3.4 FUNCIONALIDADE DE NEUTRÓFILOS	39
3.4.1 Atividade fagocitária	40

3.4.2	Produção de peróxido de hidrogênio	40
3.4.3	Produção de ânion superóxido	41
3.5	PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	42
4	DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

O óleo de fígado de tubarão (OFT) é a principal fonte natural de alquilgliceróis, e também apresenta em sua constituição, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs – *Polyunsaturated Fatty Acids*). Com a popularização dos nutracêuticos, o óleo de fígado de tubarão tem sido utilizado como adjuvante no tratamento de doenças tais como câncer (DAVIDSON *et al*, 2007). Seu uso para tal finalidade se dá pela demonstrada ação imunoestimulatória, bem como ação antitumoral (IAGHER *et al*, 2013). Tais benefícios têm sido atribuídos às moléculas de alquilgliceróis (AKG), as quais constituem cerca de 20 a 50% do conteúdo lipídico do OFT (BORDIER, SELLIER, FOULCAULT *et al*, 1996; PEDRONO, CHEMINADE, LEGRAND, 2004).

Os alquilgliceróis são estudados desde as primeiras décadas do século XX, e seus primeiros benefícios foram observados em casos de leucemia infantil na década de 1950, quando foi verificada sua capacidade de atenuar leucopenia e trombocitopenia provocadas pela radiação (BROHULT, HOLMBERG, 1954).

Alquilgliceróis são um grupo de lipídios de ocorrência natural compostos por uma cadeia hidrocarbônica unida por ligação do tipo éter a uma hidroxila do glicerol, mais especificamente na posição sn-1. Os alquilgliceróis mais comuns são os álcoois quimil (hexadecilglicerol, 16 átomos de carbono, cadeia saturada), batil (octadecilglicerol, 18 átomos de carbono, cadeia saturada) e selaquil (octadecenilglicerol, 18 átomos de carbono, uma dupla ligação) (HALLGREN, LARSON, 1962). De forma geral, os dois grupamentos hidroxila restantes do glicerol são substituídos por ácidos graxos de cadeia longa, saturada ou polinsaturada, nas posições sn-2 e sn-3, dando origem aos alquildiacilgliceróis (BROHULT, BROHULT, BROHULT, 1978).

Sabe-se que, em mamíferos, os alquilgliceróis são altamente (>90%) absorvidos pelo trato digestório sem que as enzimas locais rompam a ligação éter, por conta de sua incapacidade para executar tal função. Depois de absorvidos no trato gastrointestinal, esses compostos são inseridos como precursores de

fosfolipídios de membrana em praticamente todas as células, além das plaquetas (WEBER, 1985), formando estruturas denominadas fosfolipídeos éteres.

A partir da inserção nas membranas celulares, esses lipídios podem gerar compostos modulatórios de sinalização celular, tais como análogos de diacilglicerol (SZOSTAK, SZOSTAK-WEGIEREK, 2005). Os mecanismos celulares pelos quais os alquilgliceróis atuam não são completamente entendidos, mas acredita-se que seus efeitos antitumorais advêm da interação do 1-O-alkil-2-acilglicerol (análogo ao diacilglicerol) com a proteína quinase C (PKC) (SHUKLA, 1992; PUGLIESE *et al*, 1998; ROTH *et al*, 1996). O aumento nas concentrações de Ca^{2+} citosólico está envolvido com o desencadeamento de sinal necessário para a ativação linfocitária, e os AKG são capazes de modular a permeabilidade de canais de Ca^{2+} na membrana de linfócitos humanos *in vitro*, elevando o influxo de Ca^{2+} (GROSMAN, 2001; PÉDRONO *et al*, 2004b).

Há evidências de que o tratamento com alquilgliceróis eleva a atividade fagocitária de macrófagos dependente da estimulação por linfócitos, indicando o papel dos alquilgliceróis na comunicação intercelular, nesse caso (BERDEL *et al*, 1980).

Os alquilgliceróis também demonstraram, *in vitro*, inibição do fator ativador de plaquetas (PAF), atenuando a ativação desse fator, o qual participa do crescimento de células tumorais (GROSMAN, 2001). Outros estudos demonstraram que o OFT evita o desenvolvimento da caquexia, aumenta a peroxidação lipídica no tecido tumoral e que o exercício físico potencializa sua capacidade antitumoral, ou seja, diminui a proliferação tumoral e aumenta a apoptose em ratos Wistar (KRYCZYK *et al*, 2014).

O OFT tem potencial ação sobre os linfócitos, observada pela maior infiltração de linfócitos T em tumores murinos, após a injeção intraperitoneal de AKG. O aumento da infiltração de linfócitos do tipo CD8⁺, bem como elevação da resposta imune do tipo Th1 foi relatada por HAJIMORADI *et al* (2009). IAGHER (2008) também demonstrou o aumento da população de linfócitos CD8⁺ em tumor de Walker 256 após suplementação crônica (durante 8 semanas) com OFT de ratos Wistar. Além disso, foi observada elevação significativa da capacidade proliferativa de linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos destes animais em comparação com animais não suplementados. Estudos de QIAN *et al* (2014) também demonstraram

que os AKG isolados (batil e quimil) foram capazes de modular as respostas imunes, aumentando a proliferação e maturação de linfócitos de camundongos *in vitro*. Ainda em relação ao efeito sobre linfócitos, segundo Vitorino *et al* (2010), a suplementação crônica com OFT proporcionou maior proliferação de linfócitos do timo e baço de ratos exercitados (exercício moderado) e sedentários.

PALMIERI, PENNELLI e DI CERBO (2014) realizaram estudo envolvendo suplementação de pacientes idosos com OFT por 4 semanas, antes da realização de procedimentos cirúrgicos para tratamento de diferentes patologias. Observaram que esta suplementação promoveu efeitos imunoestimulatórios notórios em pessoas idosas com aumento significativo do número de células brancas no sangue, particularmente de linfócitos, e da concentração de IgG (imunoglobulina G), melhorando o pós-operatório destes indivíduos.

Não se tem conhecimento de dados na literatura que apontem diferenças nos efeitos proporcionados pelo OFT sobre a imunidade de indivíduos de diferentes faixas etárias, nem mesmo os efeitos em indivíduos submetidos cronicamente a exercício intervalado de intensidade progressiva.

1.2 EXERCÍCIO FÍSICO

Os termos “exercício físico” e “atividade física” são comumente utilizados de modo errôneo e intercambiável em diversas situações, o que compromete o entendimento do real assunto a ser discutido como escopo de determinado trabalho científico, artigo em mídias sociais ou até mesmo na comunicação entre profissionais da área da Educação Física. É o que disseram Caspersen, Powell e Christenson (1985), os quais também propuseram que tanto o exercício, quanto a atividade física possuem características comuns, como o envolvimento de movimentos corporais via musculatura esquelética, além de envolver gasto calórico e estarem relacionadas como o nível de aptidão física do indivíduo. Entretanto, o que propuseram como diferença foi, basicamente, o fato de que o exercício físico é planejado, estruturado e repetitivo, o qual possui objetivo de manter ou melhorar a aptidão física e seus

componentes (força, hipertrofia, resistência aeróbica, etc), diferentemente da atividade física.

O exercício, em particular, também possui suas definições, haja vista as variáveis envolvidas em sua composição, como a intensidade, frequência, tempo de prática, coletividade ou individualidade, meio onde é praticado, etc. O *American College of Sports Medicine* (ACSM) define a intensidade do exercício baseado na porcentagem da frequência cardíaca máxima (%FCM) a que chega o indivíduo ao realizar o exercício. Os exercícios vigorosos em intensidade seriam aqueles que promovem %FCM de 77% a 93% (e acima), enquanto os exercícios moderados promoveriam 55 a 76%FCM e os leves, <35%FCM. O ACSM tem alterado esses intervalos de intensidade desde a 6ª (2000), até a 9ª (2013) edição das *Guidelines for Exercise Testing and Prescription* em uma tentativa de apurar cada vez mais essas definições (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2013).

O exercício moderado é geralmente proposto como promotor de saúde, e as diretrizes do ACSM e do AHA (*American Heart Association*) recomendam a prática de 30min, na maioria dos dias da semana, de exercício moderado para benefícios à saúde tais como diminuição de riscos cardiovasculares, outras doenças crônicas e mortalidade (MANLEY, 1996).

Uma das modalidades de exercício intenso, o exercício intervalado de alta intensidade (HIIT - *High Intensity Interval Training*), tem se destacado por alguns benefícios particulares, quando comparado ao exercício moderado. O HIIT se caracteriza por sessões curtas de esforço elevado, próximas ao pico de consumo máximo de oxigênio pelo praticante (VO_2max), que promovem, portanto, menor volume total de exercício, devido à dificuldade de se manter o trabalho prolongado nessa intensidade (GIBALA, MCGEE, 2008). Geralmente, é realizado em sessões repetitivas, entre as quais existem intervalos, que variam de poucos segundos a alguns minutos (GIBALA, MCGEE, 2008). Os benefícios do HIIT são demonstrados por trabalhos como Burgomaster *et al* (2005), no qual o baixo volume de exercício (seis sessões curtas), praticadas por apenas 2 semanas, dobrou o tempo de capacidade de manutenção de exercício em uma carga fixa submáxima, que foi de 26, para 51 minutos totais, em média. Isso demonstra os efeitos do HIIT sobre a capacidade aeróbica desses indivíduos. Ademais, sabe-se atualmente, que exercícios intervalados intensos, como o HIIT e o HIRT (exercício resistido

intervalado de alta intensidade) melhoram a composição corporal, com aumento da capacidade de oxidação lipídica por 14h até 22h após a sessão de treino (TALANIAN *et al*, 2007; PAOLI *et al*, 2012). Em relação às indicações do ACSM e AHA de 30min/dia de exercícios moderados para a promoção da saúde, Godin *et al* (1994) demonstraram que a maioria dos adultos entrevistados não cumpriam essas indicações mínimas, sendo a falta de tempo a razão mais comumente relatada. Desse modo, os exercícios intervalados intensos agregam outro benefício, pois demandam menos tempo para ser executados, em geral. Cabe ainda destacar que, ao se comparar os exercícios moderados contínuos e intensos intervalados executados em mesmo volume, os exercícios intensos se destacam pela sua maior capacidade de aumentar a capacidade aeróbica ($\dot{V}O_2\text{max}$) e de diminuir fatores de risco associados à síndrome metabólica, como função endotelial, sinalização insulínica em células do tecido adiposo e musculoesquelético, biogênese no tecido musculoesquelético, diminuição da glicemia sérica e da lipogênese no tecido adiposo (TJØNNA *et al*, 2008).

No entanto, cabe destacar, que segundo o ACSM (2013), as contraindicações para execução dos exercícios intensos se estendem àqueles indivíduos com histórico recente de sedentarismo, histórico prévio de tabagismo, hipertensão arterial, diabetes e pré-diabetes, colesterol sérico elevado e obesidade, para os quais os riscos de agravos coronarianos são maiores, em comparação com indivíduos saudáveis.

1.3 SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO FÍSICO

O sistema imunitário protege o hospedeiro contra microorganismos ou quaisquer substâncias capazes de gerar uma resposta imune, os chamados antígenos (PARKIN, COHEN, 2001).

A resposta imunitária divide-se em dois tipos, a imunidade inata e a adquirida (adaptativa). A imunidade inata ocorre de maneira mais rápida e responde de maneira não específica através de fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, síntese de citocinas, entre outras ações. Em contrapartida, a imunidade adquirida possui caráter mais

específico e tardio, atuando através de anticorpos e linfócitos, culminando em adaptação evolutiva a cada exposição antigênica. Isso é comprovado pela diminuição da constante de dissociação (K_d) entre antígeno e anticorpo a cada novo contato, bem como pelo nível de anticorpos no soro após nova exposição ao antígeno (PARKIN, COHEN, 2001).

A resposta imunitária inata é ativada pelos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PMAPs), que são substâncias presentes na superfície de microorganismos, as quais ativam Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs), presentes nas superfícies de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (CRUVINEL *et al*, 2010). As principais células efetoras da imunidade inata são os macrófagos, os neutrófilos, as células dendríticas (fagócitos) e as *natural killer* (NK). Os macrófagos possuem alta capacidade fagocítica e produzem substâncias as quais atraem outras células de proteção para o sítio de infecção em que se encontram. Os neutrófilos representam a maior parte dos leucócitos circulantes no sangue (50-60%) e relacionam-se com a fagocitose (apesar de serem menos eficientes que os macrófagos nesse processo) e síntese de citocinas imunomoduladoras (SOUZA *et al*, 2010).

As células que compõem a imunidade adaptativa são os linfócitos T e B, os quais medeiam as respostas a antígenos via produção de anticorpos, e “memória” imunológica de reinfecção. Os linfócitos T se distinguem em dois tipos básicos: linfócitos T auxiliares e citotóxicos (MESQUITA JUNIOR *et al*, 2010). Os linfócitos T citotóxicos são responsáveis pela destruição de antígenos, via citotoxicidade celular. Os linfócitos T auxiliares subdividem-se em diversos subtipos, os quais são responsáveis por produção de citocinas que modulam a resposta das demais células do sistema imunitário, tanto recrutando ação citotóxica de linfócitos T e macrófagos, por exemplo, quanto à produção de anticorpos pelos linfócitos B, supressão da resposta inflamatória, entre outras funções (HERNANDEZ, 2009).

Apesar das diferenças, esses dois tipos de respostas, inata e adaptativa, atuam em conjunto e se complementam para que a resposta imunitária seja eficaz. As células do sistema imune inato funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs) e isso caracteriza o elo entre os dois sistemas, de modo que, após a apresentação de antígenos aos linfócitos, as células do sistema imune adaptativo ativam-se e iniciam sua expansão clonal (CRUVINEL *et al*, 2010).

Sabe-se que o exercício físico tem influência sobre o sistema imunitário e, mais especificamente, sobre o processo inflamatório. A resposta aguda ao exercício pode envolver, por exemplo, neutrofilia (aumento do número de neutrófilos séricos), diminuição de células NK (WOODS et al, 2012). Isso tem relação com o estresse térmico, mecânico e oxidativo, que têm como consequência danos tissulares (BUTTERFIELD, BEST, MERRICK, 2006, PEDERSEN, 2006). A prática crônica de exercícios físicos traz benefícios, mas dependendo de sua intensidade também pode gerar consequências indesejadas, inclusive sobre o sistema imunitário (GLEESON, 2007). Muito esforço tem sido empregado para identificar alterações nesse sistema geralmente com foco em atletas e pessoas idosas, bem como pessoas imunocomprometidas (SIMPSON et al, 2015).

A comunidade científica ainda busca, atualmente, responder com clareza as lacunas no conhecimento acerca dos benefícios ou custo/benefício da prática de exercícios intensos e moderados e seus efeitos sobre o sistema imunitário. Há evidências de que o exercício moderado é benéfico para a função das células de defesa e que o exercício intenso, como o HIIT (*High-Intensity Interval Training*), atenua a defesa contra infecções virais temporariamente em um padrão de curva em “J” (SHEPHARD, DINUBILE, 1999). O alto volume de exercício tem potencial de contribuir com uma possível imunodepressão crônica, aumentando risco de infecções (PEAKE et al, 1985).

A “Teoria da Janela da Oportunidade” indica que até 72h (3-72h) após uma sessão de treinamento, existe um decréscimo na atividade do sistema imunitário, a qual tende a se recuperar totalmente em cerca de 24h (PEDERSEN, ULLUM, 1994). Entretanto, fatores como intensidade, histórico de treinamento, suscetibilidade prévia a infecções, estado nutricional e outros, podem prolongar a duração desta “janela da oportunidade”, de modo que, se outra sessão de treinamento ocorrer antes da recuperação total, o quadro de imunossupressão pode se agravar e paulatinamente culminar em imunodepressão crônica (XIAO et al, 2015).

Horn et al (2010) coletaram amostras de sangue de mais de 2000 atletas, em cerca de 10 anos e observaram que atletas que praticam de exercícios tipo *endurance* de alta intensidade (ciclistas e triatletas) possuíam as contagens baixas de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos. Castell (2002) demonstrou que maratonistas avaliados na semana pós-competição que treinaram >96/km/semana,

sendo este treino caracterizado como exaustivo devido ao fato de ser prolongado, dobraram os casos de infecções, comparados aos que treinaram <32km/semana, sendo, portanto, moderado este volume de treinamento. Spence *et al* (2007), após coleta de saliva e secreções de atletas submetidos a exercícios exaustivos e com sintomas de URTI (*upper respiratory tract infection*), verificaram que menos de 30% dos casos continham algum patógeno isolado, indicando que algum fator não infeccioso, como inflamação local devido ao aumento da ventilação e exposição a poluentes, pode estar envolvido no processo.

Por outro lado, Liu *et al* (2017) demonstrou que a prática crônica de exercício intenso induz alterações transcricionais em leucócitos de sangue periférico de sujeitos jovens saudáveis, aumentando a expressão de genes relacionados ao metabolismo energético e diminuindo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. Zwetsloot *et al* (2017) demonstraram que 4 semanas de exercício composto por 8-12 tiros de 60 segundos de exercício intenso, com descanso de 75 segundos, 3 vezes/semana, sob a velocidade máxima que os sujeitos eram capazes de pedalar, tanto homens quanto mulheres, sedentários e saudáveis, proporcionaram melhora da performance atlética, moderação da resposta inflamatória sistêmica e melhora da resposta ao estresse oxidativo.

Desse modo, como existem controvérsias acerca da prática de exercícios intensos, para usufruir dos benefícios e atenuar os possíveis efeitos deletérios desse tipo de prática é preciso que mais estudos sejam realizados, avaliando a prática de exercícios intensos frente a diferentes situações de aptidão física, estado nutricional, padrões de movimentos executados, gênero, idade, entre outros (BRINES, HOFFMAN-GOETZ, PEDERSEN, 1996; PEDERSEN, ROHDE, OSTROWSKI, 1998).

A respeito das respostas celulares específicas ao exercício, a literatura mostra que neutrófilos sofrem uma espécie de perturbação no seu padrão repousado, e encontram-se marginados no endotélio vascular estimulados pelo exercício físico, e que o exercício promove aumento do fluxo sanguíneo e alteração na expressão de moléculas sinalizadoras que causam movimentação dessas células para regiões nas quais elas serão requisitadas (QUINDRY, STONE, KING *et al*, 2003). Ademais, sabe-se que a resposta dos neutrófilos é dependente da intensidade do exercício, pois enquanto a intensidade moderada leva a um quadro de neutrofilia, aumentando

o número e a atividade dessas células, o exercício intenso leva à neutropenia (queda no número de neutrófilos séricos) (NIEMAN, NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994; MACKINNON, 1997). A produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos parece ser atenuada após uma sessão de exercício agudo intenso (PYNE, 1994), indicando diminuição na atividade citotóxica dessas células.

