

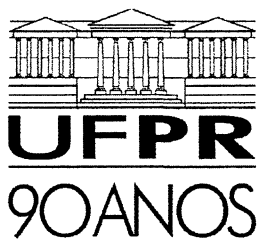
MIRNA CLEMENTE

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE O SISTEMA
IMUNITÁRIO E PERFIL LIPÍDICO DE INDÍVIDUOS PRATICANTES
DE ATIVIDADE FÍSICA INTENSA**

Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Educação Física, Área de Concentração Fisiologia do Exercício, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

**CURITIBA
2006**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
COORDENAÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

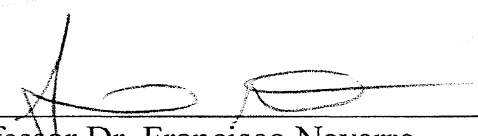
TERMO DE APROVAÇÃO

MIRNA CLEMETE


“EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE O
SISTEMA IMUNITÁRIO E PERFIL LIPÍDICO DE INDIVÍDUOS
PRATICANTES DE ATIVIDADE FÍSICA INTENSA”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Educação Física – Área de Concentração Exercício e Esporte, Linha de Pesquisa Fisiologia da Performance, do Departamento de Educação Física do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes (Orientador)
Departamento de Fisiologia / UFPR



Professor Dr. Francisco Navarro
Membro Externo



Professor Dr. Raul Osiecki
Departamento de Educação Física / UFPR

Curitiba, 16 de Outubro de 2006

AGRADECIMENTOS

Ao clima de harmonia entre as pessoas envolvidas na coleta de dados desta dissertação

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes, orientador deste trabalho, pela imensa dedicação, profissionalismo e amizade.

A minha família, mãe, irmão, irmã, sobrinhos, cunhados e padrasto pelo incentivo constante, força e carinho.

A minha grande amiga Tine, pois, sem sua paciência, amizade e companheirismo, com certeza este trabalho não se realizaria.

A minha amiga Carla Ariello que me ajudou nas análises do estudo piloto que possibilitou o sucesso desta dissertação.

Aos meus amigos Bi, Ju, Má, Fabiano, Janine, Soraya, Ernane, Faby, Athos, Carol, Paulinho, Klaire e Sheila pelo incentivo.

A equipe do Aquacenter Batel e amigos pelo estudo piloto, Fernandinho, Mariah, Rose, Mailor, Sandra, Newton, Mônica, Talitha, Maridélia, Laura, Valéria, Evandro, Lia, Mauricio, Tise e Marco.

A Elaine patrocinadora das cápsulas de óleo de peixe da Apotheke Cosmética e Farmácia Ltda.

Aos Fabianos, Paula e os outros companheiros das disciplinas do Mestrado, pela colaboração neste projeto.

Aos colegas do laboratório, em especial a Vanessa, Lolli, Sandro, Fabíola, Cris e Carine.

Aos Professores do mestrado André, Maria Gisele, Ruth, Simone, Iverson, Raul e ao secretário Daniel.

A empresa Montana que possibilitou a realização das coletas utilizadas nesta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE GRÁFICOS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ÁCIDOS GRAXOS	1
1.2 SISTEMA IMUNITÁRIO E ATIVIDADE FÍSICA	8
1.3 ÁCIDOS GRAXOS, SISTEMA IMUNITÁRIO E ATIVIDADE FÍSICA.....	15
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	17
3.2 POPULAÇÃO/ AMOSTRA	18
3.3 QUESTIONÁRIO	18
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS SÉRICOS E IMUNITÁRIOS.....	20
3.4.1 REAGENTES E ENZIMAS	20
3.4.2 Coleta e separação das células sangüíneas	20
3.4.3 Cultivo dos linfócitos.....	21
3.4.4 Análise de Marcadores de Superfície.....	21
3.5 METODOLOGIA DOS ENSAIOS PARA NEUTRÓFILOS.....	22
3.5.2 Mensuração do ânion superóxido	22
3.5.3 Volume lisossomal.....	23
3.6 ANÁLISES SÉRICAS.....	24
3.6.1 Determinação sérica.....	24
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5 RESULTADOS.....	26
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	42

REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PARÂMETROS IMUNITÁRIOS.....	13
---------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRAFICO 1. COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	6
--	---

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. SÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS	3
QUADRO 2. FORMAÇÃO DE MEDIADORES QUÍMICOS	5
QUADRO 3. RESUMO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	17
QUADRO 4. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS INDIVÍDUOS.....	26
QUADRO 5. MÉDIA, EPM E N – PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	27
QUADRO 6. MÉDIA, EPM E N - POPULAÇÃO CD4 ⁺	28
QUADRO 7. MÉDIA, EPM E N - POPULAÇÃO CD8 ⁺	29
QUADRO 8. MÉDIA, EPM E N - ÂNION SUPERÓXIDO	30
QUADRO 9. MÉDIA, EPM E N - VOLUME LISOSSOMAL	31
QUADRO 10. MÉDIA, EPM E N - COLESTEROL	32
QUADRO 11. MÉDIA, EPM E N - COLESTEROL HDL	33
QUADRO 12. MÉDIA, EPM E N - TRIACILGLICEROL.....	34
QUADRO 13. MÉDIA, EPM E N - GLICOSE.....	35
QUADRO 14. MÉDIA, EPM E N - LACTATO.....	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CADEIA CARBÔNICA DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS DAS FAMÍLIAS (N-3 E N-6).....	2
FIGURA 2. PORCENTAGEM DE CALORIAS	7
FIGURA 3. RELAÇÃO DA QUANTIDADE E INTENSIDADE DO EXERCÍCIO E INFECÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR.....	11
FIGURA 4. PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS.....	27
FIGURA 5. DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA CD4+	28
FIGURA 6. DETERMINAÇÃO DA POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA CD8+	29
FIGURA 7. PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO.	30
FIGURA 8. VOLUME LISOSSOMAL.	31
FIGURA 9. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL.....	32
FIGURA 10. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL HDL	33
FIGURA 11. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TRIACILGLICEROLEMIA.	34
FIGURA 12. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE.....	35
FIGURA 13. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LACTATO.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - ÁCIDOS GRAXOS

CD4⁺ – LINFÓCITO T AUXILIAR

CD8⁺ – LINFÓCITO T CITOTÓXICO

CELAFISCS – LABORATÓRIO DE APTIDÃO FÍSICA DE SÃO CAETANO DO SUL

CON A – CONCAVALINA A

CO – CICLOXIGENASE

CPM - CONTAGEM POR MINUTO

DMSO – DIMETIL SULFÓXIDO

EPA - ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO

EPM – MÉDIA DO ERRO PADRÃO

FITC – FLUORÊSCENCIA ISOTIOCINÉTICA

H₂O₂ – PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

IgA - IMUNOGLOBULINA A

IgD - IMUNOGLOBULINA D

IgE - IMUNOGLOBULINA E

IgG - IMUNOGLOBULINA G

IgM - IMUNOGLOBULINA M

IL – INTERLEUCINAS

INF - INTERFERON

IPAQ - QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA

ITRS - INFECÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR

LO – LIPOXIGENASE

METS - UNIDADE DE MEDIDA DE GASTO ENERGÉTICO

min – MINUTOS

ml – MILILITROS

NBT – NITROBLUE TETRAZOLIUM

N-3 - ÔMEGA-3 ou ÁCIDO LINOLÊNICO

N-6 - ÔMEGA-6 ou ÁCIDO LINOLÉICO

NK - CÉLULAS NATURAL KILLER

O₂ – ÂNION SUPERÓXIDO

OPEN WINDOW – JANELA IMUNOLÓGICA

PBS – SOLUÇÃO TAMPÃO DE FOSTATO

PUFA - ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

rpm - ROTAÇÃO POR MINUTO

T0 - INDIVÍDUOS TREINADOS NÃO SUPLEMENTADOS

T60 - INDIVÍDUOS TREINADOS NÃO SUPLEMENTADOS POR 60 DIAS

TS0 - INDIVÍDUOS TREINADOS SUPLEMENTADOS

TS60 - INDIVÍDUOS TREINADOS SUPLEMENTADOS POR 60 DIAS

20:4N-6 - ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

vs - VERSUS

RESUMO

Ácidos graxos são importantes constituintes das células exercendo funções estruturais, energética, sinalizadora, entre outras. Entre suas várias funções, para os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) n-6 foi demonstrado terem efeito estimulatório sobre o sistema imunitário e para os PUFA n-3 imunossupressor. Atividade física é estímulo que também modifica a resposta imunitária. Esta quando praticada com intensidade leve à moderada, tem ação estimulatória enquanto que à de longa duração e intensa, tem efeito imunossupressor. Na realidade, atletas de elite que praticam esportes de longa duração e alta intensidade são acometidos mais frequentemente de infecções, em particular às do trato respiratório superior (ITRS). Uma vez que PUFA n-3 tem a habilidade de modular a resposta imunitária e que a atividade física intensa leva a maiores taxas de infecção, nós aventamos a hipótese de que a suplementação com óleo de peixe modularia a resposta imunológica. Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com ômega 3 sobre parâmetros da proliferação dos linfócitos T, os marcadores de superfície CD4⁺ e CD8⁺, produção de ânion superóxido e volume lisossomal dos neutrófilos, em indivíduos humanos submetidos a atividade física intensa. Foram recrutados para este estudo indivíduos praticantes de atividade física os quais foram divididos em não suplementados e suplementados com 2 g de óleo de peixe por dia. No primeiro dia de experimento foi retirada amostra de sangue dos indivíduos não suplementados (TRE) e iniciou-se a suplementação no outro grupo (TREN-3). Após 60 dias, outra amostra de sangue destes mesmos indivíduos foi retirada (TRED e TREN-3D). Estas amostras de sangue foram centrifugadas e dos linfócitos investigou-se a população CD4⁺, CD8⁺ e a proliferação celular. Dos neutrófilos investigou-se o volume lisossomal e produção de ânion superóxido. Houve diminuição da população linfocitária CD8⁺ ($p < 0,005$) e aumento na proliferação linfocitária, da população linfocitária CD4⁺, na produção do ânion superóxido e no volume lisossomal no grupo (TREN-3D), quando comparados com os dos grupos (TRE N-3) e (TRED). Nossos resultados sugerem que indivíduos treinados e suplementados com óleo de peixe tiveram aumento da resposta linfocitária CD4⁺ e, da neutrófila na produção de ânion superóxido e volume lisossomal. Isto no permite aventar a possibilidade do uso de óleo de peixe, nesta dose, como modulador da resposta imunológica inibitória que acompanha atletas de elite.

ABSTRACT

Fatty acids are important components of many cells playing a key role for structure, energetic functions, signal transduction among others. In addition n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) has been demonstrated to have stimulatory effects on immunity system and n-3 PUFA has immunosuppressive effect. Physical activity is a stimulus which also modifies immune system response. Low-moderate exercise training enhances immunosurveillance while intense exercise training leads to immunosuppression. Indeed, elite athletes who practice intense training are more susceptible to infections, in particular those from upper respiratory tract (URTI). Since n-3 fatty acid can modulate the immune system response and intense physical activity leads to infections, we postulate that n fish oil supplementation might modulate the immune response. This study aimed to investigate the effect of fish oil supplementation on lymphocyte proliferation, T cell surface markers CD4⁺ e CD8⁺ cells, production of anion superoxide and lysosome volume by neutrophils from individuals submitted to intensive physical activity. Individual submitted to intensive physical activity were recruited into our study and set up as trained no supplemented and supplemented with 2g of oil fish per day. On the first day of the experiment blood samples were withdrawal from no supplemented (TRED) and initiate the supplementation in the other group (TREN-3). After 60 days others blood samples from these same population were withdrawal (TRED e TREN-3D). Blood were centrifuged and from lymphocytes we investigated the proliferation and T cell CD4⁺ e CD8⁺. From neutrophils the lysosome volume and production of anion superoxide. There was a significance decrease in the CD8⁺ T lymphocyte population. ($p < 0.005$) and an increase in the rate of lymphocyte proliferation, CD4⁺ T lymphocytes population, production of anion superoxide and lysosome volume in the TREN-3D group when compared to (TREN-3) and (TRED). Our results suggest that individuals submitted intensive physical activity supplemented with oil fish improved CD4⁺ T lymphocytes and from neutrophils the production of anion superoxide and lysosome volume. Thus, we hypothesize that fish oil intake, in this dose, might modulate the inhibitory immune response that accompany elite athletes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÁCIDOS GRAXOS

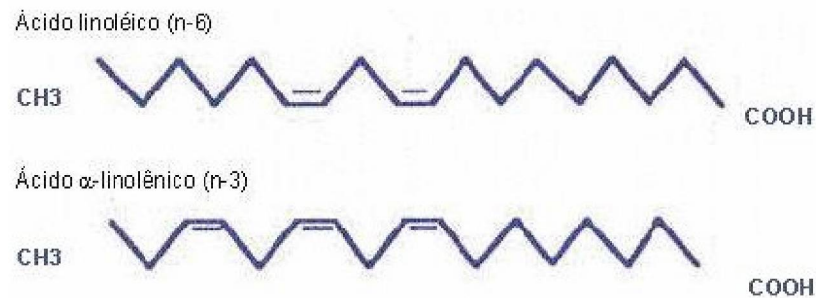
A ingestão de gordura, atualmente, tem causado preocupação, pois seu excesso está associado ao desenvolvimento de uma série de doenças tais como a obesidade, câncer e doenças coronarianas (POWEL, 1994). Apesar dos danos causados pelo seu excesso, necessitamos da gordura em nossa dieta, pois esta tem função estrutural importante. Após a década de 80 foi relatada a importância dos ácidos graxos ômega-3 (n-3) na dieta para o funcionamento de diversos órgãos e sistemas, basicamente pela sua conversão em eicosanóides, as prostaglandinas, os leucotrienos, as tromboxanas e as lipoxinas (CURI, 2002). Durante as duas últimas décadas, foi demonstrado que a quantidade e o tipo de gordura consumida na dieta podem influenciar profundamente as respostas biológicas (WESLEY, 1998).

Em muitos países europeus a ingestão da gordura representa de 40% a 45% da energia total da dieta (SHILLS, 2002). Nos Estados Unidos da América varia entre 30% e 40% das calorias totais (SHILLS, 2002). Nas populações asiática e africana, o consumo de gordura proporciona de 15% a 25% da energia total da dieta (SHILLS, 2002).

O que chamamos de gordura alimentar é classificada como lipídeos. Os lipídeos são insolúveis em água, mas solúveis em certos solventes orgânicos como álcool ou éter (WILLIAMS, 2002). As gorduras são classificadas como simples (triacilgliceróis e cêras), compostas (fosfolipídeos, glicolipídeos e lipoproteínas) e derivadas (ácidos graxos, esteróides e hidrocarbonetos). Se tomarmos o tamanho da molécula como referência, os ácidos graxos com dois a quatro átomos de carbono são denominados de cadeia curta, os de seis a dez átomos e acima de doze átomos de carbono são denominados de cadeia média e longa, respectivamente (CURI, 2002). As gorduras, ainda, podem ser classificadas pelo número de duplas ligações entre os átomos de carbono. As que apresentam uma dupla ligação são denominadas gorduras monoinsaturadas e aquelas que apresentam duas duplas ligações ou mais são denominadas de poliinsaturadas e as que não apresentam insaturação gorduras saturadas (CALDER, 1998).

