

NORTON KOPPE LEITÃO

**RESPOSTA IMUNITÁRIA EM RATOS SUBMETIDOS À
ATIVIDADE FÍSICA DE LONGA DURAÇÃO.
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE, RICO
EM ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO N-3.**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

NORTON KOPPE LEITÃO

**RESPOSTA IMUNITÁRIA EM RATOS SUBMETIDOS À
ATIVIDADE FÍSICA DE LONGA DURAÇÃO.
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE, RICO
EM ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO N-3.**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

AGRADECIMENTOS

Quando atingimos um objetivo notamos o encaixe perfeito de algumas peças, como um quebra-cabeça. Somente com o suporte de família, amigos é que obtemos êxito.

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família em especial a minha esposa Simone. Querida, obrigado pela paciência, dedicação e afeto sem os quais este trabalho estaria engavetado e as nossas alegrias Henrique e Enzo que também fizeram parte deste processo.

Ao Prof. Dr Luiz Cláudio Fernandez, doutor do discernimento, da ponderação em entender a minha limitação quando cheguei no Laboratório. Luiz a vida nos prega surpresas, jamais achei que um dia gostaria tanto de estudar suplementação, exercício e sistema imunitário. O culpado disso é você.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia da UFPR, gostaria de citar uma frase. “Nenhum de nós é melhor sozinho do que todos nós juntos, unidos e cooperativos”. Este é o grupo que mais entende o que é trabalho em equipe. Obrigado mesmo, Paulo Martins, Sandro, Gleisson, Éverson, Luciéle, Loli, Karine, Fabíola, Diogo, Vanessa, Sérgio, Marcelo.

A Universidade Federal do Paraná, por possibilitar o despertar, através desse programa de mestrado, que não devemos nunca parar de estudar, aos funcionários do biotério pelo cuidado com o nosso maior bem de pesquisa, os ratinhos.

Aos meus pais (João e Nina) que em todos momentos souberam dar uma palavra de incentivo e a minha tia Vera pela paciência em me ouvir e incentivo para conclusão desse trabalho.

E finalmente àquele que me completa em todos os momentos da minha vida: Jesus Cristo. Sem a força e a luz Dele este trabalho seria apenas vaidade.

“Ninguém tem maior amor do que este: de dar alguém a própria vida em favor de seus amigos.”

Jesus (João 15:13)

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1.0 INTRODUÇÃO.....	12
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3.....	14
2.2 AGPI E O SISTEMA IMUNITÁRIO.....	16
2.3 EXERCÍCIO E SISTEMA IMUNITÁRIO.....	17
2.4 EXERCÍCIO E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS.....	19
2.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNIDADE DA MUCOSA.....	22
2.6 FUNÇÃO DOS NEUTRÓFILOS.....	22
2.7 EXERCÍCIO E RESPOSTA DE FASE AGUDA.....	22
2.8 CITOCINAS.....	23
2.9 EFEITOS DO EXERCÍCIO CRÔNICO NO SISTEMA IMUNITÁRIO.....	25
2.10 ESTUDOS TRANSVERSAIS EM HUMANOS.....	26
2.11 ESTUDOS LONGITUDINAIS EM HUMANOS.....	27
2.12 ESTUDOS LONGITUDINAIS EM ANIMAIS.....	27
2.13 EXERCÍCIOS E INFECÇÕES.....	28
2.14 INFECÇÕES DO TRATO AÉREO SUPERIOR.....	28
2.15 ATIVIDADE FÍSICA DE LONGA DURAÇÃO E O SISTEMA IMUNITÁRIO.....	29
2.16 N-3, SISTEMA IMUNITÁRIO E A ATIVIDADE FÍSICA DE LONGA DURAÇÃO.....	30
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	32
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	32
3.3 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS.....	32
3.3.1 Programa de Treinamento.....	33
3.3.2 Sobrecargas de Chumbo.....	34
3.3.3 Suplementação com N-3.....	34

3.3.4 Controle de Peso dos Animais.....	35
3.3.5 Ortotanásia dos Animais.....	35
3.3.6 Obtenção de Macrófagos.....	35
3.3.7 Obtenção de Células Polimorfonucleares Sanguíneas.....	35
3.3.7.1 Coleta e separação de células sanguíneas.....	35
3.3.8 Soluções e Tampões.....	36
3.3.9 Produção de Peróxido de Hidrogênio.....	37
3.3.10 Mensuração do Ânion Superóxido.....	37
3.3.11 Quantificação do Óxido Nítrico.....	38
3.3.12 Mensuração de lactato.....	39
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4.0 RESULTADOS.....	41
4.1 VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	41
4.2 LATICIDEMIA.....	42
4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS.....	42
5.0 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROs).....	45
5.1 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS.....	45
5.2 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS.....	47
5.3 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR NEUTRÓFILOS.....	48
5.4 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR MACRÓFAGOS.....	49
5.5 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR NEUTRÓFILOS.....	50
6.0 DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

RESUMO

A relação entre exercício intenso, imunidade e infecção foram estudadas pela primeira vez em 1901 por Larrabee. Quatro atletas apresentaram aumento na quantidade de neutrófilos circulantes. Larrabee notou que esta mudança nas células sangüíneas estava associada à doenças inflamatórias. Trinta anos mais tarde, Baetjer estudando exercício e infecção demonstrou que “fadiga muscular, baixa resistência e doenças infecciosas, principalmente do trato respiratório superior, acometiam esses atletas”. A resposta do sistema imunitário ao exercício prolongado (> 90 min.) recebeu mais atenção após a publicação de estudos epidemiológicos sugerindo aumento de infecção no trato respiratório superior (ITRS) durante uma ou duas semanas após corridas de maratona e ultramaratona. O estudo da associação da dieta e atividade física e seus efeitos sobre o sistema imunitário têm sido pouco explorados. O presente trabalho investigou o efeito da suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, 1 g/kg de peso corporal⁻¹, associado ao treinamento de natação em ratos Wistar. Quarenta animais foram separados em quatro grupos: Sedentário sem suplementação (C), sedentário com suplementação (N-3), treinado sem suplementação (TRE) e treinado com suplementação (TRE N-3). Após seis semanas de treinamento e três dias de descanso para investigação dos efeitos crônicos do exercício, os animais foram ortotanasiados, e sangue e tecido coletados. Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) com pós-teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$. A proliferação linfocitária no grupo sedentário suplementado com óleo de peixe (N-3) foi basalmente maior que o grupo controle e o mesmo foi observado para o grupo treinado (TRE). A associação de TRE com N-3 interessantemente foi similar à do grupo C. O mitógeno concanavalina A estimulou a proliferação em todos os grupos, contudo no grupo TRE a proliferação foi significativamente menor. O estímulo com LPS promoveu o mesmo efeito de estimulação, contudo os resultados foram similares aos descritos no estado basal. A produção de NO pelos macrófago peritoneais foi similar entre todos os grupos, exceto no TRE que foi menor. O estímulo com LPS induziu a produção elevada entre todos os grupos não havendo diferença entre eles. A produção de ânion superóxido pelo macrófagos peritoneais do grupo C e N-3 não foi diferente ($P > 0,05$). O treinamento elevou significativamente a produção e a associação com óleo de peixe não modificou este cenário ficando igual ao grupo TRE. Interessantemente quando avaliamos a produção de ânion superóxido pelos neutrófilos obtivemos uma imagem especular quando comparada à dos macrófagos peritoneais. Já a produção de H_2O_2 pelos macrófagos peritoneais ou neutrófilos não foi diferente entre os grupos. Estes resultados nos sugerem que a suplementação com óleo de peixe modula diferentemente as células do sistema imunitário, seja da resposta inata ou adaptativa e o mesmo pode ser dito sobre a atividade física. A associação de suplementação com óleo de peixe com atividade física não provocou alteração adicional, às já promovidas pela suplementação ou atividade física. Isto nos permite indicar que talvez a via de sinalização seja compartilhada pelo mesmo estímulo, dieta e atividade física.

ABSTRACT

The relationship between intensive exercise, immunity, and infection were first shown by Larrabee (1901). He reported in four athletes neutrophils increased in the blood. He also noted that this change in the blood cells was associated with the development of inflammatory diseases. Thirty years later, Baetjer studying physical exercise and infection showed that "muscle fatigue, low resistance and infectious diseases, especially in the breathing realm affected these athletes". The response of the immunity system to intensive exercise ($> 70\%$ do $VO_{2\text{máx}}$) for long period of time (> 90 min.) received more attention after the publication of epidemiologic studies suggesting an increase of infection in the tract respiratory superior (ITRS) for a period of one to two weeks after running a marathon or a ultra-marathon. The present study aimed to investigate the effect of fish oil (FO) supplementation, associated to exercise on immune system of Wistar rats. Forty animals were separated in four groups. Sedentary not supplemented (C), sedentary supplement with fish oil (N-3), exercised not supplemented (TRE) and exercised supplemented with fish oil (TRE N-3). After six weeks of training the animals were killed. Blood and tissue were collected. The data were submitted to two-way ANOVA followed by post hoc Tukey test. The proliferation rate of gut associated lymphocytes in the N-3 group was basally higher when compared to C group and the same was shown for the TRE group. Exercise associated to fish oil supplementation was similar to C group. The addition of mitogen stimuli, Con-A, induced all group to proliferate but in the TRE it was lower ($P<0,05$) when compared to all groups. The LPS presence also caused increase in the lymphocyte proliferation, however the results were similar to those seen in the basal state. The nitric oxide production (NO) by peritoneal macrophages was identical in all groups except in the TRE group which was lower. The presence of LPS induced the increase of NO production by all groups however they were not different among them. The anion superoxide production by peritoneal macrophages by C and N-3 group was not different. Interestingly the TRE increased significantly the production and the association with fish oil supplementation (TRE N-3) did not cause any further increase. On the other hand, the anion superoxide production by circulating neutrophils was completely inverse to that shown by peritoneal macrophages. But the H_2O_2 production by neutrophils and macrophages were identical. Our results suggest fish oil supplementation modulates immune system as well as physical activity. The association between FO supplementation and exercise did not induce further modifications. We hypothesize that they might share the same via of signal transduction to modulate immune system. This hypothesis must be tested.

LISTA DE ABREVIATURAS

HO ⁻:	Radical Hidroxila
AG.....:	Ácido Graxo
AGE.....:	Ácidos Graxos Essenciais
ANOVA.....:	Análise de Variância
B.....:	Linfócitos B
CD19.....:	Marcador de Superfície 19
CD4.....:	Marcador de Superfície 4
CD8.....:	Marcador de Superfície 8
CK.....:	Creatina Kinase
Con-A.....:	Concanavalina A
CPM.....:	Contagem Por Minuto
DHA.....:	Ácido Docosaheptaenóico
DMSO.....:	Dimetil Sulfóxido
EPA.....:	Ácido Ecosapentaenóico
EROs.....:	Espécies Reativas do Oxigênio
H ₂ O ₂:	Peróxido de Hidrogênio
H ₃ PO ₄:	Ácido Fosfórico
IFN.....:	Interferon
IFN- γ:	Interferon γ
IgA.....:	Imunoglobulina A
IgE.....:	Imunoglobulina E
Igs.....:	Imunoglobulinas
IL-1.....:	Interleucina 1
IL-10.....:	Interleucina 10
IL-1ra.....:	Antagonista do Receptor Do IL-1
IL-2.....:	Interleucina 2
IL-4.....:	Interleucina 4
IL-5.....:	Interleucina 5
IL-6.....:	Interleucina 6
IL-8.....:	Interleucina 8
ITRS.....:	Infecções do Trato Respiratório Superior
LPS.....:	Lipopolissacarídeos
NBT.....:	Nitroblue Tetrazolium
NK.....:	Natural Killer
NO.....:	Óxido Nítrico
PBS.....:	Tampão Salina Fosfatada
PHA.....:	Fitohemaglutinina
PMA.....:	Éster de Forbol de Miristato
PMNC.....:	Células Polimorfonucleares
PR-C.....:	Proteína Reativa C
AGPI.....:	Ácidos Graxos Poliinsaturados
Tc.....:	Células T Citotóxicas
Th.....:	Linfócitos T Helper
Th1.....:	Linfócitos T Helper 1
Th2.....:	Linfócitos T Helper 2
TNF- α:	Fator de Necrose Tumoral- α

TNF-R.....: Receptor para Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Efeitos do exercício extenuante sobre o sistema imunitário.....	19
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.....	14
Figura 02.....	20
Figura 03.....	24
Figura 04.....	32
Figura 05.....	40
Figura 06.....	41
Figura 07.....	43
Figura 08.....	45
Figura 09.....	46
Figura 10.....	47
Figura 11.....	48
Figura 12.....	49

1.0 INTRODUÇÃO

Alguns estímulos promovem alterações na quantidade e na função das células do sistema imunitário. O exercício de longa duração e a suplementação quer seja de ácidos graxos saturados ou insaturados modificam a dinâmica da funcionalidade das células de defesa (CALDER *et al.*, 2002)

Competições e treinamento de alta intensidade que duram mais de 90 minutos com utilização de 70% do $Vo_{2máx}$ ¹ promovem o aparecimento de infecções e inflamações (NIEMAN, 1996), principalmente das vias aéreas do trato respiratório superior (ITRS). Isto, como conseqüência, causa debilidade no desempenho do atleta.

Nos últimos 200 anos a população humana aumentou enormemente o consumo de ácidos graxos, em especial os de gordura saturada, trans e de poliinsaturados (AGPI) da família ômega-6 (n-6), com redução concomitante dos ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) e também das vitaminas antioxidantes C e E. Esta alteração foi maior na sociedade ocidental, onde a razão de AGPI n-6 e n-3 encontra-se elevada. Atualmente, a população ocidental ingere quantidade muito grande de AGPI n-6 em relação à de n-3 (15-30:1). Esta alteração da dieta foi acompanhada de desequilíbrio das funções do sistema imunitário e está associada ao desenvolvimento de inflamações, câncer, doenças autoimunes e cardiovasculares. Essas duas famílias de AGPI (n-6 e n-3) são consideradas essenciais porque não podem ser sintetizadas pelos mamíferos e também não podem ser interconvertidas. As ausências desses nutrientes na dieta causam sérios distúrbios que podem levar o indivíduo à morte.

Óleo de peixe, rico em AGPI n-3, tem a habilidade de modular o sistema imunitário. Atletas de esportes de alta intensidade e longa duração são mais freqüentemente acometidos de infecções e inflamações. Assim, a suplementação com óleo de peixe poderia ajudar na redução dos índices de infecções decorrentes da modalidade praticada. Conseqüentemente poderiam ganhar tanto na preservação do sistema imunitário bem como no próprio treinamento, que não sofreria interrupções ou alterações devido a essas doenças.

Atletas que realizam exercícios de longa duração e alta intensidade, freqüentemente, apresentam inflamações e infecções, em especial às do trato

¹ Capacidade de absorção de Oxigênio

respiratório superior (ITRS), quando comparados a indivíduos sedentários ou mesmo à atletas que executam atividade de intensidade leve à moderada.