Quanto aos macrófagos, células importantes na primeira linha de defesa do sistema imune inato, a resposta crônica ao exercício físico se caracteriza por aumento de sua atividade metabólica, enzimática, lisossomal e fagocítica (PEREIRA *et al*, 1995; BACURAU *et al*, 2000; WOODS *et al*, 2000). Os macrófagos parecem ter sua regulação envolvida com a atividade do sistema nervoso central e com os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais, observado por Woods *et al* (1997), o qual concluiu que existe uma relação entre o aumento dos níveis de corticosterona induzidos pelo exercício com uma menor expressão de MHC II (Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II) em macrófagos peritoneais de ratos. Alguns trabalhos demonstram que ratos exercitados e de idade mais avançada possuem desregulação em atividades de macrófagos como produção de citocinas, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, atividades antimicrobicas e antitumorais (DAVILA *et al*, 1990; WALLACE *et al*, 1995; ALVAREZ *et al*, 1996; DING *et al*, 1994; KHARE, SOHDI & SINGH, 1996).

Em relação à resposta dos linfócitos ao exercício, Janeway e Travers (1994) utilizaram mitógenos para a indução de uma população ou todos os linfócitos a se proliferarem e observaram que houve declínio da proliferação linfocitária nas primeiras horas após o exercício físico agudo. Tem-se discutido na literatura como a intensidade e volume de exercícios se relacionam com o sistema imunitário, no que tange à imunomodulação. Para tanto, o exercício intenso tem sido caracterizado como imunossupressor (NIEMAN, PEDERSEN, 1999; NIEMAN, 2000), haja vista a diminuição de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) circulantes. Isso diminui a atividade de células que medeiam a imunidade por intermédio de fagocitose, o que está relacionado com suscetibilidade infecciosa no período após exercício intenso ou de longos períodos (PEDERSEN, TOFT, 2000; STEENBERG, TOFT, BRUUNGAARD *et al*, 2001). Heck *et al* (2017) concluíram que a quantidade (carga) de trabalho de uma sessão de exercício aguda é diretamente proporcional ao

estímulo imunoinflamatório de linfócitos em tecidos afastados da circulação, devido à resposta causada pelo estresse.

Apesar de haver evidências de que o exercício físico, seja ele agudo ou crônico, moderado ou intenso, pode trazer alterações não desejadas ao sistema imunitário, também podem ser encontradas adaptações benéficas, como as descritas por LIU *et al* (2017), os quais demonstraram que o exercício tipo *endurance* intenso pode induzir cronicamente alterações transcricionais em leucócitos circulatórios, aumentando a expressão de genes vinculados à síntese de proteínas relacionadas à maquinaria energética mitocondrial, ao mesmo tempo em que atenua a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (FERNANDES *et al*, 2012, SOCI, *et al*, 2011)). GLEESON (2007) também comenta que em períodos de treinamento intensificado (*overreaching*), que duram 1 semana ou mais em treinamento periodizado de atletas, existe uma disfunção no sistema imunitário nesses indivíduos, mas que não é caracterizada como disfunção clínica. Além disso, ele também argumenta que a diminuição de marcadores inflamatórios causada pela imunossupressão originada pelos exercícios intensos pode ser benéfica, pois tais marcadores estão geralmente associados com doenças crônicas.

GLEESON (2007) comenta que o risco de infecções de menor importância em praticantes de atividade física são um obstáculo praticamente inevitável como efeito anti-inflamatório do exercício mediado por citocinas.

Como o exercício físico é relacionado com aumento de longevidade e diminuição de riscos de doenças cardiovasculares, diabetes, síndrome metabólica, hipertensão, doenças infecciosas e câncer (EVENSON *et al*, 2003; KODAMA *et al*, 2009; LYNCH *et al*, 1996), ressalta-se a importância da investigação dos efeitos do exercício e outras intervenções relacionadas à funcionalidade do sistema imunitário, como a suplementação com o OFT, para a verificação de possíveis efeitos protetivos a longo prazo.

Portanto, o exercício físico regular é recomendado para manutenção da saúde, e recomenda-se sua prática em todas as idades. No entanto, as pessoas possuem cada vez menos tempo para realização regular de exercício físico, e a prática exercícios de alta intensidade realizados em curto período de tempo têm atraído cada vez mais pessoas, de diferentes faixas etárias, para as academias especializadas neste tipo de atividade. No entanto, sabe-se que exercício físico

altera respostas imunitárias. Considerando o crescente interesse das pessoas pelo o exercício intenso, as informações disponíveis a respeito do efeito imunomodulatório do óleo de fígado de tubarão, e a falta na literatura científica de estudos que comparem efeitos do exercício físico em diferentes faixas etárias, o presente trabalho se propôs a investigar, em modelo animal, efeitos do exercício intervalado de intensidade progressiva sobre imunidade inata e adaptativa de indivíduos suplementados ou não com o nutracêutico óleo de fígado de tubarão.

1.4 OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros metabólicos e imunitários de animais de diferentes faixas etárias suplementados ou não com OFT e submetidos ao efeito crônico do exercício intervalado de intensidade progressiva.

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos de diferentes faixas etárias, submetidos ou não a exercício crônico intervalado de intensidade progressiva e/ou suplementação com OFT, os efeitos sobre:

- glicemia, triacilglicerolemia e colesterolemia em jejum;
- capacidade fagocítica e volume lisossomal de macrófagos peritoneais;
- capacidade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos plasmáticos;
- capacidade proliferativa de linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos.

2 MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

No presente estudo foi adotado delineamento de pesquisa experimental com grupos randomizados, divididos de acordo com a presença ou não de suplementação e treinamento físico nos seguintes grupos: S (sem suplementação e sedentários), S+OFT (sedentários e suplementados diariamente com OFT, 1g/kg de peso corpóreo), Ex (exercitados e sem suplementação), e Ex+OFT (exercitados e com suplementação). Esse padrão foi seguido a cada conjunto etário utilizado. Os conjuntos etários foram de 90, 120, 180 e 210 dias de vida.

2.2 ANIMAIS

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Para a realização deste trabalho foram utilizados 144 ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente separados nos quatro grupos mencionados (S, S+OFT, Ex e Ex+OFT), sendo que cada grupo foi constituído de 9 animais, totalizando 36 animais por conjunto etário.

Após a divisão, os animais passaram por uma semana de adaptação à esteira própria para ratos, independentemente do grupo de que faziam parte e, subsequentemente, iniciavam-se as abordagens de suplementação e exercícios por 8 semanas, conforme os grupos.

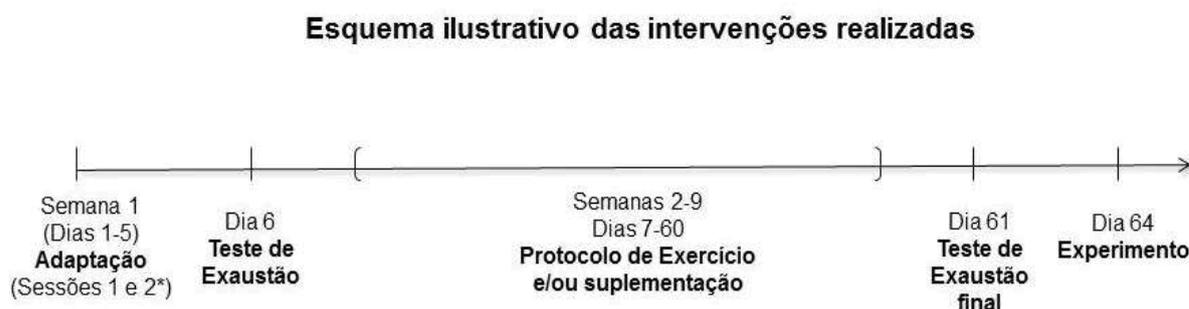
Após 8 semanas de experimentação (presença ou não de suplementação e/ou exercício físico), os animais foram ortotansados por guilhotina, e plasma,

macrófagos peritoneais, neutrófilos plasmáticos e linfócitos de linfonodos mesentéricos foram coletados. Foram avaliados capacidade fagocítica e volume lisossomal dos macrófagos capacidade fagocítica, volume lisossomal e produção de espécies reativas de oxigênio dos neutrófilos, e capacidade de proliferação dos linfócitos. Com o plasma coletado dos animais foram realizados ensaios de quantificação de glicose, triacilgliceróis e colesterol total.

2.4 PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS

As intervenções realizadas com os grupos dos diferentes conjuntos etários estão apresentadas cronologicamente na Figura 1 e descritas posteriormente.

FIGURA 1: ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS INTERVENÇÕES REALIZADAS COM CADA CONJUNTO ETÁRIO DE ANIMAIS (90, 120, 180 E 210 DIAS) NO INTERVALO DE 9 SEMANAS.



Previamente ao protocolo de exercícios, os animais passaram por um período de adaptação, que foi realizado em esteira própria para ratos. Foram 5 dias, sendo 2 sessões por dia (Sessão 1 e Sessão 2), com 5 minutos de aquecimento a 5m/min antes da Sessão 1 e desaquecimento após a Sessão 2 a 2,5m/min, com intervalo de 5 minutos entre as sessões.

As sessões foram baseadas no trabalho de WISLØFF *et al* (2001) e foram caracterizadas por:

- Dia 1:

Sessão 1: 10 minutos, a 5m/min.

Repouso: 5 minutos

- Sessão 2: 20 minutos, a 5m/min
- Dia 2:
 - Sessão 1: 10 minutos, a 7m/min
 - Repouso: 5 minutos
 - Sessão 2: 20 minutos, a 7m/min
 - Dia 3:
 - Sessão 1: 15 minutos, a 10m/min
 - Repouso: 5 minutos
 - Sessão 2: 20 minutos, a 10m/min
 - Dia 4:
 - Sessão 1: 15 minutos, a 12m/min
 - Repouso: 5 minutos
 - Sessão 2: 20 minutos, a 12m/min
 - Dia 5:
 - Sessão 1: 20 minutos, a 15m/min
 - Repouso: 5 minutos
 - Sessão 2: 20 minutos, a 15m/min
- A inclinação foi mantida em 5 graus em todos os dias e sessões.

Em seguida à fase de adaptação, os ratos foram submetidos ao teste de exaustão, cujo objetivo foi identificar a capacidade física individual máxima desses animais. Esse teste foi realizado no sexto dia da semana de adaptação e constou de 2 minutos de aquecimento a 5m/min e, subsequentemente, a cada 2 minutos, a velocidade era elevada em 2m/min (p. ex. 5m/min, depois de 2 minutos velocidade aumentava para 7m/min, após mais 2 minutos, aumentava para 9m/min e assim por diante). A inclinação foi de 5 graus em todo o teste. Para os ratos que não conseguiam acompanhar a corrida por 2 minutos, a última velocidade alcançada (nos 2 minutos anteriores) era considerada o 100% da capacidade física individual máxima desses animais (WISLØFF *et al*, 2001).

O protocolo de exercício físico em si foi iniciado 48h após o teste de exaustão e constou de 8 semanas, 3 vezes na semana. Sempre com inclinação em 5 graus. O exercício possuía caráter intervalado e progressivo para alta intensidade, com intervalos passivos, sendo constituído por 5 minutos a inicialmente 50% da

capacidade máxima individual do animal e 3 minutos de descanso passivo, seguido de aumento de 10% a cada corrida até completar 30 minutos, com 100%, ou seja, 5 minutos a 60%, seguidos de 3 minutos de descanso; 5 minutos a 70%, seguidos de 3 minutos de descanso; 5 minutos a 80%, seguidos de 3 minutos de descanso; 5 minutos as 90%, seguidos de 3 minutos de descanso; e 5 minutos as 100%, seguidos de 3 minutos de descanso, totalizando 30 minutos de exercício ativo e 15 minutos de descanso passivo. Finalmente, havia o desaquecimento a 50% por 3 minutos (adaptado de HARAM *et al*, 2008). Este tipo de protocolo de exercício foi adotado com intuito de submeter os animais a exercício intenso, mimetizando o que atualmente tem sido adotado em vários centros de atividade física (os chamados Treinamentos Intervalados de Alta Intensidade).

2.5 GLICEMIA, COLESTEROLEMIA E TRIGLICERIDEMIA

Os valores dos parâmetros séricos de glicemia, colesterolemia e triacilglicerolemia foram obtidos a partir de kits específicos para cada análise (Labtest®), cada um com a respectiva solução de valor padrão, as quais possuem uma concentração conhecida para cada analito (100mg/dL para glicose, 200mg/dL para colesterol total e triglicerídeos), sendo utilizadas posteriormente como padrão para comparação com os valores coletados de cada animal. Os valores séricos dessas análises foram obtidos por espectrofotometria, em 500nm.

2.6 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DE DEFESA

Depois de 60 dias de treinamento e/ou suplementação os animais foram eutanasiados, e macrófagos peritoneais foram obtidos após introdução no peritônio de 20mL de tampão fosfato (PBS estéril), pH 7,4 com cuidado para não perfurar órgãos internos. Em seguida, foi realizada massagem no peritônio do animal por 30 segundos e, então, aberto cuidadosamente um pequeno orifício que permitia a entrada da pipeta do tipo Pasteur de plástico e estéril para a aspiração do lavado contendo as células. Na sequência, este lavado foi centrifugado (Eppendorf-

Centrifuge 5810 R) a 322 x *g* a 4° C, durante 5 min (BELO, 2007), e as células obtidas foram contadas em câmara de Neubauer.

Para o isolamento de linfócitos, os linfonodos mesentéricos foram mantidos em PBS com antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L) (PBS+AB), e macerados com auxílio de êmbolo de seringa e peneira de malha fina, em placa de Petri. Para cada grupo de animais foi obtido um *pool* de linfócitos. O conteúdo macerado de linfonodos mesentéricos foi filtrado em papel filtro apropriado e centrifugado a 322 x *g*, durante 7 minutos, a 4° C. Os precipitados foram lavados com PBS+AB por 2 vezes, e o último sedimentado foi ressuspensão em meio de cultura RPMI1640 contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L) (IAGHER, 2008). Células foram contadas em câmara de Neubauer.

Os neutrófilos foram isolados conforme método proposto por Bøyum (1976). O sangue dos animais foi coletado em tubos tipo falcon de 15mL, contendo anticoagulante (heparina) e mantido em refrigeração. Posteriormente, o sangue foi centrifugado no próprio tubo a 322 x *g* a 4 °C por 5min. O plasma foi separado e o restante do sangue foi transferido para tubo tipo falcon de 50 mL, acrescentando-se o mesmo volume em PBS. Em tubos contendo 3 mL de Ficoll-Paque PLUS, foram acrescentados 8 mL do sangue diluído em PBS. Os tubos foram centrifugados a 400 x *g* a 18° C durante 40 min. A camada superior transparente composta por células mononucleares e plaquetas foi desprezada. A camada inferior constituída por hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo. As amostras foram submetidas duas vezes à lise hipotônica por incubação com solução hemolítica (Tris base (tris [hidroximetil] aminometano) 17,0 mM; NH₄Cl 18,7 mM) em banho-maria a 37 °C por 5 min. A solução foi centrifugada a 322 x G por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

2.7 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS

A capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos foi avaliada de acordo com o método descrito por Bonatto (2008). Foram depositados 100 µL de solução

contendo 10^6 células em placa tipo ELISA de 96 poços. Foram adicionados 20 μ L de zimosan corado com vermelho neutro e incubados por 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 μ L de fixador Baker. Após 30 min, a placa foi lavada com PBS e centrifugada a 503 x G a 4° C por 5 min. O vermelho neutro que se encontrava dentro dos fagossomos foi solubilizado utilizando-se 200 μ L de solução de extração e, após 30 minutos, foi realizada a leitura em leitor de microplacas a 550 nm. Os resultados foram expressos em absorvância/ 10^6 células.

Para a análise de volume lisossomal de macrófagos, foi utilizado o método descrito por Pipe, Coles e Farley (1995), segundo o qual, em placa do tipo ELISA, foram depositados 100 μ L da solução de macrófagos contendo 10^6 células e adicionado 20 μ L de vermelho neutro a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 min a 503 x G. O sobrenadante foi descartado e, individualmente, cada poço foi lavado com PBS, a fim de eliminar o vermelho neutro que não tivesse sido internalizado pelas células. Foram adicionados então 100 μ L de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro retido dentro dos lisossomos. Isso é possível, visto que o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular, e uma vez presente no lisossomo, fica retido por mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Após 30 min, a placa foi lida em leitor de microplacas a 550nm. Os resultados foram expressos em absorvância/ 10^6 células.

A geração de ânion superóxido pelos neutrófilos foi determinada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT – Sigma), composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al*, 1994). Os neutrófilos (10^6 células) foram incubados por 1 h com 0,1% de NBT e 30 μ L de forbol miristato acetato (PMA - 80 mM) em PBS a 37 °C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30 seg a 2236 x G) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 0,9 mL de ácido acético a 50%. A absorvância do sobrenadante foi determinada a 550 nm em espectrofotômetro. Os dados são expressos em absorvância/ 10^6 células.

A produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos foi mensurada utilizando-se o método descrito por Pick e Mizel (1981) modificado. Através da

oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H_2O_2 . Alíquotas de 100 μ L de solução de neutrófilos contendo 10^6 e 10 μ L de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 mM) foram colocadas em placas de ELISA. Após 1 h de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os poços receberam 100 μ L da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zimosan. Em seguida os neutrófilos foram incubados por mais 30 min e após o término deste tempo a leitura foi feita no comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em absorbância/ 10^6 células.

2.8 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS

Os linfócitos dos diferentes grupos foram cultivados em placas de ELISA em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, contendo 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L) com 160 μ L de solução contendo 5×10^4 células/escavação, estimuladas ou não com 20 μ L/escavação do mitógeno concanavalina A (Con A-5 μ g/m) e 20 μ L/escavação do detector de atividade metabólica AlamarBlue® (Biosource), e mantidas a 37° C em atmosfera de 95% ar / 5% de CO_2 por 72 h. A determinação da porcentagem de redução do AlamarBlue® é feita a 570 e 620 nm em leitor multifuncional de microplacas Tecan infinite® 200 nos momentos, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância de duas vias, tendo como fatores o exercício e suplementação, seguido de pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$ para cada conjunto etário. Os testes foram realizados no software estatístico GraphPad Prism 6®.

3 RESULTADOS

3.1 MASSA CORPORAL

Não foram encontradas diferenças estatísticas para a massa corporal entre os grupos tanto no conjunto etário 90d (Figura 2), 120d (Figura 3) e 180d (Figura 4). No entanto, no conjunto 210d (Figura 5) foi observado que os animais do grupo Ex obtiveram peso 3,78% menor na análise de área sob a curva, quando comparados ao grupo S.

FIGURA 2: (A) EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL AO LONGO DAS 8 SEMANAS DE TRATAMENTO, COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 DIAS DE VIDA. (B) GRÁFICO DA ÁREA SOB A CURVA. N= 9 RATOS POR GRUPO. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO E SUPLEMENTADO.