Os ácidos graxos insaturados são divididos em quatro grandes famílias denominadas n-9, n-7, n-6 e n-3. Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da família ômega-6 ou n-6, derivados do ácido graxo essencial linoléico (Quadro 1), têm a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomo de carbono, a partir do terminal metila, portanto, a denominação n-6. Da mesma forma, os da família n-3 derivados do ácido graxo essencial alfa-linolênico (Quadro 1), têm sua primeira dupla ligação entre o terceiro e quarto átomo de carbono a partir do terminal metila, portanto, a denominação n-3 (Figura 1).

FIGURA 1. CADEIA CARBÔNICA DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS DAS FAMÍLIAS (N-3 E N-6)



Cada família origina-se de um ácido graxo precursor específico (Quadro 1), o qual é convertido em outros ácidos graxos da mesma série através de sucessivas reações enzimáticas, onde ocorrem adição de novos átomos de carbono e insaturações na cadeia original (WESLEY, 1998).

QUADRO 1. SÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

ÁCIDO GRAXO N-6		ENZIMA	ÁCIDO GRAXO N-3	
Linoléico	18:2		α -Linolênico	18:3
↓		Δ 6-dessaturase	↓	
γ -linolênico	18:3		octadecatetraenóico	18:4
↓		alongase	↓	
dihomo- γ -linolênico	20:3		eicosatetraenóico	20:4
↓		Δ 5-dessaturase	↓	
araquidônico	20:4		eicosapentaenóico (EPA)	20:5
↓		alongase	↓	
adrênico	22:4		docosapentaenóico (DHA)	22:5
↓		alongase	↓	
tetracosatetraenóico	24:4		tetracosapentaenóico	24:5
↓		Δ 6-dessaturase	↓	
tetracosapentaenóico	24:5		tetracosahexaenóico	24:6
↓		β -oxidação	↓	
docosapentaenóico	22:5		docosahexaenóico	22:6

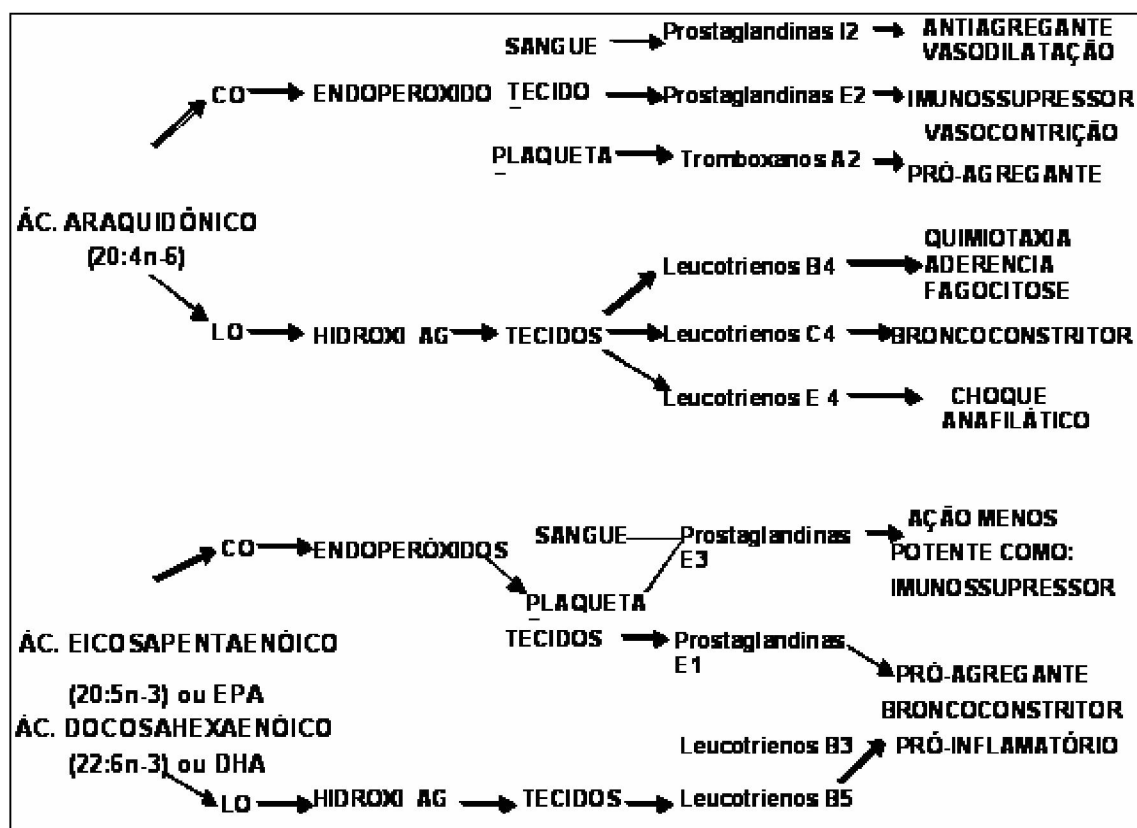
Quadro adaptado: Calder, 1996.

As duas famílias de ácidos graxos essenciais, n-3 e n-6 são produzidas pelas plantas ou fitoplânctons. Os fitoplânctons também têm dessaturases e alongases que são requeridas para transformação em ácidos graxos de cadeia longa. Os n-3 e n-6 não podem ser interconvertidos.

Devido à natureza competitiva da dessaturação e da alongação dos ácidos graxos, cada classe de ácidos graxos pode interferir no metabolismo do outro. Esta competição apresenta implicações funcionais. Excesso de n-6 irá reduzir o

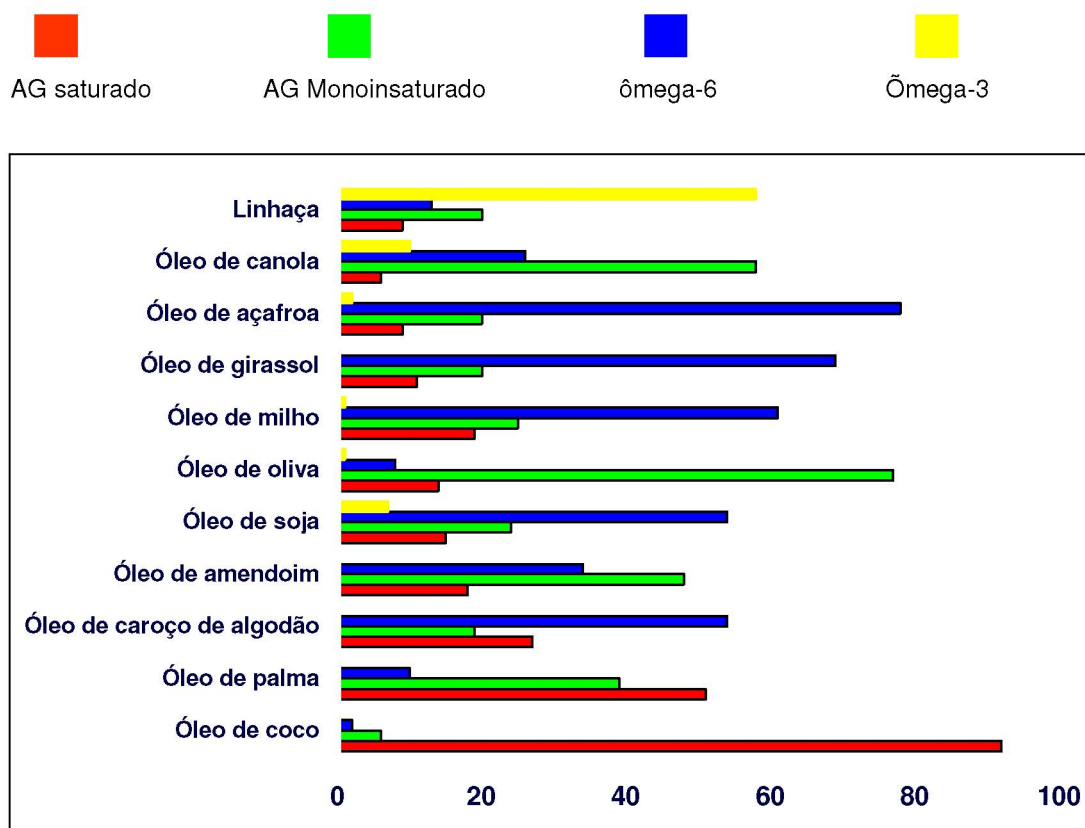
metabolismo de n-3, levando a um déficit de seus metabólitos. Este é tema importante em relação às fórmulas para lactantes, que contêm excesso de n-6, sem respectivo balanceamento do n-3. Inversamente, da mesma forma, o excesso de n-3 pode levar ao prejuízo do metabolismo de n-6 (SHILLS, 2000). Ácidos graxos n-3 e n-6 quando metabolizados formam os eicosanóides (Quadro 2), os quais são importantes para diversas funções como também no crescimento celular. Diferentes tipos celulares produzem diferentes tipos de eicosanóides, com diferentes funções biológicas, gerando resposta a estímulos fisiológicos (adrenalina ou anticorpos/antígenos complexos) e também a estímulos não fisiológicos (machucaduras). Eicosanóides formados a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA) são menos potentes que os formados a partir do ácido araquidônico (AA). Conseqüentemente, a dieta tem importante papel em determinar a mistura e a potência dos eicosanóides (CALDER, 2001). Prostaglandinas estão envolvidas na intensidade de modulação e duração da resposta inflamatória e imunitária. Prostaglandinas da série E₂ têm efeito pró-inflamatório, induz a febre e eritema, aumenta a permeabilidade vascular e promove vasodilatação. Prostaglandinas da série E₃ (PG E₃) são menos pró-inflamatórias que as prostaglandinas E₂ (CALDER, 2001). Sardesai (1992) sugere que a síntese de PG E₃ parece ter efeitos imunossupressivos menores que os derivados PG E₂.

QUADRO 2. FORMAÇÃO DE MEDIADORES QUÍMICOS A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS N-3 E N-6



Adaptado de LANDS WEN, 1998. Cox: cicloxigenase e LOX: lipoxigenase

GRAFICO 1. COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NOS DIFERENTES ÓLEOS CONSUMIDOS NA DIETA 0 A 100 = PORCENTAGEM DE GORDURA



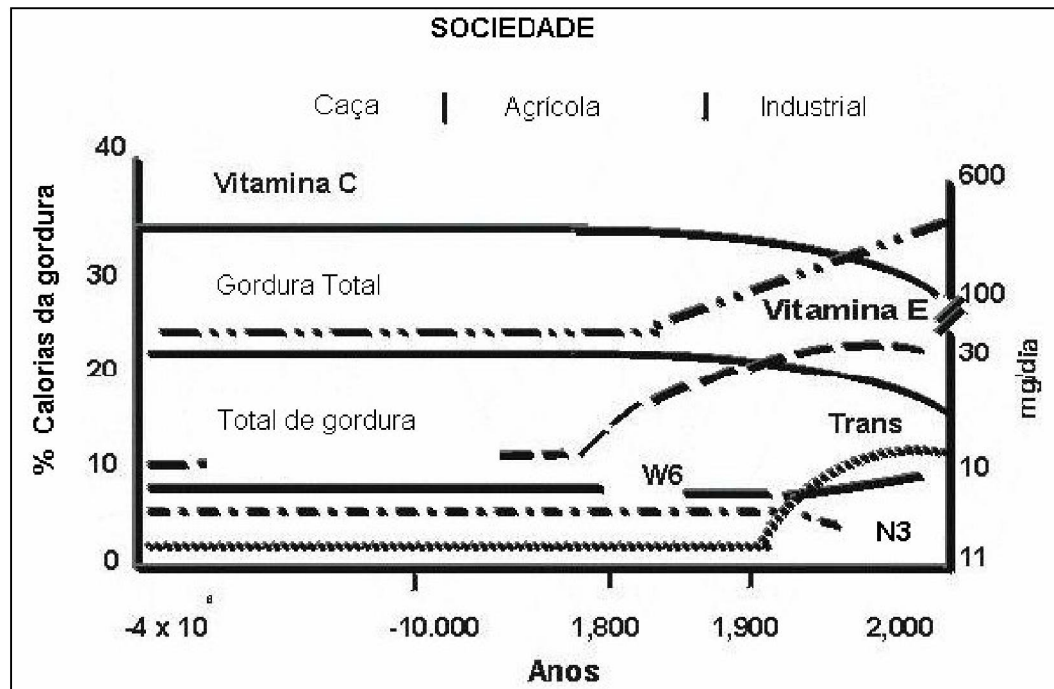
LUTZ, M. BONILLA, S. CONCHA, J. et al. Efeitos dos óleos consumidos na dieta, colesterol e suplementação de vitamina antioxidante em ratos. *Ann Nutr Metab*, 42: 350-359, 1998.

Os efeitos dos ácidos graxos no sistema imunitário tem sido objeto de estudo por muitos anos, mas este interesse tem se intensificado com o papel dos eicosanóides do ácido araquidônico na modulação inflamatória e imunitária (CURI, 2002). Estudos epidemiológicos relataram baixa prevalência de aterosclerose e doenças coronarianas entre esquimós da Groenlândia e algumas populações japonesas, cujas dietas são ricas em gorduras predominantes de poliinsaturadas, principalmente derivadas de peixes e animais marinhos (KROMANN, 1980). A baixa incidência de câncer de mama em mulheres esquimós e japonesas levou a especulação do efeito protetor do ácido graxo n-3, devido ao alto consumo de peixe nestas populações (SIMOPOULOUS, 2001). Em contrapartida, alguns autores sugerem que não existem evidências consistentes de que o consumo de peixe diminua os riscos de câncer (CALDER, 1998). Portanto mais estudos são necessários para clarificar este assunto. Em 1929, trabalho de Burr e Burr mostrou,

pela primeira vez, a importância nutricional de lipídeos específicos na dieta. Ratos recém desmamados, alimentados com dieta sem gorduras, apresentaram prejuízo do crescimento, pele escamosa, necrose da cauda e aumento da mortalidade, condições revertidas pelo consumo de ácido linoléico. Em trabalho posterior, os mesmos autores descreveram prejuízo da fertilidade na deficiência de n-3 e n-6 e atividade visual.

A rápida mudança em nossa dieta, particularmente nos últimos 150 anos (Figura 2), é colocada como um dos importantes fatores promotores de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas tais como a aterosclerose, câncer e doenças auto-imune. Outros fatores como sedentarismo e hereditariedade também desempenham importante papel neste processo e não podem ser descartados.

FIGURA 2. PORCENTAGEM DE CALORIAS INGERIDAS A PARTIR DE GORDURA PELA ESPÉCIE HUMANA, DA ÉPOCA PALEOLÍTICA ATÉ OS DIAS ATUAIS (SIMOPOULOS, 2001)



Vários estudos sugerem que a excessiva quantidade de ácidos graxos n-6 e a redução da de n-3 na nossa dieta, leva a uma razão desproporcional de n-6/n-3, trazendo desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas. Na dieta ocidental esta razão pode chegar até 30:1. Em países no qual a alimentação está associada com maior consumo de óleo de peixe (n-3), esta razão atinge 4:1 e tem sido associada há redução de 70% das mortes associadas aterosclerose (SIMOPOULOS, 2001). Assim, tem se tornado claro que a quantidade de gordura na dieta altera respostas celulares, mas devemos salientar que não reagem sozinhas, sendo também influenciadas por outros nutrientes (SHEPARD & SHEK, 1995). Suplemento com ácido graxo n-3 tem se tornado popular no tratamento de artrite reumatóide (KREMER, 1987). O óleo de peixe tem efeitos benéficos em alguns indivíduos que sofrem de psoríase quando este é associado com drogas terapêuticas (CURI, 2002).