O objetivo desse trabalho foi o de investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, sobre as células do sistema imunitário de indivíduos submetidos a exercício de longa duração, avaliando a taxa de proliferação de linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico, nos macrófagos a produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e óxido nítrico, e por neutrófilos a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

A palavra lipídeo é derivada do grego *lipos* que significa gordura. Os lipídeos ou gorduras envolvem uma série de diferentes substâncias hidrofóbicas, as quais desempenham diferentes papéis nos organismos, tais como reserva de energia, composição de membranas, cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem a luz, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares (LEHNINGER, NELSON & COX, 2000). A estrutura fundamental dos lipídeos é composta de ácidos graxos ou estruturas diretamente a eles relacionados, como álcoóis, aldeídos ou aminas.

2.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS N-3

Os ácidos graxos (AG) são tijolos para síntese de lipídeos. Eles formam uma cadeia de átomos de carbono, nos quais estão ligados átomos de hidrogênio. As propriedades dos AG, como solubilidade e flexibilidade, são determinadas pelo tamanho da cadeia e grau de insaturação, sendo que AG poliinsaturados de cadeia longa, são mais flexíveis e solúveis que os saturados (NETTLETON, 1995). Há duas importantes famílias de AG poliinsaturados (AGPI): a família n-6 (ômega-6 ou ω -6), derivada do AG essencial linoléico; a família n-3 (ômega-3 ou ω -3), derivada do AG essencial linolênico. Em adição, as duas famílias não podem ser interconvertidas (JIANG *et al.*, 1998; CALDER, 2001). Esses dois AG são considerados essenciais (AGE) porque não podem ser sintetizados pelo organismo. A ausência desses nutrientes na dieta está associada ao aparecimento de síndromes que podem levar à morte. A essencialidade dos AGPI n-6 é conhecida desde a década de 1930. Sua deficiência, por exemplo, está associada a problemas dérmicos. Quanto ao AGPI n-3, só após 1980 é que se descobriu sua necessidade na dieta, para evitar, principalmente, distúrbios neurológicos e visuais (CURI *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstraram que a ingestão de peixes, principal fonte de AGPI n-3, reduz o risco de doenças cardiovasculares (HE *et al.*, 2002; WILLETT & SPAMPFER, 2003).

Atualmente (FIGURA 01), a população ocidental ingere quantidade muito grande de AGPI n-6 em relação à de n-3 (15-30:1). Isto tem sido associado ao desenvolvimento de várias patologias, tais como doenças cardiovasculares,

câncer, doenças autoimunes e inflamatórias (ABEYWARDENA, 2001; SIMOPOULOS, 2002). Vários estudos têm demonstrado que a ingestão adequada de AGPI n-3 pode diminuir os riscos de desenvolvimento destas patologias (ASHERIO *et al.*, 1996; ALEXANDER, 1998; PABLO, PUERTOLLANO & CIENFUEGOS, 2000; CALDER *et al.*, 2002; CURI *et al.*, 2002; TOGNI, OTTA & FOLADOR 2003). SIMOPOULOS (2002) advoga que se a ingestão de AGPI n-6 e n-3 for nas proporções de:

4:1 = teríamos redução de 70% da mortalidade por doenças cardiovasculares;

2,5:1 = teríamos redução da proliferação celular em pacientes com câncer de colo retal;

2-3:1 = teríamos diminuição da inflamação em pacientes com artrite reumatóide;

5:1 = teríamos benefícios em pacientes com asma.

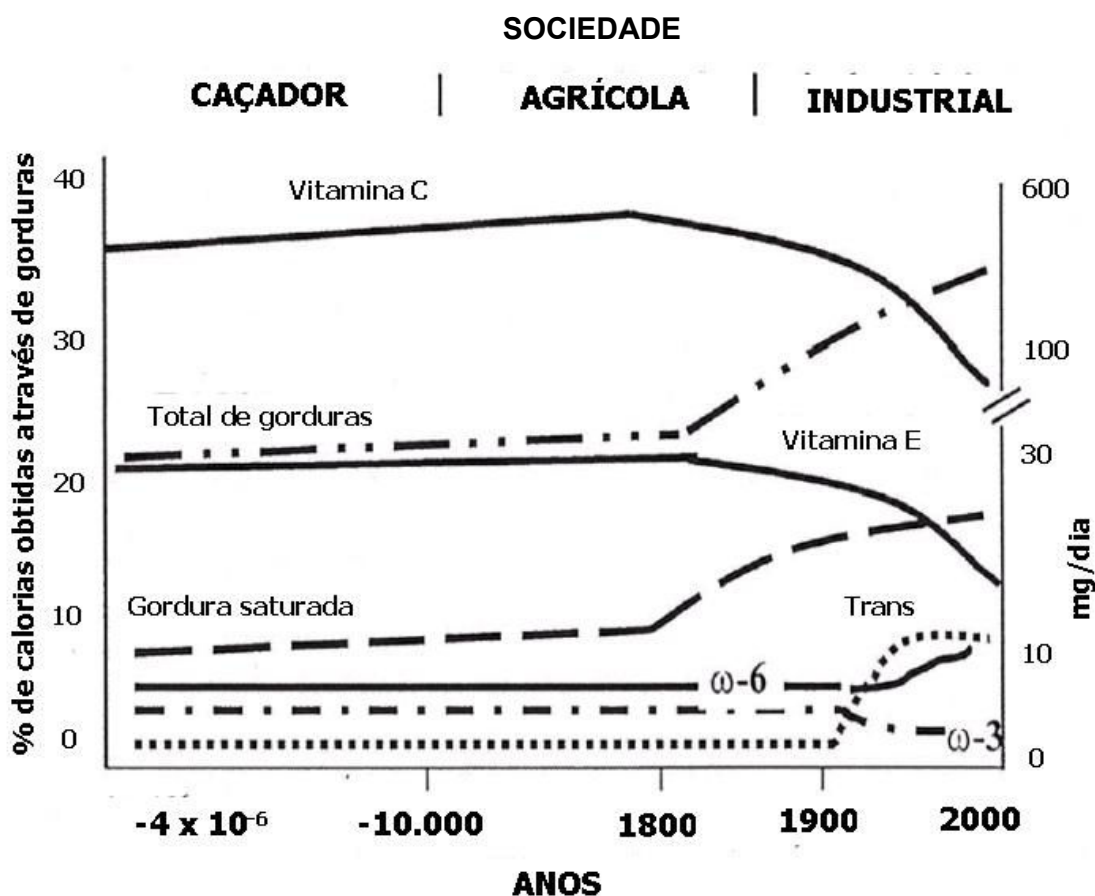


FIGURA 01. Percentagem de gordura ingerida por nossos ancestrais desde a época paleolítica até a atualidade. A.P. Simopoulos, 2002.

2.2 AGPI E SISTEMA IMUNITÁRIO

Os AG modificam a resposta imunitária específica, agindo como mediadores intracelulares e intercelulares. Os AGPI da família ômega-3 em concentração elevada têm efeito supressor, inibindo a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e citocinas, a expressão de moléculas de adesão, a atividade de células citotóxicas e causam a morte celular (CURI *et al.*, 2002). Tem sido relatado que a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, reduz a produção das citocinas interleucina 1(IL-1), interleucina 6 (IL-6), do fator de necrose tumoral (TNF) pelas células mononucleares em voluntários normais, sendo que este efeito é mantido por várias semanas após a interrupção da suplementação (ENDRES, GHORBANI & KELLEY, 1989; COOPER *et al.*, 1993). Dietas ricas em AGPI n-3 diminuem a produção de interleucina 2 (IL-2) pelos linfócitos de roedores e humanos. A IL-2 e interferon-gama (IFN- γ) estão envolvidos na imunidade célula-mediada, na ativação de macrófagos e células NK (*natural killer*) e na rejeição de transplantes e reações inflamatórias (MEYDANI, LICHTENSTEIN & CORNWALL, 1993; CALDER 1996 e 1998a).

O papel modulador dos AGPI n-3 sobre o sistema imunitário tem sido comprovado através de estudos epidemiológicos, clínicos e em modelos animais (CALDER, 1996, 1998a, b) e através da observação das populações de esquimós, que consomem grande quantidade de óleo de peixe e possuem baixa incidência de doenças autoimunes (KROMANN & GREEN, 1980; BITTNER *et al.*, 1988). Vários estudos têm demonstrado significativa redução de inflamações em pacientes com artrite reumatóide (KREMER *et al.* 1990), psoríase (BITTNER *et al.*, 1988), lupus eritematoso (WATSON *et al.* 1991) e esclerose múltipla (DAS, 1994; HARBIGE, 1998). Em geral, essas doenças autoimunes são caracterizadas pela atividade exacerbada do sistema imunitário, com ativação inapropriada dos linfócitos T, resultando na destruição de tecidos do hospedeiro. Tipicamente, os sítios de destruição (por exemplo, articulações na artrite reumatóide, tecido neural na esclerose múltipla) contêm linfócitos T ativados e mediadores químicos produzidos por essas células, que podem estimular macrófagos. A proliferação dos linfócitos e ativação de macrófagos é parte importante na resposta autoimune e a regulação desse processo representa papel central na modulação do sistema imunitário (NETTLETON, 1995).

2.3 EXERCÍCIO E O SISTEMA IMUNITÁRIO

A resposta imunitária ocorre devido a uma variedade de estímulos causados por doenças invasivas, sejam infecciosas ou neoplásicas. Esta resposta é dada pelo recrutamento de células especializadas, as quais secretam substâncias capazes de alterar o metabolismo do organismo portador. As células recrutadas são os leucócitos, que estão categorizados em dois grupos funcionais: os fagócitos (mastócitos, monócitos, neutrófilos e basófilos) e os linfócitos [linfócitos B, T e células natural killer (NK)]. Estas células não atuam isoladamente, havendo necessidade da presença das duas classes celulares para o sistema imunitário executar sua função com eficiência (JANEWAY *et al.*, 2000).

Os linfócitos (dependendo do microambiente onde ocorre sua maturação, marcadores de membrana, reações a estímulos, padrões de migração e meia vida), podem ser do tipo B (LB) ou T (LT). Normalmente presentes do sistema circulatório no estado quiescente, estas células são maturadas em órgãos linfóides secundários, como a medula óssea, timo, baço e linfonodos ou estão dispersos em outras localidades do corpo. Os linfócitos T e B têm lugares específicos para seu desenvolvimento, sendo que no timo há desenvolvimento dos T; na medula óssea e baço o dos B. (ARDAWI & NEWSHOLME, 1985; JANEWAY *et al.*, 2000). Estas células são produzidas diariamente nesses órgãos na ordem de 10^9 , de onde migram, via circulação, para outros órgãos linfóides ou àqueles associados à mucosas (órgãos linfóides secundários). Estas células são pequenas e arredondadas, apresentando diâmetro que varia de 6 a 10 μm , com alta ou baixa relação núcleo citoplasma e com variações na forma nuclear e na presença ou não de grânulos azurofílicos no citoplasma (ROITT *et al.*, 1998; CURI, 1994). Estas células são importantes na resposta imunitária tanto humoral quanto celular e, sua funcionalidade está relacionada não só com a capacidade de defesa do organismo contra infecções, mas também com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Estímulo do tipo invasivo ou neoplásico é capaz de promover a ativação dessas células, levando-as a se proliferarem, sintetizar e secretar substâncias (citocinas) envolvidas na resposta imunitária (JANEWAY *et al.*, 2000).

Linfócitos B participam da resposta humoral. Quando ativados, se diferenciam em plasmócitos produzindo imunoglobulinas (Igs). Proliferam-se quando estimulados

por antígenos específicos, como interleucina-4 ou artificialmente com lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactéria. Já os linfócitos T, responsáveis pela resposta imunitária celular proliferam-se, ativamente, quando estimulados com a interleucina-2 ou artificialmente pelo uso de mitógenos, como por exemplo, a concanavalina-A (Con-A).

Os linfócitos T não sintetizam imunoglobulinas, atuam modulando a resposta imunitária através da produção de citocinas e ativando outras células, como por exemplo, os macrófagos. As células T são divididas em duas classes bem distintas: células T auxiliar (helper-Th) e células T citotóxicas (Tc). Essas classes são bem definidas pela presença de proteínas de superfície celular. Os linfócitos Th são os principais coordenadores da resposta imunitária, uma vez que são necessários para a ativação das células que expressam antígenos estranhos. (ALBERTS *et. al.*, 1997, ROITT *et. al.*, 1998; CALDER, 2001). Além das funções descritas, os linfócitos Th e Tc também podem suprimir a resposta imunitária.

Existe outra classe de linfócitos, ainda não bem definida, conhecida como T supressor. De fato, não é evidente se a supressão da resposta imunitária é mediada por um tipo distinto de célula T ou por células, que dependendo da situação, podem agir como auxiliares ou citotóxicas (JANEWAY *et al.*, 2000).

As populações de linfócitos Th são subdivididas funcionalmente de acordo com o padrão de citocinas que produzem. As células do tipo 1, denominadas Th1, são células que produzem interleucina-2 (IL-2) e interferon gama (IFN_γ), capazes de ativar macrófagos, células natural killer e Tc. Os linfócitos Th2 produzem interleucina-4 (IL-4), que estimulam a produção de IgE pelos linfócitos, interleucina-5 (IL-5), fator de ativação de eosinófilos e interleucina-10 (IL-10), que juntamente com IL-4 suprimem a imunidade mediada por célula (MOSSMANN *et. al.*, 1996; CALDER, 1998; 2001). Cada grupo de citocinas produzida por um tipo celular, inibe a produção de citocinas do outro tipo celular.

Exercício está associado com a grande alteração da quantidade de leucócitos. Após 2h30min à 3h de corrida intensa foi demonstrado aumento na quantidade de leucócitos, atingindo o pico aproximadamente 3h após a corrida e retornando ao normal no dia seguinte. A quantidade de granulócitos aumentou fortemente (250%) acompanhada de monócitos (60%) enquanto linfócitos emergem do compartimento sanguíneo (40%). Há decréscimo nos linfócitos por pelo menos 6 hs, representados por células T e NK, mas não de células B. É interessante notar que duas células do

sistema imunitário inato mudam sua quantidade na reação desencadeada pelo exercício intenso.

Neutrófilos e monócitos são a primeira linha de defesa para eliminar agentes estranhos e são responsáveis pela resposta inflamatória do tecido muscular (EVANS & CANNON, 1991). Alguns estudos têm sido conduzidos para definir a resposta dessas células fagocitárias, especialmente os monócitos, decorrente do exercício intenso e prolongado (ORTEGA, 1994). Monócitos e neutrófilos invadem a área inflamada e realizam a fagocitose. O estresse e a sobrecarga reduzem a capacidade dos neutrófilos em oxidar esses agentes infecciosos (PYNE, 1994).

2.4 EXERCÍCIO E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

As maiorias dos estudos realizadas sobre proliferação de linfócitos, usaram mitógenos que induzem muitos, senão todos, os linfócitos de um certo tipo, a proliferarem-se (JANEWAY & TRAVERS, 1994). Estudos em seres humanos indicam que há declínio na resposta dos linfócitos aos mitógenos fitohemaglutinina (PHA) e concanavalina-A (Con-A) durante e por até muitas horas após o exercício; isto também foi detectado consistentemente em estudos em animais, (Tabela 1, PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000) ocorrendo, pelo menos em parte, devido ao aumento das células NK na circulação (FRY *et. al*, 1992).