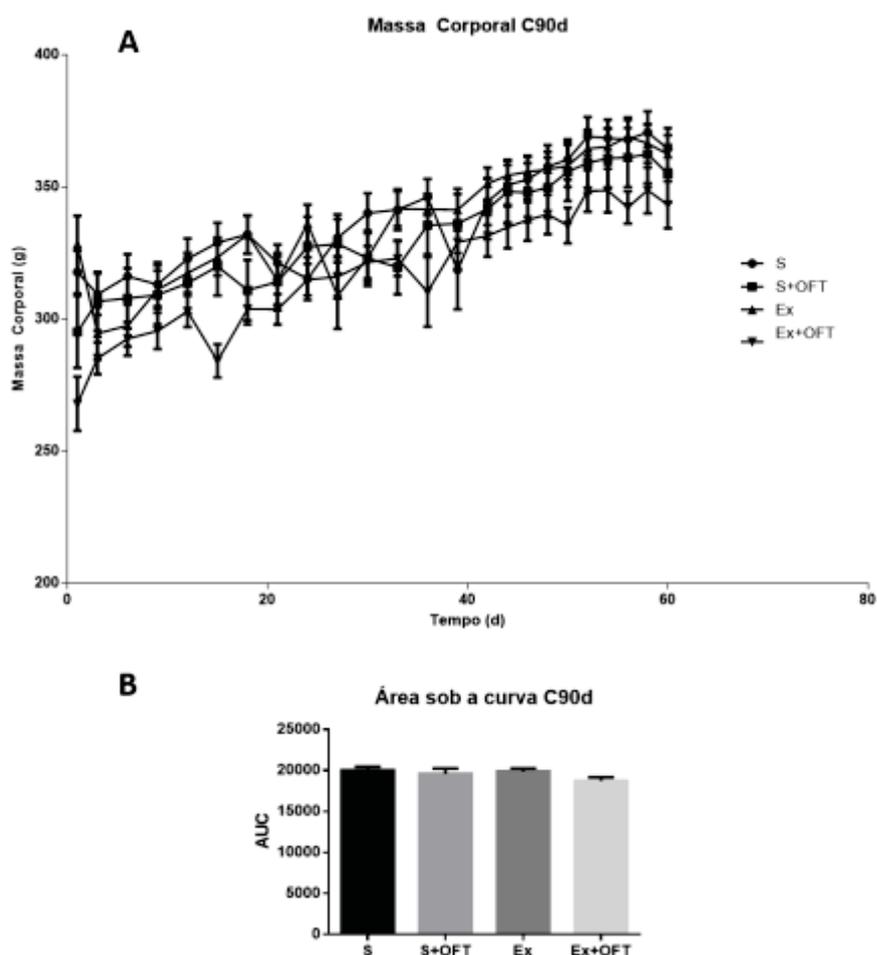


FIGURA 3: (A) EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL AO LONGO DAS 8 SEMANAS DE TRATAMENTO, COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 120 DIAS DE VIDA. (B) GRÁFICO DA ÁREA SOB A CURVA. N= 9 RATOS POR GRUPO. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO E SUPLEMENTADO.

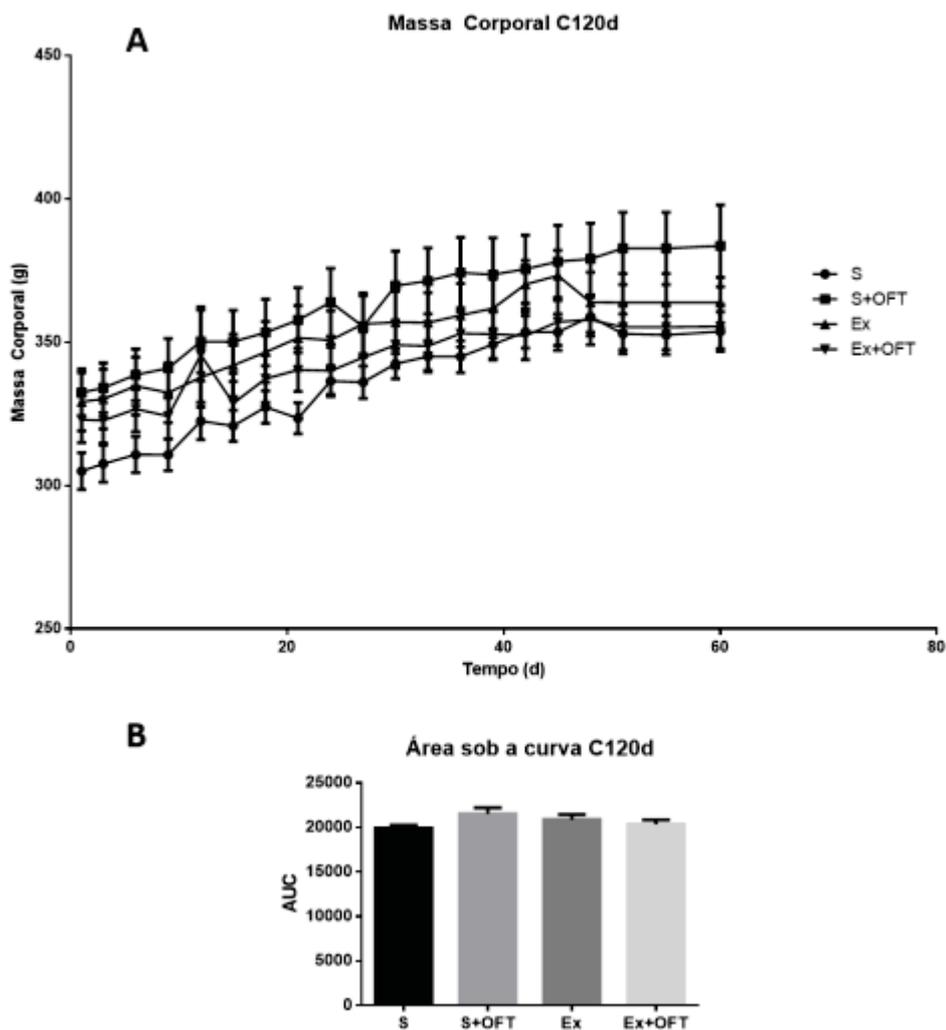


FIGURA 4: (A) EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL AO LONGO DAS 8 SEMANAS DE TRATAMENTO, COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 180 DIAS DE VIDA. (B) GRÁFICO DA ÁREA SOB A CURVA. N= 9 RATOS POR GRUPO. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO E SUPLEMENTADO.

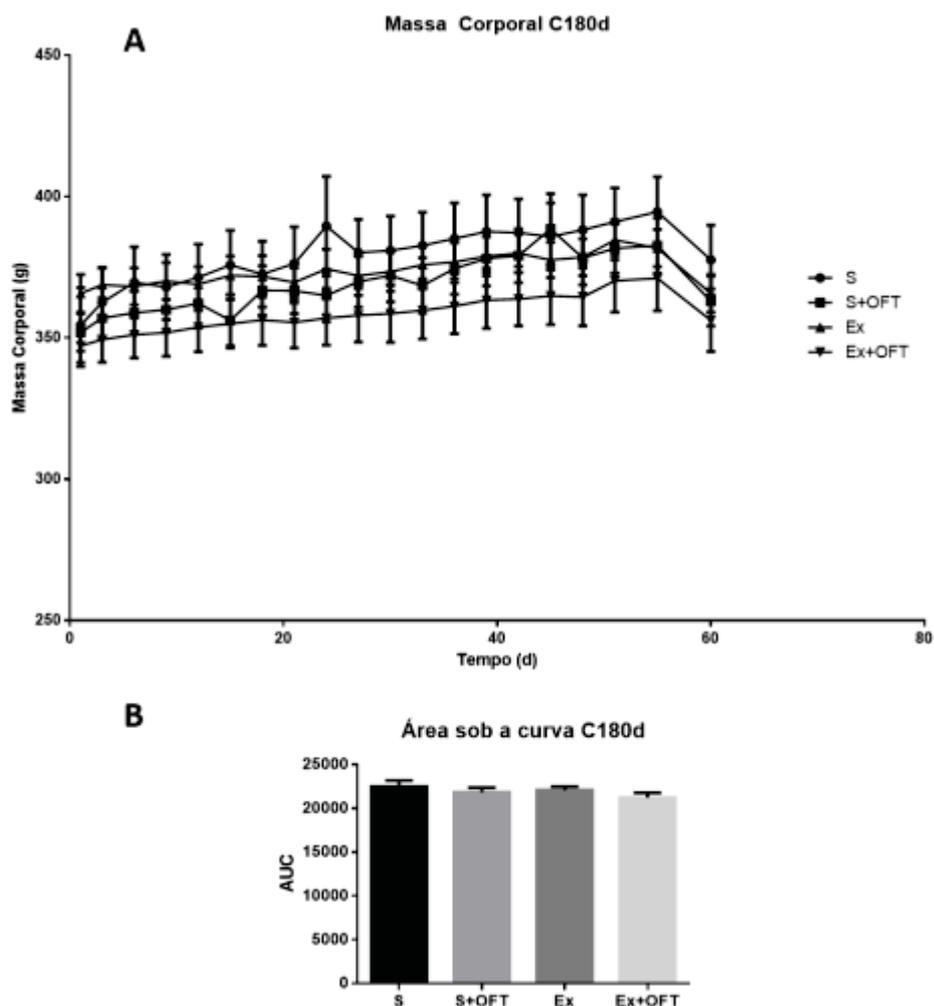
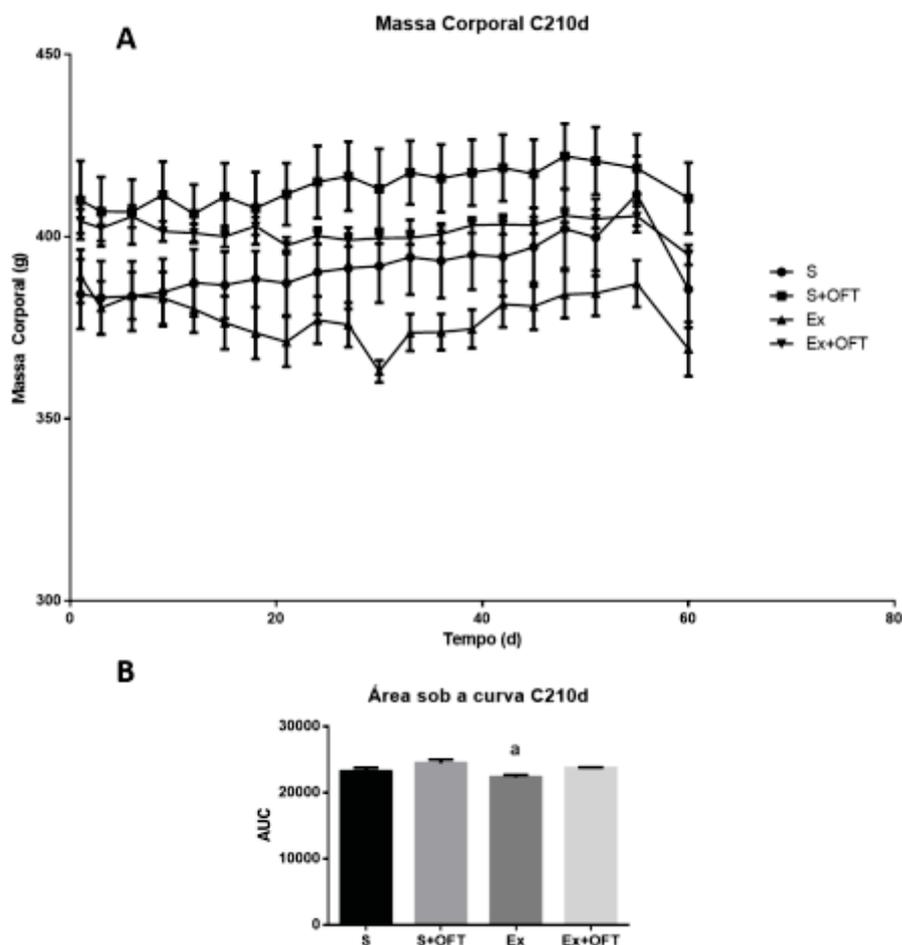


FIGURA 5: (A) EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL AO LONGO DAS 8 SEMANAS DE TRATAMENTO, COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 210 DIAS DE VIDA. (B) GRÁFICO DA ÁREA SOB A CURVA. N= 9 RATOS POR GRUPO. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO E SUPLEMENTADO. ^A P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO S.



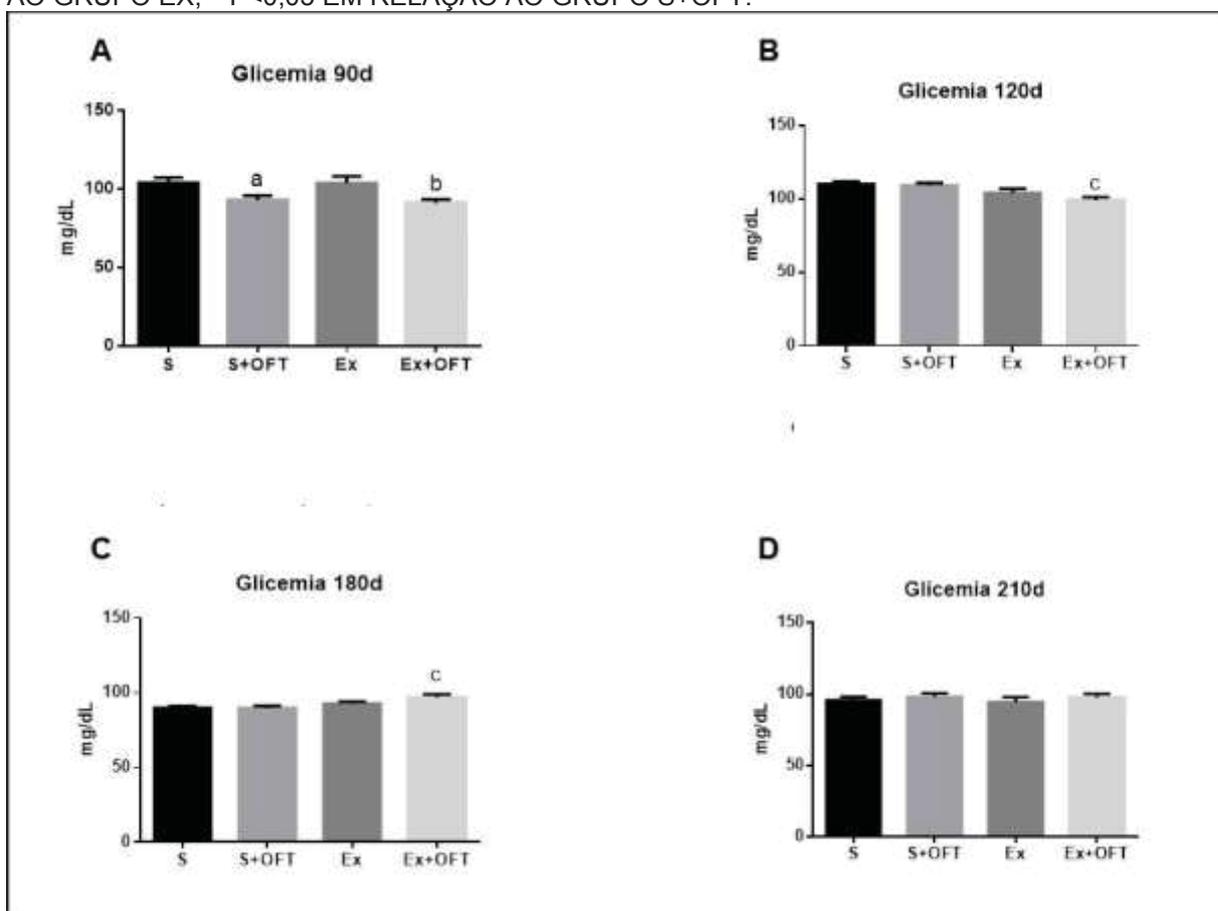
3.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.2.1 Glicemia em jejum

Animais com 90 dias de vida dos grupos suplementados (S+OFT e Ex+OFT) apresentaram redução da glicemia em jejum de 10% ao final da intervenção em relação aos seus respectivos controles, grupos S e Ex ($p < 0,05$). Este padrão de resposta não foi observado nas outras faixas etárias avaliadas. Com 120 dias, os animais do grupo Ex+OFT apresentaram redução da glicemia em jejum em relação

ao grupo S+OFT (cerca de 10%, $p < 0,05$). Ao contrário, animais com 180 dias de vida do grupo Ex+OFT apresentaram acréscimo da glicemia em relação ao grupo S+OFT (cerca de 8%, $p < 0,05$). Animais com 210 dias de vida dos diferentes grupos não apresentaram diferença na glicemia ($p > 0,05$) (Figura 6).

FIGURA 6: GLICEMIA EM JEJUM DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO E SUPLEMENTADO. ^A $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S; ^B $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO EX; ^C $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S+OFT.

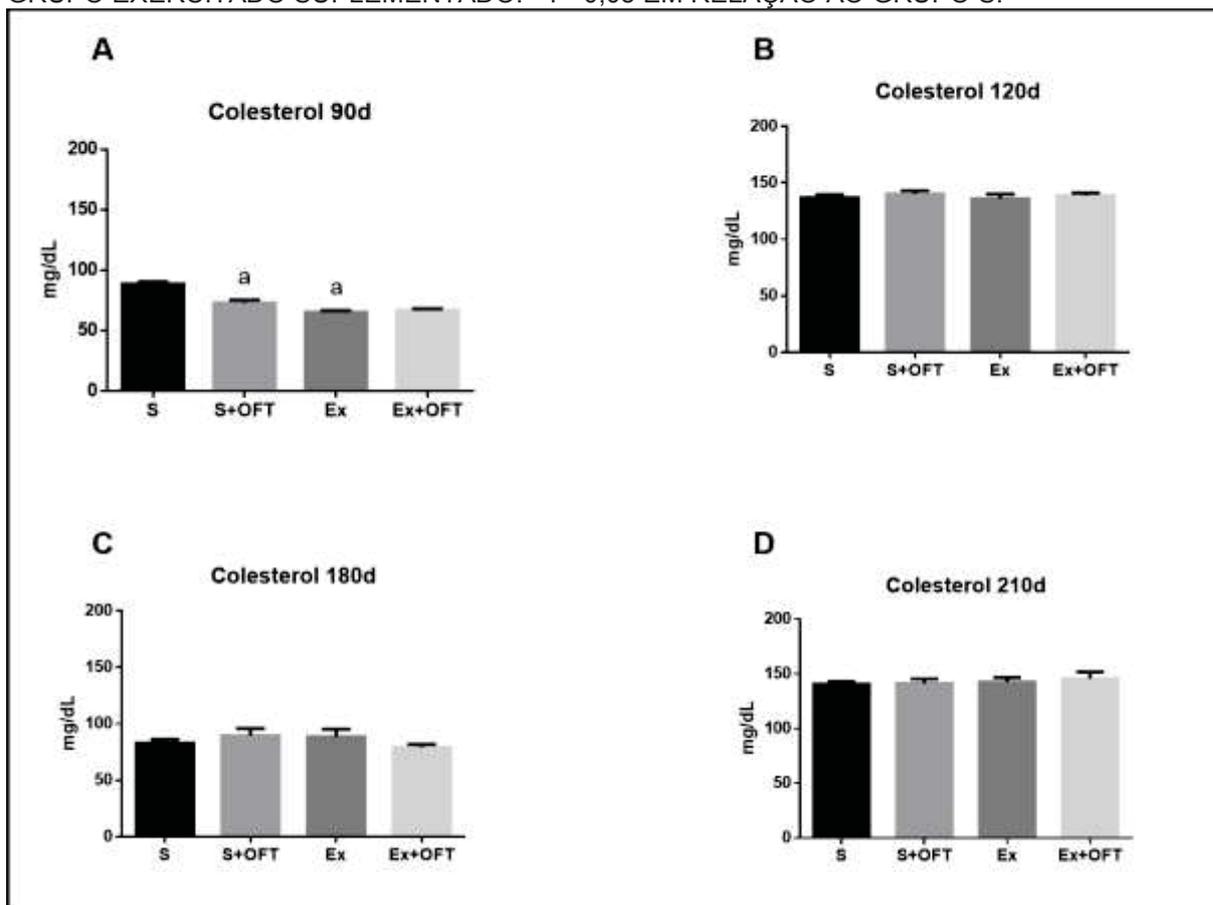


3.2.2 Colesterolemia

Animais com 120, 180 e 210 dias de vida dos diferentes grupos apresentaram valores de colesterol total plasmático em jejum similares ($p > 0,05$). Já animais com 90 dias suplementados (S+OFT) apresentaram redução da colesterolemia em

relação ao grupo S (18%, $p < 0,05$). Do mesmo modo, animais de 90 dias exercitados (Ex) apresentaram redução na colesterolemia quando comparados aos animais do grupo S (26%, $p < 0,05$). Para os demais grupos, não houve diferença significativa.