1.2 SISTEMA IMUNITÁRIO E ATIVIDADE FÍSICA

Muitos aspectos da função imunitária (incluindo proliferação de linfócitos, citotoxicidade das células natural killer, secreção de IgA na mucosa salivar) pode estar deprimida temporariamente no exercício intenso (correr uma maratona), de longa duração ou ainda quando se treina em excesso (SHEPARD & SHEK, 1995).

O sistema imunitário é um conjunto intrincado de células, órgãos e estruturas especializadas ou não, cuja missão é identificar e destruir invasores estranhos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) ou qualquer célula anormal, como as células cancerosas, antes que qualquer mal seja feito ao corpo. A imunidade é dividida em inata ou natural, que não se altera mediante exposição repetida a um dado agente infeccioso; imunidade adaptativa ou adquirida a qual se torna mais eficiente após cada encontro subsequente com o mesmo agressor. O sistema imunitário “memoriza” o agente infeccioso evitando desta forma, que este mesmo patógeno venha posteriormente, causar doenças. Podemos ainda subdividir a imunidade adaptativa em imunidade humoral a qual é mediada por anticorpos, moléculas responsáveis pelo reconhecimento e eliminação de invasores estranhos e; imunidade celular a qual é mediada pelos linfócitos T (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

Os leucócitos ou glóbulos brancos são células do sistema imunitário, e têm como função a defesa celular e humoral do organismo. Eles são classificados em granulócitos (neutrófilos, eosinófilo e basófilo) e agranulócitos (linfócitos e monócitos)

Os neutrófilos apresentam-se em caso de processo inflamatório de longa duração e em alta porcentagem no sangue circulante, constituindo a primeira linha de defesa celular contra a invasão bacteriana.

Os eosinófilos estão aumentados em pacientes portadores de doenças alérgicas, e agem fagocitando as bactérias mais lentamente que os neutrófilos.

Os basófilos também possuem um envolvimento nas reações alérgicas e inflamatórias.

Os linfócitos são divididos em linfócitos B e T, e estão associados à resposta imunitária do organismo de maneira específica e as células natural killer (NK). Os linfócitos B (derivados da medula óssea) são responsáveis pela resposta imune do tipo humoral. Estes reconhecem o determinante antigênico da macromolécula estranha e diferenciam-se em plasmócitos que sintetizam anticorpos específicos. O reconhecimento de antígenos é realizado através de glicoproteínas localizadas na superfície celular, denominadas imunoglobulinas ou anticorpos. Os linfócitos B sintetizam e secretam moléculas de imunoglobulinas, principalmente IgM e IgD. Os linfócitos T (derivados do timo) por sua vez liberam citocinas que ativam os fagócitos e estes então destroem as células infectadas por vírus (BLOOM, 1992). Células NK correspondem a 15% do "pool" de linfócitos circulantes e tem como principal função reconhecer e matar células infectadas por vírus e células tumorais. É de extrema importância o aumento na atividade das células NK, pois elas exacerbam a capacidade citotóxica do sangue constituindo a primeira linha de defesa do corpo contra vários patógenos. Os monócitos se diferenciam em macrófagos cujas principais funções são a apresentação de antígenos para os linfócitos, síntese de moléculas importantes para a resposta inflamatória, imunitária e a fagocitose.

Os monócitos se diferenciam em macrófagos cujas principais funções são a apresentação de antígenos para os linfócitos, síntese de moléculas importantes para a resposta inflamatória, imunitária e fagocitose (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

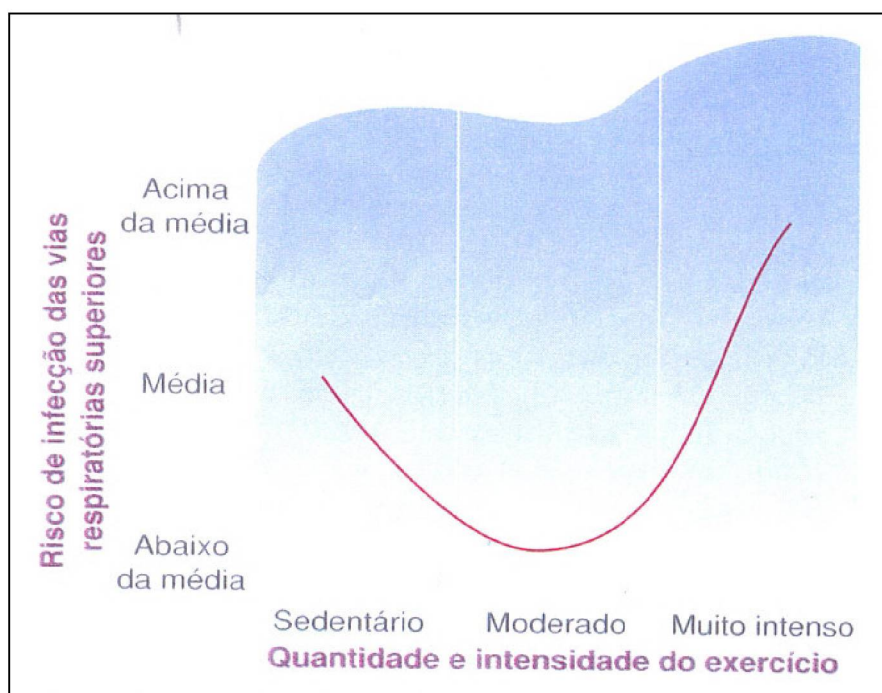
A atividade física habitual tem sido reconhecida como importante componente para a vida saudável. Em adultos, tem sido mostrado que a inatividade física relaciona-se com doenças coronarianas, diabetes, alguns tipos de câncer,

osteoporose e doenças pulmonares bem como também com doenças mentais (TWISK, 2000).

A atividade física é dividida em leve, moderada e intensa. Sessão de exercício físico leve a moderado proporciona reforço da função imunitária natural e de defesa do organismo que dura por várias horas durante a recuperação. Enquanto o exercício moderado fortalece o sistema imunitário, um período de exercício exaustivo exerce efeito oposto e enfraquece profundamente a primeira linha de defesa do corpo contra agentes infecciosos (NIEMAN, 2001).

Nieman e Cannarella (1999) sugeriram que indivíduos que se exercitam moderadamente exibem baixa incidência de doenças do trato respiratório superior comparado com a população sedentária (Figura 4). Em contraste, atletas em treinamento intenso apresentavam aumento na incidência de infecção. Apesar deste estudo em corredores ser epidemiológico, ele aponta para a necessidade de mais pesquisas para confirmar a hipótese, bem como para outros tipos de atletas.

FIGURA 3. RELAÇÃO DA QUANTIDADE E INTENSIDADE DO EXERCÍCIO E INFECÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR



Retirado de Wilmore, 2001

O mecanismo responsável pela alta incidência de doenças do trato respiratório superior entre atletas ainda não é bem conhecido, mas tem sido proposto: altas taxas de fluxo ventilatório alterando a superfície da mucosa; infiltração de células inflamatórias no interior da mucosa; supressão de uma ou mais funções do sistema imunitário; depleção de fatores necessários ao sistema imunitário e; estresse psicológico (MACKINNON, 1999). Estudos recentes confirmam que o treinamento intenso suprime a função imunitária, aumentando a suscetibilidade a infecções (NIEMAN, 1999). Além disso, o exercício intenso durante a doença pode diminuir a capacidade do organismo em reagir contra infecções e aumentar ainda mais o risco de complicações (PEDERSEN, 2000). Nem todos os atletas, entretanto, apresentam redução da função imunitária durante o treinamento. Estudos recentes, realizados com ginastas do sexo feminino jovens, demonstraram que apesar do treinamento de 22 horas semanais, a resposta imunitária dessas ginastas foi similar a do grupo controle de garotas não treinadas (ELIAKIN, *et. al.*, 1997). Em 1918, foi relatado que a maioria dos casos de pneumonia, entre meninos nos internatos, ocorria em atletas e que as infecções respiratórias pareciam

progredir para pneumonia após treinamento desportivo intenso (MACKINMON, 1994). Muitos componentes do sistema imunitário apresentam mudanças após o exercício intenso. Durante este “espaço de tempo” (open window) que acontece de 3 a 72 horas, ocorre alteração das funções imunitárias, dependendo do tipo, duração e intensidade do exercício. Neste período bactérias e vírus podem ganhar força, aumentando riscos de infecções (NIEMAN & PEDERSEN, 1999). De acordo com o conceito “espaço de tempo” o exercício moderado estimula a função imunitária durante e por um curto tempo após o exercício. Em contraste, exercício intenso causa estimulação inicial seguida de longa supressão. Nos indivíduos que realizam, regularmente, apenas exercício moderado, este “espaço de tempo” para a infecção permanece fechado e observa-se a manutenção dos benefícios protetores do exercício regular. David Niemann, 2001 discutiu o “espaço de tempo” relacionando-o com o sistema imunitário seguido de treinamento intenso, observando a atividade das células NK e o risco de infecções. Na maioria dos casos, a resposta é relativamente transitória, durando somente poucas horas. Mas outros estudos demonstram que chega a afetar de 24 até 48 horas após exercício intenso prolongado (NIEMANN, 2001).

Em outro estudo com ciclistas e corredores, a razão CD4/CD8 diminuiu imediatamente após exercício, concluindo-se que essa diminuição está relacionada com aumento da suscetibilidade à infecções (KEAST, D *et. al.*, 1988).

Existem evidências associadas ao exercício prolongado e intenso (maratona) com efeitos adversos no sistema imunitário. Esses efeitos incluem: diminuição da atividade citotóxica das células NK; baixa circulação dos números de linfócitos T após 3 ou 4 horas de exercício; diminuição da habilidade de proliferação dos linfócitos; diminuição da atividade dos neutrófilos; diminuição dos níveis imunoglobulinas na saliva e sangue; enfraquecimento da síntese de anticorpos e; diminuição da razão de células CD4[±]/CD8[±] (Tabela 1).

TABELA 1. PARÂMETROS IMUNITÁRIOS PRÉ-ESTABELECIDOS EM ATLETAS EM REPOUSO E APÓS TREINAMENTO INTENSO

PARÂMETRO IMUNITÁRIO	VALORES EM ATLETAS EM REPOUSO	APÓS TREINAMENTO INTENSO
Número de leucócito	Normal	Sem mudanças
Número de linfócitos	Normal	sem mudanças ou aumento
Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Normal ou alta	Diminuição
Proliferação e ativação dos linfócitos	Normal ou alta	Aumenta
Atividade citotóxica das células NK	Normal ou alta	Diminui
Concentração de IgA na mucosa	Baixa a normal	Diminui com o aumento da intensidade
Concentração de glutamina plasmática	Normal	Diminui ou aumenta
Anticorpos séricos específicos	Normal	Sem mudanças

Adaptado de Mackinnon, 2000

Atletas de endurance apresentam leucopenia. Green (2000) relatou baixa leucopenia em quatro e, baixa contagem de linfócitos em cinco de vinte corredores. É possível que a leucopenia seja refletida após um período de treinamento intenso. Número de células NK pode diminuir durante um período curto (1-4 semanas) ou longo (7 meses) de treinamento intenso. Por exemplo, os números de células declinaram mais que 40% durante 10 dias de treinamento intenso de corrida, em militares treinados (MACKINNON, 2000). Em outro estudo, número e porcentagem de células NK diminuíram em 30-40% após 7 meses de treinamento intenso de natação. Tanto as células NK quanto sua atividade citotóxica diminuiu em nadadores sob treinamento intenso, após 4 semanas. Exercício prolongado intenso causa supressão transitória da atividade de citotoxicidade da célula NK, durando pelo menos 6 horas ou até mais de 12 horas (MACKINNON, 2000). Para reverter o quadro clínico (Tabela 1) gerado por treinamento intenso, alguns autores têm sugerido que

2 a 5 semanas de descanso de treinamento pode restaurar a função imunitária (SHARP, 1992).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS, SISTEMA IMUNITÁRIO E ATIVIDADE FÍSICA

Em um estudo com ratos, Benquet (1994) uniu atividade física intensa, sistema imunitário e suplementação de n-3 por 8 semanas, e conclui que a imunossupressão de IgM causada pós exercício, foi diminuída ao final das 8 semanas.

Há vários trabalhos que relatam o efeito dos ácidos graxos n-3 e sistema imunitário (CURI, 2002), bem como da atividade física e o sistema imunitário (CASTELL, 2002).

Contudo há poucos relatos que associam os três, ou seja, o papel da dieta com ácidos graxos n-3 associada a atividade física sobre o sistema imunitário (BENQUET *et al.*, 1994) (PEDERSEN *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ômega 3 são imunomoduladores do sistema imunitário. Nós aventamos a hipótese de que a suplementação com este ácido graxo associado à atividade física possa modular positivamente o sistema imunitário e assim minimizar os efeitos de imunossupressão causada pela atividade física intensa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é investigar o efeito da suplementação com óleo de peixe em humanos submetidos a atividade física intensa, sobre parâmetros imunitários das células circulantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a-) Caracterizar atividade física leve, moderada e intensa através do questionário do IPAQ reconhecido no Brasil;
- b-) Comparar os grupos suplementados e não suplementados;
- c-) Avaliar a resposta proliferativa dos leucócitos circulantes através de cultivo celular e da população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺;
- d-) Averiguar a resposta dos neutrófilos pela produção de radicais livres (ânion superóxido) e volume lisossomal;
- e-) Investigar o perfil lipídico, glicemia e a lactidemia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL E SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE

Os indivíduos foram divididos em grupos: indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) (n= 9), e indivíduos treinados suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) (n=19).

Os indivíduos foram suplementados, diariamente, durante sessenta (60) dias pela ingestão de duas (2) cápsulas de óleo de peixe (mistura marinha de triacilglicerol contendo 180 mg de ácido eicosapentanóico e 120 mg de ácido doxosahexanóico por cápsula). Eles foram orientados a ingerirem uma (1) cápsula de óleo de peixe (1g) durante o almoço e outra durante o jantar. Os indivíduos suplementados por 60 dias e treinados ao final de 60 dias são referidos como TS60 (n=19) e os não suplementados treinados ao final de 60 dias como T60 (n=9) (Quadro 3).

QUADRO 3. - RESUMO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL. INDIVÍDUOS TREINADOS FORAM RECRUTADOS E DIVIDIDOS NO DIA ZERO EM NÃO SUPLEMENTADOS (T0) E SUPLEMENTADOS (TS0). APÓS 60 DIAS DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE NOVA AMOSTRA DE SANGUE FOI RETIRADA DO GRUPO NÃO SUPLEMENTADO (T60) E DO SUPLEMENTADO COM ÓLEO DE PEIXE (TS60)

GRUPOS	NÃO SUPLEMENTADOS	SUPLEMENTADOS
DIA 0	T0	TS0
DIA 60	T60	TS60
N	9	19

3.2 População/ Amostra

Vinte oito homens adultos (entre 20 a 40 anos de idade), com diferentes medidas antropométricas, peso, altura e alimentação, provenientes da cidade de São José dos Pinhais, no estado do Paraná foram convidados a participar deste estudo. Aos mesmos foi encaminhado carta para autorização prévia, conforme exigência do comitê de ética em pesquisa. Os indivíduos do estudo fazem parte de um time de jogadores de futebol de campo, da empresa Montana Indústria de Máquinas Ltda, que participam de campeonatos entre empresas no estado do Paraná, e treinam três vezes por semana por duas horas. Estes indivíduos foram orientados a manter o mesmo tipo de treinamento realizado anteriormente à suplementação, e foram orientados a informar qualquer mudança desta durante o período do estudo.