Efeitos do exercício extenuante sobre o sistema imunitário		
	Durante Exercício	Após Exercício
Contagem de neutrófilos	↑	↑↑
Contagem de monócitos		↑
Contagem de linfócitos	↑	↓
Contagem células T CD4+	↑	↓
Contagem células T CD8+	↑	↓
Contagem de células B CD19+	↑	↓
Contagem de células NK CD16+56	↑	↓
Apoptosi em linfócitos	↑	↑
Resposta proliferativa à mitógenos	↓	↓
Resposta dos anticorpos in vitro	↓	↓
IgA da saliva	↓	↓
Tempo de resposta hipersensível (teste de pele)		↓
Atividade das células NK	↑	↓
Atividade das células LAK	↑	↓
Proteína C-reativa		↑
Neoptarina		↑
Concentração plasmática de TNF-	↑	↑
Concentração plasmática de IL-1	↑	↑
Concentração plasmática de IL-6	↑↑	↑
Concentração plasmática de IL-1ra	↑↑	↑
Concentração plasmática de IL-10	↑	↑
Concentração plasmática de TNF-R	↑	↑
Concentração plasmática de MIP-1 IL-8		↑

↑- Acréscimo; ↓- Decréscimo; ↑↑- Acréscimo acentuado; TNF--fator de necrose tumoral-; TNF-R-fator de necrose tumoral receptor; IL- interleucina; MIP- proteína inflamatória macrófago.

Tabela 01-Efeitos do exercício extenuante sobre o sistema imunitário.

A resposta da proliferação e distribuição na subpopulação das células do sangue foram estudadas no exercício concêntrico da bicicleta com 75% do $VO_{2máx}$, 1h de duração (TVEDE *et. al.*,1989). De acordo com muitos outros estudos a resposta a PHA e das células T auxiliares declinaram, e as células NK aumentaram durante o exercício. Desta forma, mais linfócitos são recrutados do sangue. Assim, as respostas mais baixas a PHA e a Con-A refletem em mudanças proporcionais nos subconjuntos de linfócitos, e declínio na porcentagem de células T (NIELSEN & PEDERSEN, 1997). Após o exercício a concentração total de linfócitos diminui, e a resposta de proliferação permanece inalterada dos valores obtidos antes do exercício. Conseqüentemente, o total na função de linfócitos pode ser considerado suprimido após o exercício (FIGURA 02).

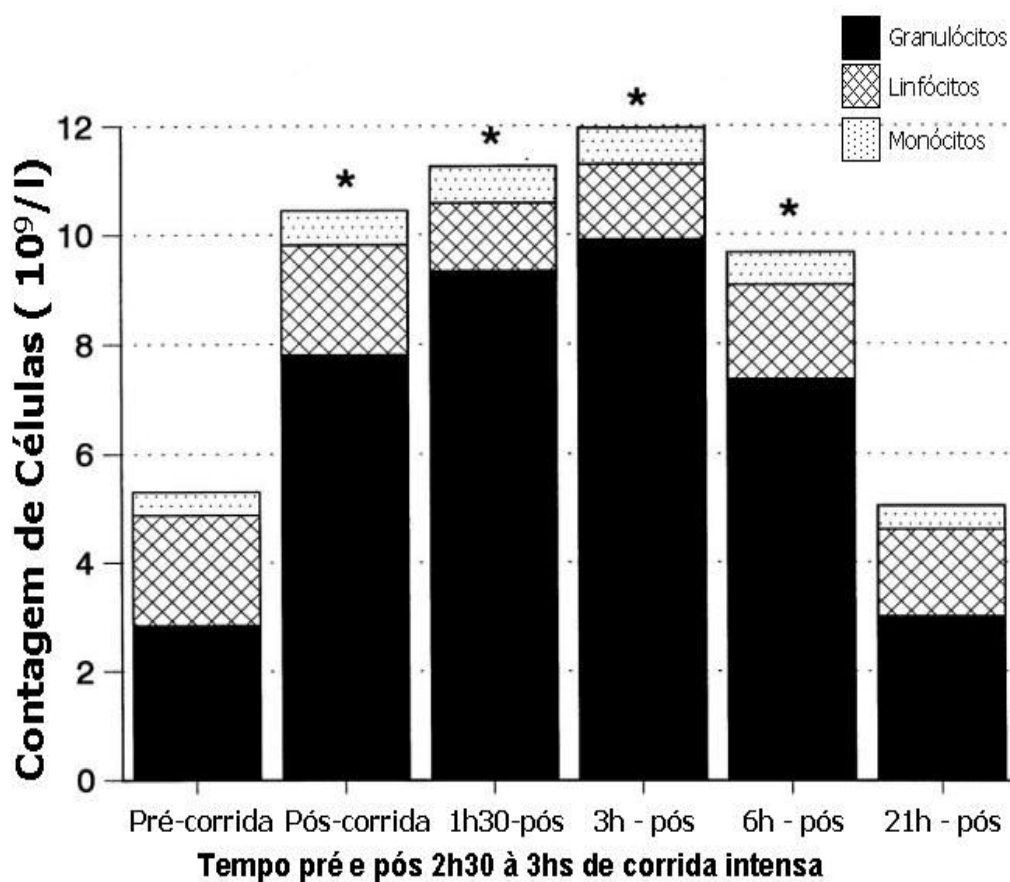


FIGURA 02-Resposta à produção linfocitária e de leucócitos após corrida intensa realizada por 62 maratonistas. * $P < 0,01$ relativo a pré-corrida

2.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNIDADE DA MUCOSA

Para muitos imunologistas, as secreções da mucosa são a primeira barreira contra a colonização de microorganismos patogênicos. Embora IgA da mucosa constitua somente de 10 a 15% da imunoglobulina total no sangue, a concentração de IgA na mucosa está mais relacionada com ITRS do que os próprios anticorpos do sangue (LIEW *et. al.*, 1984). Concentrações mais baixas da IgA da saliva foram relatadas em esquiadores “cross-country” após uma prova longa. Estes dados foram confirmados pela diminuição da IgA da saliva por várias horas após o exercício, em corrida de longa duração e alta intensidade. IgA baixa também foi encontrado após natação intensa. O exercício submáximo não teve nenhum efeito na IgA da saliva.

2.6 FUNÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos representam 50 a 60% do total de leucócitos circulantes. Estas células são parte do sistema imunitário inato. São essenciais para a defesa do organismo e estão envolvidos na patologia de diversas situações inflamatórias. Esta última se reflete na oxidação do tecido resultando em fagocitose incompleta.

Uma das características mais pronunciadas da atividade física nos parâmetros imunitários é a neutrocitose prolongada após exercício de longa duração e alta intensidade. Os trabalhos apontam que o exercício ocasiona uma série de mudanças na população de neutrófilos à curto e longo prazo. A resposta dos neutrófilos à infecção inclui aderência, quimiotaxia, fagocitose, oxidação, degranulação e a matança microbial. No exercício moderado, incluindo a quimiotaxia, oxidação e fagocitose são otimizadas. No exercício extenuante, por outro lado, estas funções são suprimidas, à exceção da quimiotaxia e degranulação que não são afetados (BRINES, HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1996)

2.7 EXERCÍCIO E RESPOSTA DE FASE AGUDA

Os locais da resposta à infecção ou produção de citocinas envolvendo o tecido afetado são liberados no local da inflamação. Estas citocinas facilitam o fluxo de linfócitos, neutrófilos, monócitos e outras células, as quais participam no surgimento do antígeno e da recuperação do tecido. A resposta inclui a produção,

em grande quantidade, pelos hepatócitos da proteína C reativa (PRC), macroglobulina e transferrina. Injeções de $TNF\alpha$, IL-1 e IL-6 em animais ou humanos pode produzir, não para todos, aspectos de resposta de fase aguda. Estas citocinas são usualmente referidas como inflamatórias, talvez seja mais razoável classificar IL-6 como citocina de resposta inflamatória. Há um número de inibidores biológicos das citocinas inflamatórias, estão inclusos o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), dos receptores $TNF\alpha$, IL-4 e IL-10.

2.8 CITOCINAS

Os primeiros estudos revelam que o exercício reduz a resposta às citocinas analisadas através do plasma obtido de humanos após o exercício, e se injetada intraperitonealmente em ratos, provoca elevação da temperatura retal. Em 1986, dois estudos foram publicados mostrando aumento das concentrações de IL-1 em resposta ao exercício. Aumento na concentração de IL-6 também foi relatada após uma prova de maratona, mas não foi detectado IL-1B. A concentração de IL-6 também estava elevada em resposta ao exercício (VENKATRAMAN & PENDERGAST, 1998) (tabela 1). Alguns estudos têm falhado na detecção do $TNF\alpha$ após o exercício, entretanto outros estudos relatam aumento nas concentrações plasmáticas de $TNF\alpha$ (tabela 1).

Após uma corrida de maratona, $TNF\alpha$ e IL-1B aumentaram duas vezes entretanto, a concentração de IL-6 aumentou cinquenta vezes. Recentes estudos demonstram que algumas citocinas podem ter suas concentrações aumentadas no plasma durante e após exercícios extenuantes (tabela 1). Este tipo de exercício induz ao aumento na concentração de citocinas inflamatórias $TNF\alpha$ e IL-1B e um aumento considerável na resposta do IL-6. Esta liberação é equilibrada pela produção de citocinas inibitórias (IL-1ra, $TNF\beta$) e da citocina antiinflamatória IL-10. Também as concentrações de quimocina, IL-8 e proteína inibitória do macrófago MIP- α e MIP-1B, estão elevadas após a maratona. Estes relatos sugerem que citocinas inibitórias e antiinflamatórias restringem a sua ação e duração à resposta antiinflamatória do exercício. A presença de múltiplas citocinas ($TNF\alpha$, IL-1B, IL-6, IL-2_{receptores} e $TNF\gamma$) na urina após o exercício demonstrou que é possível uma

expressão de largo espectro das citocinas em resposta ao exercício. (SPRENGER *et. al.*, 1992).

Há algumas possibilidades para se explicar a variação do resultado sobre citocinas pró-inflamatórias em relação ao exercício:

- 1- o tipo de atividade física, bem como a intensidade e a duração. Aumento das concentrações de citocinas pode ser bem descrita após o exercício excêntrico. Entretanto, quando o aumento está relacionado, provavelmente, com a duração do exercício, estes dados são relatados em estudos comparando as concentrações de citocinas em grupo que foram submetidos a exercícios de intensidade, mas com durações variadas.
- 2- A especificidade e a sensibilidade em ensaios é outra possibilidade de explicação. Por exemplo, acredita-se que IL-1 é a citocina responsável nos exercícios reduzidos do plasma, a possibilidade existe até outras citocinas serem mensuradas. Estudos mais tarde foram conduzidos após a recombinação das proteínas IL-1. Entretanto, a proliferação timocitária em ensaios detectou IL-6.

Aumento nas concentrações de citocinas pode ser encontrado em exercícios excêntricos. Exercícios excêntricos e concêntricos foram comparados e, em relação ao consumo de O₂, foram semelhantes. Através das concentrações de catecolaminas não houve diferenças entre os dois experimentos, mas as concentrações de creatina kinase aumentaram aproximadamente 40 vezes após 4 dias de exercício excêntrico. (BRUUNSGARD *et. al.*, 1997)

Não foram observadas mudanças nas concentrações de creatina kinase (CK) em relação ao exercício concêntrico. As concentrações de IL-6 aumentaram em cinco vezes em relação ao exercício excêntrico e isto foi correlacionado significativamente com as concentrações de CK nos dias subseqüentes. Entretanto, não foram encontradas mudanças em relação ao exercício excêntrico. Este estudo indica que há uma associação entre os aumentos nas concentrações de IL-6 e o músculo atingido. . (OSTROWSKI *et. al.*, 1998)

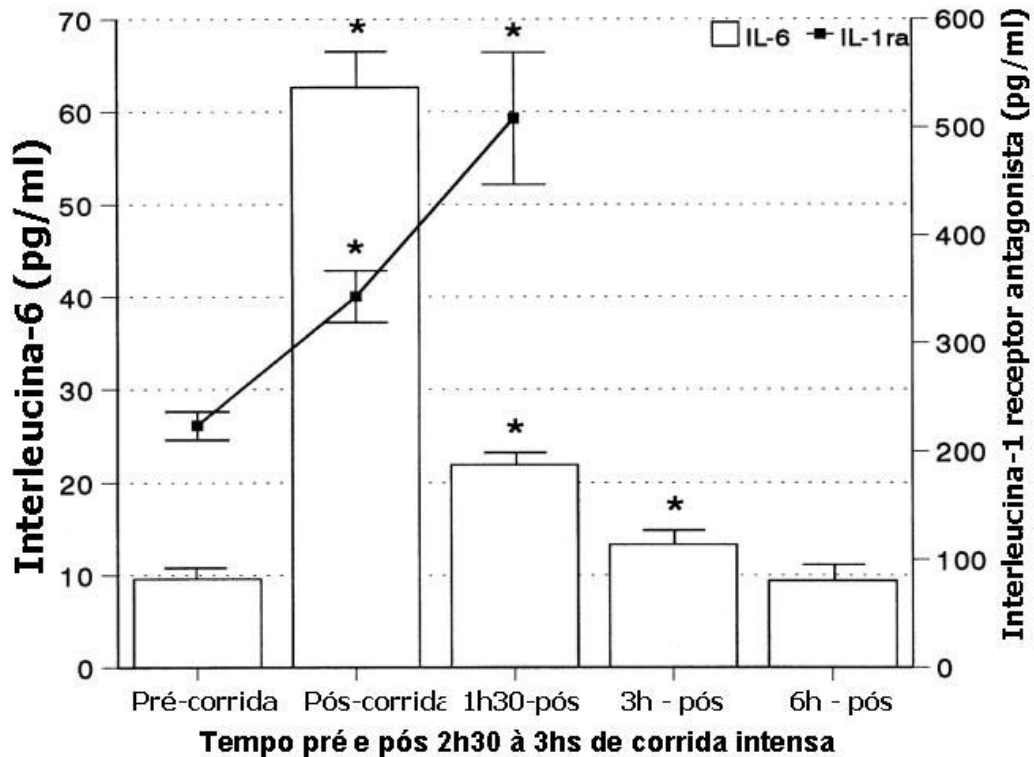


FIGURA 03-Concentração sérica de interleucina-6 (IL-6) e de interleucina-1 receptor antagonista (IL-1ra) após corrida intensa realizada por 30 maratonistas. * $P < 0,05$ relativo a pré-corrida

2.9 EFEITOS DO EXERCÍCIO CRÔNICO NO SISTEMA IMUNITÁRIO

Em contraste com o grande número de estudos sobre o sistema imunitário e o exercício agudo, pouco é conhecido sobre os efeitos do condicionamento ou treinamento sobre a função imunitária. Isto ocorre pela dificuldade em se separar os efeitos da aptidão física e a necessidade de aplicação de treinamentos de longa duração. As mudanças no sistema imunitário provenientes do exercício intenso pode durar pelo menos 24 horas e mesmo o exercício moderado induz a mudanças significativas por várias horas. Isto ocorre porque não é fácil persuadir os atletas a descansar pelo menos um dia para análise dos resultados, incluindo o descanso. A influência do exercício crônico foi estudada em modelos animais e humanos, sendo que em humanos foram realizados estudos transversais e longitudinais.