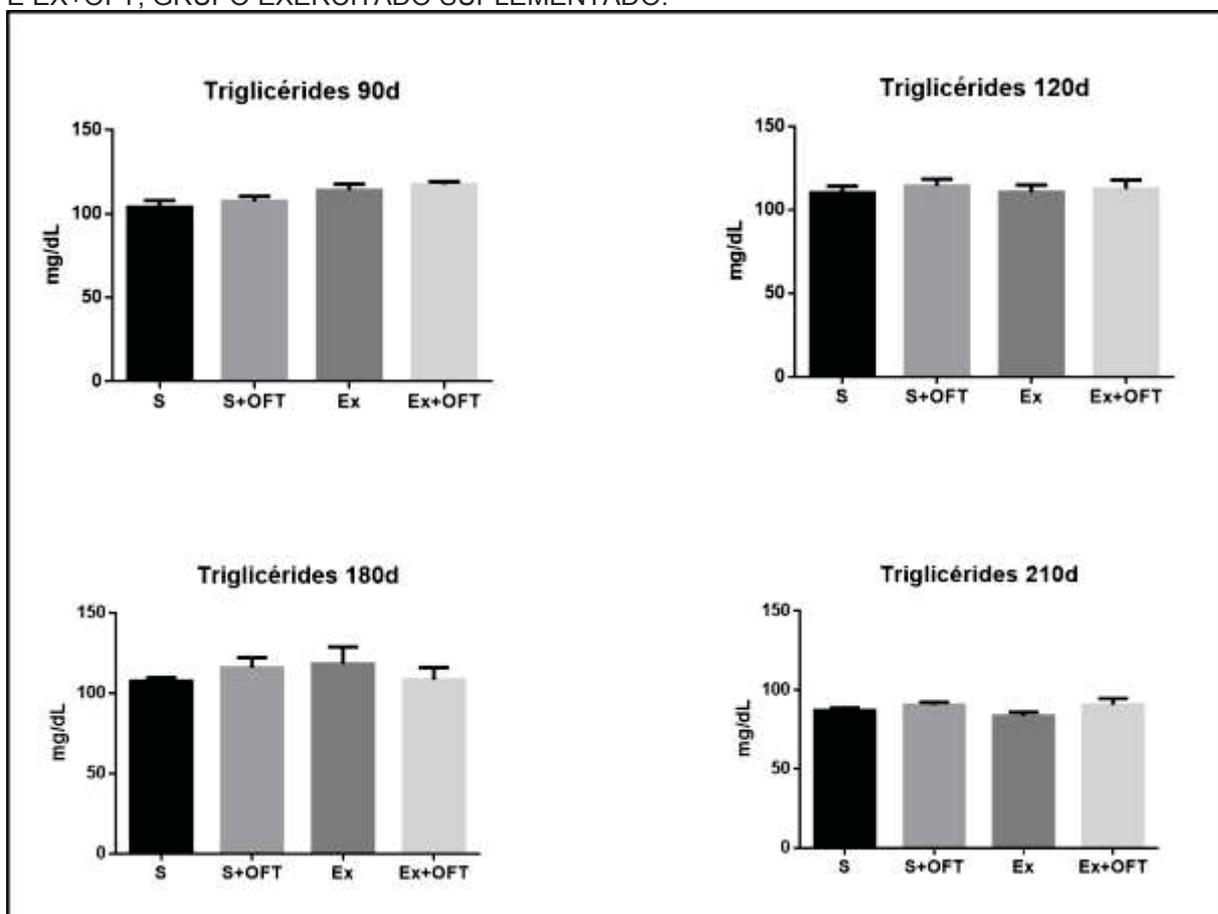
FIGURA 7: COLESTEROLEMIA EM JEJUM DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S.



3.2.3 Triacilglicerolemia

Animais dos grupos S, S+OFT, Ex e Ex+OFT apresentaram valores semelhantes de triacilglicerolemia, nas diferentes faixas etárias estudadas ($p > 0,05$).

FIGURA 8: TRIACILGLICEROLEMIA EM JEJUM DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO.



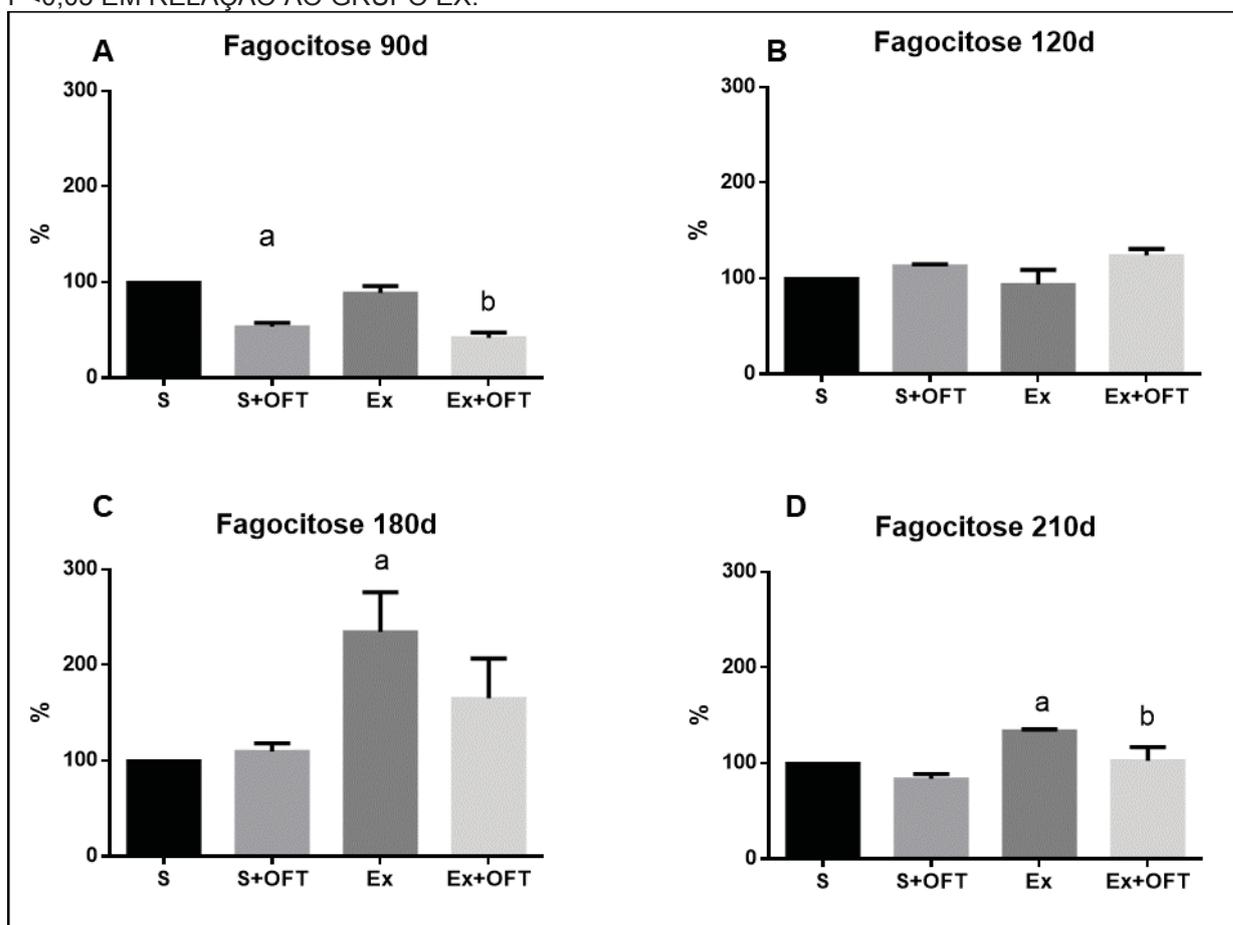
3.3 FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS

3.3.1 Atividade fagocitária

Macrófagos de animais com 120 dias de vida dos diferentes grupos apresentaram valores de atividade fagocitária que não foram diferentes estatisticamente ($p > 0,05$). Já animais com 90 dias de vida dos grupos S+OFT e Ex+OFT apresentaram redução na atividade fagocitária de macrófagos em relação aos respectivos grupos controle, S e Ex (46,5% e 52,7%, $p < 0,05$). Enquanto isso, animais de 180 dias de vida exercitados (Ex) apresentaram elevação na atividade fagocitária de macrófagos (134%, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo S. Quanto

aos animais de 210 dias de vida, o grupo exercitado (Ex) apresentou aumento na atividade fagocitária de macrófagos (33,9%, $p < 0,05$), em comparação ao grupo S, ao passo que o grupo exercitado e suplementado (Ex+OFT) apresentou diminuição da mesma atividade (23,4%, $p < 0,05$), em comparação ao grupo Ex.

FIGURA 9: ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S; ^B $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO EX.

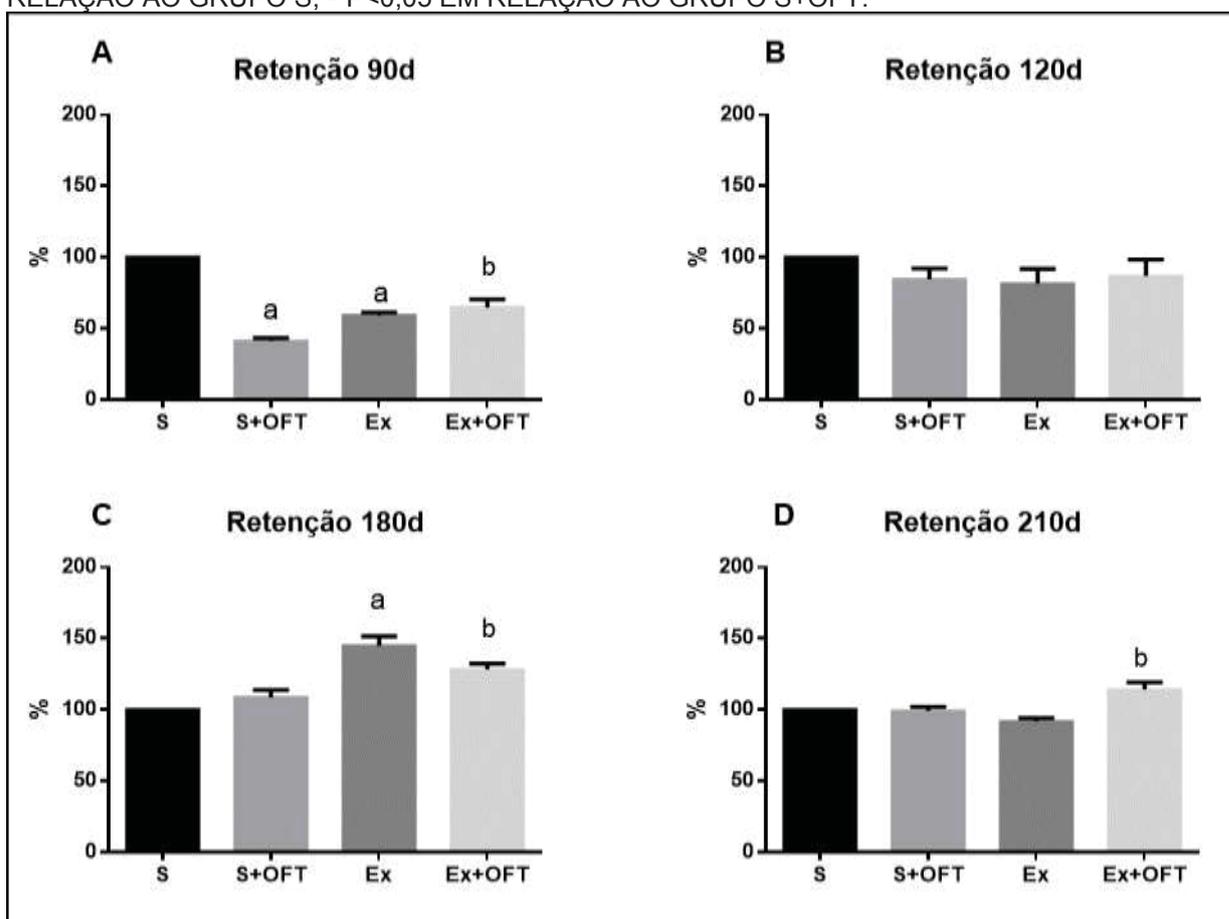


3.3.2 Capacidade de retenção lisossomal

Macrófagos de animais de 120 dias de vida dos diferentes grupos apresentaram valores de retenção lisossomal similares ($p > 0,05$). Já animais com 90 dias de vida suplementados (S+OFT) e animais exercitados (Ex) apresentaram

diminuição da retenção lisossomal (58,8% e 40,7%, respectivamente; $p < 0,05$), em comparação ao grupo S. Animais do grupo Ex+OFT apresentaram elevação da retenção lisossomal quando comparados ao grupo S+OFT. Os animais de 180 dias de vida exercitados (Ex) apresentaram aumento (44,7%, $p < 0,05$) na capacidade de retenção lisossomal em comparação ao grupo S, enquanto animais do grupo Ex+OFT apresentaram aumento em relação ao grupo S+OFT (18%, $p < 0,05$). Animais do grupo Ex+OFT de 210 dias apresentaram elevação da retenção lisossomal em relação ao grupo S+OFT de 15% ($p < 0,05$).

FIGURA 10: CAPACIDADE DE RETENÇÃO LISSOSSOMAL DE MACRÓFAGOS DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S; ^B $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S+OFT.

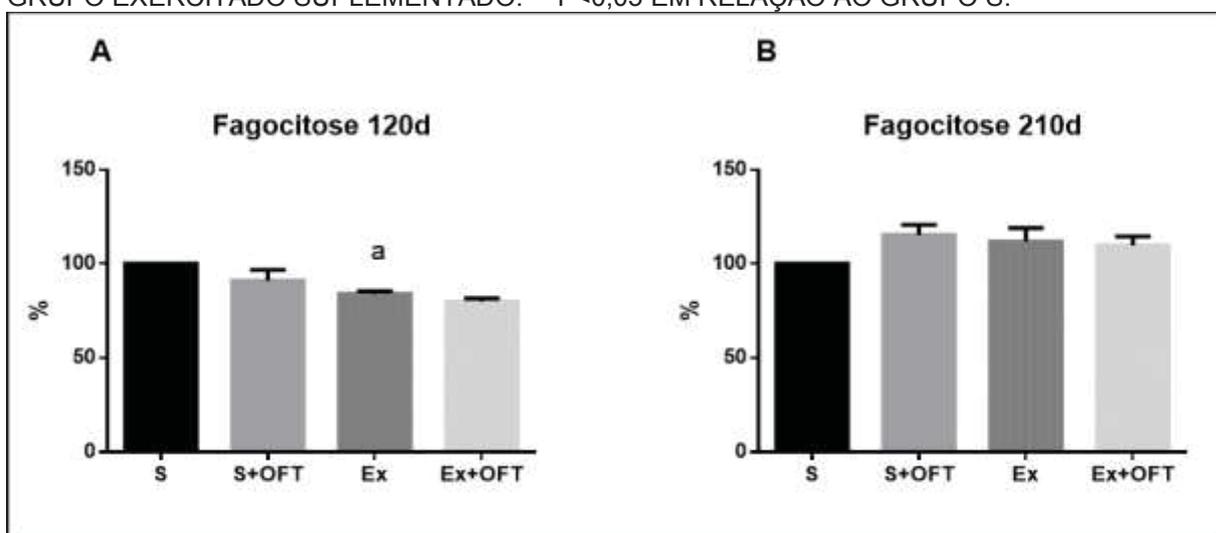


3.4 FUNCIONALIDADE DE NEUTRÓFILOS

3.4.1 Atividade fagocitária

Animais de 120 dias exercitados (Ex) apresentaram redução da atividade fagocitária de neutrófilos em relação aos animais do grupo S (16%, $p < 0,05$). Os neutrófilos dos grupos S, S+OFT, Ex e Ex+OFT não apresentaram diferença de atividade fagocitária, tanto de animais com 180 quanto de 210 dias de vida ($p > 0,05$).

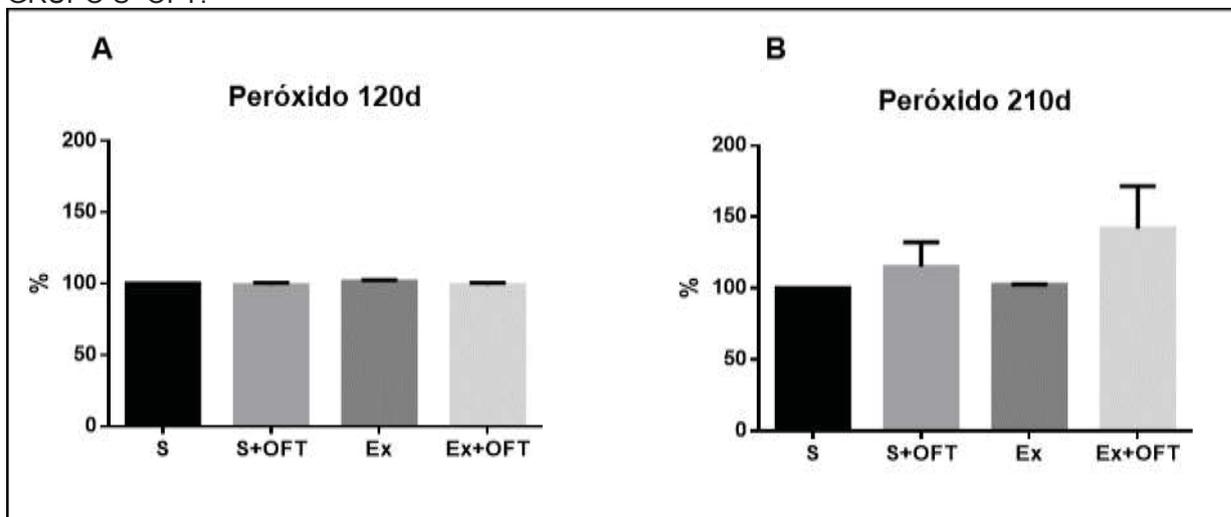
FIGURA 11: ATIVIDADE FAGOCITÁRIA DE NEUTRÓFILOS DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 120 (A) E 210 (B) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A $P < 0,05$ EM RELAÇÃO AO GRUPO S.