3.3 QUESTIONÁRIO

Os indivíduos foram requisitados a responder questionário IPAQ (Questionário Internacional de Atividade Física) na versão longa (anexo 1). A variável usada para análise foi a atividade física total em METS.min (unidade de medida de gasto energético) e uma análise separada do tempo total sentado. O nível de atividade física foi classificado segundo proposta do IPAQ, a saber, **INSUFICIENTEMENTE ATIVO**: aquele que não realizou nenhum tipo de atividade física ou realizou algum tipo de atividade física, porém, não suficiente para se enquadrar nas outras categorias; **SUFICIENTEMENTE ATIVO**: aquele indivíduo que cumpriu tres ou mais dias de atividade vigorosa de pelo menos 20 minutos por dia ou 5 ou mais dias de atividades de intensidade moderada ou caminhadas de pelo menos 30 minutos por dia ou cinco ou mais dias de qualquer combinação de atividades entre caminhadas e atividades com intensidade moderada ou intensa alcançando um mínimo de pelo menos 600 MET- minutos/semana; **MUITO ATIVO**: aquele indivíduo que excede o mínimo exigido pelas recomendações para a prática de atividade física. Os dois critérios para classificação como muito ativos, são atividades de intensidade intensa em pelo menos tres dias da semana e acumulando pelo menos 1500 MET-

minutos/semana ou sete ou mais dias de qualquer combinação de atividades entre caminhadas e atividades com intensidade moderada ou intensa, alcançando um mínimo de pelo menos 1500 MET- minutos/semana (www.ipaq.ki.se). A versão longa do questionário IPAQ permite recolher informação detalhada da atividade física dispêndida em trabalhos domésticos, jardinagem, atividades ocupacionais, meios de transporte, atividade física de lazer e inatividade física (Craig, Marshall et al., 2003), sendo os totais de cada domínio somados e assim calculados o total de toda atividade física em minutos por semana. Os minutos são registrados por cada categoria de atividade, através dos MET definidos: (atividade física leve=3,3 MET; moderada= 4,0 MET; e intensa= 8,0 MET). Desta forma o somatório em MET de atividade física/semana foi calculado pela seguinte expressão: total de minutos de atividade física leve X 3,3 MET + total de minutos de atividade moderada X 4,0 MET + total de minutos de atividade intensa X 8,0 MET. Cada categoria tinha as variáveis dias/semana, horas/semana e minutos/semana. Os dados que não continham alguma ou nenhuma das respostas foi considerada perdida e codificada como zero. O questionário foi validado internacionalmente pelo centro de estudos do laboratório de aptidão física de São Caetano do Sul (CELAFISCS) em 2000.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS PLÁSMÁTICOS E IMUNITÁRIOS

3.4.1 Reagentes e Enzimas

Todos os componentes dos tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A. Concanavalina A e o meio de cultura (RPMI 1640) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. St. Louis (EUA). O antibiótico (penicilina e estreptomicina) e o soro fetal bovino da Gibco-Brasil. Os anticorpos monoclonais utilizados foram obtidos da Clontech - BD Bioscience, EUA. A [2-¹⁴C]-timidina (50 mCi/mmol) foi obtida da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company – Biotechnology Systems – EUA).

3.4.2 Coleta e separação das células sanguíneas

O sangue dos pacientes foi coletado em tubos previamente heparinizados e mantidos sob refrigeração. O sangue foi centrifugado no próprio tubo de coleta a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C (Eppendorf modelo 410R). Parte do plasma foi aliquotado e o restante transferido para outro tubo falcon de 50 ml, sendo adicionado o mesmo volume de tampão fosfato salina (PBS). Em outro conjunto de tubos foi pipetado 3 mL de Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics) e sobre estes acrescentados 8 mL de sangue diluído com PBS. Em seguida, procedeu-se a centrifugação a 1200 rpm durante 30 minutos a 12°C. Ao final desta foi desprezada a fase superior e transferida a camada intermediária para outro tubo; duas camadas intermediárias foram juntadas em cada tubo (volume 2 mL). **Linfócitos e Monócitos** - a camada constituída de hemáceas e células polimorfonucleares foi transferida para um tubo falcon capacidade de 50 mL. O volume do tubo contendo células polimorfonucleares foi completado com solução hemolítica com o volume de 50 mL e deixado em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Os linfócitos foram ressuspendidos em PBS e ao final dessa houve a contagem das células em câmara de Neubauer.

3.4.3 Cultivo dos linfócitos

Linfócitos ($1,4 \times 10^5$ células por poço) foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 UmL e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μ L) a 37^o C em atmosfera de 95% O₂ / 5% CO₂, por 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/poço de solução (5 μ g/mL) do mitógeno Concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após 48 h de cultivo, foram adicionados 20 μ l de uma solução contendo (2-¹⁴C)-timidina (0,02 μ Ci/poço) e as células cultivadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Ao final das 66 horas de cultivo, os linfócitos foram coletados automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papel de filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papel contendo os linfócitos com a radioatividade incorporada ao seu DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem (COM-contagem por minuto) em contador Beckman LS 6500.

3.4.4 Análise de Marcadores de Superfície

A determinação quantitativa dos marcadores de superfície para linfócitos T auxiliar (CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) foi realizada através de citometria de fluxo PIZATO *et al.* (2006). Linfócitos foram ressuspensos em PBS e incubados por 30 minutos com anticorpos monoclonais contra CD4⁺, marcado com *Phycoerythrin* - PE (fluorescência laranja-avermelhada; detector FL2; 585 \pm 42 nm) e contra CD8⁺, marcado com *Fluorescein Isothiocyanate* - FITC (fluorescência verde; detector FL1; 530 \pm 30 nm). O excesso de anticorpos foi removido pela lavagem com tampão azida PBS (0,05%).

3.5 METODOLOGIA DOS ENSAIOS PARA NEUTRÓFILOS

3.5.1 Soluções

Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador foi o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consistiu de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro (Sigma) foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 mL de DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e a solução para uso de rotina é 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, consiste 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, e previamente adiciona-se 0,05% de zymosan (2,3 x 10⁸ partículas/mL - Sigma), para os ensaios de fagocitose. Obtém-se a solução diluindo-se 40 mg de zymosan em 6 ml de PBS e adicionando-se 600 µL de vermelho neutro.

3.5.2 Mensuração do ânion superóxido

A geração de superóxido foi estimada 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 *et al.*, 1994). Os neutrófilos (150 µL) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT e 10 µL de PMA (80 µM) em PBS a 37 °C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 300 µL de ácido acético a 50% e sonificado (1 pulso). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000). Os dados foram expressos em % de ânion superóxido por número de células.

3.5.3 Volume lisossomal

Para esta análise foi utilizado o método descrito por PIPE *et al.* (1995), onde em placa do tipo ELISA depositou-se 100 μ L da solução de neutrófilos e se adicionou 20 μ L da solução estoque de vermelho neutro (20 mg de vermelho neutro em 1 ml de DMSO) a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os orifícios lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 μ L de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após 30 minutos, a absorbância foi mensurada a 550 nm utilizando-se o “Microplate reader Bio-rad” (Benchmark).

3.6 ANÁLISES PLASMÁTICAS

3.6.1 Determinações plasmáticas

A concentração de glicose circulante foi determinada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o Kit Glicose da BioTécnica segundo Trinder, 1969 e quantificada pela medida de absorvância em 505 nm. A concentração do colesterol total, HDL colesterol e triacilglicerol foi medida pelo Kit da Bioliquid descrito por Jung et al. e Young, respectivamente, e com leitura de absorvância a 500 nm (colesterol) e 540 nm (triacilglicerol) respectivamente. O lactato sérico foi determinado pelo método enzimático segundo Eagle & Jones, 1978 e com leitura de absorvância a 340 nm. Todos os kits foram utilizados segundo as informações do fabricante, cujos procedimentos técnicos utilizados seguiram os protocolos descritos nos kits comercialmente disponíveis.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram submetidos inicialmente a análise de variância de uma via (ANOVA) com pós teste de Tukey. Quando foi necessário aplicamos também o teste “t” de student pareado e não pareado, com nível de significância para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A classificação encontrada de atividade física no teste de IPAQ (Questionário Internacional de Atividade Física) na versão longa (Anexo 2), em METS min/semana, foi de atividade física intensa (Tabela 3) dos indivíduos dos grupos T (n=9) e TS (n=19).

QUADRO 4. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS NO DIA ZERO

POPULAÇÃO	T0	EPM (T0)	EPM TS0	EPM (TS0)
IPAQ- INTENSA (1500 MET – min/semana)	1625 MET – min/semana	0,981	1689 MET- min/semana	1,023
N	9	-	19	-
IMC (Kg/m ²)	13,99	1,121	13,53	1,237
% GORDURA CORPORAL	15,92	1,312	15,66	1,345
% INGESTÃO DE GORDURA	30,95	1,093	30,18	1,131

A proliferação de linfócitos sanguíneos (%) obtidos dos indivíduos não suplementados antes ou ao final de 60 dias de exercício, não foi diferente (T0 x T60). Os indivíduos treinados suplementados com 2 g de óleo de peixe ao final de 60 dias (TS60) apresentaram proliferação linfocitária 2,63 vezes maior quando comparado o grupo TS0 e de 2,51 vezes maior entre o grupo T60 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos, no início do experimento treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) ($p > 0,05$) (Figura 4).

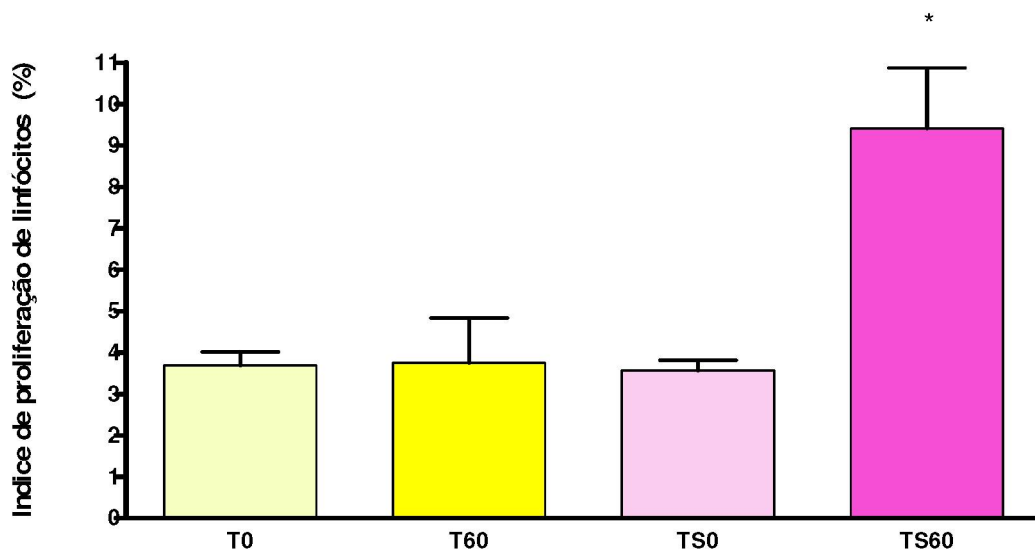


Figura 4. Proliferação dos linfócitos sanguíneos (%) dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 3 (T0, T60) e 6 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * $p < 0,05$ vs T60 e TS60.

QUADRO 5. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	3,690	3,753	3,570	9,415
\pm EPM	0,330	1,081	0,242	1,463
N	3	3	6	6

A população CD4⁺ (Figura 5) no dia zero de suplementação foi de 2,93% em 10⁴ eventos (TS0) ao final de 60 dias (TS60), esta população elevou-se para 10,4%, o que significou num aumento de 3,58 vezes (p<0,05). Ainda, quando comparado ao grupo sem suplementação ao final de 60 dias (T60), o aumento foi de 3,83 vezes (p<0,05). Não houve diferença significativa entre os grupos no início do experimento, treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) (p>0,05).

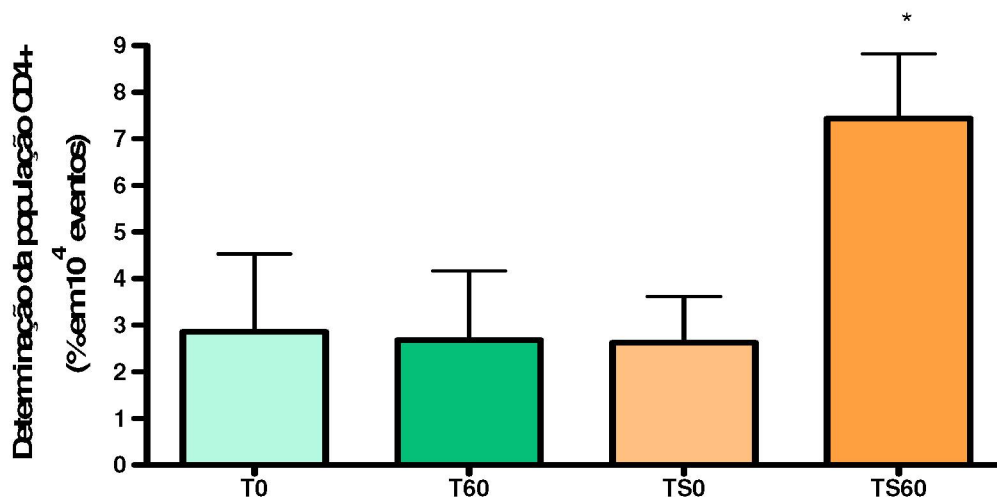


Figura 5. Determinação da população linfocitária CD4⁺ circulante dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média ± EPM de 3 (T0, T60) e 7 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * p < 0,05 vs T60 e TS60.

QUADRO 6. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DETERMINAÇÃO POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA CD4⁺

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	2,857	2,680	2,931	10,370
±EPM	1,672	1,490	0,905	3,165
N	3	3	7	7

A determinação quantitativa da população de linfócitos CD8⁺ (Figura 6) representada em % células no dia zero de suplementação foi de 8,5% em 10⁴ eventos (TS0) ao final de 60 dias (TS60), esta população diminuiu para 6,1%, o que significou numa redução em 1,4 vezes (p<0,05). O mesmo foi observado quando comparado ao grupo não suplementado ao final de 60 dias (T60) (p<0,05). Não houve diferença significativa entre os grupos, no início do experimento treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) (p>0,05).

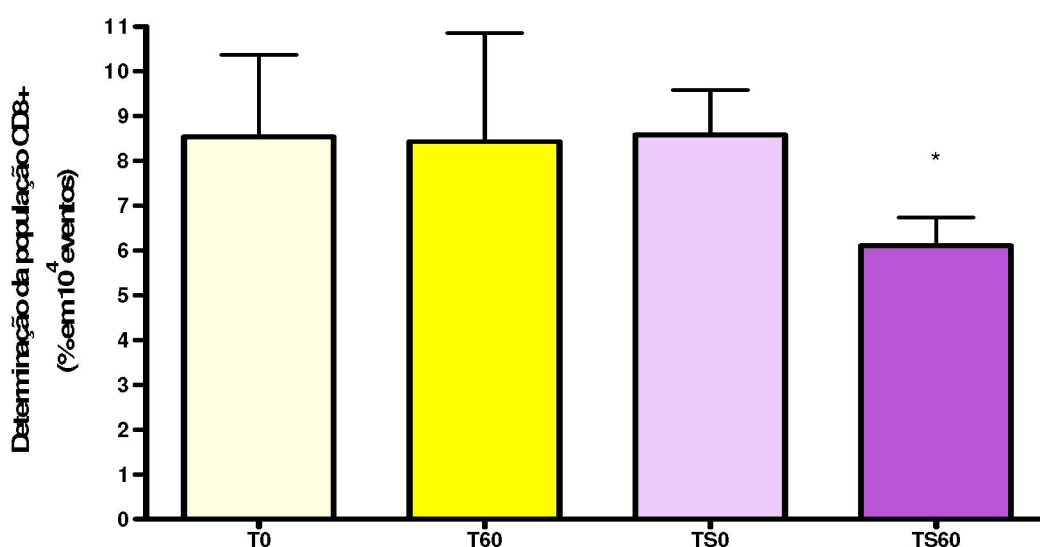


Figura 6. Determinação da população linfocitária CD8⁺ circulante dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média ± EPM de 4 (T0, T60) e 13 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * p < 0,05 vs T60 e TS60.