2.10 ESTUDOS TRANSVERSAIS EM HUMANOS

Dois estudos foram conduzidos com atletas de ciclismo, requerendo dos sujeitos que não se exercitassem 20 horas antes da amostra sangüínea. (PEDERSEN *et. al.*, 1989). Todos os sujeitos praticavam este esporte por pelo menos 4 anos e com volume anual de 20 mil km. A atividade das células NK foi de 38,1% para o grupo treinado comparado com 30,3% para o grupo destreinado e a média de CD16+NK foi de 17% no grupo treinado contra 11% no grupo destreinado. Em outro estudo, 15 ciclistas e 10 controles foram examinados durante os períodos de alta e baixa intensidade do treinamento. A atividade das células NK foi significativamente maior no grupo treinado em ambos os períodos. No de baixa intensidade 39,2% X 30,9% e no de alta intensidade 55,2% X 33,6%, respectivamente comparado ao controle (TVEDE *et. al.*, 1991). O aumento da atividade das células NK no período de baixa intensidade foi devido ao aumento da porcentagem destas células. No treinamento de alta intensidade o aumento da função das células NK não foi devido simplesmente ao aumento da quantidade destas células: ambos os grupos foram comparados quanto à quantidade de células NK circulantes. Os mecanismos de aumento das células podem ser secundários para as diferenças na ativação das células NK. Os resultados sugerem que as células NK foram ativadas nos sujeitos treinados durante o treinamento de alta intensidade e isto pode ser o ajuste do número de células CD16+ na circulação, mas alguns mecanismos são desconhecidos. Em outros estudos a subpopulação e resposta proliferativa de linfócitos não foram diferentes entre os grupos treinados e destreinados. (PEDERSEN *et. al.*, 1989 e TVEDE *et. al.*, 1991)

Após 7 maratonas completadas, 22 corredores foram comparados com 18 sedentários do grupo controle (NIEMAN *et. al.*, 1995). Houve grandes diferenças entre os grupos no $VO_{2máx}$, porcentagem de gordura corporal e estilo de vida, mas somente a atividade das células NK sobre o sistema imunitário foram consideradas significativamente diferentes entre os grupos (alta entre os maratonistas). A atividade das células NK e a resposta proliferativa à PHA foram significativamente elevadas no grupo condicionado quando comparados com o grupo inativo.

Resposta proliferativa de linfócitos tem sido descrita com decréscimo, elevada ou sem alteração quando se compara atletas e destreinados. A função dos neutrófilos pode ser suprimida ou a influência do treinamento não é significativa. Não

ocorreram transformações na função dos neutrófilos em atletas durante o período de baixa intensidade, mas houve decréscimo na função no período de alta intensidade de treinamento. (HACK *et. al.*, 1994)

2.11 ESTUDOS LONGITUDINAIS EM HUMANOS

O efeito do exercício crônico tem sido bem investigado em estudos longitudinais. Isto é vantajoso porque estes estudos usam a randomização, excluindo valores que podem causar confusões. A desvantagem é que estudos longitudinais investigam os efeitos do exercício sobre o sistema imunitário após 16 semanas de treinamento, entretanto os estudos cruzados refletem muitos anos de treinamento. Todos os estudos, entretanto, demonstram efeitos significativos sobre o $VO_{2máx}$ como resultado de treinamento.

Não houve influência sobre a atividade das células NK, em 30 mulheres jovens escolhidas para um programa de 12 semanas de caminhada. (NIEMAN *et. al.*, 1997).Entretanto, em contraste, a atividade das células NK em mulheres foi aumentada após 16 semanas de treinamento em esteira. (CRIST *et. al.*, 1989). Em outro estudo, após 15 semanas de caminhada houve aumento da atividade das células NK em mulheres moderadamente obesas. (NIEMAN *et. al.*, 1990). Quando 18 pacientes, com artrite reumatóide, realizaram 8 semanas de ciclismo, este tipo de exercício teve pouco efeito sobre a atividade das células NK, resposta proliferativa dos linfócitos, concentração ou proporção da subpopulação de linfócitos e produção de citocinas. (RASUND *et. al.*, 1993)

2.12 ESTUDOS LONGITUDINAIS EM ANIMAIS

A influência do exercício crônico em 9 semanas de treinamento sobre a citotoxicidade natural foi investigada em ratos C3H (MacNEIL & HOFFMAN-GOETZ, 1993). Tanto a citotoxicidade in vivo (vascularização pulmonar) e citotoxicidade in vitro após corrida voluntária e forçada (corrida na esteira, 15m/min, 30min/dia) foram estudadas. O grupo controle sedentário e o grupo controle da esteira (5m/min, 5 min/dia) foram incluídos. Exercício crônico voluntário e forçado aumentou a atividade citotóxica in vivo e in vitro, mas citotoxicidade elevada não foi encontrada nos outros grupos controle. Alguns estudos usando protocolos de treinamentos de volume e

intensidade e espécies diferentes de animais dão suporte aos achados de que as concentrações de citotoxicidade estão aumentadas após exercício voluntário. (HOFFMAN-GOETZ *et. al.*, 1992)

2.13 EXERCÍCIOS E INFECÇÕES

Não há dúvidas que o exercício e treinamento influenciam na imunocompetência das células sanguíneas, na distribuição proporcional das subpopulações de linfócitos e nas funções de outras células. Uma importante questão é se as concentrações de mudanças destas células são clinicamente significativas, especialmente com respeito à resistência de doenças infecciosas.

2.14 INFECÇÕES DO TRATO AÉREO SUPERIOR

Muitas revisões foram realizadas na década passada relacionando exercício e infecção (CANNON, 1993). Em 1922 foi demonstrado que 80% de porcos (n=12/15) morreram após a exposição de pneumococos tipo 1, entretanto animais que realizaram exercício antes de inoculação demonstraram somente 20% de fatalidade (n=3/15). Em contraste, exercício de natação durante período de incubação de toxoplasma demonstrou que não ocorreram alterações significativas da doença em ratos (CHAO *et. al.*, 1992).

Ratos treinados e saudáveis que receberam injeções com “salmonella typhimurium” tiveram alta porcentagem de sobrevivência quando comparados com ratos sedentários, o que foi correlacionado com o aumento das concentrações de IL-1 (CANNON & KLUGER, 1984). Houve uma taxa de mortalidade menor nos ratos treinados que foram infectados com vírus (ILBACK *et. al.*, 1984). Em um programa de treinamento de 4 semanas de natação que foram sendo aumentados gradativamente em ratos com pneumococos, ocorreu uma proteção a mortalidade e a resposta catabólica foi menor (ILBACK *et. al.*, 1991). Estudos experimentais demonstram que os efeitos estressantes do exercício sobre a mortalidade da doença variam com o tipo e o tempo. Em geral, exercícios ou treinamento antes da infecção não causam efeito sobre a mortalidade da doença. Em contraste com a evidência experimental há estudos epidemiológicos sobre exercício e ITRS. Esses estudos são baseados nos sintomas e verificações clínicas. Em geral, ocorre aumento do número

de ITRS após dias de exercício extenuante, como por exemplo, uma corrida de maratona, contudo o treinamento moderado reduz os sintomas.

2.15 ATIVIDADE FÍSICA DE LONGA DURAÇÃO E O SISTEMA IMUNITÁRIO

A relação entre exercício intenso, imunidade e infecção foi estudada pela primeira vez em 1901 por Larrabee (LARRABEE, 1902). Quatro atletas apresentaram aumento na quantidade de neutrófilos circulantes. Larrabee notou que esta mudança nas células sanguíneas estava associada à doenças inflamatórias. Trinta anos mais tarde, Baetjer estudando exercício e infecção demonstrou que “fadiga muscular, baixa resistência e doenças infecciosas, principalmente do trato respiratório, acometiam esses atletas”. (BAETJER, 1932).

A resposta do sistema imunitário ao exercício intenso (> 70% do VO_2 máx.) e prolongado (> 90 min.) recebeu mais atenção após a publicação de estudos epidemiológicos sugerindo aumento de infecção no trato respiratório superior (ITRS) durante uma ou duas semanas após corridas de maratona e ultramaratona (NIEMAN, 1996). Também, dependendo da patogenia, estudos em animais têm corroborado o achado de que um ou dois períodos de exercício exaustivo, após inoculação de agente patogênico, leva ao aparecimento freqüente de infecção e alta mortalidade em ratos (CHAO *et al.*, 1992). Várias medidas da capacidade de performance física estão reduzidas durante o período de infecção (SHARP, 1989). Alguns estudos sugerem que a resposta do sistema imunitário inato é diferente no exercício intenso, com tendência a aumentar a ativação das células Natural Killer, enquanto é suprimida a função dos neutrófilos (NIEMAN *et al.*, 1995). A modulação do sistema imunitário (equilíbrio), em geral, parece que não é afetado pelo esforço atlético. Entretanto, pesquisas são necessárias com grande grupo de atletas e não atleta para permitir comparação mais precisa do comportamento do sistema imunitário em cada grupo.

Alguns estudos têm apontado para o efeito do treinamento intensivo crônico sobre a função imunitária em repouso. Alguns autores têm defendido que exercícios de resistência cardiorrespiratório prolongado levam a transformações na imunidade e no “exército” de defesa, corroborando a racionalidade entre o fisiológico e o epidemiológico (NIEMAN, PEDERSEN *et al.*, 1995). Outros estudos relatam que as células NK, várias funções das células B e T, função dos neutrófilos nas vias aéreas

superiores e a concentração de imunoglobulina A (Ig A), sofrem supressão algumas horas durante a recuperação prolongada. Durante esse intervalo de tempo, aumenta-se o risco de infecção clínica, pela diminuição da atividade do “exército” de proteção. (HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1994)

2.16 N-3, SISTEMA IMUNITÁRIO E A ATIVIDADE FÍSICA DE LONGA DURAÇÃO

Em 1987 o efeito de IRTS foi investigado em 2.311 maratonistas (NIEMAN *et al.*, 1990). Na semana seguinte a maratona, 12,9% contraíram doenças comparados à apenas 2,2% de atletas não competitivos. Corredores que treinaram acima de 96 Km/semana dobraram os casos de doenças comparados aos que treinaram abaixo de 32 Km/semana. Isto sugeriu que exercício regular e moderado diminui a suscetibilidade à infecção em indivíduos que treinam com carga menor, mas em indivíduos que treinam exaustiva ou intensamente, existe maior risco à infecções (CASTELL, 2002).

Exercício está associado com alteração na quantidade de leucócitos. Após 2h30 a 3h de corrida intensa há aumento na quantidade de leucócitos, atingindo o pico aproximadamente 3h após a corrida e retornando ao normal no dia seguinte. A quantidade de granulócitos aumenta fortemente (250%) acompanhada de monócitos (60%) enquanto linfócitos emergem do compartimento sanguíneo (40%). Há decréscimo nos linfócitos por pelo menos 6hs, representados por células T e NK, mas não de células B. É interessante que duas células do sistema imunitário inato tem modificação na sua quantidade quando se executa exercício intenso.

Neutrófilos e monócitos são a primeira linha de defesa para eliminar agentes infecciosos e são responsáveis pela resposta inflamatória do tecido muscular (EVANS & CANNON, 1991). Alguns estudos têm sido conduzidos para definir a resposta dessas células fagocitárias, especialmente às dos monócitos, decorrente do exercício intenso e prolongado (ORTEGA, 1994). Monócitos e neutrófilos invadem a área inflamada e realizam a fagocitose. O estresse e a sobrecarga reduzem a capacidade dos neutrófilos em oxidar esses agentes infecciosos (PYNE, 1994).

Ácidos graxos n-3 e exercício físico têm a habilidade de modular a resposta imunitária, nós não encontramos na literatura trabalho algum que investigasse o perfil imunitário de macrófagos, neutrófilos e linfócitos, em indivíduos exercitados e

suplementados com óleo de peixe, nós, portanto, estudaremos o efeito desta associação.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO/AMOSTRA

Todos os estudos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas protocolo número 129 (Processo 29397/05-11)

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram mantidos no biotério, em gaiolas coletivas em número de cinco, em ambiente claro/escuro (12h/12h), com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ração e água *ad libitum*.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos em 04 grupos de 10 animais, sendo dois deles suplementados com ácido graxo, diariamente, desde o desmame até atingirem 70 dias. Os outros dois receberam ração normal.

Os grupos foram assim denominados: (C) – ratos não treinados sem suplementação; (N-3) – ratos não treinados com suplementação; (TRE) – ratos treinados sem suplementação; (TRE N-3) – ratos submetidos ao treinamento com suplementação.

3.3 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS

Os animais dos grupos TRE e TRE N-3 foram submetidos ao treinamento de natação, em água aquecida a 32°C . A natação tem sido utilizada como modelo de exercício físico por vários grupos de pesquisa. Esta modalidade de exercício apresenta pelo menos dois tipos de estresse: um caracterizado pelo próprio exercício físico e outro pela necessidade de sobreviver na água, muito embora a natação constitua uma condição de solicitação física que freqüentemente aparece para animais de vida livre (VIEIRA, HAEBISH H & KOKUBUN, 1998). O sistema de natação é constituído de 10 tubos de PVC de 48 cm de profundidade por 24 cm de diâmetro (FIGURA 01), ligados por meio de mangueiras a um tubo central, que contém uma resistência em serpentina para aquecimento da água. A água aquecida

circula para dentro das piscinas mantendo a temperatura por todo o período de treinamento. Dentro de cada piscina foi adaptado outro tubo de profundidade de 55 cm e diâmetro de 23 cm, no qual foi perfurado todo o fundo de maneira a formar uma peneira. (VIEIRA, HAEBISH H & KOKUBUN, 1998).



FIGURA 04 - Piscina de Treinamento

3.3.1 Programa de Treinamento

Os animais dos grupos TRE e TRE N-3 foram submetidos a treinamento diário (2ª a 6ª feira) e nas quartas-feiras os animais descansaram. O treinamento começou com a duração de 30 minutos na primeira semana, até chegar a uma hora e meia de

treinamento, sem intervalo; durante 6 semanas (a primeira semana foi realizado sem sobrecarga, para adaptação ao meio aquático). A sobrecarga de treinamento foi de chumbo, com 5% (aproximadamente 70% do VO_2 máx.) do peso corporal do animal (KOKUBUN, 1990).

ESQUEMA DE TREINAMENTO (PROTOCOLO)

1ª Semana	2ª/3ª Semana	4ª Semana	5ª/6ª Semana
Os grupos TRE e TRE N-3, treinaram sem sobrecarga para adaptação ao meio líquido, de 30 min a uma hora.	Os grupos TRE e TRE N-3 treinaram 1 hora com 2% do peso na 2ª semana e 3% do peso na 3ª semana.	Os grupos TRE e TRE N-3 treinaram uma hora com 4% do peso corporal	Os grupos TRE e TRE N-3 treinaram 1h30min com 5% de peso corporal
Os grupos TRE N-3 e N-3 receberam suplementação de n-3 (1g/Kg).	Os grupos TRE N-3 e N-3 receberam suplementação de n-3 (1g/Kg).	Os grupos TRE N-3 e N-3 receberam suplementação de n-3 (1g/Kg).	Três dias após o teste de exaustão, os animais foram ortotanaziados e o sangue coletado.