3.4.2 Produção de peróxido de hidrogênio

Os neutrófilos de animais com 120 e 210 dias de vida dos diferentes grupos apresentaram valores de produção de peróxido de hidrogênio similares, sem diferença estatística ($p > 0,05$).

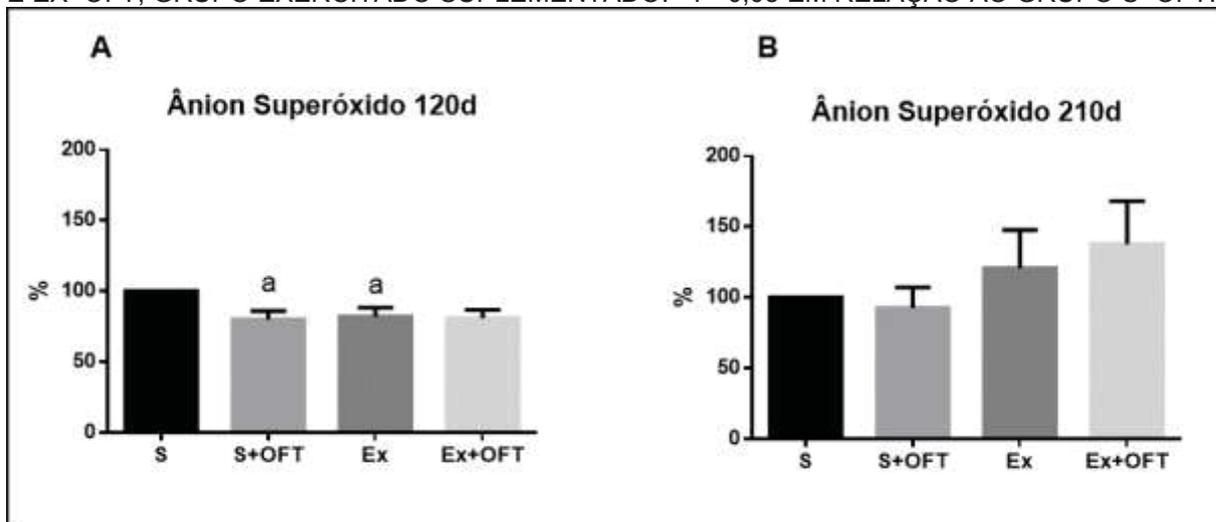
FIGURA 12: PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DE NEUTRÓFILOS DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 120 (A) E 210 (B) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO, S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS, EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO, E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS. ^A P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO S; ^B P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO S+OFT.



3.4.3 Produção de ânion superóxido

Os neutrófilos dos grupos S, S+OFT, Ex e Ex+OFT de animais com 210 dias de vida dos diferentes grupos apresentaram valores de produção de ânion superóxido similares ($p > 0,05$). Já animais de 120 dias suplementados (S+OFT) apresentaram diminuição na produção de ânion superóxido (20,1%, $p < 0,05$), comparados ao grupo S. Da mesma forma, animais exercitados (Ex) apresentaram diminuição na produção de ânion superóxido (18%, $p < 0,05$), quando comparados com o grupo S (Figura 13).

FIGURA 13: PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO DE NEUTRÓFILOS DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 120 (A) E 210 (B) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^a P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO S+OFT.

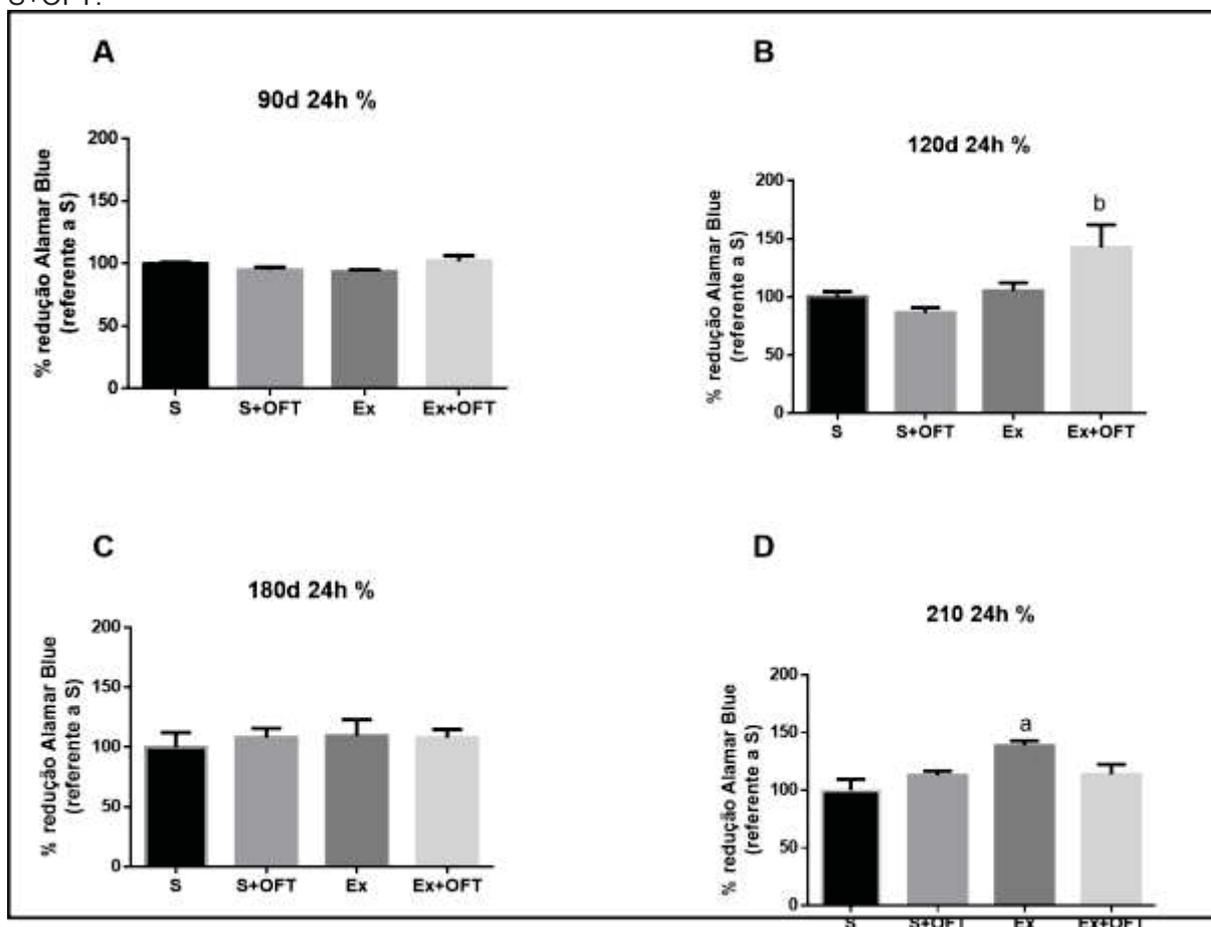


3.5 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

A resposta proliferativa de linfócitos de animais de 90, 120, 180 e 210 dias é apresentada a seguir, de acordo com o tempo de estímulo com o mitógeno concanavalina A (Figuras 14, 15 e 16).

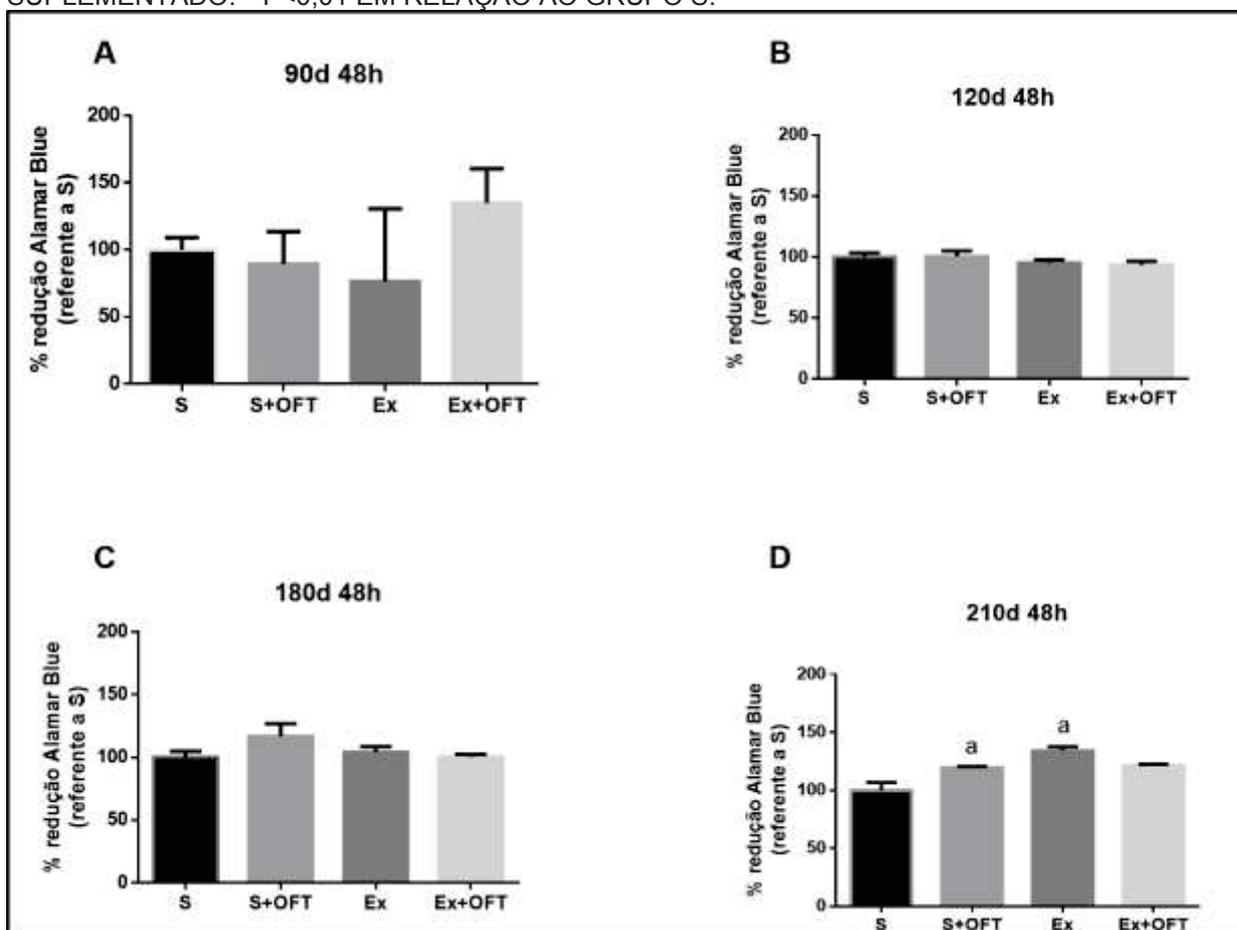
Não foram observadas diferenças entre a proliferação linfocitária após 24h de estímulo com Concanavalina A (Figura 14) dos grupos S, S+OFT, Ex e Ex+OFT de animais com 90 e 180 dias de vida. No entanto, animais de 120 dias do grupo Ex+OFT apresentaram aumento da capacidade proliferativa em relação a do grupo S+OFT (39%, $p<0,01$), e animais de 210 dias do grupo Ex apresentaram aumento da proliferação em relação ao grupo S (28%, $p<0,01$).

FIGURA 14: PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA APÓS 24 HORAS DE ESTÍMULO COM CONCANAVALINA A DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A P<0,01 EM RELAÇÃO AO GRUPO S; ^B P<0,01 EM RELAÇÃO AO GRUPO S+OFT.



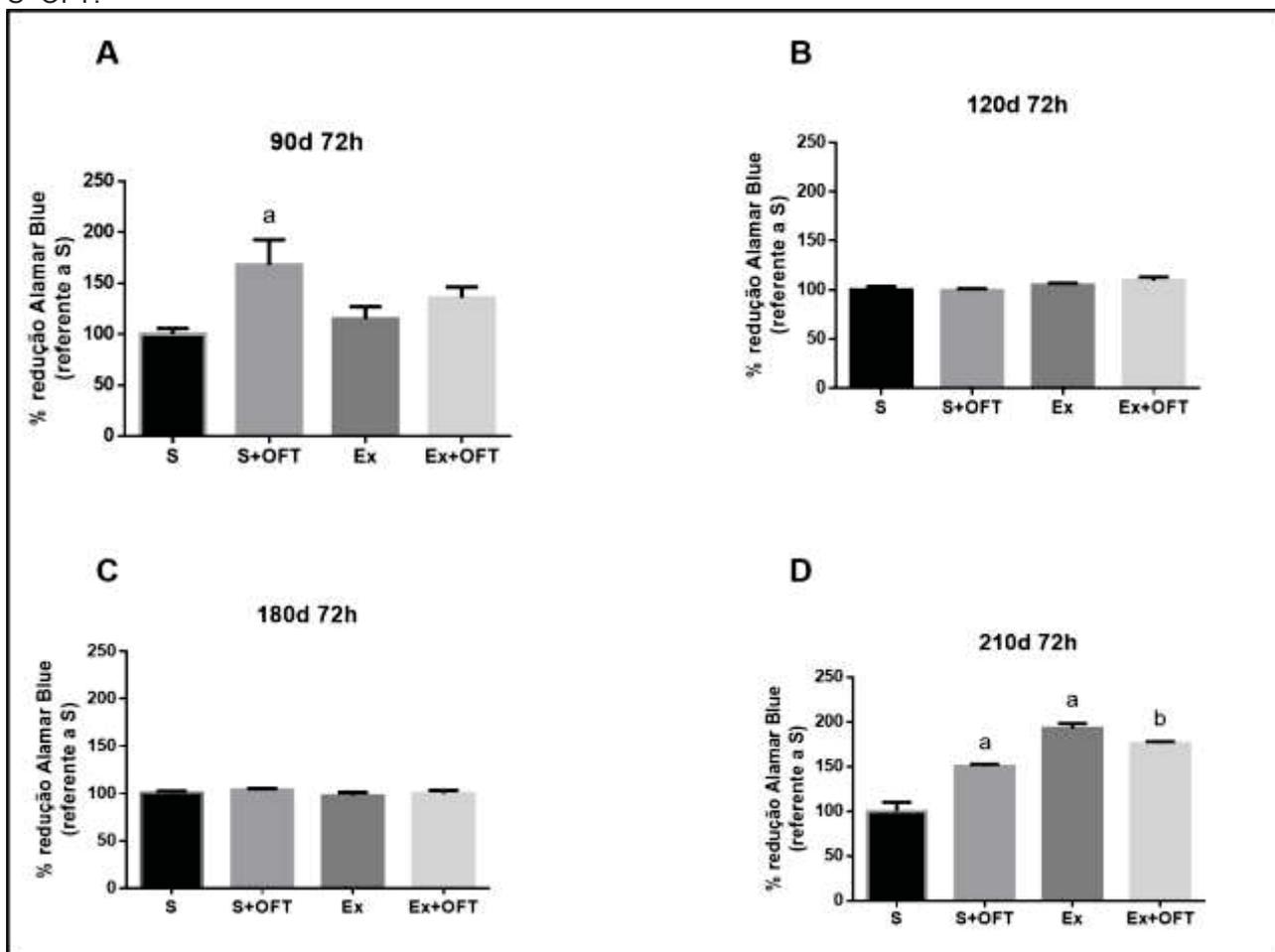
Após 48h de incubação dos linfócitos com Concanavalina A (Figura 15), apenas as células de animais com 210 dias apresentaram diferença entre os grupos, sendo que a proliferação observada nos grupos S+OFT e Ex foi superior à encontrada no grupo S (20% e 34%, respectivamente; $p < 0,05$).

FIGURA 15: PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA APÓS 48 HORAS DE ESTÍMULO COM CONCANAVALINA A DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A P<0,01 EM RELAÇÃO AO GRUPO S.



Após 72 horas de incubação com Concanavalina A (Figura 16), os linfócitos dos animais de 120 e 180 dias não proliferaram de maneira diferente entre os grupos ($p>0,05$). Animais com 90 dias do grupo S+OFT apresentaram maior proliferação linfocitária em relação ao grupo S (68%, $p<0,05$). Animais com mais idade (210 dias) dos grupos S+OFT e Ex mostraram aumento da capacidade proliferativa em relação ao grupo S (50% e 93%, respectivamente; $p<0,05$). O grupo Ex+OFT apresentou 76% de aumento da atividade proliferativa linfocitária em relação ao grupo S+OFT (14%; $p<0,05$).

FIGURA 16: PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA APÓS 72 HORAS DE ESTÍMULO COM CONCANAVALINA A DE RATOS COM INTERVENÇÃO INICIADA AOS 90 (A), 120 (B), 180 (C) E 210 (D) DIAS DE VIDA. S, GRUPO SEDENTÁRIO NÃO SUPLEMENTADO; S+OFT, GRUPO SEDENTÁRIO E SUPLEMENTADO COM 1G/KG/DIA DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO POR 8 SEMANAS; EX, GRUPO EXERCITADO NÃO SUPLEMENTADO; E EX+OFT, GRUPO EXERCITADO SUPLEMENTADO. ^A P<0,01 EM RELAÇÃO AO GRUPO S; ^B P<0,01 EM RELAÇÃO AO GRUPO S+OFT.



4 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi verificar as alterações provocadas pela suplementação com 1g/kg/dia de óleo de fígado de tubarão e/ou exercício intervalado de intensidade progressiva sobre parâmetros metabólicos, imunidade inata e adaptativa. As alterações provocadas pela suplementação e/ou exercício intenso foram mais pronunciadas nos parâmetros imunitários avaliados (funcionalidade de macrófagos, neutrófilos e linfócitos) do que nas concentrações plasmáticas de glicose, colesterol e triacilglicerol em jejum. Também foi possível observar que animais nas diferentes faixas etárias analisadas apresentaram respostas diferentes.

As faixas etárias dos animais deste estudo foram escolhidas tentando abarcar desde animais adultos jovens (90 dias de vida) até adultos maduros (210 dias), considerando que cada 30 dias de vida destes animais correspondem aproximadamente a 2,5 anos de vida de um ser humano (QUINN, 2005, ANDREOLLO *et al*, 2012; SENGUPTA, 2013). Significa que a diferença de idade entre os animais mais jovens (90d) e mais velhos (210d) deste trabalho é de 120 dias, o que corresponde aproximadamente a uma diferença de 10 anos em seres humanos. Apesar de ser aparentemente pequena a faixa de idade adotada, vale ressaltar que o período experimental de 8 semanas de suplementação e/ou exercício intenso corresponde a cerca de 5 anos de suplementação e/ou exercício intenso regular para um ser humano.