QUADRO 7. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO POPULAÇÃO LINFOCITÁRIA CD8⁺

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	8,535	8,430	8,576	6,105
±EPM	1,834	2,419	1,004	0,627
N	4	4	13	13

A produção de ânion superóxido pelos neutrófilos sanguíneos (Figura 7) no dia zero da suplementação foi de 0,12% em absorbância 10^5 células (TS0) ao final de 60 dias (TS60), esta população elevou-se para 0,28%, o que significou num aumento de 2,3 vezes $p < 0,05$. O mesmo foi observado quando comparado ao grupo treinado não suplementado ao final de 60 dias (T60) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos, no início do experimento treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) ($p > 0,05$).

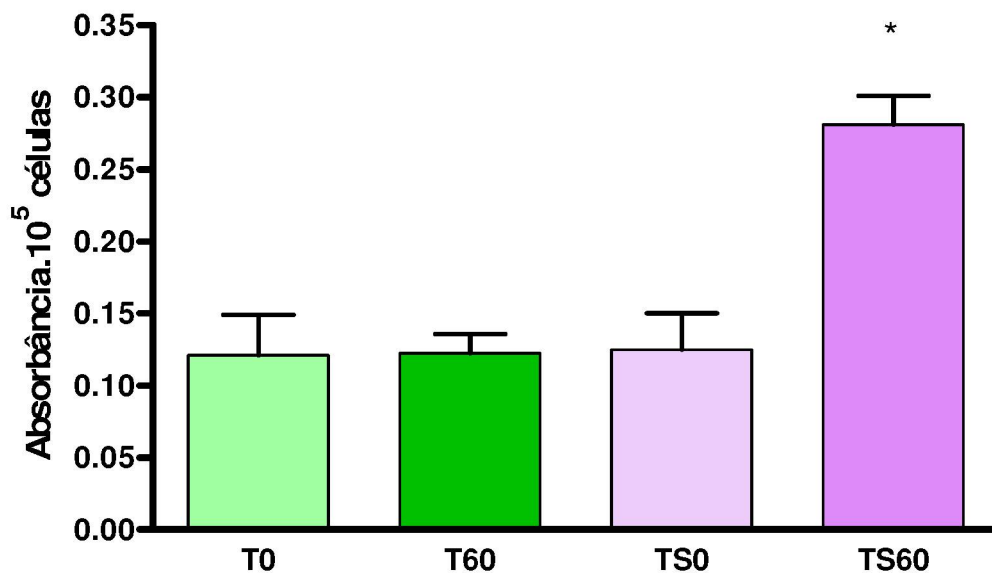


Figura 7. Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos sanguíneos dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 5 (T0, T60) e 19 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * $p < 0,05$ vs T60 e TS60.

QUADRO 8. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA PRODUÇÃO ÂNION SUPERÓXIDO PELOS NEUTRÓFILOS

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	0,1211	0,1222	0,1249	0,2810
\pm EPM	0,027	0,0135	0,0251	0,0200
N	5	5	19	19

O volume lisossomal (Figura 8) pelos neutrófilos sanguíneos no dia zero da suplementação foi de 0,18 em absorbância.10⁵ células (TS0) ao final de 60 dias (TS60), esta população elevou-se para 0,23, o que significou num aumento de 1,26 vezes $p < 0,05$. O mesmo foi observado quando comparado ao grupo treinado não suplementado ao final de 60 dias (T60) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos, no início do experimento treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) ($p > 0,05$).

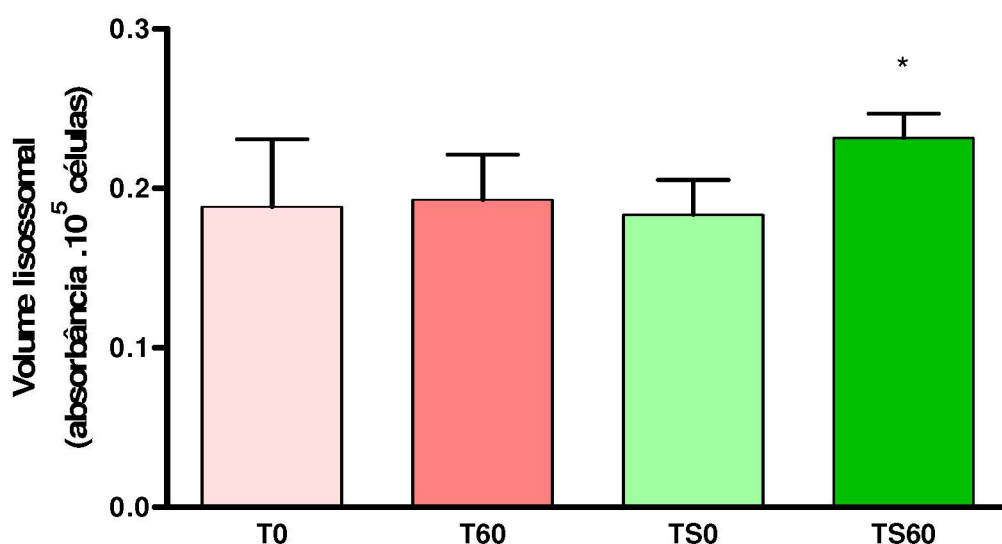


Figura 8. Volume lisossomal dos neutrófilos sanguíneos dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 8 (T0, T60) e 19 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * $p < 0,05$ vs T60 e TS60.

QUADRO 9. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO VOLUME LISOSSOMAL

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	0,1884	0,1930	0,1836	0,2316
\pm EPM	0,0425	0,0282	0,0218	0,0153
N	8	8	19	19

A concentração plasmática de colesterol (mg/dl) nos indivíduos do grupo treinado suplementado no dia zero foi de 157,8 (Figura 9). Ao final de 60 dias de suplementação com óleo de peixe a concentração de colesterol foi de 142,4, o que significou numa queda de 1,10 vezes ($p < 0,05$). Quando comparado ao grupo treinado não suplementado ao final de 60 dias (T60) essa redução foi de 1,08, contudo não foi significativa ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos, no início do experimento treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) ($p > 0,05$).

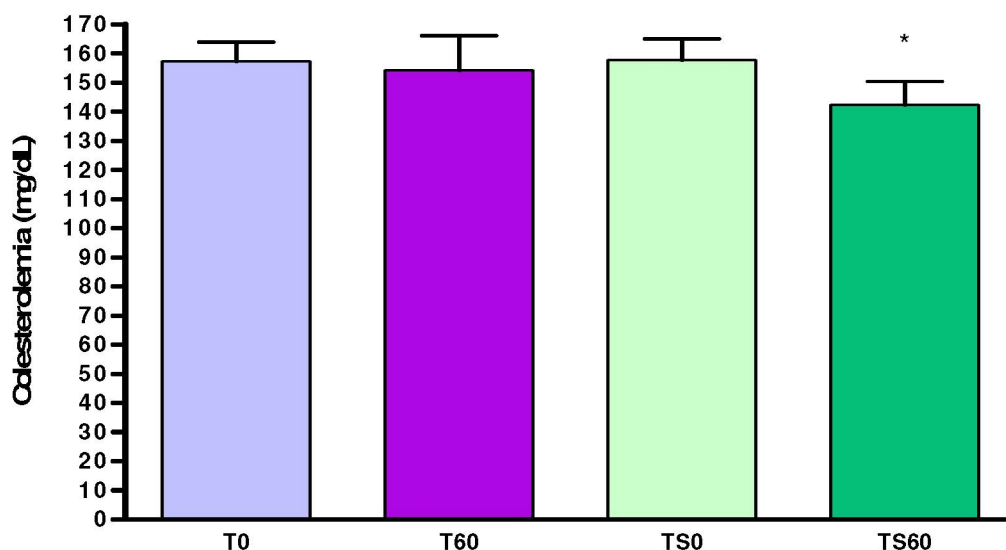


Figura 9. Concentração plasmática de colesterol dos indivíduos dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 8 (T0, T60) e 16 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * $p < 0,05$ vs T60 e TS60.

QUADRO 10. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL

Dados	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	157,3	154,2	157,8	142,4
\pm EPM	6,56	11,89	7,18	8,01
N	8	8	16	16

A concentração plasmática de colesterol HDL (mg/dl) não foi diferente entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 10).

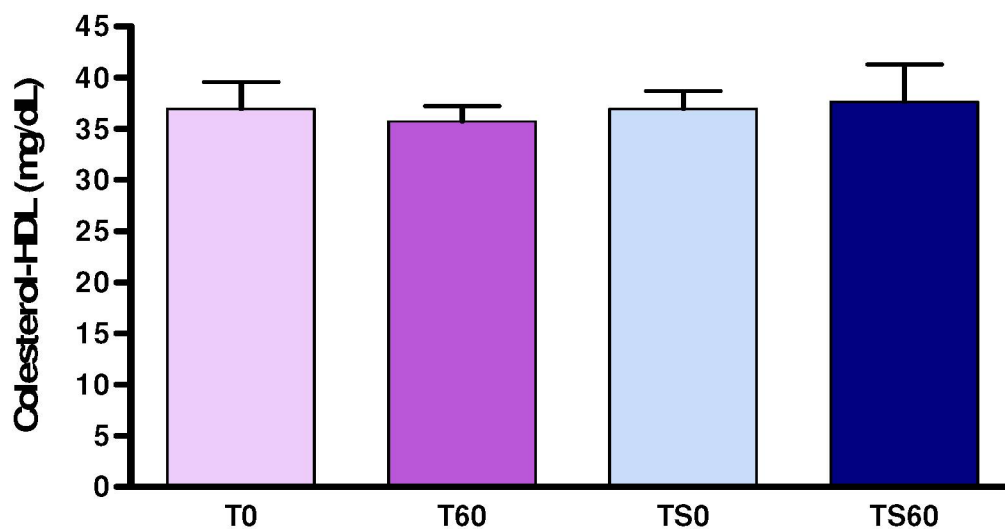


Figura 10. Concentração plasmática de colesterol HDL (mg/dl) dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 5 (T0, T60) e 13 (TS0, TS60) indivíduos por grupo.

QUADRO 11. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL HDL

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	31,97	35,72	39,96	37,65
\pm EPM	2,605	1,524	1,758	3,621
N	5	5	13	13

A concentração plasmática de triacilglicerol (mg/dl) nos indivíduos do grupo treinado suplementado no dia zero foi de 123,5 (Figura 11). Ao final de 60 dias de suplementação com óleo de peixe a concentração de colesterol foi de 86,7, o que significou numa queda de 1,4 vezes ($p < 0,05$). O mesmo foi observado quando comparado ao grupo treinado não suplementado ao final de 60 dias (T60) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos, no início do experimento treinado não suplementado (T0) e ao final de 60 dias (T60), bem como quando comparado ao grupo treinado suplementado no dia zero (TS0) ($p > 0,05$).

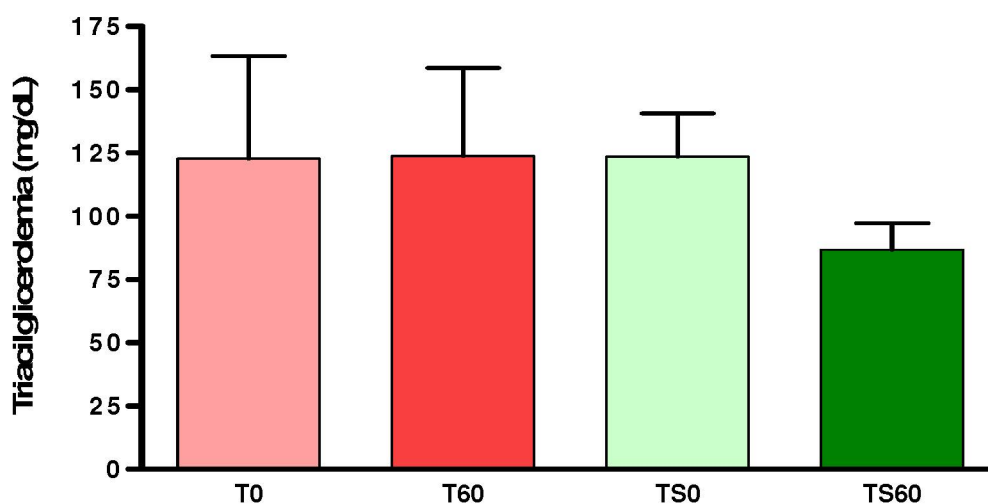


Figura 11: Concentração plasmática de triacilglicerol (mg/dl) dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 5 (T0, T60) e 15 (TS0, TS60) indivíduos por grupo. * $p < 0,05$ vs T60 e TS60.

QUADRO 12. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TRIACILGLICEROL

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	122,9	123,8	123,5	86,77
\pm EPM	40,39	34,79	17,17	10,49
N	5	5	15	15

A concentração plasmática de glicose (mg/ dl) não foi diferente entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 12).

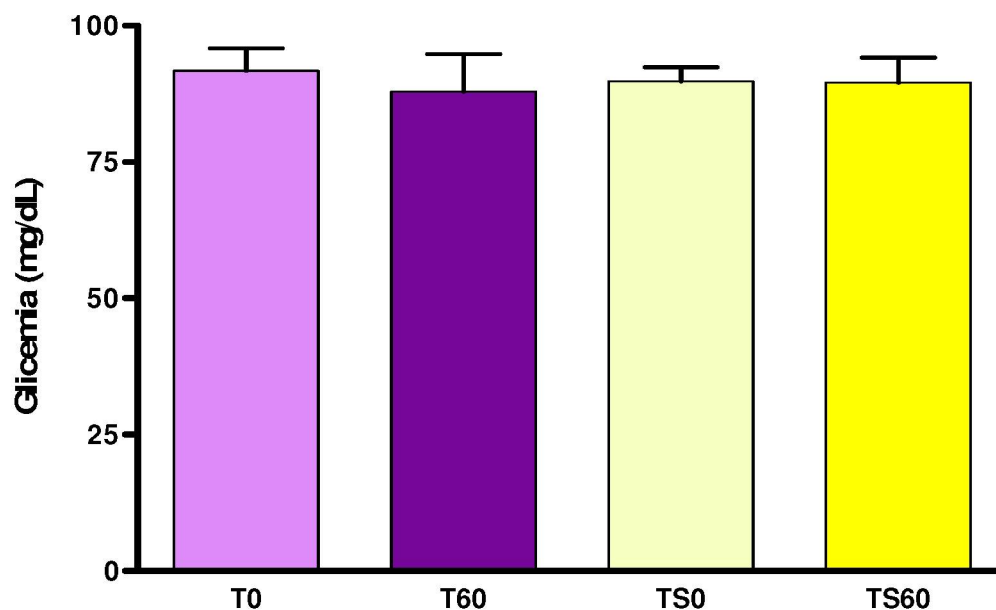


Figura 12. Concentração plasmática de glicose (mg/dl) dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 8 (T0, T60) e 17 (TS0, TS60) indivíduos por grupo.