3.3.2 Sobrecargas de Chumbo

A carga utilizada foi confeccionada com bolinhas de chumbo após pesagem dos animais. Sempre que havia variação de peso, a carga era reajustada. O chumbo foi armazenado em bolsinhas feitas com esparadrapo e presas ao corpo do animal por meio de um elástico de 3 cm de espessura. No elástico havia um velcro costurado para facilitar a colocação da carga no rato.

3.3.3 Suplementação com n-3

Os ratos dos grupos N-3 e TRE N-3 foram suplementados oralmente, utilizando-se de pipeta, com óleo de peixe na dose de 1 g/kg p.c. desde desmame (21dias) até um dia antes do sacrifício. O óleo de peixe foi obtido de uma preparação

de lípides marinhos (cápsula de 1g de NATURALLIS - com 192,40 mg de ácido eicosapentaenóico-EPA e 124,10 mg de ácido docosahexaenóico-DHA);

3.3.4 Controle de Peso dos Animais

Os ratos foram pesados todos os dias, sempre no mesmo horário, para que fossem reajustadas as sobrecargas e a suplementação.

3.3.5 Ortotanásia dos Animais

Os ratos foram exsanguinados por meio de decapitação, com o auxílio de uma guilhotina, três dias após o último dia de treinamento. O sangue foi coletado para análise.

3.3.6 Obtenção de Macrófagos

Para obtenção de macrófagos peritoneais, os animais pós-ortotanásia tiveram sua pele removida da região abdominal, e 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS – estéril), pH 7,4, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido contendo as células foi aspirado com o auxílio de pipeta estéril de plástico, tipo Pasteur. Em seguida, estas células foram submetidas a centrifugação (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em 3 mL de PBS, para posterior análise de parâmetros imunitários.

3.3.7 – Obtenção de Células Polimorfonucleares Sanguíneas

3.3.7.1 - Coleta e separação de células sanguíneas

O sangue dos indivíduos foi coletado em tubos de ensaio previamente heparinizados e, mantidas sob refrigeração. Após a coleta, o sangue foi submetido ao seguinte protocolo:

1. Centrifugar o sangue no próprio tubo de coleta a 1200 rpm por 10 minutos a

- 4°C;
2. Aliquotar o plasma;
3. Transferir o restante para um tubo falcon de 50 mL;
4. Colocar o mesmo volume de PBS;
5. Preparar os tubos de vidro (15 mL) com 3 mL de HISTOPAQUE[®]-1077;
6. Acrescentar 8 mL de sangue diluído com PBS em cima do HISTOPAQUE[®]- 1077;
7. Tampar com parafilm;
8. Centrifugar a 1200 rpm durante 30 minutos a 12°C;
9. Desprezar a fase superior e transferir a camada intermediária para outro tubo – juntar duas camadas intermediárias em cada tubo (volume 2 mL) – **Linfócitos e Monócitos**; A camada constituída de hemácias e células polimorfonucleares é transferida para um falcon de 50 mL.

Polimorfonucleares

1. Transferir o sedimento de células para 2 tubos Falcon de 50 mL;
2. Completar o volume de 50 mL com Solução hemolítica;
3. Deixar em banho-maria a 37°C por 15 minutos;
4. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C;
5. Desprezar o sobrenadante, se necessário fazer nova lise de hemácias;
6. Ressuspender as células em PBS;
7. Contar em Câmara de Neubauer;
8. Submeter os polimorfonucleares aos experimentos.

Depois de isoladas as células polimorfonucleares, representada em sua maioria pelos neutrófilos que constituem 60% dos leucócitos circulantes (CURI et al., 1998), foram submetidas aos mesmos protocolos dos macrófagos.

3.3.8 Soluções

Os reagentes usados na preparação das soluções foram obtidos da Reagen (Quimibrás Indústria Química Ltda, RJ). Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado será o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consiste de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em

água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro (Sigma) foi preparada pela solubilização de 20 mg de corante em 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e a solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 20 µL da solução estoque em 5 mL de PBS. A solução de vermelho fenol (Sigma) para os ensaios de produção de H₂O₂ consistiu de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/mL peroxidase “horseradish” (Sigma) em PBS pH 7,4 a 340 mOsm. Foi também previamente adicionado 0,05% de zimosan (2,3 x 10⁸ partículas/mL - Sigma), para os ensaios de fagocitose, obtendo-se uma solução diluindo-se 40 mg de zimosan em 6 mL de PBS e adicionou-se 600 µL de vermelho neutro.

3.3.9 Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por PICK & MIZEL (1981). Através da oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H₂O₂. Alíquotas de 100 µL de solução de macrófagos e 10 µL de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 µM) foram colocadas em placas de ELISA. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os pocinhos receberam 100 µL da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zimosan. Em seguida os macrófagos foram incubados por mais 30 minutos e após o término deste tempo foi executada a leitura a 620 nm em espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os resultados foram determinados a partir de uma curva e, expressos em µmol/mg de proteínas.

3.3.10 Mensuração do Ânion Superóxido

A geração de ânion superóxido foi determinada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT – Sigma), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI & DAS, 1994). Os macrófagos (450 µL) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 30 µL de PMA (80 µM) em PBS a 37 °C. Esta reação foi intdesviompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30

segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 900 μ L de ácido acético a 50% e sonificado (1 pulso de 30"). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000). Os dados estão expressos em % de ânion superóxido por mg de proteína.

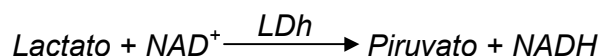
3.3.11 Quantificação do Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico foi avaliada como descrito por STUEHR & MARLETTA (1985). O óxido nítrico (NO) formado é rapidamente convertido a nitrito/nitrato. Por este método quantifica-se NO mensurando-se o nitrito/nitrato, utilizando o reagente de Griess que, ao reagir com o nitrito, produz cor lilás com leitura a 550 nm. Para esta dosagem, os macrófagos foram coletados assepticamente, centrifugados e ressuspensos em meio RPMI-1640, ajustando-se para a concentração adequada de 2×10^5 células/poços para placas de 96 poços. Após semear, foi deixado os macrófagos a aderirem por 2 horas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após a aderência, a placa foi lavada duas vezes com PBS e adicionado a mesma meio RPMI com soro fetal bovino (10%) e, posterior incubação por 24 h, nas condições gasosas citadas acima. Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante recolhido e misturado com o reagente de Griess (1:2). Para o preparo deste reagente, foram utilizadas soluções estoques de cloreto de naftiletlenodiamina (0,1%) dissolvido em água MiliQ e de sulfanilamida a 1% dissolvida em H₃PO₄ (5%). Pouco antes do uso, as soluções foram misturadas na proporção 1:1, formando o reagente de Griess propriamente dito. A padronização da dosagem do óxido nítrico foi feita preparando-se uma curva de NaNO₃. Estas soluções foram misturadas a 100 μ L do reagente de Griess. Após, as amostras foram lidas em leitor de microplacas (Bench Mark – Biorad) a 550 nm. Por este procedimento, foi estabelecida uma curva de calibração para a dosagem do óxido nítrico, com concentrações de 10 μ M até 200 μ M.

3.3.12 Mensuração de Lactato

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE & JONES (1978). Inicialmente fez-se a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura é agitada em um vórtex, centrifugado por 1 minuto a 13.00 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Em seguida, foram coletadas 200 µL do sobrenadante e adicionou-se 4 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TIRS (0,5 M/2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Deste volume neutralizado pipetou-se 100 µL em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão do ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm (Pharmacia 4300 Pro).

O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação do lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD^+ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existentes na amostra. Segundo a reação:



A partir da medida da absorbância calculou-se a concentração de lactato sérico em µmol/mL, pela fórmula:

$$[Lactato] = \frac{Abs}{6,22} \times \frac{V_1}{V} \times \frac{V_2}{V_3} \times \frac{V_4}{V_5}$$

[Lactato] = concentração de lactato produzido

Abs = absorbância

6,22 = constante

V = volume da amostra

V_1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V_2 = volume do soro + TCA

V_3 = volume do soro com proteínas

V_4 = volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

V_5 = volume do soro desproteinizado

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média e foram submetidos à ANOVA de duas vias, seguido de pós teste de Tukey, com nível de significância para $P < 0,05$.

4.0 RESULTADOS

4.1 VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Na FIGURA 05 está representada a variação de peso no transcorrer do período de desmame até o sacrifício dos animais. Não foi observada diferença na evolução da massa corpórea entre os grupos durante este período.

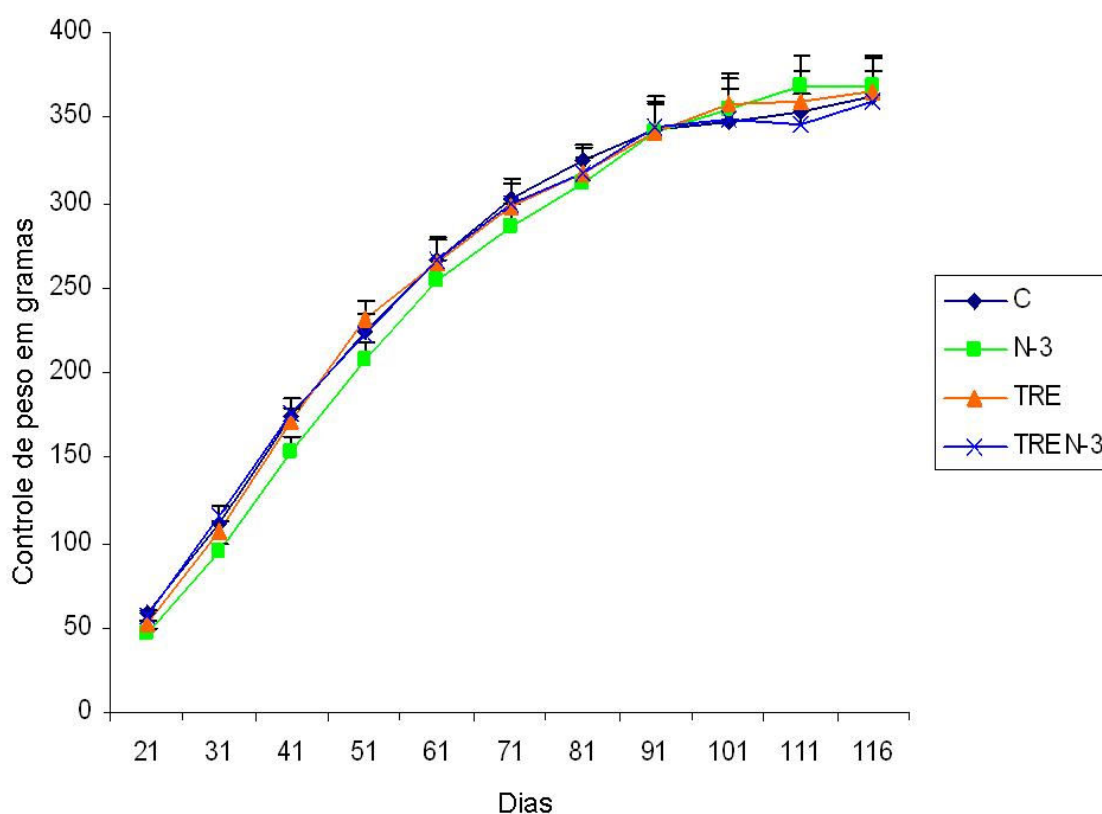


FIGURA 05 – Evolução do peso corpóreo obtidos nos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário Suplementado (N-3), do grupo Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

4.2 LATICIDEMIA

A concentração sérica de lactato (FIGURA 06), 3 dias após o encerramento da atividade física não foi significativamente diferente entre os grupos, indicando estado de repouso.

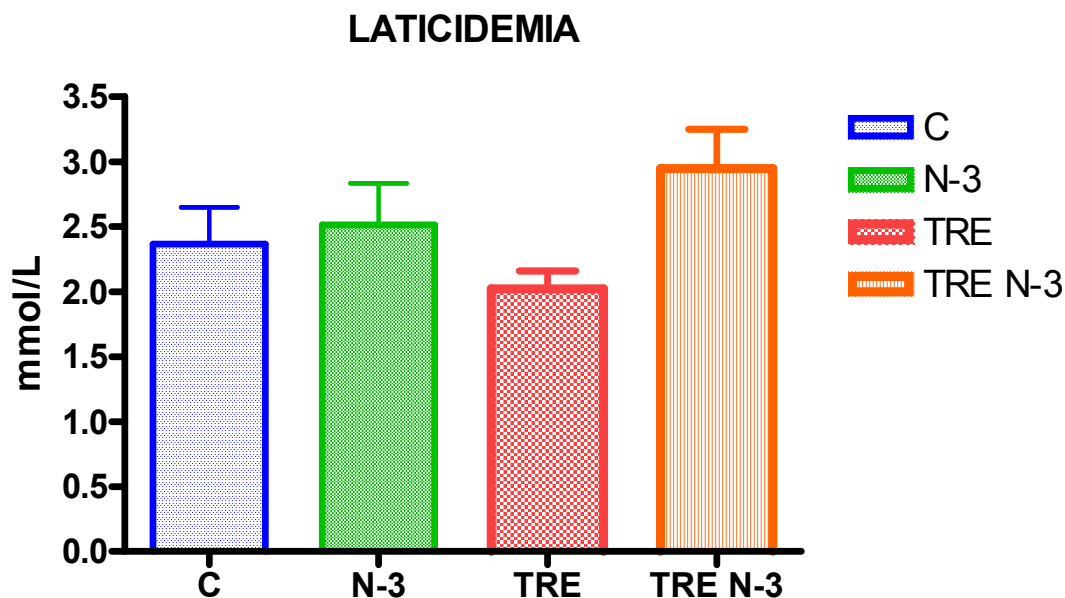


FIGURA 06 – Concentração de lactato sérico (mmol/L) dos animais não foi alterada dos grupos, Sedentário Suplementado (N-3), do grupo Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3), quando comparada ao grupo C ($p > 0,05$). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINFÓCITOS

Na FIGURA 07 está representada a proliferação de linfócitos obtidos dos linfonodos mesentéricos. Na ausência de estímulo a taxa de proliferação (cpm) no grupo controle foi de $101,8 \pm 15,83$, no grupo N-3 de $559,5 \pm 47,53$, no TRE de $508,7 \pm 74,99$ e no de TRE N-3 de $118,2 \pm 8,87$. Os grupos N-3 e TRE tiveram taxa de proliferação basal ao redor de cinco vezes maior quando comparada à dos grupos C e TRE N-3 ($P < 0,001$). Na presença do mitógeno Con-A (estimulador de linfócitos T), no grupo C houve uma elevação na taxa de proliferação de 45,5 vezes,

no N-3 de 9,6 vezes, no TRE de 8,2 vezes e no TRE N-3 de 51,7 vezes, todas altamente significativas quando comparadas aos seus respectivos controles na ausência de estímulo. Na presença do mitógeno LPS (estimulador de linfócitos B) a taxa de proliferação dos linfócitos do grupo C foi de $132,3 \pm 17,25$ a qual não foi diferente daquela observada na ausência de estímulo ($P > 0,05$). Já no grupo N-3 esta foi de $1785 \pm 193,1$, a qual foi 3,2 vezes maior quando comparada à ausência de estímulo ($P < 0,01$). No TRE foi de $1308 \pm 73,4$ que foi 2,6 vezes maior que na ausência de estímulo ($P < 0,01$) e finalmente à do grupo TRE N-3 foi de $345 \pm 57,12$ a qual elevou-se em 3 vezes quando comparada à ausência de estímulo ($P < 0,01$). A presença do mitógeno Con-A não promoveu alteração da resposta proliferativa entre os grupos C e N-3 ($P > 0,05$), contudo à do LPS sim ($P < 0,01$). O mesmo foi observado quando compara-se o grupo treinado não suplementado (TRE) com o grupo C ($P < 0,01$). A combinação do treinamento com a suplementação (TRE N-3) elevou a proliferação linfocitária quando compara-se à dos grupos C e TRE ($P < 0,01$) mas não foi diferente a do grupo sedentário suplementado com óleo de peixe ($P > 0,05$). O estimulante LPS promoveu maior proliferação linfocitária no grupo N-3 ($P < 0,01$ vs todos). O exercício (TRE) promoveu proliferação maior que à do controle ($P < 0,01$) e a associação da suplementação não teve efeito aditivo

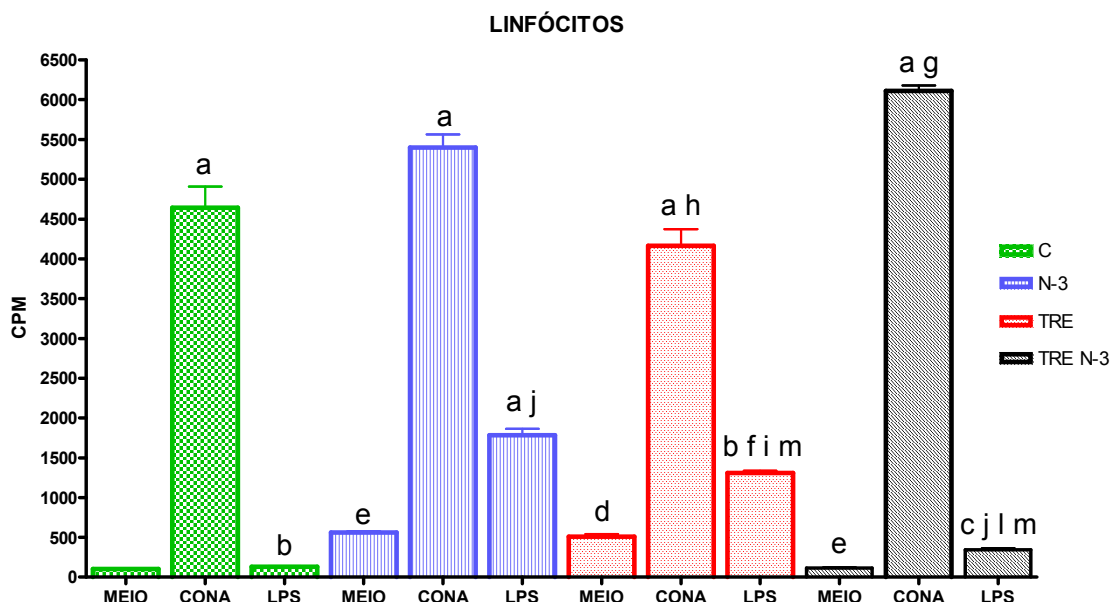


FIGURA 07 – Proliferação de linfócitos obtidos nos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário Suplementado (N-3), Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

- a - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao meio do seu grupo;
- b - Diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado ao meio do seu grupo;
- c - Diferença significativa ($P < 0,01$) quando comparado ao meio do seu grupo;
- d - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo C;
- e - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo TRE;
- f - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo TRE N-3;
- g - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo C e TRE;
- h - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo N-3;
- i - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo C;
- j - Diferença significativa ($P < 0,01$) quando comparado ao grupo C;
- l - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo N-3;
- m - Diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo TRE;

5.0 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROS)

5.1 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS

A produção de óxido nítrico ($\mu\text{mol/L}$) pelos macrófagos peritoneais está apresentado na FIGURA 08. Na ausência de estímulo, a produção de óxido nítrico (NO) no grupo controle (C) foi de $13,24 \pm 1,38$ e de $9,98 \pm 1,1$ no TRE ($P < 0,01$ vs C). No grupo N-3 foi de $12,07 \pm 1,35$ e no TRE N-3 foi de $11,55 \pm 2,11$ ($P > 0,05$). A suplementação com óleo de peixe (N-3) reduziu significativamente a produção basal de NO ($P < 0,01$ vs C). A adição de LPS ao meio de cultivo elevou significativamente a produção de NO quando comparado ao seu respectivo grupo sem estímulo. No grupo C o aumento foi de 1,4 vezes, no N-3 de 1,5 vezes, no grupo TRE de 2 vezes e no TRE N-3 de 1,2 vezes. Apenas no grupo suplementado com óleo de peixe exercitado, a produção de NO foi significativamente menor quando comparada à dos demais grupos sem a estimulação do LPS ($P < 0,01$).

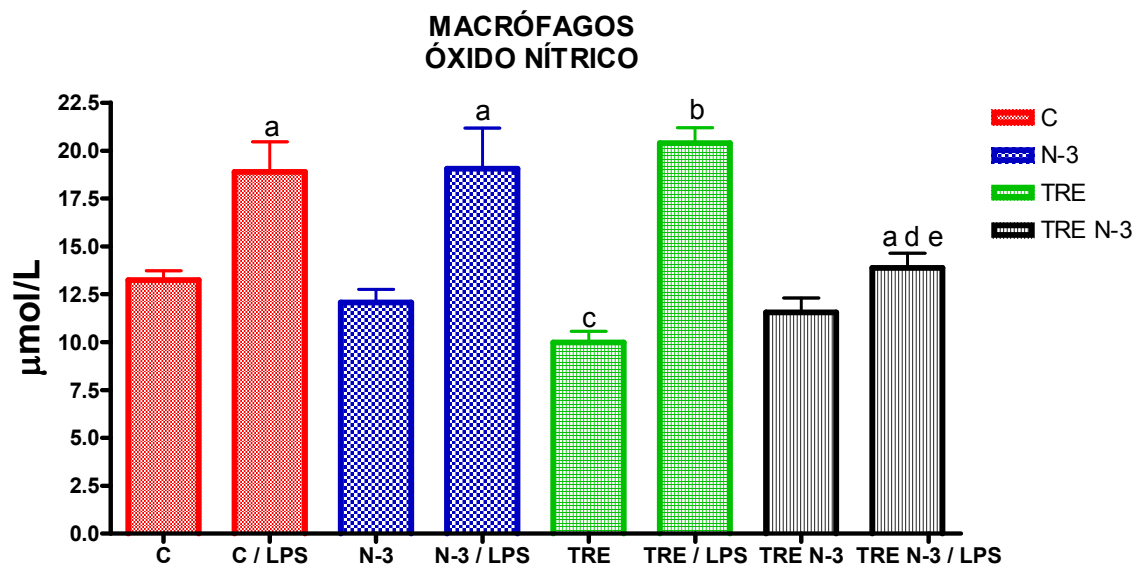


FIGURA 08 – Produção de óxido nítrico por macrófagos obtidos nos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário Suplementado (N-3), Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

- a) Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao seu grupo sem LPS;
- b) Diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparado ao seu grupo sem LPS;
- c) Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo C;
- d) Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo C/LPS;
- e) Diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo TRE/LPS.

5.2 PRODUÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS

A produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais estão apresentados na FIGURA 09. A suplementação com óleo de peixe (n-3) não modificou a produção de ânion superóxido ($p > 0,05$ vs. C). O treinamento (TRE) teve efeito estimulatório sobre a produção de ânion superóxido ($p < 0.01$ vs. todos). Interessantemente a associação do treinamento com a suplementação com óleo de peixe fez com que a produção retornasse aos valores do controle.

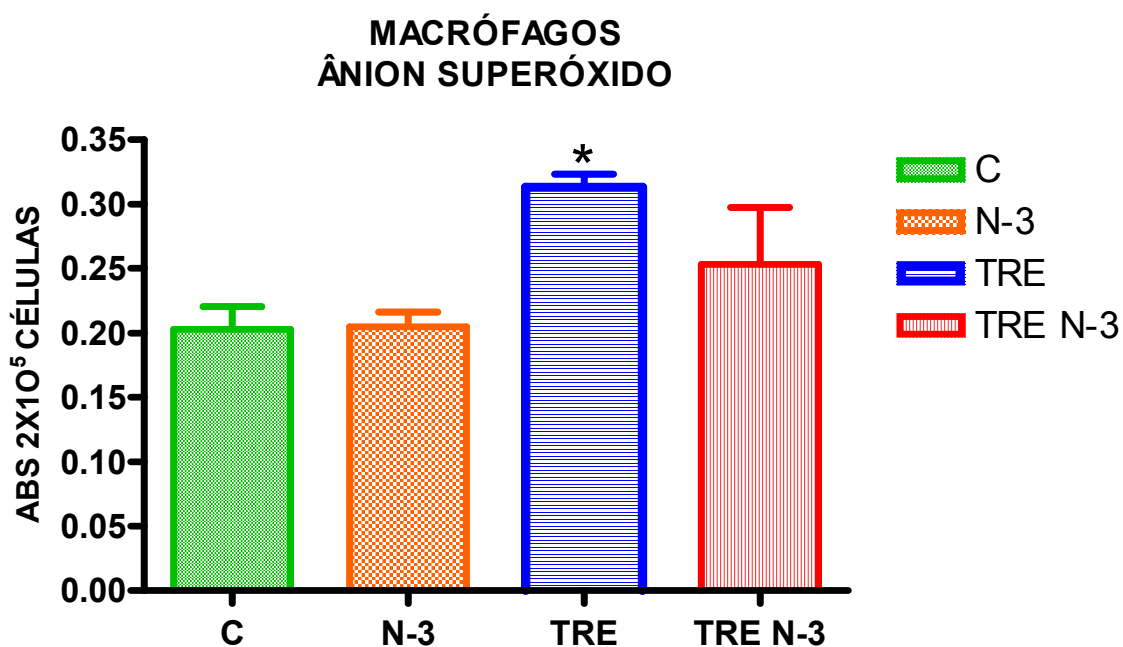


FIGURA 09 – Produção de Anion Superóxido pelos macrófagos peritoneais dos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário Suplementado (N-3), Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

* ($p < 0,05$, vs C e N-3)

5.3 PRODUÇÃO DE ANION SUPERÓXIDO POR NEUTRÓFILOS

A suplementação com óleo de peixe (N-3) não alterou a produção de ânion superóxido pelos neutrófilos (FIGURA 10) quando comparada à do grupo C ($p > 0,05$). Os animais submetidos à treinamento e suplementados com óleo de peixe ou não (TRE e TRE N-3) tiveram a produção de ânion superóxido reduzido pelos seus neutrófilos quando comparado à dos animais sedentários, suplementados ou não (N-3 e C) ($p < 0,05$).

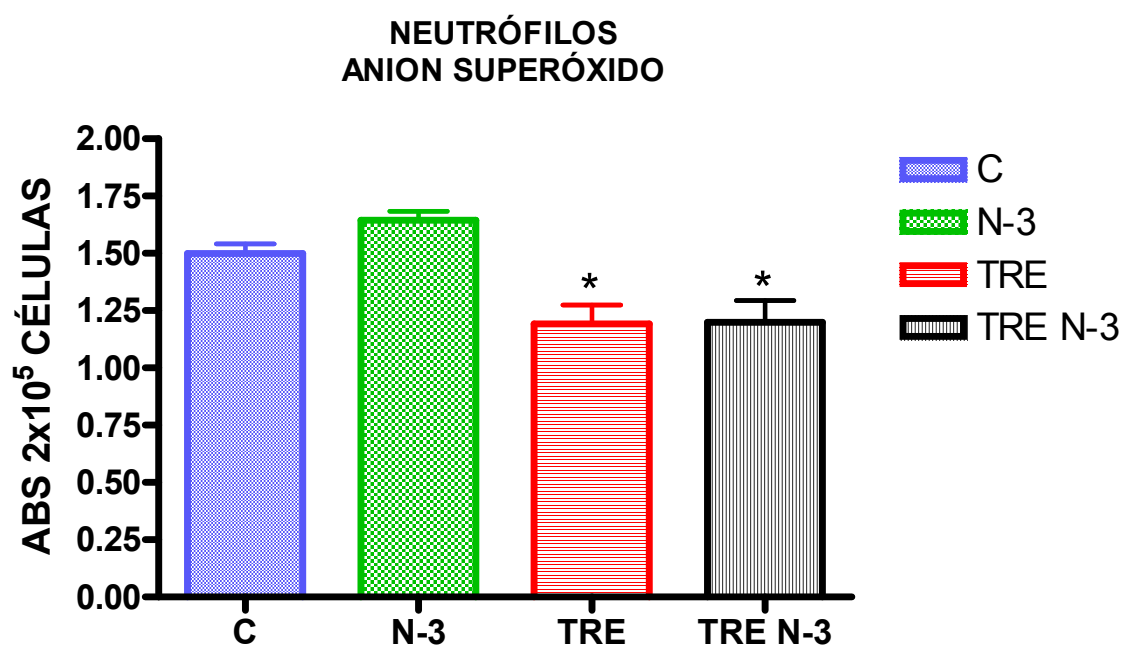


FIGURA 10 - Produção de Anion Superóxido de Neutrófilos obtidos nos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário suplementado com N-3 (N-3), do grupo Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado com N-3 (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

* ($p < 0,05$ vs C e N-3)

5.4 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) POR MACRÓFAGOS

A produção de H₂O₂ pelos macrófagos peritoneais (FIGURA 11) não foi afetada pela suplementação com o óleo de peixe (N-3), exercício (TRE) ou a combinação de ambos (TRE N-3) quando comparado à do grupo C (P > 0,05)

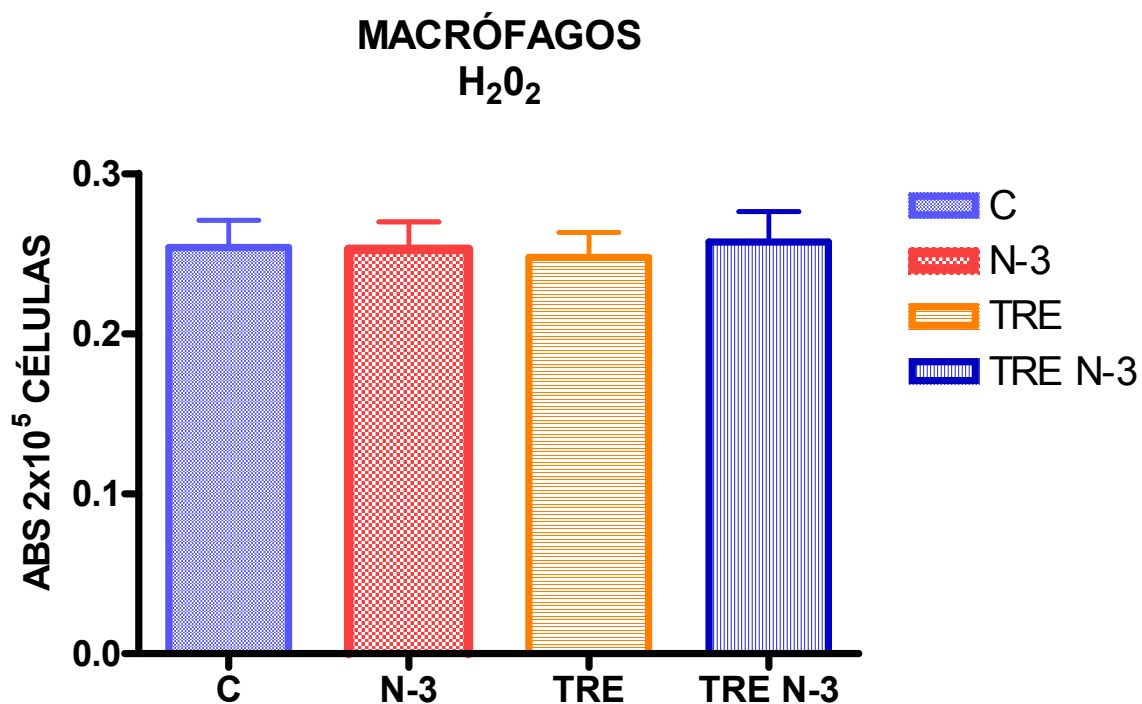


FIGURA 11 - Produção de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) pelos Macrófagos peritoneais obtidos dos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário Suplementado (N-3), Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média ± DPM de 08 indivíduos por grupo.