A massa corporal dos animais teve um comportamento linear e crescimento para quase que exclusivamente todos os grupos e em todos os conjuntos etários estudados, de modo que, levando em consideração o grupo S como padrão de controle, a evolução da massa se deu dentro dos parâmetros de crescimento de animais saudáveis e sem restrição alimentar/hídrica (CURI *et al*, 1989). Animais alimentados *ad libidum* demonstram um padrão de crescimento linear e que tende a gradativa estabilização no decorrer dos meses (TOMANARI, PINE, SILVA, 2003). No entanto, os animais do grupo Ex, do conjunto etário 210d demonstraram uma tendência diferente da mencionada, na qual a média ponderal teve uma queda inicial nas primeiras semanas de intervenção e uma recuperação, ao final da intervenção,

a valores próximos aos de peso inicial. Desse modo, a diferença se dá exclusivamente por conta desse momento de perda de peso inicial.

Estadella *et al*, 2004 demonstrou que animais alimentados com dietas hiperlipídicas, acompanhadas ou não da alimentação padrão dos animais (ração), promove aumento da massa corporal. Do mesmo modo, eles afirmam que o exercício é capaz de atenuar esse ganho. Dessa maneira, observando que o grupo Ex do conjunto 210d (Figura 5) teve menor ganho de massa corporal, vale dizer que a suplementação com o OFT apresentou uma tendência ao aumento de peso nesses animais, se comparado com o exercício isoladamente. Isso se observa pelo fato de que os dois grupos suplementados (S+OFT e Ex+OFT) obtiveram maior média de massa corporal, do que os grupos S e Ex, sendo ainda o grupo S+OFT, aquele com maior massa corporal, quando comparado ao grupo Ex+OFT, reforçando a importância do exercício na prevenção do ganho ponderal.

Em relação aos parâmetros metabólicos analisados, pôde-se observar queda nos níveis de glicemia (Figura 6) dos animais mais jovens (90 e 120 dias) submetidos ao exercício e/ou à suplementação, principalmente naqueles que sofreram as duas intervenções concomitantemente. Esse padrão não foi observado sobre a glicemia de ratos mais velhos (180 e 210 dias). No que diz respeito à colesterolemia (Figura 7), destacam-se os menores valores séricos de colesterol total em ratos de 90 dias e que foram submetidos ao exercício ou à suplementação exclusivamente. As concentrações de triacilgliceróis no plasma (Figura 8) não foram impactadas pela suplementação e/ou exercício em nenhuma faixa etária estudada.

Os parâmetros bioquímicos, como glicemia, colesterolemia e triacilglicerolemia foram avaliados uma vez que a suplementação foi realizada com nutracêutico de natureza lipídica, e também pelo fato de que a realização de exercício intenso pode alterar esses parâmetros (KANG *et al*, 1996; MANN, BEEDIE, JIMENEZ, 2014; BIRD, LINDEN, HAWLEY, 2014). Além disso, tais parâmetros estão relacionados ao estado nutricional do indivíduo, tendo impacto sobre o crescimento e desenvolvimento (GAREMO, PALSDOTTIR, STRANDVIK, 2006), saúde cardiovascular (AZIZI, 2001; RAITOHARJU *et al*, 2013), composição corporal (JOHNSON, 2017) e prevenção de outras doenças (MANJER, *et al*, 2001; MCKEOWN-EYSSEN, 1994).

Notou-se no conjunto 90d (Figura 6A) uma diminuição da glicemia sérica nos animais sedentários e suplementados (S+OFT), e nos exercitados e suplementados (Ex+OFT) em relação aos seus respectivos controles (S e Ex). Esta redução de cerca de 10% parece ter sido promovida pela suplementação com OFT. Zhang *et al* (2013) verificaram redução dos níveis séricos de glicose, bem como aumento da sensibilidade à insulina com o consumo de alquilgliceróis encontrados no OFT, em animais sedentários de 50 dias de vida suplementados por 8 semanas com o alquilglicerol selaquil. Isso indica que o consumo de OFT pode influenciar nesses parâmetros, independentemente da presença de exercício físico.

O conjunto 120d (Figura 6B) apresentou redução da glicemia no grupo Ex+OFT em relação ao grupo S+OFT, e uma tendência à redução no grupo Ex em relação ao grupo S, indicando papel do exercício físico nesta redução. De fato, o exercício físico leva a aumento da necessidade de combustível metabólico que é seguido de aumento na captação e utilização de glicose pelas células musculares esqueléticas (GOODYEAR, KAHN, 1998). Alguns trabalhos demonstram há décadas que o exercício melhora a utilização de glicose como um todo pelo corpo (PRUETT, OSEID, 1970; BOGARDUS *et al*, 1983) e a sensibilidade à captação de glicose sinalizada pela insulina (RICHTER, MIKINES, GALBO, KIENS, 1989). Esse incremento na captação de glicose pelo músculo esquelético, a qual perdura por algum tempo depois da sessão de exercício, foi primeiramente demonstrado em ratos, ao se avaliarem músculos de patas traseiras desses animais, após exercício (IVY, HOLLOSZY, 1981; RUDERMAN, 1982).

Portanto, cabe inferir que a prática de exercício físico nos animais com 120d tende a promover menores valores de glicemia em jejum nos ratos. Entretanto, notou-se que no conjunto 180d (Figura 6C), o grupo Ex+OFT apresentou valor de glicemia em jejum cerca de 8% maior que o grupo S+OFT. Isso sugere que o exercício não é o único fator atuante nos valores séricos de glicemia, e que a idade pode ter influenciado no resultado (KO, WAI TANG, 2006; O'SULLIVAN, 1974), tanto que não foram observadas mudanças na concentração de glicose plasmática entre os grupos de animais de 210 dias de vida (Figura 6D). Sabe-se que o avançar da idade tende a deteriorar a tolerância celular à glicose (IOZZO *et al*, 1999), no entanto é preciso considerar que animais de 210 dias de vida não são considerados idosos.

De forma geral, é perceptível que animais de diferentes faixas etárias respondem de forma particular ao exercício e à suplementação.

Os níveis diminuídos de colesterol plasmático observados nos animais apenas suplementados (S+OFT) do conjunto 90d em relação ao grupo S (Figura 7A) são corroborados pelo estudo já citado de Zhang *et al* (2013), os quais demonstraram que o consumo do alquilglicerol selaquil por 8 semanas promoveu redução dos valores de colesterol total nos animais de 50 dias avaliados. Da mesma maneira, estudos demonstram a capacidade de o exercício isoladamente ser capaz de proporcionar diminuição dos níveis de colesterol total em ratos de 90 dias consumindo dieta padrão (SPERETTA, ROSANTE, *et al*, 2012), e em humanos, em geral (WANG, XU, 2017). Não foi observado efeito cumulativo do exercício e da suplementação na redução da colesterolemia.

Animais das outras faixas etárias (120, 180 e 210 dias) cujos resultados são apresentados nas Figuras 7B, 7C e 7D, não apresentaram alteração na concentração de colesterol plasmático promovida por suplementação e/ou exercício. Novamente a idade parece ser um fator que interfere na resposta à suplementação e/ou ao exercício intenso. Em relação à triacilglicerolemia (Figura 8), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos diferentes conjuntos etários (MANN, BEEDIE, JIMENEZ, 2014). Este dado contraria o que traz a literatura, que aponta redução de triglicerídeos em ratos de 140 dias exercitados em esteira por 12 semanas, tanto em intensidade moderada, quanto intensa (LINDEN *et al*, 2015), assim como estudos que demonstram benefícios sobre o metabolismo lipídico promovidos pelo exercício aeróbico e intenso (RACIL *et al*, 2013; JHONSON *et al*, 2009). Entretanto, Cassader *et al* (1996) afirma que existe uma correlação positiva entre idade e concentração de triglicerídeos séricos, sugerindo que o exercício e a suplementação, no trabalho em pauta, serviriam como uma medida protetora quanto ao aumento dos valores de triglicerídeos séricos nos ratos exercitados e de diferentes idades.

Enquanto as alterações em glicemia, triacilglicerolemia e colesterolemia foram sutis nos diferentes grupos de diferentes faixas etárias, as alterações na resposta de células imunitárias se mostraram mais intensas. Para analisar se houve alteração na função das células da imunidade inata estudadas neste trabalho (macrófagos e neutrófilos), foi preciso acessar os parâmetros que refletem sua atividade, sendo

eles a capacidade fagocítica, a capacidade de retenção lisossomal e a produção de espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos exercem um papel crítico como defesa primária do hospedeiro, haja vista sua capacidade citotóxica, a qual causa morte de patógenos por estresse oxidativo, via espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e fagocítica, através da fagocitose e retenção lisossomal de células e partículas indesejáveis (CRUVINEL *et al*, 2010; SUGIRA, 2001). Ademais, tais células possuem alta capacidade de migração para locais de infecção, otimizando a proteção tecidual (LEVADA-PIRES *et al*, 2007).

De forma geral, foi possível observar neste trabalho que, em relação aos macrófagos a presença de exercício intenso (grupo Ex) promoveu aumento da capacidade fagocítica nos conjuntos 180d (Figura 9C) e 210d (Figura 9D) em relação ao grupo sedentário (grupo S). Ao contrário do que foi observado para animais com 180d e 210d, animais com 90d (Figura 9A) e 120d (Figura 9B) não apresentaram aumento da atividade fagocítica de macrófagos com a realização de exercício intenso. Scholer *et al* (2016) observaram que o exercício intenso proporciona aumento na capacidade fagocítica de macrófagos em ratos Wistar de 90 dias, ao contrário do que foi observado no presente trabalho. No entanto, Scholer *et al* (2016) submeteram os animais à natação em uma sessão única de 20min com cargas de 2, 4, 6 ou 8% do peso corporal, seguindo, portanto um protocolo de exercício agudo e bastante diferente do realizado aqui, indicando que o sistema imune responde de forma particular a diferentes tipos e duração de exercício físico.

O exercício físico intenso (grupo Ex) também foi incapaz de elevar a retenção lisossomal nos conjuntos 90d (Figura 10A) e 120d (Figura 10B), repetindo o padrão de resposta observado para a capacidade fagocítica. Gleeson (2007) afirma que existe uma disfunção no sistema imunitário, incluindo as células componentes do sistema imunitário inato, quando o exercício se dá em intensidades moderadas a altas (55-75% do VO_2 max e acima), que é agravada por sessões mais longas que 1,5h e/ou executadas em jejum. O exercício intenso também promove supressão na resistência antiviral intrínseca de macrófagos alveolares (KOHUT *et al*, 1998), e pode promover a diminuição dos níveis pré-exercício de monócitos séricos, alterando seu processo de maturação a macrófagos (GABRIEL *et al*, 1994). Interessante notar que, considerando-se a capacidade de retenção lisossomal, o grupo Ex do conjunto 180d (Figura 10C) apresentou aumento em relação ao grupo

S, e não redução, apontando novamente para particularidade de resposta do sistema imune dependente da faixa etária.

Em relação ao efeito da suplementação sobre a funcionalidade de macrófagos, animais do conjunto 90d (Figura 9A) apresentaram redução da capacidade fagocítica de macrófagos quando suplementados com OFT (grupos S+OFT e Ex+OFT em relação aos grupos S e Ex, respectivamente), bem como redução ou manutenção da retenção lisossomal nestes grupos. Nos demais conjuntos etários (120d, 180d e 210d; Figuras 9B, 9C e 9D, respectivamente), a suplementação (grupo S+OFT e grupo Ex+OFT) não alterou a capacidade fagocítica e a retenção lisossomal em relação aos animais não suplementados (grupo S e grupo Ex, respectivamente), exceto pelo grupo Ex+OFT do conjunto 210d que apresentou redução da capacidade fagocítica em relação ao grupo Ex. De forma resumida, a suplementação com OFT não promoveu elevação da capacidade fagocítica e da retenção lisossomal de macrófagos em nenhuma faixa etária estudada, independente da presença de exercício.

Ao contrário do que foi proposto em alguns estudos, os quais verificaram aumento da funcionalidade de macrófagos por administração de OFT ou alquilgliceróis (HAJIMORADI *et al*, 2009; BERDEL *et al*, 1980; HOMMA, MILLMAN, YAMAMOTO, 1990), o presente estudo demonstra que OFT não apresentou este efeito estimulador, considerando os parâmetros analisados que foram capacidade fagocítica e retenção lisossomal de macrófagos. Os estudos de Vitorino *et al* (2010) e de Belo *et al* (2010), de forma semelhante, não observaram aumento na atividade funcional de macrófagos (capacidade fagocítica e retenção lisossomal) submetidos à suplementação com OFT, 1g/kg de peso corpóreo. Estes resultados aparentemente contraditórios provavelmente se devam aos diferentes delineamentos experimentais dos estudos. Vitorino *et al* (2010) e Belo *et al* (2010) realizaram suplementação com OFT 1g/kg, por 6 e 14 semanas, respectivamente, e observaram ausência de efeito estimulador da capacidade fagocítica e da retenção lisossomal, assim como foi observado no presente estudo. Por outro lado, os estudos que mostram efeito imunoestimulador sobre a capacidade fagocítica de macrófagos, empregaram diferentes doses e períodos de tempo de suplementação com OFT (HAJIMORADI *et al*, 2009; BERDEL *et al*, 1980; HOMMA, MILLMAN, YAMAMOTO, 1990).

Em relação à associação da suplementação com exercício intenso (grupo Ex+OFT), cabe destacar que promoveu efeitos diferentes sobre a capacidade fagocítica e sobre a retenção lisossomal de macrófagos. Com exceção do conjunto etário 120d, nos demais foi observado que no grupo Ex+OFT o efeito da suplementação parece prevalecer sobre o efeito do exercício quando se considera a capacidade fagocítica dos macrófagos. Já quando se observa a retenção lisossomal, exceto para o conjunto 120d, o exercício parece ter efeito mais importante (Ex+OFT \neq S+OFT, $p < 0,05$).

Capacidade fagocítica e capacidade de retenção lisossomal são parâmetros supostamente relacionados de forma direta, uma vez que quanto maior a quantidade de material fagocitado, teoricamente maior deve ser a quantidade de fagolisossomas formados. No entanto, a literatura mostra que esta relação não é direta desta forma, e este trabalho confirma isto. Ao se observar a Figura 9 (capacidade fagocítica) e a Figura 10 (capacidade de retenção lisossomal), é possível notar que nem sempre as respostas são equivalentes. Por exemplo, o conjunto 90d na Figura 9A mostra o grupo Ex com capacidade fagocítica similar à do grupo S, enquanto que na Figura 10A, o grupo Ex apresentou redução de cerca de 40% na capacidade de retenção lisossomal em relação ao grupo S. As células fagocíticas possuem diversos receptores de membrana envolvidos nas atividades de interação celular, os quais, dentre outras coisas, levam a reconhecimento e ativação dessas células (STOUT; SUTTLES, 2005) para o processo de fagocitose, no qual a ligação de receptores de membrana promove a polimerização de filamentos de actina, formando o fagossoma.

Na sequência, os eventos que seguem são fusões de fagossomas com lisossomas, gerando estruturas denominadas fagolisossomas (AMER, SWANSON, 2002). São tais estruturas que são aferidas nas análises de capacidade fagocítica. No entanto, a maior capacidade celular de retenção lisossomal de patógenos e partículas não é diretamente relacionada à capacidade fagocítica de fagócitos. Enquanto a capacidade fagocítica avalia a avidez dos fagócitos em englobar componentes antígenos, a capacidade de retenção lisossomal mensura o arsenal de lisossomas previamente existentes nas células, disponíveis para a fusão com as partículas a serem endocitadas. Ao se comparar as Figuras 9 e 10, nota-se que para o conjunto etário 90d não há o mesmo padrão de resposta para capacidade

fagocítica e retenção lisossomal, o mesmo acontecendo para o conjunto etário 210d. No conjunto 90d, a presença do exercício intenso (grupo Ex) não alterou capacidade fagocítica em relação ao grupo S, mas reduziu retenção lisossomal, enquanto no conjunto 210d o exercício elevou a capacidade fagocítica sem alterar a retenção lisossomal.

A funcionalidade de neutrófilos foi avaliada considerando apenas 2 conjuntos etários, 120d e 210d. Em relação à capacidade fagocítica, o grupo submetido exclusivamente ao exercício (Ex) do conjunto etário 120d (Figura 11A) apresentou diminuição nesse parâmetro, comparado ao seu controle (S). Isso vai de encontro ao que foi observado em alguns trabalhos em que a atividade dos neutrófilos foi reduzida após o exercício intenso (LEWICKI *et al*, 1987; GLEESON, 2000; LANCASTER *et al*, 2003). Animais com mais idade (conjunto 210d, Figura 11B) não apresentaram alterações na atividade fagocitária de neutrófilos. Simpson *et al* (2012) destacam que o avançar da idade está relacionado a um declínio da função normal de neutrófilos, ou seja, era de se esperar perda funcional dos neutrófilos nos ratos de maior idade estudados, o que não foi observado. No entanto, eles também informam que o exercício regular tem a capacidade de aumentar a capacidade fagocítica de neutrófilos em indivíduos mais velhos, o que também não foi observado. Possivelmente a idade de 210 dias não seja avançada o suficiente para promover essas alterações descritas na literatura em relação à fagocitose por neutrófilos.

A suplementação com OFT não promoveu alteração da capacidade fagocítica dos neutrófilos nos conjuntos etários 120d e 210d, assim como observado para os macrófagos, o que corrobora os resultados descritos por Vitorino *et al* (2010) que utilizou a mesma dose de 1g/kg de OFT que o utilizado no presente trabalho. A suplementação associada ao exercício não apresentou efeito diferente do observado para o grupo suplementado ou exercitado.

No tocante à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à capacidade de produção de peróxido de hidrogênio, tanto no conjunto etário 120d (Figura 12A) quanto no conjunto 210d (Figura 12B). Já a produção de ânion superóxido foi reduzida tanto pela suplementação (grupo S+OFT) quanto pelo exercício (grupo Ex) no conjunto etário 120d (Figura 13A), não havendo sobreposição destes efeitos isolados no

grupo Ex+OFT. Alguns trabalhos demonstram que a resposta aguda ao exercício (a cada sessão) se assemelha em vários aspectos às respostas induzidas por infecção, sepse e trauma (NORTHOFF, WEINSTOCK, 1998), com aumento dos neutrófilos circulantes em uma relação dependente da intensidade do esforço. Entretanto, estudos demonstram que após várias sessões de treinamento intenso, que foi o que aconteceu no presente trabalho, a tendência é de diminuição da capacidade de produção de EROS por essas células. Prasad *et al* (1991) sugeriram que, após sessões de treinamento intenso, os neutrófilos possuíam uma capacidade menor de produção de EROS em estímulos subsequentes com zimozan, mas que, no entanto, essa capacidade se recupera com o tempo. Em relação à suplementação com OFT, esta promoveu redução da produção de ânion superóxido no conjunto 120d, e este resultado vai contra o efeito imunoestimulante que a literatura relata (PALMBLAD, SAMUELSON, BROHULT, 1990; TCHORZEWSKI, 2005), no entanto vai de encontro com o que foi observado por Vitorino *et al* (2010), que utilizaram a mesma dose (1g/kg de OFT) que a empregada no presente estudo. De fato, como já discutido anteriormente, a dose de OFT administrada tem impacto sobre as respostas celulares observadas, e isso explica pelo menos parcialmente as diferenças encontradas na literatura, seja em trabalhos com animais, seja com humanos.