QUADRO 13. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	91,73	87,94	89,82	89,54
\pm EPM	4,121	6,822	2,578	4,561
N	8	8	17	17

Os concentração de lactato sanguíneo ($\mu\text{mol/l}$) não foi diferente entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 13).

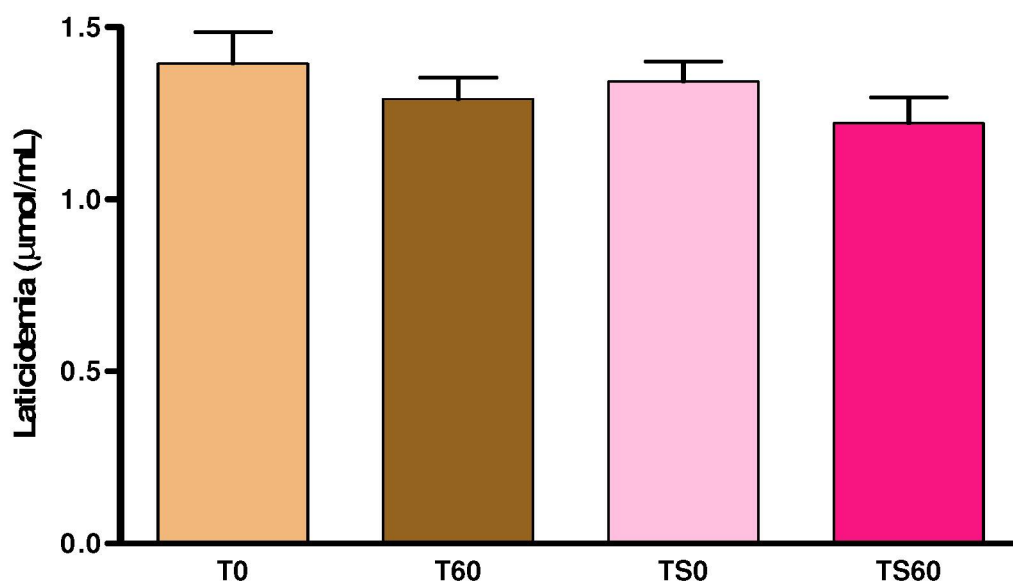


Figura 13. Concentração plasmática de lactato dos indivíduos treinados não suplementados no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60), treinados e suplementados com óleo de peixe no dia zero (TS0) e após 60 dias (TS60). Os dados representam a média \pm EPM de 6 (T0, T60) e 19 (TS0, TS60) indivíduos por grupo.

QUADRO 14. MÉDIA, EPM E N DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE LACTATO

DADOS	T0	T60	TS0	TS60
MÉDIA	1,395	1,292	1,342	1,221
\pm EPM	0,0908	0,0622	0,0573	0,074
N	6	6	19	19

6 DISCUSSÃO

Ácidos graxos são importantes constituintes das células, exercendo função estrutural, energética, sinalizadora, imunitária, entre outras. Os ácidos graxos n-3 e n-6, em especial, têm a habilidade de modularem a resposta imunitária (CURI, 2002). Outro fator que tem a mesma habilidade é a atividade física. Se praticada com intensidade leve até moderada tem ação estimulatória, se com alta intensidade tem efeito imunossupressor, levando a diminuição da proliferação dos linfócitos, atividade dos neutrófilos, razão $CD4^+/CD8^+$ e a produção de anticorpos (NIEMAN, 2001) e (MACKINNON, 2000).

Neste estudo, indivíduos humanos adultos praticantes de atividade física intensa, suplementados com 2g por dia de óleo de peixe rico em ácido graxo n-3, durante 60 dias, foram avaliados quanto a possível ou não associação da dieta e atividade física como potencializadores da imunomodulação.

A confirmação da intensidade física foi demonstrada no quadro 4 pelo teste de IPAQ. Os indivíduos treinados no início (T0) e ao final de 60 dias (T60) não tiveram alteração da proliferação dos linfócitos, o que demonstra que o exercício não causou, ao longo do treinamento, imunossupressão (Figura 4). A associação da atividade física com a suplementação com óleo de peixe (TS60) pós 60 dias elevou a proliferação linfocitária em 2,6 vezes (Figura 4), a população $CD4^+$ em 3,5 vezes (Figura 5) e a redução da população $CD8^+$ em 1,4 vezes (Figura 6). Estes achados nos sugerem que a associação da dieta com a atividade física foi hábil em elevar a resposta proliferativa dos linfócitos bem como da população $CD4^+$. O efeito da diminuição das células $CD8^+$ em 1,4 vezes e o aumento das células $CD4^+$ em 3,5 promoveu de forma modesta a razão $CD4^+/CD8^+$. Tem sido demonstrado que óleo de peixe, rico em ácido graxo n-3, tem capacidade estimulatória (ROBINSON et. al., 2001, CALDER, 1995 e CALDER, et al., 2002) ou inibitória (THIES et al, 2001, SANDERSON, et al., 1993; CALDER, 1995) sobre o sistema de defesa. As diferentes respostas nestes estudos são explicadas pela dose usada de ácido graxo n-3, onde os estudos que utilizaram doses baixas tiveram ação imunoestimulatória e àqueles que utilizaram doses altas, ações inibitórias.

Arrington e colaboradores (2001) mostraram que a dieta com ácidos graxos poliinsaturados modula a ativação de subsets de células T, em camundongos. Quando linfócitos esplênicos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, obtidos de camundongos alimentados com dieta com 2% foram analisados quando a proliferação, foi

demonstrado que a dieta com ômega-3 aumentou a população Th2 CD4⁺ via IL-4 e diminuiu a IL-2 que induziria ao fenótipo Th1. Colocando isto em outras palavras, temos que os efeitos anti-inflamatórios dos ácidos graxos n-3 podem resultar tanto da supressão direta da ativação das células Th1 IL-2 induzida e a supressão indireta das células Th1 por função regulatória cruzada elevada das células Th2.

Ácidos graxos de cadeia longa, EPA e DHA, são os principais componentes do óleo de peixe. Quando administrados isolados tem efeitos distintos. Quando DHA é administrado a camundongos, há uma relação oposta entre DHA e expressão de CD4⁺ e CD8⁺. Em outras palavras, a medida que a concentração de DHA elevou-se foi observado redução na expressão dos marcadores de superfície CD4⁺ e CD8⁺ (SASAKI, 1999). Interessantemente, este ácido graxo de cadeia longa eleva o número de linfócios CD28⁺, ou seja, há uma imunomodulação negativa para CD4⁺, CD8⁺ e positiva para CD28⁺. Portanto, a expressão reduzida dessas moléculas de superfície envolvidas na proliferação das células T tem sérias implicações no papel do DHA como imunossupressor (SASAKI, 2006).

O mecanismo pelo qual o ácido graxo n-3 altera a proliferação das células T ainda não está claro. Um possível mecanismo de ação é pela síntese de eicosanóides. Prostaglandina E₂ derivada do ácido araquidônico é imunoestimulador e os derivados do EPA, a prostaglandina E₃, não tem efeito imunoestimulador (CALDER, 1995). Assim, a ingestão de EPA diminuiu a produção dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico e aumentou à dos derivados do EPA. Como esses eicosanóides regulam a proliferação de linfócitos, a alteração da produção desses eicosanóides não foi suficiente para reduzir a proliferação de linfócitos como esperado pela ação do EPA. Como a dose que administramos aos atletas não foi elevada esta, possivelmente, teve o efeito estimulador já demonstrado em outros estudos. Outros possíveis mecanismos podem participar desta resposta não devem ser descartados e devem ser investigados. Em adição ao aumento da proliferação das células T, também encontramos diminuição da proporção de células CD8⁺. Como as células CD8⁺ podem agir como supressoras da resposta imunitária, a diminuição do número dessas células pode ser responsável pelo aumento da resposta proliferativa das células T (CALDER, 2002).

Os neutrófilos representam 50-60% do *pool* de leucócitos circulantes e destróem o agente invasor por fagocitado e pela produção de radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio.

Na figura 7, houve aumento da produção de ânion superóxido de hidrogênio quando o grupo treinado suplementado ao final de 60 dias (TS60), foi comparado com os grupos T60 e TS0, com diferença estatística ($p < 0,05$).

Uma das explicações para que ocorra o aumento da produção de ânion superóxido de hidrogênio de neutrófilos no grupo suplementado com óleo de peixe é de que as enzimas que resultam na síntese de ânion superóxido são reguladas por eicosanóides, citocinas, como os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ômega 3 afetam na produção de eicosanóides e citocinas, e estas, podem afetar a produção das espécies reativas do oxigênio e estes compostos são capazes de regular as atividades citotóxica dos neutrófilos (CALDER, 2001).

Observamos que houve também aumento da retenção lisossomal de neutrófilos em indivíduos suplementados com óleo de peixe (TS60), esta elevou-se de 1,26 vezes quando comparada à dos grupos T60 e TS0 (Figura 8). Uma possível explicação pode ser o fato de que as dietas em n-3 podem diminuir a síntese de leucotrienos da série B4, já que a via metabólica do n-3 estimulam o leucotrienos da série ímpar e n-6 da série par, devida a natureza competitiva entre n-3 e n-6, a suplementação de n-3 inibiria os leucotrienos da série B4, os quais são considerados agentes desgranuladores, dessa forma, pode haver uma maior retenção lisossomos (CURI, 2002).

Apesar das hipóteses serem favoráveis a uma imunestimulação positiva, é importante ressaltar que a presença de antioxidantes na dieta, atividade física de alta intensidade, nutrição desbalanceada, com deficiências de alguns nutrientes podem também influenciar na funcionalidade das células do sistema imunitário. Philpott & Ferguson (2004) em uma grande revisão associaram a nutrição ao sistema imunitário trazendo benefícios ou malefícios sobre o sistema imune. Por isso muitos resultados obtidos sobre os efeitos dos lipídeos no sistema imune, algumas vezes não devem ser comparados.

Tem sido demonstrado que tanto exercício aeróbico quanto a ingestão de óleo de peixe são capazes de reduzir os lipídeos do plasma (CURI, 2002). Yeater e cols., 1989 demonstraram que a combinação de ambas abordagens foi hábil em reduzir a concentração de colesterol-LDL. Em nosso trabalho, demonstramos que a concentração de colesterol total (Figura 9) e de triacilglicerol (Figura 11) na circulação também foram reduzidas quando da associação de exercício e óleo de peixe, o que se soma aos achados dos estudos de Yeater e colaboradores (1989). Por outro lado, não houve alteração na concentração de HDL-colesterol (Figura 10).

Tem sido defendido por muitos estudos o uso de ômega-3 e exercício no tratamento de dislipidemias devido aos seus efeitos de elevar a concentração de HDL-colesterol (STANTON, 1997). No nosso trabalho não fomos capazes de demonstrar este fenômeno porque nossos indivíduos já eram praticantes de atividade física. O que os dados nos permitem mostrar foi que a associação de suplementação e atividade física não foi hábil em elevar a concentração do HDL, mas foi eficaz em reduzir os lipídeos que são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular e tem sido observado em pacientes cardíacos (PATSCHE, 1992). De fato, Smith (2004) estudou em indivíduos recreacionalmente ativos o efeito da atividade física combinada com ácido graxo n-3. Eles observaram um efeito aditivo desta abordagem em reduzir a lipemia pós-prandial após uma refeição rica em gordura. Outro trabalho que examinou também a mesma abordagem foi o de Thomas (2000), contudo em indivíduos sedentários. Estes encontraram que os efeitos observados em indivíduos treinados não acontecem em sedentários. Estes dois dados contraditórios nos permitem sugerir que indivíduos ativos podem realmente experimentar maior benefício da combinação de suplementação e atividade física quanto a redução da lipemia. Baseado nestas informações é justo perguntar se indivíduos sedentários praticarem exercícios e forem suplementados com ômega-3 quando tempo demorará a ser observado os efeitos benéficos demonstrados? Esta resposta pode ser obtida ao analisar-se o trabalho de Warner (1989). Estes autores examinaram o efeito combinado de 12 semanas de treinamento de exercício aeróbico com suplementação com ômega-3 sobre os lipídeos de indivíduos sedentários hiperlipidêmicos. Eles mostram que após 4 semanas já foi encontrado o efeito benéfico desta combinação. Portanto, podemos responder a questão acima que os efeitos benéficos ocorrem rapidamente, em menos de 4 semanas, em indivíduos sedentários. Estes dados e os nossos representam os efeitos em curto prazo desta combinação e no nosso caso, indivíduos treinados. Seria interessante no futuro alguém examinar a combinação de ambas as abordagens e seus efeitos em longo prazo. Em adição e talvez tão importante ou mais, seria qual o efeito desta combinação em prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Obviamente estas questões devem ser examinadas no futuro.

Não encontramos nenhuma alteração na glicemia e lactacidemia (Figuras 12 e 13), como seria de se esperar. Ou seja, não houve nenhuma modificação nestes importantes parâmetros que são alterados na presença de atividade física ou de

ingestão de gordura. Em adição, por estarmos ministrando ácido graxo poliinsaturado, os quais são mais propensos a peroxidação, é legítimo perguntar se não estaríamos tendo como efeito colateral a pró-oxidação tecidual e celular. Na verdade, Atalay e colaboradores (2000) demonstraram que ratos, em repouso ou após exercício agudo, quando suplementados com óleo de peixe, apresentaram maior atividade da catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase no fígado e porção vermelha do músculo gastrocnêmio. Em outras palavras, mesmo tendo maior incorporação de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas, os tecidos tem sua “bateria” anti-oxidante melhorada. O mecanismo molecular que leva a este fenômeno não é sabido e necessita ser determinado.

7 CONCLUSÃO

A associação da suplementação com óleo de peixe a atividade física, nestes indivíduos, foi hábil em aumentar função de neutrófilos, proliferação de linfócitos CD4⁺ e reduzir a de CD8⁺. Ainda, reduzir a concentração de lipídeos envolvidos com risco de doenças cardiovasculares. Sendo assim, parece lícito afirmar que o óleo de peixe pode ser utilizado como coadjuvante, no combate de doenças do ITRS, aliando estratégias anti-sedentarismo e hábitos alimentares saudáveis, na busca da melhoria na qualidade de vida, dos indivíduos com desordens imunitária e nos permitem sugerir que indivíduos ativos podem realmente experimentar maior benefício da combinação de suplementação e atividade física quanto a redução da lipemia.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª Ed.(traduzida)-Rio de Janeiro –RJ, Elsevier, 580p, 2005.

AKIMOTO, T.; AKAMA, T.; TATSUNO, M.; SAITO, M.; KONO, I. **Effect of brief maximal exercise on circulating levels of interleukin-12**. Eur J Appl Physiol.81(6):510-2, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.;WALTER, P. **Fundamentos de biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Artmed, Porto Alegre, 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ªed., Artmed, Porto Alegre, 1997

ANDERSON. M., FRITSCHKE K.L. **(n-3) Fatty accids and infections disease resistance**. American Society for nutritional sciences, 2002.

ASCHERIO A. **Epidemiologic studies on dietary fats and coronary heart disease**. Am J Med 2002;113(suppl):9S–12S.

ATALAY H., AYBEK H., KOSEOGLU M, DEMIR S, ERBAY H. **The effects of amifostine and dexamethasone on brain tissue lipid peroxidation during oxygen treatment of carbon monoxide-poisoned rats**. Adv Ther. 2006 Mar-Apr;23(2):332-41.

BACARAU, Reury Frank. **Nutrição e Suplementação Esportiva**. Edição 2000.