5.5 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO POR NEUTRÓFILOS

Da mesma forma que a observado nos macrófagos peritoneais, os neutrófilos também não tiveram a produção de H_2O_2 alterado (FIGURA 12) seja pela suplementação (N-3), exercício (TRE) ou combinação de ambos (TRE N-3) quando comparado à do C ($p > 0,05$).

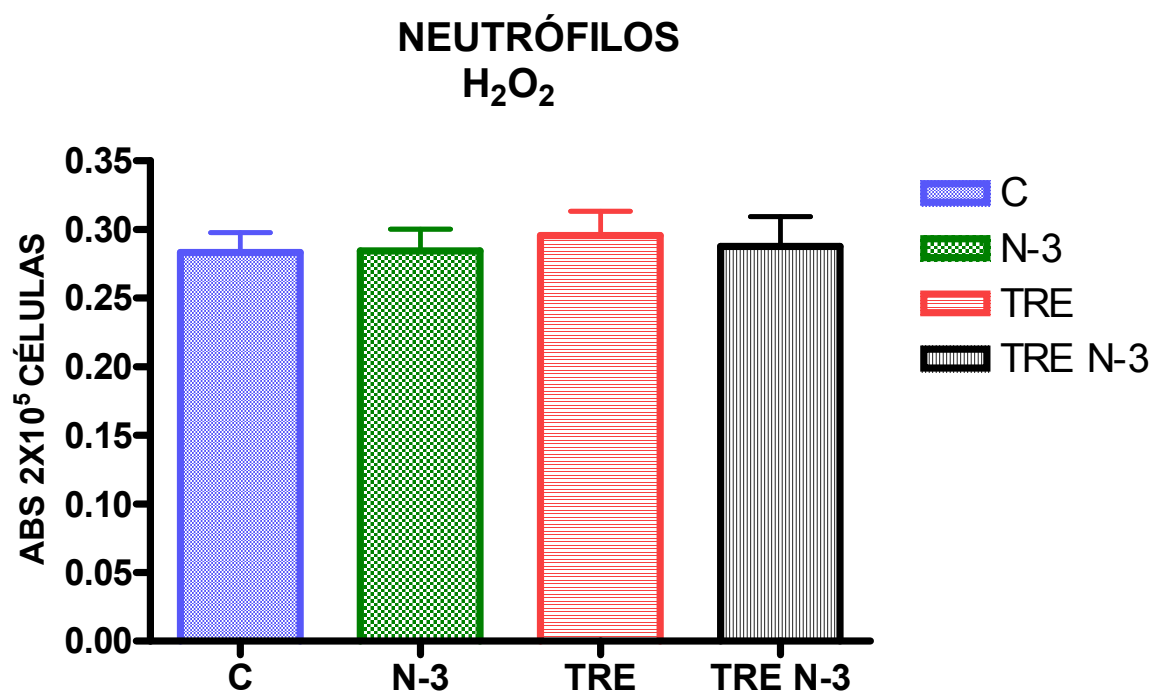


FIGURA 12 - Produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) por neutrófilos obtidos nos indivíduos dos grupos Controle (C), Sedentário Suplementado (N-3), Treinamento (TRE) e do grupo Treinamento Suplementado (TRE N-3). Os dados estão apresentados como média \pm DPM de 08 indivíduos por grupo.

6.0 DISCUSSÃO

Diferentes estímulos promovem alterações na quantidade e na função das células do sistema imunitário. O exercício ocasiona desequilíbrio na homeostase orgânica, levando à reorganização da resposta de diversos sistemas, entre eles o sistema imunitário. O status nutricional e metabólico também alteram este quadro em que os ácidos graxos, sejam saturados ou insaturados, modificam a dinâmica da funcionalidade das células de defesa. (CALDER, *et. al.*, 2002) e (POMPÉIA, *et. al.*, 2000). A alta incidência de doença em atletas de elite, em especial as do trato respiratório superior ainda não tem conhecida os seus mecanismos, contudo tem sido aventado: altas taxas de fluxo aéreo que alteram a superfície da mucosa; infiltração de células inflamatórias no interior da mucosa; supressão de uma ou mais funções do sistema imunitário; depleção de fator(es) necessário(s) pelo sistema imunitário e, estresse psicológico. Atletas e treinadores tem relatado que atletas que praticam exercício de alta intensidade e atletas de competição, têm aumento de risco de infecções. Desse modo, tem havido grande interesse por estes e pelos médicos desportistas em prevenir ou limitar este risco.

A maioria dos trabalhos investigando exercício e imunidade foca sobre os efeitos do exercício sobre a capacidade do organismo em montar uma resposta imunológica. PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ (2000) demonstraram supressão da função dos linfócitos após o exercício extenuante. Este mesmo achado foi também demonstrado por NIEMAN (1997), que relatou que a quantidade de linfócitos só se normalizou 21 horas após a maratona. Contudo, todos estes dados foram obtidos em situações agudas do exercício, ou seja, imediatamente após a execução do exercício. Em nossa abordagem objetivamos contornar os efeitos das alterações agudas provocadas pelo exercício *per se* e decidimos estudar a função imunitária três (03) dias após o último dia de treinamento. Podemos demonstrar o retorno do status metabólico pela análise do lactato sérico (FIGURA 06), em que todos os animais tinham laticidemia similar à do grupo controle, portanto retornaram ao estado de repouso.

Atividade física tem papel imunomodulador onde atividade de leve a moderada é estimuladora e a intensa e de longa duração é imunossupressora (COSTA ROSA, WAISBERG, 2002, FITZGERALD 1988, NASH 1987, NIEMAN 2000). Nosso protocolo foi o de atividade física de 1h30min de duração e 70% do

$VO_{2\text{máx}}$ e, portanto com características imunossupressoras, agudamente. Óleo de peixe, rico em AGPI n-3 têm também a habilidade de modificar a resposta imunitária onde em doses elevadas é depressor da resposta e em leves para moderadas imunoestimulatória (CALDER, *et. al.*, 2002). Nós incrementamos a quantidade de gordura na dieta em apenas 0,1%, o que representou pequena alteração ao longo da vida (desmame até a fase adulta). A maioria dos trabalhos, investigando o papel dos ácidos graxos sobre a função imunitária, a faz a abordagem de dietas pobres ou ricas em AGPI n-3 por período que varia de 2 a 8 semanas (CALDER 1997, TOFT, *et. al.*, 2000). Nossa abordagem é única, pois não há relato na literatura sobre o efeito da administração de óleo de peixe, da infância até a fase adulta, na dose utilizada e seu efeito sobre o sistema de defesa de indivíduos exercitados.

Os linfócitos dos animais sedentários suplementados com óleo de peixe (1g/kg p.c.), interessante, apresentaram taxa de proliferação basal (FIGURA 04) cinco vezes maior quando comparada à do grupo sem suplementação (C). Isto mostra o efeito imunoestimulador do óleo de peixe na ausência de estímulo. Tal achado também foi demonstrado por TREBBLE *et. al.*, 2003; MIYASAKA *et. al.*, 2001; ROBINSON, CLANDININ & FIELD, 2001; YAQOUB, CALDER, 1995. O mesmo foi observado para o grupo submetido à atividade física (TRE). Curiosamente, a associação de treinamento e suplementação com óleo de peixe não tiveram efeito aditivo e sim o oposto, fazendo com que a proliferação basal não fosse diferente à do grupo controle. Este dado é difícil de interpretar, mas acreditamos ser necessário aumentar o número de animais para verificar se ele é reproduzível ou artefato de técnica.

É sabido que os linfócitos quando submetidos a estímulos adequados, mitógenos, por exemplo, são estimulados e passam a produzir interleucinas/citocinas e iniciam seu processo de proliferação celular (COSTA ROSA, WAISBERG, 2002, FITZGERALD 1988, NASH 1987, NIEMAN 2000). A adição do mitógeno concanavalina A, estimulador de linfócitos T, levou a proliferação dos linfócitos em todos os grupos, contudo a magnitude desta resposta foi diferente entre os grupos. Nos grupos que apresentaram proliferação basal elevada (N-3 e TRE), a presença do mitógeno elevou a taxa de proliferação em aproximadamente 9 vezes, enquanto que no C e TRE N-3 esta foi, em média, de 50 vezes. Isto demonstra que apesar da magnitude da resposta dos grupos N-3 e TRE ser ao redor de 5,5 vezes menor, a potência da resposta foi similar (FIGURA 07). Em outras palavras, não

houve necessidade de induzir à mesma potência de resposta, pois basalmente ela já se encontrava elevada. Na presença do LPS, estimulador de linfócitos B, no grupo controle a proliferação de linfócitos foi similar àquela encontrada em situação não estimulada. Por outro lado, a suplementação com óleo de peixe promoveu, no grupo sedentário, elevação de 3,2 vezes. O mesmo foi observado para o grupo treinado (TRE, aumento de 2,6 vezes) e treinado suplementado com óleo de peixe (TRE N-3, aumento de 3 vezes). Da mesma forma que observamos para os linfócitos T, os B também foram estimulados pela suplementação ou o exercício, entretanto a associação de ambos não teve efeito aditivo. Esse resultado nos sugere que tanto a dieta quanto o exercício, provavelmente atuam pela mesma via para modular o sistema imunitário.

A utilização do oxigênio se tornou fundamental no desenvolvimento de organismos mais complexos, a demanda de energia aumentou mais de dez vezes através da via aeróbica. Apesar de ser uma necessidade vital, isto trouxe um efeito indesejável. A molécula de oxigênio, além de atuar como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial (VOET, VOET & PRATT, 2001), pode ainda originar espécies químicas capazes de reagir com as demais biomoléculas, principalmente proteínas e fosfolípidios, inativando-as e, assim, prejudicando o metabolismo intracelular. Essas substâncias originadas a partir do oxigênio são chamadas radicais livres. (COOPER *et al.*, 2002).

O Óxido Nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxico devido à presença de radical livre, que a torna muito reativa. Essa pequena molécula, talvez a menor produzida pelos mamíferos, é sintetizada por muitos tipos de células e, com várias funções, dentre elas imunomodulação, agente antimicrobiano, antiparasitário e antitumoral (VALENTINE, *et al.*, 1998; SCHINI-KERTH 1999; FLORA-FILHO & ZILBERSTAIN, 2000; ABEYWARDENA & HEAD, 2001; PAVLICK, *et al.*, 2002).

A produção basal de NO pelos macrófagos (FIGURA 08) não foi diferente entre os grupos, mas ao estímulo de LPS todos responderam significativamente. Contudo os animais do grupo treinado e suplementado (TRE N-3) a magnitude da resposta foi significativamente menor quando comparada à dos demais grupos. Macrófagos e neutrófilos desempenham importante papel na imunocompetência. Vários trabalhos têm investigado a resposta destas células alvo após o término do exercício ou até seis (06) horas após (NIEMAN, 2000). Nós, com o objetivo de

eliminar o efeito das influências hormonais, metabólicas e neurais, investigamos as funções imunitárias 72 horas depois. Isto levou a obtenção de dados que corroboram os da literatura, mesmo três (03) dias depois. Na realidade a associação de exercício e suplementação em nenhum momento teve efeito aditivo, seja em macrófagos ou neutrófilos. Outro dado interessante foi que estas células nem sempre responderam da mesma maneira. Por exemplo, enquanto em macrófagos peritoneais a produção de O_2^- foi elevada, nos animais exercitados estava reduzida ($p < 0,05$) quando comparada à do controle. No grupo exercitado e suplementado, os neutrófilos também tiveram produção reduzida, mas nos macrófagos foi similar à do controle, ou seja, o óleo de peixe, de alguma forma, impediu a resposta promovida pelo exercício. Por outro lado a produção de H_2O_2 não foi diferente entre os grupos, seja pela população de macrófagos ou de neutrófilos (FIGURAS 11 e 12).

Não houve aumento significativo na produção de NO nos animais sedentários e nos sedentários suplementados com óleo de peixe (CON e N-3). Os outros dois grupos, treinados e treinados e suplementados, (TRE e TRE N-3) apresentaram diferenças significativas entre si quando estimulados com LPS. Mesmo após três (03) dias de descanso, o grupo TRE apresentou diferença significativa ($P < 0,01$) quando comparado com TRE N-3. Isto pode sugerir que mesmo com descanso o grupo TRE está mais suscetível para produção de NO. Pode-se inferir que atletas que utilizam este protocolo terão estar mais sujeitos a ação das espécies reativas do oxigênio.

Em resumo, a produção de agentes citotóxicos, três dias após o término do exercício foram afetados diferentemente pelo exercício e exercício com suplementação de óleo de peixe (FIGURAS 09 e 10), onde esta atividade e a suplementação parecem modificar o sistema imunitário inato. Investigação da fagocitose e volume lisossomal devem ser realizadas para dar suporte a esta hipótese, bem como colocar estas células sob diferentes estímulos, como por exemplo tumores ou bactérias, e assim poderíamos com maior precisão sugerir qual o real impacto destas respostas sob as condições experimentais estabelecidas. Quanto aos linfócitos não observamos imunodepressão em nenhum grupo.

CONCLUSÃO

Óleo de peixe rico em AGPI n-3, administrado desde o desmame (21 dias) até um dia antes do sacrifício promoveu ativação do sistema imunitário via linfócitos, e o exercício físico também teve ação imunomoduladora. A associação da suplementação com o exercício não foi somatória ou potencializadora da resposta imunológica, indicando provavelmente, uma mesma via estimulatória para desencadear respostas de defesa observadas no presente protocolo experimental.