Embora não tenha sido observada significância estatística, nota-se uma tendência para o aumento da produção de ânion superóxido nos grupos exercitados (Ex e Ex+OFT) do conjunto etário 210d (Figura 13B). Levando-se isso em consideração, bem como a produção de ânion superóxido do conjunto 120d, as informações de Simpson *et al* (2012) de que o exercício regular tem a capacidade de aumentar a funcionalidade de neutrófilos em indivíduos mais velhos poderiam ser utilizadas para explicar o dado.

Para análise da atividade das células da imunidade adaptativa estudadas neste trabalho (linfócitos T), foi avaliada a capacidade de proliferação sob estímulo de mitógeno (Concanavalina A), cujos valores foram aferidos 24, 48 e 72h após o início do estímulo. Concanavalina A é uma lectina com capacidade de ligação ao receptor de linfócitos T, estimulando sua proliferação (PALACIOS, 1982). É frequentemente utilizada em experimentação científica para estimular a proliferação de linfócitos T *in vitro* e permitir com isso a comparação de diferentes populações

destas células, sob diferentes condições. Alamar Blue® é indicado para mensurar quantitativamente a proliferação celular. Atua como um indicador de crescimento colorimétrico relacionado à atividade metabólica das células viáveis. À medida que as células crescem, a atividade metabólica resulta na redução química do Alamar Blue®, e na mudança da cor de vermelho (ambiente reduzido) para azul (ambiente oxidado), viabilizando a leitura de absorvância em leitor de microplaca.

Nas primeiras 24 horas sendo desafiados pelo mitógeno, os linfócitos T de animais do grupo Ex do conjunto etário 210d (Figura 14D) apresentaram proliferação linfocitária significativamente maior comparada a do grupo S. Estes dados sugerem que o exercício exerceu papel mais relevante que a suplementação na estimulação de linfócitos T na idade mencionada. Após 48 horas de cultivo, a suplementação com OFT (grupo S+OFT) do conjunto 210d (Figura 15D) promoveu significativa elevação da capacidade proliferativa em relação ao grupo controle (grupo S), e o exercício (grupo Ex) novamente apareceu como fator estimulante da capacidade proliferativa de linfócitos nesta faixa etária. Apenas após 72 horas de cultivo na presença de mitógeno é que os animais mais jovens (conjunto 90d, Figura 16A) apresentaram maior capacidade proliferativa estimulada pela suplementação (grupo S+OFT). Após 72h, a suplementação (grupo S+OFT) e o exercício (grupo Ex) no conjunto 210d (Figura 16D) continuaram exercendo efeito importante sobre a proliferação celular, porém de forma mais intensa que a observada após 24 e 48h. Portanto, observou-se em determinados momentos a capacidade individual das intervenções (exercício ou suplementação) de promoverem aumento da capacidade proliferativa de linfócitos. Particularmente para o conjunto etário 210d houve aumento da proliferação linfocitária em todos os tempos de cultivo celular, sendo que o grupo Ex apresentou maior proliferação linfocitária, quando comparado ao grupo S nos tempos 24 (28%), 48 (34%) e 72h (93%), bem como os linfócitos do grupo S+OFT, os quais apresentaram aumento da proliferação em 20% (48h) e 50% (72h), quando comparados a do grupo S. Percebe-se, portanto, que existe uma tendência para que o tratamento com óleo ou exercício tenha efeitos positivos sob a proliferação linfocitária. No entanto, pode-se dizer de modo geral que, de acordo com os dados apresentados, os animais de maior idade foram aqueles que mais se beneficiaram dos tratamentos, haja vista a maior ocorrência de significância estatística ($p < 0,05$) para as intervenções nesse conjunto etário.

Em relação à suplementação com OFT, há trabalhos mostrando sua influência sobre número e/ou atividade de linfócitos. Hajimoradi *et al* (2010) demonstrou que o OFT em doses de 50, 10, 5, 2.5 e 0.1mg/kg/dia administrado para camundongos por 5 dias, promoveu maior atividade de linfócitos CD8⁺, demonstrando que há relação da suplementação com a atividade linfocitária. Palmieri, Pannelli e Di Cerbo (2014) também observaram elevação no número de linfócitos plasmáticos obtidos de humanos idosos suplementados com 500 mg de AKG durante 4 semanas. Qian *et al* (2014) demonstraram em estudos *in vitro* que AKG foram capazes de impulsionar a proliferação e maturação de linfócitos T e B. Estudo realizado há mais tempo por Lewkowicz *et al* (2005) demonstrou que a suplementação de humanos com elevada dose de AKG (3,6 g/dia) durante 4 semanas levou a predominância de produção de citocinas Tipo I tais como IFN- γ , TNF- α e IL-2 por células mononucleares de sangue periférico, indicando claramente a influência destes lipídeos sobre a atividade linfocitária.

Antes deste estudo, Guránska *et al* (2001) relataram significativo aumento da porcentagem de linfócitos T plasmáticos em pessoas portadoras de estomatite aftosa recorrente suplementadas durante 3 meses com OFT, em comparação com a porcentagem de células antes do tratamento. Tomados juntos, estes dados da literatura apontam para a capacidade do OFT ou AKG isolados de estimular a funcionalidade de linfócitos. No entanto, nossos dados apontam interferência da idade sobre a resposta linfocitária de animais suplementados com OFT, e estas diferenças promovidas pela idade são de difícil comparação com a literatura dada à escassez de estudos que abordem o mesmo protocolo experimental para diferentes faixas etárias. Independentemente disso, nossos dados indicam que a suplementação com 1 g/kg de OFT por 8 semanas parece ter maior impacto sobre a capacidade proliferativa de linfócitos de indivíduos com mais idade (neste caso, com 210 dias).

A respeito do mecanismo molecular pelo qual OFT atua, é sabido que os alquilgliceróis do OFT possuem influência sobre a atividade da proteína quinase C (PKC), envolvida no controle da proliferação celular (HEYMANS *et al*, 1987; PUGLIESE *et al*, 1998) e, além disso, a PKC tem sua atividade aumentada pelo exercício, haja vista a sua sensibilização pelo Ca⁺² (ROBLES *et al*, 2011; ROSE *et al*, 2004). A ativação dessa proteína é dependente de Ca⁺², o qual permite a ligação

da PKC no domínio intracelular a uma porção da membrana plasmática, sendo ativada pelo 1,2 diacilglicerol (DAG) (DARNELL *et al*, 1990). O DAG encontra-se aumentado durante a proliferação celular e a maior ativação da PKC pode culminar em maior proliferação celular dos linfócitos.

Em relação ao exercício físico, a maioria dos estudos aborda resposta aguda do exercício, e realizam protocolos em que linfócitos plasmáticos são coletados imediatamente antes da sessão, durante, logo após e 24 horas após. Nestes protocolos observa-se normalmente uma resposta bifásica, ou seja, aumento no número de linfócitos (linfocitose) durante e imediatamente após a realização do exercício, com número de células caindo abaixo dos níveis mensurados pré-exercício durante as primeiras horas de recuperação, e retornando aos níveis iniciais após 24h. Essas mudanças tendem a ser proporcionais à intensidade do exercício, mais que a duração do mesmo. A linfocitose pode ser explicada pela influência da adrenalina, que age diretamente sobre a expressão de moléculas de adesão nos linfócitos, e indiretamente por influência simpática sobre o débito cardíaco e subsequente aumento na tensão de cisalhamento (*shear stress*) associada ao aumentado fluxo sanguíneo. A queda no número de linfócitos plasmáticos pode ser explicada pela ocorrência de apoptose e/ou redistribuição de células para outros compartimentos (WALSH *et al*, 2011; TURNER, 2016). Os dois estudos a seguir são alguns dos que avaliaram efeito agudo do exercício intenso sobre imunidade adaptativa. Fisher *et al* (2011) avaliaram número de linfócitos plasmáticos e atividade de enzimas antioxidantes de linfócitos humanos antes, imediatamente após, 3 e 24h após realização de exercício intervalado de alta intensidade, em 3 dias consecutivos. Verificaram que o exercício não promoveu linfocitopenia pós-exercício, contrariando muitos estudos prévios, e que houve aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT) nos linfócitos plasmáticos. Krüger *et al* (2016) coletaram amostras de sangue de indivíduos submetidos a exercício intervalado de alta intensidade antes, imediatamente depois, 3 e 24h pós-exercício para avaliar viabilidade de diferentes subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo e encontraram que este tipo de exercício promove mobilização de linfócitos pouco diferenciados e linfócitos reguladores (T_{regs}), bem como apoptose principalmente de linfócitos altamente diferenciados, sem afetar os poucos diferenciados e reguladores.

Há estudos que avaliam o efeito crônico do exercício intenso, como é o caso do publicado por Monteiro *et al* (2017). Este estudo demonstrou que houve aumento na concentração plasmática de IL-6 e IL-10 após 8 semanas de exercício intervalado de alta intensidade associado a exercício de força, e sugere que o referido programa de exercício promove resposta inflamatória benéfica, como adequada capacidade de recrutamento de macrófagos. Outro estudo utilizando o exercício intervalado de alta intensidade foi desenvolvido por Born *et al* (2017), o qual avaliou a função imune de mucosa após 3 semanas de treinamento. Os pesquisadores encontraram que a exposição crônica ao exercício promoveu aumento de secreção de IgA na saliva, ao contrário do que se hipotetizava inicialmente. Estes dois estudos crônicos, bem como os dois anteriores relacionados a efeito agudo do exercício, foram realizados em humanos. Nosso estudo foi realizado em modelo animal, a partir do qual diferentes informações podem ser obtidas, como por exemplo, a capacidade proliferativa de linfócitos de linfonodos mesentéricos, órgão linfoide secundário onde a comunicação entre sistema imune inato e adaptativo se processa através da apresentação de antígenos. Há escassez na literatura de dados obtidos de estudos em modelo animal, o que torna limitada a comparação dos nossos resultados. No entanto, vários resultados obtidos de humanos revelam, assim como os nossos, que a realização de exercício de alta intensidade por longo período de tempo não promove prejuízo de função linfocitária (BORN *et al*, 2017; MONTEIRO *et al*, 2017).

Diferente dos trabalhos já publicados envolvendo realização crônica de exercício intervalado de intensidade progressiva e atividade linfocitária, nosso estudo investigou o impacto deste exercício sobre a imunidade de indivíduos de diferentes faixas etárias. Nossos resultados indicam diferentes padrões de resposta linfocitária nos conjuntos etários estudados, sendo o conjunto 210d o que mais respondeu ao exercício. Apesar de estar claro na literatura que ratos com 210 dias não são considerados idosos, sabe-se também que há mudanças que acometem o sistema imune com o passar da idade, particularmente linfócitos T, processo denominado imunosenescência. É bem documentado que com o passar da idade há aumento da susceptibilidade a infecções, ao surgimento de células cancerosas, desordens autoimunes e doenças inflamatórias crônicas (FÜLOP *et al*, 2013). Evidências experimentais indicam que o envelhecimento está associado ao baixo número de linfócitos T “naive”, alta proporção de células T de memória altamente

diferenciadas (*late-stage differentiated effector memory cells*), e pobre resposta proliferativa a mitógenos (TURNER, 2016). No presente trabalho foi possível observar que a realização de exercício intervalado de intensidade progressiva de forma crônica promoveu aumento da capacidade proliferativa dos linfócitos T estimulados com concanavalina A dos animais com mais idade investigados. Esse resultado sugere que este tipo de exercício não traz prejuízo à função do sistema imune adaptativo se realizado por indivíduos com mais idade, no entanto informações adicionais tais como padrão de citocinas plasmáticas e determinação quantitativa das subclasses de linfócitos circulantes e presentes em órgãos linfoides são necessárias.

A associação do exercício físico intenso crônico e a suplementação com OFT (grupo Ex+OFT) promoveu elevação da proliferação de linfócitos T no conjunto 120d após 24h de estímulo com concanavalina A, e também no conjunto 210d após 72h. Em ambos os casos, esta elevação parece ser devida à presença do exercício físico, e não à suplementação. Nota-se que a associação de exercício com suplementação não promoveu efeito aditivo ou sinérgico sobre a capacidade proliferativa de linfócitos. Para explicar isso, é sugerido que os dois tipos de intervenção podem partilhar de vias comuns de sinalização celular. Isto é o que sugere Vitorino *et al* (2010), quando observou semelhantemente que não havia potencialização entre os dois tratamentos (suplementação com OFT e exercício moderado, no caso), apesar da diferença do tipo e intensidade do exercício proposto.

Particularmente em relação ao exercício físico e resposta imunitária, é vasta a literatura disponível. No entanto cabe ressaltar aqui que são muitas as variáveis que podem interferir nas respostas aferidas, e que estas variáveis acabam sendo limitantes para que se façam comparações adequadas. O exercício pode ser moderado ou intenso, crônico ou agudo. Em se tratando especificamente de exercício intervalado de alta intensidade, há aquele realizado de forma aeróbica (*aerobic HIIT program*) e aquele realizado como exercício de força ou resistência (*resistance HIIT program*). O exercício pode variar quanto ao tempo de execução de cada sessão, e quanto ao número de sessões por semana. Indivíduos submetidos ao exercício podem ser sedentários ou ter histórico prévio de atividade ou treinamento físico, o que por si só já se constitui em um problema, pois como definir o que torna um indivíduo fisicamente ativo? Ainda, indivíduos, tanto em modelo

humano, como animal, podem ser saudáveis ou portadores de alguma patologia, bem como podem ser de diferentes espécies, no caso dos animais (estudos em modelo animal utilizam *Rattus norvegicus*, e geram informações nem sempre comparáveis aos estudos em modelo humano) (TURNER, 2016). Sabe-se que esses fatores interferem no padrão de resposta do sistema imunitário, e diferentes desenhos experimentais se propõem a responder perguntas específicas.

Pode ser elencada como limitação do presente trabalho o fato de não termos grupo experimental submetido a exercício moderado para comparação. Há uma percepção geral por atletas e outros indivíduos fisicamente ativos de que atividade física moderada regular aumenta resistência a doenças infecciosas do trato respiratório superior, enquanto o exercício intenso diminui esta resistência (MACKINNON, 2000). Apesar desta afirmação não ser completamente verdadeira devido às muitas variáveis envolvidas (tempo de cada sessão, número de sessões semanais, entre outras), há carência de estudos que avaliem efeito da idade sobre a resposta imunitária de praticantes de exercício moderado e intenso.

Outra limitação é o fato de não termos avaliado a atividade de linfócitos plasmáticos, o que nos permitiria fazer comparações mais adequadas com dados obtidos de estudos com humanos. E por fim, a avaliação da atividade de neutrófilos em apenas duas faixas etárias limitou o alcance dos resultados e as comparações possíveis com a literatura.

5. CONCLUSÕES

Tomados juntos, os resultados deste trabalho indicam que a suplementação crônica com OFT e o exercício crônico intervalado de intensidade progressiva, quando aplicados isoladamente, promovem efeitos sobre os parâmetros metabólicos e imunitários que varia conforme a faixa etária dos animais. Não temos conhecimento de literatura que tenha aplicado o mesmo protocolo experimental em diferentes faixas etárias, seja de animais ou humanos, o que torna nossa abordagem experimental inédita, e nossos resultados importantes à medida que apontam para variadas respostas dependendo da idade do indivíduo. Ainda, observamos que a associação do exercício com a suplementação não exerceu efeito aditivo ou sinérgico sobre os parâmetros analisados.

De forma geral, é possível afirmar que o exercício intervalado de intensidade progressiva não prejudica a função imunitária, promovendo elevação da funcionalidade de macrófagos e linfócitos T. A suplementação com OFT na dose escolhida não promoveu efeito estimulatório sobre as células da imunidade inata estudadas, mas sim sobre linfócitos. As respostas metabólicas e imunitárias variaram conforme a idade dos indivíduos.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, E. et al. Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophages. **Cellular immunology**, v. 169, n. 1, p. 152-155, 1996.
- AMER, Amal O.; SWANSON, Michele S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 1, p. 56-61, 2002.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE et al. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- ANDREOLLO, Nelson Adami et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship?. ABCD. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** (São Paulo), v. 25, n. 1, p. 49-51, 2012.
- AZIZI, F. et al. Serum lipid levels in an Iranian population of children and adolescents: Tehran lipid and glucose study. **European journal of epidemiology**, v. 17, n. 3, p. 281-288, 2001.
- BACURAU, R. F. et al. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. **Cell biochemistry and function**, v. 18, n. 4, p. 249-258, 2000.
- BELO, S. Estudo da suplementação com óleo de peixe associado ao de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral e resposta de macrófagos peritoneais em ratos portadores de tumor de Walker 256. 78p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2007.
- BELO, Sérgio RB et al. Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: a response linked by the increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition research**, v. 30, n. 11, p. 770-776, 2010.
- BERDEL, Wolfgang E. et al. The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid-activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma. **European Journal of Cancer (1965)**, v. 16, n. 9, p. 1199-1204, 1980.
- BIRD, Stephen R.; LINDEN, Matthew; HAWLEY, John A. Acute changes to biomarkers as a consequence of prolonged strenuous running. **Annals of clinical biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 137-150, 2014.
- BOGARDUS, Clifton et al. Effect of muscle glycogen depletion on in vivo insulin action in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 5, p. 1605, 1983.

BONATTO, S. Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito *in vitro* do óleo de peixe sobre as células tumorais. 115p. **Tese** (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2008.

BORDIER, C. G.; SELIER, N.; FOUCAULT, A. P. ; LE GOFFIC, F. Purification and characterization of deep sea shark *Centrophorus squamosus* liver oil 1-Oalkylglycerol ether lipids. **Lipids**, v. 31,p. 521-529, 1996.

BORN, D.; ZINNER, C.; SPERLICH, B. The mucosal immune function is not compromised during a period of high-intensity interval training. Is it time to reconsider an old assumption? **Frontiers in Physiology**, v. 8, article 485, 2017.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 5, n. s5, p. 9-15, 1976.

BRINES, Robert; HOFFMAN-GOETZ, Laurie; PEDERSEN, Bente Klarlund. Can you exercise to make your immune system fitter?. **Immunology today**, v. 17, n. 6, p. 252-254, 1996.

BROHULT, A.; HOLMBERG, J. Alkylglycerols in the Treatment of Leucopenia Caused by Irradiation. **Nature** **1954**, 174, 1102–1103.

BROHULT, Astrid; BROHULT, Johan; BROHULT, Sven. Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 79-83, 1978.

BURGOMASTER, Kirsten A. et al. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. **Journal of applied physiology**, v. 98, n. 6, p. 1985-1990, 2005.

BUTTERFIELD, T. A.; BEST, T. M.; MERRICK, M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. **Journal of Athletic Training**, v. 41, p. 457-465, 2006.

CASPERSEN, Carl J.; POWELL, Kenneth E.; CHRISTENSON, Gregory M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports**, v. 100, n. 2, p. 126, 1985.

CASSADER, M. et al. Postprandial triglyceride-rich lipoprotein changes in elderly and young subjects. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 8, n. 6, p. 421-428, 1996.