BENQUET, C; KRZYSTYNIAK, K; SAVARD, R; GRETTIN, F. **Modulation of exercise-induced immunosuppression by dietary**, 1994.

BERNADOT D. **Working with young athletes: views of a nutritionist of the sports medicine team**. Int J Sports Nutr 1996; 6: 110-20.

BROUGHTON KS, JOHNSON CS, PACE BK, LIEBMAN M, KLEPPINGER KM: **Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production**. Am J Clin Nutr 65:1011–1017, 1997.

CALDER P.C. **Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids** Proceeding of the nutrition society. 55: 737-774, 1996.

CALDER P.C. **N-3 polyunsaturated fatty acids and monoclear phafocyte function medicinal fatty acids in inflammation**, 1998.

CALDER P.C.. ***N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity.*** *World rev. Nutr. Diet. Basel, Karger.* 88: 109-116, 2001.

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

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.

COLBERT, L.H.; DAVIS, J.M.; ESSIG, D.A.; GHAFAR, A.; MAYER, E.P. ***Tissue expression and plasma concentrations of TNF-, IL-1_ and IL-6 following treadmill exercise in mice.*** *Int. J. Sports. Med.* 22:261-267, 2001.

CORDAIN L, MILLER JB, EATON SB, MANN N. ***Macronutrient estimations in hunter-gatherer diets.*** *Am J Clin Nutr* 2000;72:1589–90.

CORDAIN L, MILLER JB, EATON SB, MANN N, HOLT SH, SPETH JD. ***Plantanimal subsistence ratios and macronutrient energy estimations in worldwide hunter-gatherer diets.*** *Am J Clin Nutr* 2000;71:682–92

COX C, MANN J, SUTHERLAND W, BALL M. ***Individual variation in plasma cholesterol response to dietary saturated fat.*** *Br Med J* 1995;311:1260–4.

CURI, R., MIYASAKA C.K., POMPEIA C., PROCOPIO J. ***Entendendo a gordura-Os ácidos graxos,*** 2002.

DEHMER GJ, POPMA JJ, VAN DEN BERG EK, EICHHORN EJ, PREWITT JB, CAMPBELL WB, JENNINGS L, WILLERSON JT, SCHMITZ JM: ***Reduction in the rate of early restenosis after coronary angioplasty by a diet upplemented with n-3 fatty acids.*** *N Engl J Med* 319:733–40, 1988.

Department of Agriculture, US Department of Health and Human Services. Nutrition and your health: dietary guidelines for Americans. Home and garden bulletin no. 232. Washington, DC: US Government Printing Office, 1980.

ELEAKIN, A., KODESH, F., GAVRIELI, R., RADNAY, J., BEN-TOVIM, T., & FALK, B. ***Celular and humoral immune resposne to exercise among gymnasts and untrained girls.*** *Internacional Journal of Sports Medicine,* 18, 208-212, 1997.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. ***Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity.*** *Ann N Y Acad Sci.* 966:290-303, 2002.

ELENKOV, IJ; CHROUSOS, G.P. ***Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity.*** *Ann NY Acad Sci,* 966:290-303, 2002.

ENGLE PC and JONES JB: ***Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assay involving the use of NAD+ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites,*** *Anal Biochem* 88, 475-484, 1978.

FAHLMAN, M.M., ENGLER, H.F., MORGAN, A.L. AND KOLOKOURI, I. (2001) **Mucosal IgA response to repeated Wingate tests in females.** *International Journal of Sports Medicine* **22**, 27-131.

FERNANDES, L.C. **Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos.** Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 1995.

FOSTER, C. (1998) **Monitoring training in athletes in reference to overtraining syndrome.** *Medicine and Science in Sports and Exercise* **30**, 1164-1168.

GALLAI *et al.*, **Cytokine secretion and eicosanoid production in the peripheral blood mononuclear cells of Ms patients undergoing dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Neuroimmunol*, **56**: 143-153, 1993.

GANNON GA, Shek PN, SHEPARD RJ: **Natural killer cells: modulation by intensity and duration of exercise.** *Exerc Immunol Rev* 1995, **1**:26-48.

GREEN R.J.. **Immune function in the marathon runner.** *Ann allergy*. **47**: 73-75, 1981

GLEESON M., PYNE D.B.. **Exercise effects on mucosal immunity.** *Immunology and cell biology*. **78**: 536-544, 2000.

GLEESON, M., MCDONALD, W.A., PYNE, D.B., CRIPPS, A.W., FRANCIS, I.L., FRECKERS, P.A. AND CLANCY, R.L. (1999) **Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers.** *Medicine and Science in Sports and Exercise* **31**, 67-73.

GLEESON, M. AND PYNE, D.B. (2000) **Special features for the Olympics: effects of exercise on the immune system exercise effects on mucosal immunity.** *Immunology and Cell Biology* **78**, 536-544.

HANNET I, ERKELLER-YUKSEL F, LYDYARD P, DENEYS V, DE BRUYERE M: **Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations.** *Immunol Today* 1992, **13**:215-218.

JOHNSON WA, LAUNDRY GL. **Nutritional supplements: facts vs. fiction.** *Adolesc Med* 1998; **9**: 501-13. *Nutrição e atividade física - Juzwiak CR et alii*

JOHNSON WA, LAUNDRY GL. **Nutritional supplements: facts vs. fiction.** *Adolesc Med* 1998; **9**: 501-13. *Nutrição e atividade física - Juzwiak CR et alii*

JONSDOTTIR JH: **Exercise immunology: Neuroendocrine regulation of NK cells.** *Int Sports Med* 2000, **21**(Suppl):S20-S23.

KEAST, D *et al.*, **Exercise and the immune response.**- 1988

KRAEMER WJ: **Lymphocyte subpopulations in lymphoid organs of rats after acute resistance exercise.** *Med & Sci in Sports & Exercise* 1999, **31**:74-81.

KREMER J.M., JUBIZ W., MICHALEK A.. **Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis.** *Ann intern med*. **106**: 497-503, 1987.

KEHN P, FERNANDES G: ***The importance of omega-3 fatty acids in the attenuation of immuno-mediated diseases.*** J Clin Immunol 21:99–101, 2001.

KONIG D, VAISANEN SB, BOUCHARD C, *et al.* ***Cardiorespiratory fitness modifies the association between dietary fat intake and plasma fatty acids.*** Eur J Clin Nutr 2003;57:810.

KOZAWA O, SUZUKI A, TOKUDA H, AND UEMATSU T. ***Prostaglandin F₂ stimulates interleukin-6 synthesis via activation of PKC in osteoblast-like cells.*** Am J Physiol Endocrinol Metab 272:E208–E211, 1997

KROMANN N., GREEN A., ***Epidemiological studies in the upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases.*** 1950-1974. Acta. Med. Scand. 208: 401-406, 1980.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. CAPRA, J. D. ***Imunobiologia: osistema imunológico na saúde e na doença.*** Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.100

JUNG DH, BIGGS HG, AND MOOREHEAD WR: ***Colorimetry of serum cholesterol with use of ferric acetate/uranyl acetate and ferrous sulfate/sulfuric acid reagents.*** Clin Chem 21, 1526-1530, 1975.

KEAST, D CAMERON, K, MORTON, A. R. ***Exercise and immune response.*** Sport Med 5: 248-267, 1988.

LADA AT, RUDEL LL. ***Dietary monounsaturated versus polyunsaturated dietary saturated fatty acids: which is really better for protection from coronary heart disease?*** Curr Opin Lipidol 2003;14:41–6.

LANDS WEN ***Formação de mediadores químicos a partir de ácidos graxos n-3 e n-6,*** 1998.

LAKIER SMITH, L. ***Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: is this a T helper-1 versus T helper-2 lymphocyte response?*** Sports Med.33(5):347-64, 2003.

LOCKE CA, STOLL AL: ***Omega-3 fatty acids in major depression.*** World Rev Nutr Diet 89:173–85, 20

LUTZ, M. BONILLA, S. CONCHA, J. *et al.* ***Efeitos dos óleos consumidos na dieta, colesterol e suplementação de vitamina antioxidante em ratos.*** Ann Nutr Metab, 42: 350-359, 1998

MAMALAKIS, *et al.* ***Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids,*** 2002

MCARDLE, W.D., KATCH F.I., KATCH V.L.. ***Fisiologia do exercício.*** Energia, nutrição e desempenho humano, 1998.

MACKINNON L.T. **Immunity in athletes.** Current challenges and future expectations in exercise immunology: back to the future. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 26:191, 1994)

MACKINNON L.T. **Immunity in athletes.** *Int. J. Sports Med.* 18: 62-68, 1997.

MACKINNON L.T.. **Overtraining effects on immunity and performances in athletes.** *Immunology and cell biology.* 78: 502-509, 2000.

MACKINNON, L.T. (1997) **Immunity in athletes.***International Journal of Sports Medicine* 18, 562-568.

MCDOWELL, S.L., HUGHES, R.A., HUGHES, R.J., HOUSH, D.J., HOUSH, T.J. AND JOHNSON, G.O. (1992) **The effect of exhaustive exercise on salivary immunoglobulin A.** *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 32, 412-415.

MANDEL I.D. & ELISSON S.A.**The isolation of a family of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva.-** 1982

MASTRO, A.M.; SCHLOSSER, D.A.; GROVE, D.S.; LINCOSKI, C.; PISHAK, S.A.,GORDON, S.; KRAEMER, W.J. **Lymphocyte subpopulations in lymphoid organs of rats after acute resistance exercise.** *Med. Sci. Sports Exerc.* 31:74-81, 1999.

MATARASE, G.; LA CAVA, A. **The intricate interface between immune system and metabolism.** *TRENDS in Immunol.* 25(4):193-200, 2004.

MOTTA M, MALAGUARNERA M, CARUSO C: **B cells in the aged: CD27,CD5 and CD40 expression.** *Mech Ageing Dev* 2003, 124:389-393.

NIEMAN D.C. **Exercise immunology. Nutritional countermeasures.** *Can. J. Appl. Physiol.* 26: 45-55, 2001.

NIEMAN D.C., PEDERSEN B.K.. **Exercise and immune function.** *Sports Med.* Feb. 27: 73-80, 1999.

NIEMAN DC, HENSON DA, SMITH LL, UTTER AC, VINCI DM, DAVIS JM, KAMINSKY DE, AND SHUTE M. **Cytokine changes after a marathon race.** *J Appl Physiol* 91: 109–114, 2001.

NIEMAN DC, NEHLSSEN-CANNARELLA SL, FAGOAGA OR, HENSON DA, UTTER A, DAVIS JM, WILLIAMS F, AND BUTTERWORTH DE. **Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion.** *Med Sci Sports Exerc* 30: 671–678, 1998.

NIEMAN DC, PETERS EM, HENSON DA, NEVINES EI, AND THOMPSON MM. **Influence of vitamin C supplementation on cytokine changes following an ultramarathon.** *J Interferon Cytokine Res* 20: 1029–1035, 2000.

NEIMAN, D.C., JOHANSEN L. M., LEE J. W. AND ARABATZIS K. (1990) **Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon.** *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 30, 31-328.

NEIMAN, D.C. (2000) ***Is infection risk linked to exercise workload?*** *Medicine and Science in Sports and Exercise* 32, S406-S411.

NIEMAN DC, PEDERSEN BK. ***Exercise and immune function. Recent developments.****Sports Med.* 27(2):73-80,1999.

NIEMAN, D.C.; COOK, V.D.; HENSON, D.A.; SUTTLES, J.; REJESKI, W.J.; RIBISL, P.M.; FAGOAGA, O.R.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. ***Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients.*** *Int. J. Sports Med.*16:334-337, 1995.106

OSTROWSKI K, ROHDE T, ASP S, SCHJERLING P, PEDERSON BK: ***The cytokine balance and strenuous exercise: TNF- α , IL-1 β , IL-6,IL-1 ra, sTNF-r1, sTNF-r2, and IL-10.*** *J Physiol* 1999, 515:287-291.

PACKER L. ***Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete.****J Sports Sci* 15: 353–363, 1997.

PATSCH W, SZKLO M, FOLSON AL, GOTTO A JR, NIETTO FG, SHIMAKUWA T, WIJNBERG L. ***Trends in plasma cholesterol levels in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study.*** *Prev Med.* 2000 Mar;30(3):252-9.

PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; OSTROWSKI, K.; KRABBE, K.; HANSEN, H.; KRZYWKOWSKI, K.; TOFT, A.; SONDERGAARD, S.R.; PETERSEN, E.W.; IBFELT, T.; SCHJERLING, P. ***Cytokines in aging and exercise.*** *Int. J. Sports Med.*21 Suppl. 1:S4-S9, 2000.107

PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. ***Effects of exercise on lymphocytes and cytokines.*** *Br.J Sports Med.* 34:246-51, 2000.

PETERS EM, ANDERSON R, NIEMAN DC, FICKL H, AND JOGESSARV. ***Vitamin C supplementation attenuates the increases in circulating cortisol, epinephrine and anti-inflammatory polypeptides following ultramarathon running.*** *Int J Sports Med* 22:537–543, 2002.

PETERS JC. ***Dietary fat and body weight control.*** *Lipids* 2003;38:123–7.

PETERSEN EW, OSTROWSKI K, IBFELT T, RICHELLE M, OFFORD E, HALKJAER-KRISTENSEN J, AND PEDERSEN BK. ***Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage.***

PHILPOT, M.; FERGUSON, L. R. ***Immunonutrition and cancer.*** *Mutation Research*, 551, p. 29-42, 2004..

PRICKETT JD, ROBINSON DR, STEINBERG AD: ***Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid upon autoimmune nephritis in female NZB _ NZW F1 mice.*** *Arthritis Rheum* 26:133–139,1983.

POWEL K.E., BLAIR S.N. ***The public health burden of sedentary living habits. Theoretical but realistic estimates.*** *Med Sci. Sports Exerc.* 26: 851-856, 1994.

POWERS, S.K.; HOWLEY, E.T. **Fisiologia do Exercício, Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho.** 1ª ed., Manole: Barueri-SP, 2000, 527p.

PYNE, D.B. AND GLEESON, M. (1998) **Effects of intensive exercise on immunity in athletes.** *International Journal of Sports Medicine* 19, S183-194.

ROBERGS, R.A.; ROBERTS, S.O. **Princípios Fundamentais de Fisiologia do Exercício para a aptidão, desempenho e saúde.** 1ª ed., Phorte editora: São Paulo-SP, 2002, 489 p.

ROGATTO, G.P.; LUCIANO, E. **Efeitos do treinamento físico intenso sobre o metabolismo de carboidratos.** *Atividade Física & Saúde* (6) 2:39-46, 2001.

ROBINSON, L. E.; FIELD, C. J. Dietary Long-Chain (n-3) **Fatty Acids Facilitate Immune Cell Activation in Sedentary, but not Wxercise-Trained Rats.** *J. Nutr.* 128:498-504, 1998.

ROUBENOFF, R.; McDERMOTT, a.; WEISS, L.; SURI, J.; WOOD, M.; BLOCH, R.; GORBACH, S. **Short-term progressive resistance training increases strength and lean body mass in adults infected with human immunodeficiency virus.** *AIDS.* 13:231-239,1999.

RYAN M. **Complete guide to sports nutrition.** Boulder, Col: Velopress; 1999.

SANDERS TA. **High- versus low-fat diets in human diseases.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:151-6.

SADERSAI, V. M.; **Nutritional role of polyunsaturated fatty acids.** *J Nutr Biochem* 3: 154-166, 1992.

SASAKI T, MAKINO Y. **Effective injection in pulsed splitless mode for impurity profiling of methamphetamine crystal by GC or GC/MS.** *Forensic Sci Int.* 2006 Jun 27;160(1):1-10. Epub 2005 Oct 3.