REFERÊNCIAS

ABEYWARDENA, M.Y.; HEAD, R.J. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. **Cardiovascular Res.** 52: 361-371, 2001.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J.D. **Biologia molecular e celular**, 3 ed., Artmed, Porto Alegre, 1997.

ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. **Nutrition.** 14: 627-633, 1988.

ARDAWI, M.S.M. ; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem. J.**, **212**: 835-42, 1993.

ASHERIO, A. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow-up study in the United States. **Br Med.**, 313:84-90, 1996.

BASLUND, B.; LYNGBERG, K.; ANDERSEN, V.; HALKJAER-KISTENSEN, J.; HANSEN, M.; KLOKKER, M.; PEDERSEN, B.K.; Effect of 8 wk of bicycle training on the immune system of patients with rheumatoid arthritis. **J Appl Physiol** **75**: 1691-1695, 1993.

BAETJER, A.M. The effect of muscular fatigue upon resistance. **Physiol Rev** **12**: 453-468, 1932.

BITTNER, S.B.; TUCKER, W.F.G.; CARTWRIGHT, I.; BLEEHEN, S.S. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. **Lancet** **i**:378-380, 1988.

BRINNES, R.; HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. Can you exercise to make your immune system fitter? **Immunol Today** **17**: 252-254, 1996.

BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T.L.; MACLEAN D.A; PEDERSEN, B.K. Exercise induced increase in interleukin 6 is related to muscle damage. **J Physiol** **499**: 833-841, 1997.

CALDER P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and Cytokine Production in Health and Disease. **Ann Nutr Metab.** 41:203-234, 1997.

CALDER, P.C. The effect of dietary fatty acids on the immune response and susceptibility to infection. **Nutrition, Immunity and Infection in Infants and Children.** 45: 137-172, 2001.

CALDER, P.C.; YAQOOB, P.; THIES, F.; WALLACE, F.A.; MILES, E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, S31-S48, 2002.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr rev.** **56**:S70-S83, 1998a.

CALDER, P.C. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. **Proc Nutr Soc.** **55**:127-150, 1996.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. **Medicinal Fatty Acids in Inflammation.** Edited by J. Kremer, 1998.

CANNON, JG. Exercise and resistance to infection. **J Appl Physiol** **74**: 973-981, 1993.

CANNON, J.G. ; KLUGER, M.J. Exercise enhances survival rate in mice infected with salmonella typhimurium. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **175**: 518-521, 1984.

CASTELL, L.M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged exhaustive exercise? **Nutrition.** 18: 371-375, 2002.

CHAO, C.C.; STRGAR, F.; TSANG, M. ; PETERSON, P.K. Effects of swimming exercise on the patogenesis of acute murine. **Clin. Immunol. Immuno pathol.** 62: 220-226, 1992.

COOPER, C.E.; VOLLAARD, N.B.J.; CHOUERI, T.; WILSON, M.T.; Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.** 30:280-285, 2002.

COOPER, A.L.; GIBBONS, L.; HORAN, M.A.; LITTLE, R.A.; ROTHWELL, N.J. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. **Clin Nutrition**, 12:321-328, 1993.

COSTA ROSA, L.F.P.B.; WAISBERG, M.W. Influências do Exercício na Resposta Imunitário. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte.** Vol 8 nº4, 2002.

CRIST, D.M.; MACKINNON, L.T.; THOMPSON, R.F.; ATTERBOM, H.A. ; ECAN, P.A. Physical exercise increases natural cellular-mediated tumor cytotoxicity in elderly women. **Gerontology** 35: 66-71, 1989.

CURI, R; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos.** Manole, São Paulo, 2002.

DAS, U.N. Beneficial effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine network. **Prostagl, Leukot and Essential Fatty Acids**, 51:207-213, 1994.

ENDRES, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V.E. The effects of dietary enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids on the síntesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **New Engl. J. Med.** 320: 265-71, 1989.

EVANS, W. J; CANNON, J.G. The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. **Exercise Sport Sci. Rev.** 19: 99-125, 1991.

EVANS, W.J.; MEREDITH, C.N.; CANNON, J.G.; DINARELLO, C.A.; FRONTERA, W.R.; HUGHES, V.A.; JONES, B.H.; KNUTTCHEN, H.C. Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. **J. Appl. Physiol** **61**: 1864-1868, 1986.

FITZGERALD L. Exercise and the Immune System. **Immunology Today** **9**. 337-339, 1988.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, **46 (3)**:265-271, 2000.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity in radical explanation. **J. Exp. Biol.**, **201**: 1203-1209, 1998.

FRY, R.W.; MORTON, A.R.; CRAWFORD, C.P.; KEAST D. Cell numbers and in vitro responses of leukocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. **Eur J Appl Physiol** **64**: 218-227, 1992.

HACK, V., STROBEL, G., WEISS, M.; WEICKER, H. PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. **J. Appl Physiol** **77**: 1731-1735, 1994.

HARBIGE, L.S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. **Proc Nutr Soc.**, **57(4)**:555-562, 1998.

HE, K.; RIMM, E.B.; MERCHANT, A.; ROSNER, B.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. Fish consumption and risk of stroke in men. **JAMA**, **288**:3130-3136, 2002.

HOFFMAN-GOETZ, L.; MacNEIL, B.; ARUMUGAN, Y.; RANDALL-SIMPSON, J. Differential effects of exercise and housing condition on murine natural killer cell activity and tumor growth. **Int J Sports Med** **13**: 167-171, 1992.

HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. Exercise and immune system: a model of the stress response? **Immunol Today** **15**: 382-387, 1994.

ILBACK, N.G.; FRIMAN, G.; BEISEL, W.R.; JOHSON, A.J. Sequential metabolic alterations in the myocardium during influenza and tularemia in mice. **Infect Immun** **45**: 491-497, 1984.

ILBACK, N.C.; FRIMAN, C.; CRAWFORD, D.J.; NEUFELD, H.A. Effects of training on metabolic responses and performance capacity in Streptococcus pneumoniae infected rats. **Med. Sci. Sports Exercise** **23**: 422-427, 1991.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. The Immune System in Health and Disease. **Oxford, UK**: Garland, 1994.

JIANG, W.G.; BRYCE, R.P.; HORROBIN, D.F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Oncology/hematology**, **27**:179-209, 1998.

KOKUBUN, E. **Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos**. São Paulo, SP. Tese de Doutorado, 1990.

KREMMER, J.M.; LAWRENCE, D.A.; JUBIZ, W.; DI GIACOMO, R.; RYNES, K.; BARTHOLOMEY, L.E.; SHERMAN, M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, **33**:810-820, 1990.

KROMAN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. **Acta Medica Scandinavica**, **208**:401-406, 1980.

LARRABEE, R.C. Leucocytosis after violent exercise. **J Med Res** **7**: 76-82, 1902.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. Sarvier, São Paulo, 2000 .

LIEW, F.Y.; RUSSELL, S.M.; APPLEYARD, C.; BRAND, C.M.; BEALE, J. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA antibody rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. **Eur. J. Immunol** **14**: 350-356, 1984

MacNEIL, B.; HOFFMAN-GOETZ, L. Chronic exercise enhances in vivo and vitro cytotoxicity mechanisms of natural immunity in mice. **J Appl Physiol** **74**: 388-395, 1993.

MADHAVI, N.; DAS, V.N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vineristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Lett.** **84**:31-41, 1994.

MEYDANI, S.N.; LICHTENSTEIN, A.H.; CORNWALL, S. Immunologic effects of cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. **J. Clin. Invest.** **92**:105-13, 1993.

MYIASAKA, C.K.; MENDONÇA, J.R.; NISHIYAMA, A.; ALVES DE SOUZA, J.A.; MELO, M.P.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. **Life Sciences** **69**:1739-1751, 2001.

NASH H.L. Can Exercise Make us Immune to Disease? **Phys Sportsmed.** 250-253, 1987.

NETTLETON, J.A. **Omega-3 fatty acids and health**. Chapman & Hall. New York, 1995.

NIEMAN, D.C. Immune Response to Heavy Exertion. **J. Appl. Physiol.** 82(5): 1385-1394, 1997.

NIEMAN, D.C.; NEHELSEN-CANNARELLA, S.L.; MARKOFF, P.A.; BALKLAMBERTON, A.J.; YANG, H.; CHRITTON, D.B.; LEE, J.W.; ARABATZIS, K.; The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. **Int J Sports Med** 11:467-473, 1990.

NIEMAN, D.C.; HENSON, D.A.; GARNER, E.B.; BUTTERWORTH, D.E.; WARREN, B.J.; VAVIS, J.M.; FAGOAGA, O.R.; NEHLSSEN-CANARELLA, S.L.; Carbohydrate affects natural killer cell redistribution but not activity after running. **Med Sci Sports Exercise** 29: 1318-1324, 1997.

NIELSEN, H.B.; PEDERSEN, B.K. Lymphocyte proliferation in response to exercise. **Eur. J. Appl. Physiol** 75: 375-379, 1997.

NIEMAN, D.C. Exercise Effects on Systemic Immunity. **Immunology and Cell Biology**. 2000.

NIEMAN, D.C. JOHANSEN, L.M.; LEE, J.W.; CERMAK, J.; ARABATZIS, K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. **J. Sports Med. Phys. Fitness** 30: 316-328, 1990.

NIEMAN, D.C. Exercise immunology: practical applications. **Int. J. Sports Med**. In Press.

NIEMAN, D.C. Prolonged aerobic exercise, immune response, and risk of infection. In: Exercise and Immune Function. **CRC Press**, 143-161, 1996.

NIEMAN, D.C.; SIMANDLE, S.; HENSON, D.A.; WARREN, B.J.; SUTTLES, J.; DAVIS, J.M.; BUCKLEY, K.S.; AHLE, J.C.; BUTTERWORTH, D.E.; FAGOAGA, O.R.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. Lymphocyte proliferative response to 2.5 hours of running. **Int. J. Sports Med.** **16**: 404-408, 1995.

ORTEGA, E. Physiology and biochemistry: influence of exercise on phagocytosis. **Int. J. Sports Med.** **15**: S172-S178, 1994.

OSTROWSKI, K.; RODHE, T.; ZACHO, M.; ASP, S.; PEDERSEN, B. K.; Evidence that IL-6 produced in skeletal muscle during intense long term muscle activity. **J Physiol** **508**: 919-953, 1998.

PABLO, M.A.; PUERTOLLANO, M.A.; CIENFUEGOS, G.A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **29**: 323-328, 2000.

PAVLICK, K.P.; LAROUX, F.S.; FUSELER, J.; WOLF, R.E.; GRAY, L.; HOFFMAN, J.; GRISHAM, M.B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. **Free radical Biology & Medicine**, **33(3)**: 311-322, 2002.

PEDERSEN, B.K., HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the Immune System: regulation, Integration and Adaptation. **Physiol. Rev.** **80**: 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H. How physical exercise influences the establishment of infections. **Sports Med.** **19**: 393-400, 1995.

PEDERSEN, B.K.; TVEDE, N.; CHRISTENSEN, L.D.; KLARLUND, K.; KRAGBAK, S.; HALKJRKRISTENSEN, J. Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. **Int J Sports Med** **10**: 129-131, 1989.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, **46**: 211-226, 1981.

PINTO J.R., J.A.; FOLADOR, A.; BONATO, S.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA H.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.; NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDEZ, L.C. Fish oil supplementation in f1 generation associated to naproxen, clenbuterol and insuline administration reduce growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15:358-365, 2004.

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

POMPÉIA. C.; LOPES, L.R.; MIYASAKA C.K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R.; Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 33:1255-1268, 2000.

PYNE, D.B. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Med.** 17: 245-258, 1994.

ROBINSON, L.E., CLANDININ, M.T.; FIELD, C.J. R3230AC rat mammary tumor and dietary long chain (n-3) fatty acids change immune cell composition and function during mitógeno activation. **J Nutr.** Jul; 131(7):2021-7, 2001.

ROIT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 3ª ed. São Paulo; Manole, 1994.

SCHINI-KERTH, V.B. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effects on homeostasis and fibrinolysis. **Transfus Clin Biol.**, **6**:355-363, 1999.

SHARP, J.C.M. Viruses and the athlete. **Br. J. Sports Med.** 16:491-497, 1995.

SHARP, J.C.M. Viruses and the athlete. **Br: J. Sports Med.** **23**: 47-48, 1989.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother.**, 56:365-379, 2002.

SPRENGER, H.; JACOBS, C.; NAIN, M.; GRESSNER, A. M.; PRINZ, H.; WESEMANN, W.; GEMSA, D. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long distance running. **Clin Immunol Immunopathol** **63**: 188-195, 1992.

STUEHR, P.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **82**: 7738-7742, 1985.

TOFT, A.D., THORN M., OSTROWSKI K., ASP S., MOLLER K., IVERSEN S.I., HERMANN C., SONDERGAARD S.R., PEDERSEN B. K. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids do not Affect Cytokine Response to Strenuous Exercise. **J. Appl. Physiol.** 89: 2401-2406, 2000.

TOGNI, V.; OTTA, C.C.C.; FOLADOR, A. Câncer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrition and Cancer**, 46:52-58, 2003.

TREBBLE, T.M; WOOTTON, S. A.; MILES, E. A.; MULLEE, M.; ARDEN, N.K.; BALLINGER, A.B.; STODD, M.A.; BURDGE, G.C.; CALDER, P.C. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish oil supplementation: response to antioxidant co supplementation. **Am J Clin Nutr.** Sep; 78 (3):376-82, 2003.

TVEDE, N.; STEENSBERG, J.; BASLUND, B.; HALKJAER K.J.; PEDERSEN, B.K. Cellular immunity in highly trained elite racing cyclists during periods of training with high and low intensity. **Scand J Med Sci Sports** **1**: 163-166, 1991.

TVEDE, N.; HEILMANN, C.; HALKJAER. K.J.; PEDERSEN, B.K. Mechanisms of B-lymphocyte suppression induced by acute physical exercise. **J. Clin. Lab. Immunol** **30**: 169-173, 1989.

VALENTINE, J.S.; WERTZ, D.L; LYONS, T.J.; LIOU, L.L.; GOTO, J.J.; GRALLA, E.B. The dark side of dioxygen biochemistry. **Chemical Biology**, **2**:253-262, 1998.

VFNKATRAMAN, J.T.; PENDERGAST, D. Effect of the level of dietary fat intake and endurance exercise on plasma cytokines in runners. **Med. Sci. Sports Exercise** **30**: 1198-1204, 1998.

VIEIRA, R.; HAEBISH H.; KOKUBUN E. Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arq. Biol. Technol.** 31(3): 387-394, 1998.

VOET, D; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentals of Biochemistry**. 2001

WATSON, J.; MADHOK, R.; WIJELATH, E.; CAPELL, H.A.; GILLESPIE, J.; SMITH, J.; BYARS, M.L. Mechanism of action of polyunsaturated fatty acids in rheumatoid arthritis. **Biochem. Soc. Trans.** **18**: 282, 1991.

WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J. Rebuilding the food pyramid. *Scientific American*, 288:52-59, 2003.

YAQOUB, P.; CALDER, P.C. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. **Cell Immunology**, **163**: 120-128, 1995.