CASTELL, Linda M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise?. **Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 371-375, 2002.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. bras. reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CURI, R. et al. Reversibility of metabolic changes induced by feeding schedule in rats. **Physiology & behavior**, v. 45, n. 2, p. 249-254, 1989.

DARNELL, James et al. *Molecular cell biology*. 1990.

DAVIDSON, B. C. et al. The influence of shark liver oils on normal and transformed mammalian cells in culture. **in vivo**, v. 21, n. 2, p. 333-337, 2007.

DAVILA, D. R. et al. Interferon-gamma-induced priming for secretion of superoxide anion and tumor necrosis factor-alpha declines in macrophages from aged rats. **The FASEB journal**, v. 4, n. 11, p. 2906-2911, 1990.

DING, Jin Wen et al. Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. **Journal of Surgical Research**, v. 57, n. 2, p. 238-245, 1994.

ESTADELLA, Debora et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

EVENSON, Kelly R. et al. Statewide prevalence and correlates of walking and bicycling to school. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 157, n. 9, p. 887-892, 2003.

FERNANDES, Tiago et al. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors. **Hypertension**, p. HYPERTENSIONAHA.111.185801, 2012.

FISHER, G.; SCHWARTZ, D.; QUINDRY, J.; BARBERIO, M.D.; FOSTER, E.B.; JONES, K.W.; PASCOE, D.D. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. **J Appl Physiol**, v. 110, p. 730-737, 2011.

FÜLOP, T. LARBI, A.; PAWELEC, G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. **Frontiers in Immunology**, v. 4, article 217, 2013.

GABRIEL, Holger et al. Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 69, n. 2, p. 179-181, 1994.

GAREMO, Malin; PALSDOTTIR, Vilborg; STRANDVIK, Birgitta. Metabolic markers in relation to nutrition and growth in healthy 4-y-old children in Sweden. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 5, p. 1021-1026, 2006.

GIBALA, Martin J.; MCGEE, Sean L. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain?. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 36, n. 2, p. 58-63, 2008.

GLEESON, Michael. Immune function in sport and exercise. **Journal of applied physiology**, v. 103, n. 2, p. 693-699, 2007.

GLEESON, Michael. Interleukins and exercise. **The Journal of physiology**, v. 529, n. 1, p. 1-1, 2000.

GODIN, Gaston et al. Differences in perceived barriers to exercise between high and low intenders: observations among different populations. **American Journal of Health Promotion**, v. 8, n. 4, p. 279-285, 1994.

GOODYEAR, Laurie J.; KAHN, Barbara B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual review of medicine**, v. 49, n. 1, p. 235-261, 1998.

GROSMAN, N. Similar effects of ether phospholipids, PAF and lyso-PAF on the Ca²⁺-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leucocyte membranes. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1321-1329, 2001.

GURAŃSKA, N. et al. The assessment of the effectiveness of the shark liver oil in recurrent aphthous stomatitis treatment: clinical and immunological studies. **Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 11, n. 63, p. 233-238, 2001.

HAJIMORADI, M.; DANESHMANDI, S.; HASSAN, Z. M. Effect of shark liver oil on nitric oxide production and MTT reduction by peritoneal macrophages from BALB/c mice. 2010.

HAJIMORADI, Monire et al. The effect of shark liver oil on the tumor infiltrating lymphocytes and cytokine pattern in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 565-570, 2009.

HALLGREN, Bo; LARSSON, Sam. The glyceryl ethers in man and cow. **Journal of Lipid Research**, v. 3, n. 1, p. 39-43, 1962.

HARAM, Per Magnus et al. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. **Cardiovascular research**, 2008.

HECK, Thiago Gomes et al. Acute exercise boosts cell proliferation and the heat shock response in lymphocytes: correlation with cytokine production and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio. **Cell Stress and Chaperones**, v. 22, n. 2, p. 271-291, 2017.

HERNANDEZ, Antonio Serrano. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. **Reumatología Clínica**, v. 5, p. 1-5, 2009.

HEYMANS, Françoise et al. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C. **FEBS letters**, v. 218, n. 1, p. 35-40, 1987.

HOMMA, Sadamu; MILLMAN, Irving; YAMAMOTO, Nobuto. A serum factor for macrophage activation after in vitro dodecylglycerol treatment of mouse lymphocytes. **Immunology & Cell Biology**, v. 68, n. 2, 1990.

HORN, P. L. et al. Lower white blood cell counts in elite athletes training for highly aerobic sports. **European journal of applied physiology**, v. 110, n. 5, p. 925-932, 2010.

IAGHER, F. Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos Wistar portadores de tumor de Walker 256. 139p. **Tese** (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2008.

IAGHER, Fabíola et al. Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. **Lipids Health Dis**, v. 12, n. 146, p. 10.1186, 2013.

IOZZO, Patricia et al. Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 3, p. 863-868, 1999.

IVY, J. L.; HOLLOSZY, J. O. Persistent increase in glucose uptake by rat skeletal muscle following exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 241, n. 5, p. C200-C203, 1981.

JANEWAY, Charles A., TRAVERS, Paul. The immune system in health and disease. **Immunobiology**. Blackwell, Oxford, 1994.

JOHNSON, Kalen A. DXA Body Composition is Weakly Related to Blood Lipids, Blood Pressure, and Glucose in Firefighters. In: **International Journal of Exercise Science: Conference Proceedings**. 2017. p. 39.

JOHNSON, Nathan A. et al. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. **Hepatology**, v. 50, n. 4, p. 1105-1112, 2009.

KANG, Jie et al. Effect of carbohydrate substrate availability on ratings of perceived exertion during prolonged exercise of moderate intensity. **Perceptual and motor skills**, v. 82, n. 2, p. 495-506, 1996.

KHARE, V.; SODHI, A.; SINGH, S. Mahendra. Effect of aging on the tumoricidal functions of murine peritoneal macrophages. **Natural immunity**, v. 15, n. 6, p. 285, 1996.

KO, Gary TC; WAI, Hendena PS; TANG, Joyce SF. Effects of age on plasma glucose levels in non-diabetic Hong Kong Chinese. **Croatian medical journal**, v. 47, n. 5, p. 709-713, 2006.

KODAMA, Satoru et al. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis. **Jama**, v. 301, n. 19, p. 2024-2035, 2009.

KOHUT, Marian L. et al. The role of stress hormones in exercise-induced suppression of alveolar macrophage antiviral function. **Journal of neuroimmunology**, v. 81, n. 1, p. 193-200, 1998.

KRÜGER, K.; ALACK, K.; RINGSEIS, R.; MINK, L.; PFEIFER, E.; SCHINLE, M.; GINDLER, K.; KIMMELMANN, L.; WALSCHEID, R.; MUDERS, K.; FRECH, T.; EDER, K.; MOOREN, F. Apoptosis of T-cell subsets after acute high-intensity interval exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 48, n. 10, p. 2021-2029, 2016.

KRYCZYK, M. et al. Exercise and Shark Liver Oil Supplementation Reduce Tumor Growth and Cancer Cachexia in Walker 256 Tumor Bearing Rats. **J Cancer Sci Ther**, v. 6, p. 087-093, 2014.

LANCASTER, G. I. et al. Effect of feeding different amounts of carbohydrate during prolonged exercise on human T-lymphocyte intracellular cytokine production. **Journal of Physiology P**, v. 548, p. 98, 2003.

LEVADA-PIRES, Adriana C. et al. Exercise training raises expression of the cytosolic components of NADPH oxidase in rat neutrophils. **European journal of applied physiology**, v. 100, n. 2, p. 153, 2007.

LEWICKI, R. et al. Effect of physical exercise on some parameters of immunity in conditioned sportsmen. **International journal of sports medicine**, v. 8, n. 05, p. 309-314, 1987.

LEWKOWICZ, P. et al. Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function. **Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 18, n. 108, p. 686-692, 2005.

LINDEN, Melissa A. et al. Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 47, n. 3, p. 556, 2015.

LIU, Dongmei et al. Immune adaptation to chronic intense exercise training: new microarray evidence. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 29, 2017.

LYNCH, John et al. Workplace demands, economic reward, and progression of carotid atherosclerosis. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 302-307, 1997.

MACKINNON, L. T. Immunity in athletes. **International Journal of Sports Medicine**, v. 18, p. S62-8, 1997.

MACKINNON, L.T. Chronic exercise training effects on immune function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n. 7, p. 5369-76, 2000.

MADHAVI,N.; DAS,U.N.; PRABHA,P.S.; KUMAR,G.S.; KORATKAR,R.; SAGAR,P.S. Suppression of human T-cell growth in vitro by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. 1994 Jul;51(1):33-40.

MANJER, Jonas et al. Risk of breast cancer in relation to anthropometry, blood pressure, blood lipids and glucose metabolism: a prospective study within the Malmö Preventive Project. **European journal of cancer prevention**, v. 10, n. 1, p. 33-42, 2001.

MANLEY, Audrey F. Physical activity and health: A report of the surgeon general. **DIANE Publishing**, 1996.

MANN, Steven; BEEDIE, Christopher; JIMENEZ, Alfonso. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. **Sports Medicine**, v. 44, n. 2, p. 211-221, 2014.

MCKEOWN-EYSSEN, Gail. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk?. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 3, n. 8, p. 687-695, 1994.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. bras. reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MONTEIRO, P.A.; CAMPOS, E.Z.; OLIVEIRA, F.P.; PERES, F.P.; ROSA-NETO, J.C.; PIMENTEL, G.D.; LIRA, F.S. Modulation of inflammatory response arising from high-intensity intermitente and concurrent strength training in physically active males. **Cytokine**, v. 91, p. 104-109, 2017.

NIEMAN, David C.; NEHLSEN-CANNARELLA, Sandra L. The immune response to exercise. In: **Seminars in hematology**. 1994. p. 166-179.

NIEMAN, David C.; PEDERSEN, Bente K. Exercise and immune function. **Sports Medicine**, v. 27, n. 2, p. 73-80, 1999.

NIEMAN, David C. Exercise effects on systemic immunity. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 5, p. 496-501, 2000.

NORTHOFF, H.; BERG, A.; WEINSTOCK, C. Similarities and differences of the immune response to exercise and trauma: the IFN- γ concept. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 497-504, 1998.

O'SULLIVAN, JOHN B. Age gradient in blood glucose levels: magnitude and clinical implications. **Diabetes**. V. 23, n. 8, p. 713–715, 1974.

PALACIOS, R. Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. **J Immunol**, v. 128, n. 1, p. 337-342, 1982.

PALMBLAD, J.; SAMUELSSON, J.; BROHULT, J. Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 50, n. 4, p. 363-370, 1990.

PALMIERI, Beniamino; PENNELLI, Alfonso; DI CERBO, Alessandro. Jurassic surgery and immunity enhancement by alkylglycerols of shark liver oil. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 178, 2014.

PAOLI, Antonio et al. High-Intensity Interval Resistance Training (HIRT) influences resting energy expenditure and respiratory ratio in non-dieting individuals. **Journal of translational medicine**, v. 10, n. 1, p. 237, 2012.

PARKIN, Jacqueline; COHEN, Bryony. An overview of the immune system. **The Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

PEAKE, Jonathan M. et al. Recovery of the immune system after exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 5, p. 1077-1087, 2017.

PEDERSEN, Bente Klarlund; TOFT, Anders Dyhr. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 4, p. 246-251, 2000.

PEDERSEN, Bente Klarlund; ULLUM, Henrik. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 26, n. 2, p. 140-146, 1994.

PEDERSEN, B. K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI, K. Recovery of the immune system after exercise. **Acta Physiologica**, v. 162, n. 3, p. 325-332, 1998.

PEDERSEN, Bente Klarlund. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. **Essays in biochemistry**, v. 42, p. 105-117, 2006.

PEDRONO, F.; CHEMINADE, C.; LEGRAND, A. B. Natural 1-O-alkylglycerols reduce platelet-activating factor-induced release of [³H]-serotonin in rabbit platelets. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, v. 71, n. 1, p. 19-23, 2004.

PÉDRONO, F.; KHAN, N.A.; LEGRAND, A.B. Regulation of calcium signalling by 1-O-alkylglycerols in human Jurkat T lymphocytes. *Life Sciences*, v. 74, p. 2793-2801, 2004b.

PEREIRA, Benedito et al. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in rat macrophages. **Biochemical pharmacology**, v. 50, n. 12, p. 2093-2098, 1995.

PICK, E. ; MIZEL, M. Rapid micro assay for the measurement of super oxide and hydrogen peroxide production by macrophages using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p.211-26, 1981.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Technology Fish Immunology**, 4:93-100, 1995.

PRASAD, Kailash; CHAUDHARY, Ajai K.; KALRA, Jawahar. Oxygen-derived free radicals producing activity and survival of activated polymorphonuclear leukocytes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 51-62, 1991.

PRUETT, Esther DR; OSEID, S. Effect of exercise on glucose and insulin response to glucose infusion. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 26, n. 3, p. 277-285, 1970.

PUGLIESE, Peter T. et al. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 87-99, 1998.

PYNE, David B. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Medicine**, v. 17, n. 4, p. 245-258, 1994.

QIAN, Linxi et al. Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e96207, 2014.

QUINDRY, J. C.; STONE, W. L.; KING, J.; BROEDER, C. E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, p. 1139-1145, 2003.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, p. 775-777, 2005.

RACIL, G. et al. Effects of high vs. moderate exercise intensity during interval training on lipids and adiponectin levels in obese young females. **European journal of applied physiology**, v. 113, n. 10, p. 2531-2540, 2013.

RAITOHARJU, Emma et al. A comparison of the accuracy of Illumina HumanHT-12 v3 Expression BeadChip and TaqMan qRT-PCR gene expression results in patient samples from the Tampere Vascular Study. **Atherosclerosis**, v. 226, n. 1, p. 149-152, 2013.

RICHTER, ERIK A. et al. Effect of exercise on insulin action in human skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v. 66, n. 2, p. 876-885, 1989.

ROBLES, Juan Carlos et al. Ca²⁺ sensitization and PKC contribute to exercise training-enhanced contractility in porcine collateral-dependent coronary arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 4, p. H1201-H1209, 2011.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**, v. 43, p. 86-90, 1994.

ROSE, Adam J. et al. Effect of exercise on protein kinase C activity and localization in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 561, n. 3, p. 861-870, 2004.

ROTH, Michael et al. Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 1, p. 191-201, 1996.

RUDERMAN, N. B.; SCHNEIDER, S.; KRAMSCH, D. Physical training and cardiovascular disease in the diabetic. **Current problems in clinical biochemistry**, v. 11, p. 166, 1982.

SCHOLER, Cinthia Maria et al. Modulation of rat monocyte/macrophage innate functions by increasing intensities of swimming exercise is associated with heat shock protein status. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 421, n. 1-2, p. 111-125, 2016.

SENGUPTA, Pallav. The laboratory rat: relating its age with human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624, 2013.

SHEPHARD, Roy J.; SHEK, Pang N.; DINUBILE, Nicholas A. Exercise, immunity, and susceptibility to infection: a j-shaped relationship?. **The Physician and sportsmedicine**, v. 27, n. 6, p. 47-71, 1999.

SHUKLA, S. D. Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms. **The FASEB journal**, v. 6, n. 6, p. 2296-2301, 1992.

SIMPSON, Richard J. et al. Chapter Fifteen-Exercise and the Regulation of Immune Functions. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 135, p. 355-380, 2015.

SIMPSON, Richard J. et al. Exercise and the aging immune system. **Ageing research reviews**, v. 11, n. 3, p. 404-420, 2012.

SOCI, Ursula Paula Reno et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. **Physiological genomics**, v. 43, n. 11, p. 665-673, 2011.

SOUZA, Alexandre Wagner Silva de et al. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

SPENCE, Luke et al. Incidence, etiology, and symptomatology of upper respiratory illness in elite athletes. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 4, p. 577-586, 2007.

SPERETTA, Guilherme Fleury Fina et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics**, v. 67, n. 12, p. 1469-1477, 2012.

STEENBERG, A.; TOFT, A. D.; BRUUNGAARD, H.; SANDMAND, M.; LKJAERKRINSTENSEN, J.; PEDERSEN, B.K. Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1708-1712, 2001.

STOUT, Robert D.; SUTTLES, Jill. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. **Immunological reviews**, v. 205, n. 1, p. 60-71, 2005.

SUGIURA, Haruo et al. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 3, p. 789-794, 2001.

SUN, Chenghong et al. Cycloastragenol mediates activation and proliferation suppression in concanavalin A-induced mouse lymphocyte pan-activation model. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n. 3, p. 131-139, 2017.

SZOSTAK, W. B.; SZOSTAK-WEGIEREK, D. [Health properties of shark oil]. **Przegląd lekarski**, v. 63, n. 4, p. 223-226, 2005.

TALANIAN, Jason L. et al. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. **Journal of applied physiology**, v. 102, n. 4, p. 1439-1447, 2007.

TCHORZEWSKI, H. Inflammation is a key effector phase in immune reactions. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, v. 20, n. 119, p. 567-572, 2006.

TJØNNA, Arnt Erik et al. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 118, n. 4, p. 346-354, 2008.

TOMANARI, Gerson Yukio; PINE, Alexandre de Souza; SILVA, Maria Teresa Araújo. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 5, n. 1, p. 57-71, 2003.

TURNER, J.E. Is immunosenescence influenced by our lifetime “dose” of exercise? **Biogerontology**, v. 17, p. 581-602, 2016.

VITORINO, Daniele Cristina et al. Effect of chronic supplementation with shark liver oil on immune responses of exercise-trained rats. **European journal of applied physiology**, v. 108, n. 6, p. 1225-1232, 2010.

WALLACE, Paul K. et al. Decreases in macrophage mediated antitumor activity with aging. **Mechanisms of ageing and development**, v. 77, n. 3, p. 169-184, 1995.

WALSH, Neil P. et al. Position statement part one: immune function and exercise. 2011.

WANG, Yating; XU, Danyan. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 132, 2017.

WEBER, Nikolaus. Metabolism of orally administered rac-1-O-[1'-14C] dodecylglycerol and nutritional effects of dietary rac-1-O-dodecylglycerol in mice. **Journal of lipid research**, v. 26, n. 12, p. 1412-1420, 1985.

WISLØFF, Ulrik et al. Intensity-controlled treadmill running in rats: $\dot{V}O_2$ max and cardiac hypertrophy. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 3, p. H1301-H1310, 2001.

WOODS, J. A. et al. Effects of exercise on the macrophage MHC II response to inflammation. **International journal of sports medicine**, v. 28, n. 06, p. 483-488, 1997.

WOODS, J. A.; LU, Q.; LOWDER, T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunology and cell biology**, v. 78, n. 5, p. 545, 2000.

WOODS, Jeffrey A. et al. Exercise, inflammation and aging. **Ageing and disease**, v. 3, n. 1, p. 130, 2012.

XIAO, Xiao et al. Common variable immunodeficiency and autoimmunity—an inconvenient truth. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n. 8, p. 858-864, 2014.

ZHANG, Mingshun et al. Oral administration of alkylglycerols differentially modulates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

ZWETSLOOT, Kevin A. et al. Effect of 4 weeks of high-intensity interval training on exercise performance and markers of inflammation and oxidative stress. , v. 31, n. 1 Supplement, p. 839.1-839.1, 2017.