SASAKI T, NAKAMURA K, OGAWA K, ONISHI H, OTANI Y. **Postoperative Radiotherapy for Patients with Prostate Cancer in Japan;** Changing Trends in National Practice between 1996-98 and 1999-2001: Patterns of Care Study for Prostate Cancer.

SCHIMPL A, BERBERICH I, KNEITZ B, KRAMER S, SANTNER-NANAN B, WAGNER S, WOLF M, HUNIG T: **IL-2 and autoimmune disease.** *Cytokine & Growth Factor Rev* 2002, 13:369-378.

SHARP N.C.C., KOUTEDAKISY. **Sports and the overtraining syndrome.** Immunological aspects. *British Medical Bulletin.* 48: 518-533, 1992.

SHEN B-J, TODARO JF, NIAURA R, *et al.* **Are metabolic risk factors one unified syndrome? Modeling the structure of the metabolic syndrome X.** *Am J Epidemiol* 2003;157:701-11.

SHEPARD R.J., SHEK P.N.. **Heavy exercise nutrition and immune function; Is there a connection?** *Int. J. Sports Med.* 16: 491-497, 1995.

SHEPHARD, R.J., AND SHEK, P.N. (1993) ***Athletic competition and susceptibility to infection.*** *Clinical Journal of Sports Medicine* 3, 75-77.

SHILS, Maurice Edward. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.** Editora Manoele 2003.

SIMOPOULUS ^{AP}. ***The importance of the ration of omega-6/omega-3 essential fatty acids.*** *Biomed Pharmacother.* 56: 365-379, 2002.

SIMOPOULOS AP: ***Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development.*** *Am J Clin Nutr* 54:438–463, 1991.

SIMOPOULOS AP, KIFER RR, MARTIN RE, BARLOW SM (eds): ***“Health Effects of w3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods,”*** vol. 66, *World Rev Nutr Diet.* Basel: Karger, 1991.

SIMOPOULOS AP. ***Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*** 1999;60:421–9.

SIQUEIRA Jr J.F., DANTAS C.J.S. **Mecanismo celulares e moleculares da inflamação,** 2000

STANTON KG, DUSTAN DW, MORI TA, PUDDEY ID, BURKE V. ***The independent and combined effects of aerobic exercise and dietary fish intake on serum lipids and glycemic control in NIDDM. A randomized controlled study.*** *Diabetes Care.* 1997 Jun;20(6):913-21.

SUGIURA H, NISHIDA H, INABA R, MIRBOD SR, IWATA H: ***Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice.*** *Acta Physiol Scand* 2000, 168:413-420.

TAUBES G. ***The soft science of dietary fat.*** *Science* 2001;291:2535–41.

TENOVUO J., MOLDOVEANU Z., MESTECKYJ., PRUITT K.M. & MANSSON-RAHEMTULLA B. ***Interaction of specific and innate factors of immunity: IgA enhances the antimicrobial effect of the lactoperoxidase system against Streptococcus mutans.*** *J. immunol.* 128, 726, 1982.

THOMAS TR., SMITH BK, SUN GY., DONAHUE OM. ***Exercise plus n-3 fatty acids: Additive effect on Postprandial Lipemia.*** *Metabolism*, vol 53, no 10 (October), 2004:pp 1365-1371.

TIMOTHY D., MICKLEBOROUGH, PhD. (2006) ***Protective Effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in Asthma.*** *Asthma*

TOMASI, T.B., TRUDEAU, F.B., CZERWINSKE, D. AND ERREDGE,S. (1982) ***Immune parameters in athletes before and after strenuous exercise.*** *Journal of Clinical Immunology* 2, 173-178.

TRINDER P: ***Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with non-carcinogenic chromogen.*** *J Clin Pathol* 22, 158-161, 1969.

TWISK J.W.R., KEMPER H.C.G., VAN MECHELEN W. **Tracking of activity and fitness and the relationship with cardiovascular disease risk factors.** *Med Sci Sports Exerc.* 32: 1455-1461, 2000.

VELEZ-CARRASCO W, LICHTENSTEIN AH, WELTY FK, *et al.* **Dietary restriction of saturated fat and cholesterol decreases HDL ApoA-I secretion.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:918–24.

YEATER RA, WARNER GJR, ULLRICH IH. **Combined effects of aerobic exercise and omega-3 fatty acids in hyperlipidemic person.** *Med Sci Sports Exerc.* 1989 Oct;21(5):498-505.

YOUNG DS: **The effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests,** Washington, DC: AACC Press, 1993.

WEIDNER, T. AND SCHURR, T. (2003) **Effect of exercise on upper respiratory tract infection in sedentary subjects.** *British Journal of Sports Medicine* 37, 304-306. *Immune function in soccer players*

WESLEY Alexander J. *Immunonutrition. The role of w-3 fatty acid.* *Nutrition* 14: 7-8, 1998.

WILLIAN, MELVIN H. **Nutrição para saúde, condicionamento físico e desempenho esportivo.** 5ª ed., Manole, 138-177p, 2002

WILMORE, J. K.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício.** 1ª ed., Manole, Barueri-SP, 709p, 2001.

WOODS JA, CEDDIA MA, ZACK MD, LOWDER TW, LU Q: **Exercise training increases the naive to memory T cell ratio in old mice.** *Brain Behavior Immunity* 2003, 17:384-392.

WOODS, JA.; DAVIS, J.M.; SMITH, J.A., NIEMAN, D.C. **Exercise and cellular innate immune function.** *Med. Sci. Sports Exerc.* 31:57-66, 1999.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, do sexo _____, de _____ anos de idade, residente à _____, declaro ter sido informado e estar devidamente esclarecido sobre os objetivos e intenções desse estudo, sobre as técnicas (procedimentos) a que estarei sendo submetido, sobre os riscos e desconfortos que poderão ocorrer. Recebi garantias de total sigilo e de obter esclarecimentos sempre que o desejar. Sei que minha participação está isenta de despesas. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e sei que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou perda de qualquer benefício (caso o sujeito de pesquisa esteja matriculado na Instituição onde a pesquisa está sendo realizada).

Assinatura do sujeito de pesquisa

__/__/__

Assinatura da testemunha

__/__/__

Pesquisador responsável

Eu, _____, responsável pelo projeto _____ declaro que obtive espontaneamente o consentimento deste sujeito de pesquisa (ou do seu representante legal) para realizar este estudo.

Assinatura _____

__/__/__

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA

Nome: _____ Data: ____/____/____
Idade : ____ Sexo: F () M () Você trabalha de forma remunerada: () Sim () Não.
Quantas horas você trabalha por dia: ____
Quantos anos completos você estudou: ____
De forma geral sua saúde está:() Excelente () Muito boa () Boa () Regular () Ruim

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **NORMAL USUAL** ou **HABITUAL**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

SEÇÃO 1- ATIVIDADE FÍSICA NO TRABALHO

Esta seção inclui as atividades que você faz no seu serviço, que incluem trabalho remunerado ou voluntário, as atividades na escola ou faculdade e outro tipo de trabalho não remunerado fora da sua casa. **NÃO** incluir trabalho não remunerado que você faz na sua casa como tarefas domésticas, cuidar do jardim e da casa ou tomar conta da sua família. Estas serão incluídas na seção 3.

1a. Atualmente você trabalha ou faz trabalho voluntário fora de sua casa?
() Sim () Não – Caso você responda não **Vá para seção 2: Transporte**

As próximas questões são em relação a toda a atividade física que você faz em uma semana **USUAL** ou **NORMAL** como parte do seu trabalho remunerado ou não remunerado. **NÃO** inclua o transporte para o trabalho. Pense unicamente nas atividades que você faz por **pelo menos 10 minutos contínuos** :

1b. Em quantos dias de uma semana normal você gasta fazendo atividades **vigorosas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como trabalho de construção pesada, carregar grandes pesos, trabalhar com enxada, escavar ou subir escadas **como parte do seu trabalho**:

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1d.**

1c. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades físicas vigorosas **como parte do seu trabalho** ?

_____ horas _____ minutos

1d. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades **moderadas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como carregar pesos leves **como parte do seu trabalho** ?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1f**

1e. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades moderadas **como parte do seu trabalho** ?

_____ horas _____ minutos

1f. Em quantos dias de uma semana normal você **anda**, durante **pelo menos 10 minutos contínuos**, **como parte do seu trabalho** ? Por favor **NÃO** inclua o andar como forma de transporte para ir ou voltar do trabalho

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a seção 2 - Transporte.**

1g. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** caminhando **como parte do seu trabalho** ?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 2 - ATIVIDADE FÍSICA COMO MEIO DE TRANSPORTE

Estas questões se referem a forma típica como você se desloca de um lugar para outro, incluindo seu trabalho, escola, cinema, lojas e outros.

2a. Em quantos dias de uma semana normal você anda de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para questão 2c**

2b. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** andando de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ horas _____ minutos

Agora pense **somente** em relação a caminhar ou pedalar para ir de um lugar a outro em uma semana normal.

2c. Em quantos dias de uma semana normal você anda de bicicleta por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua o pedalar por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a questão 2e.**

2d. Nos dias que você pedala quanto tempo no total você pedala **POR DIA** para ir de um lugar para outro?

_____ horas _____ minutos

2e. Em quantos dias de uma semana normal você caminha por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a Seção 3.**

2f. Quando você caminha para ir de um lugar para outro quanto tempo **POR DIA** você gasta? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 3 – ATIVIDADE FÍSICA EM CASA: TRABALHO, TAREFAS DOMÉSTICAS E CUIDAR DA FAMÍLIA

Esta parte inclui as atividades físicas que você faz em uma semana **NORMAL** na sua casa e ao redor da sua casa, por exemplo trabalho em casa, cuidar do jardim, cuidar do quintal, trabalho de manutenção da casa ou para cuidar da sua família. Novamente pense **somente** naquelas atividades físicas que você faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**.

- 3a. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades físicas **vigorosas no jardim ou quintal** por pelo menos 10 minutos como carpir, lavar o quintal, esfregar o chão:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a questão 3c**

- 3b. Nos dias que você faz este tipo de atividades vigorosas **no quintal ou jardim** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

- 3c. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer, rastelar com **no jardim ou quintal**

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3e.**

- 3d. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo no total você gasta **POR DIA** fazendo essas atividades moderadas **no jardim ou no quintal**?

_____ horas _____ minutos

- 3e. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer ou limpar o chão **dentro da sua casa**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para seção 4**

- 3f. Nos dias que você faz este tipo de atividades moderadas **dentro da sua casa** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 4- ATIVIDADES FÍSICAS DE RECREAÇÃO, ESPORTE, EXERCÍCIO E DE LAZER

Esta seção se refere às atividades físicas que você faz em uma semana **NORMAL** unicamente por recreação, esporte, exercício ou lazer. Novamente pense somente nas atividades físicas que faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**. Por favor **NÃO** inclua atividades que você já tenha citado.

- 4a. **Sem contar qualquer caminhada que você tenha citado anteriormente**, em quantos dias de uma semana normal, você caminha **por pelo menos 10 minutos contínuos no seu tempo livre**?

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4c**

4b. Nos dias em que você caminha **no seu tempo livre**, quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

4c. Em quantos dias de uma semana normal, você faz atividades **vigorosas no seu tempo livre** por pelo menos 10 minutos, como correr, fazer aeróbicos, nadar rápido, pedalar rápido ou fazer jogging :

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4e**

4d. Nos dias em que você faz estas atividades vigorosas **no seu tempo livre** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

4e. Em quantos dias de uma semana normal, você faz atividades **moderadas no seu tempo livre** por pelo menos 10 minutos, como pedalar ou nadar a velocidade regular, jogar bola, vôlei, basquete, tênis :

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para seção 5**

4f. Nos dias em que você faz estas atividades moderadas **no seu tempo livre** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 5 - TEMPO GASTO SENTADO

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

5a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____ horas _____ minutos

5b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____ horas _____ minutos



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

Curitiba, 10 de Agosto de 2005.

Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Depto. Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

Caro Prof. Fernandes.

Venho por meio desta comunicar que o projeto intitulado “Ácidos graxos poliinsaturados N-3 e sua ação sobre o sistema imunitário de indivíduos participantes de atividade física”, de sua responsabilidade, foi aprovado pelo Comitê Setorial de Pesquisa em reunião realizada em 10/08/2005.

Sem mais,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Renato Goldenberg'.

Dr. Renato Goldenberg
Professor Adjunto – Depto. Botânica
Presidente do Comitê Setorial de Pesquisa
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



Projeto: “Ácidos graxos poliinsaturados n-3 e sua ação sobre o sistema imunitário de indivíduos participantes de atividade física”

Pesquisador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes

Departamento: Departamento de Fisiologia

Data de entrada no CEP-Biológicas: 26/07/2005

Registro CEP-Biológicas: 006-05

Curitiba, 22 de setembro de 2005

Prezado Prof. Dr. **Luiz Cláudio Fernandes**

Em relação a projeto acima citado, venho por meio desta informá-lo de que este foi avaliado pelo CEP-Biológicas, estando de acordo com a Declaração de Helsinque (e suas atualizações) e com a resolução 196/96 do CNS (e resoluções complementares), tendo sido aprovado pelo comitê. Portanto, a partir desta data poderá ser iniciada a execução e a coleta de dados do referido projeto.

Ressalto que, de acordo com a resolução 196/96 que: (a) o pesquisador deve comunicar a este comitê qualquer alteração no protocolo experimental ou no termo de consentimento (nestas circunstâncias a inclusão deve ser temporariamente suspensa até análise do CEP das modificações propostas); (b) comunicar imediatamente ao CEP qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; (c) os dados individuais de todos indivíduos devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria; (d) apresentar relatório parcial em março de 2006.

Contando com sua compreensão e apoio, coloco-me à disposição para maiores esclarecimentos, atenciosamente

Roberto Andreatini

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do
Setor de Ciências Biológicas



FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Campinas, 3 de junho de 2005

Depto. de Alimentos e Nutrição – Laboratório de Nutrição e Metabolismo

Prof. Dr. André Luiz Felix Rodacki

Coordenador do Curso de Mestrado em Educação Física

Universidade Federal do Paraná

Prezado Professor,

Venho pelo presente encaminhar a V.Sa., em anexo, o projeto “Ácidos graxos...atividade física” com algumas sugestões descritas no corpo do projeto e o respectivo parecer.

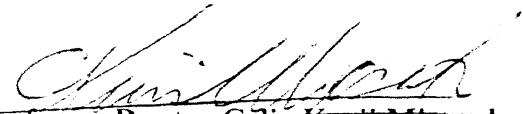
As observações de cada item do projeto e as suas respectivas notas estão descritas ao final de cada tópico, onde considerei: Introdução (nota 85); Objetivos (nota 70); Metodologia (nota 85); Cronograma (nota 100); Bibliografia (nota 85) e Viabilidade Técnica (nota 100), O total foi de 525 pontos, obtendo a média geral de 87,5 pontos.

Deste modo sugiro a APROVAÇÃO do projeto sendo no mínimo condicionada a discussão, porém, não necessariamente envolvendo a alteração ou inclusão dos pontos *marcados por este consultor*.

Coloco-me a disposição para eventuais esclarecimentos relativos aos pontos levantados e para outros posteriores projetos submetidos a esta coordenação.

Cordiais saudações.

Atenciosamente,



Professor Doutor Celio Kenji Miyasaka
DEPAN-FEA-UNICAMP

PROF.DR.CELIO KENJI MIYASAKA
DEPAN - FEA