

PERFIL FUNCIONAL DE LEUCÓCITOS SANGUÍNEOS DE JOGADORES DE FUTEBOL AMADOR APÓS DOIS MESES DE SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE**Mirna Clemente¹, Sandro José Bonatto¹, Heloísa Helena Paro de Oliveira¹, Everson Araújo Nunes¹, Luiz Cláudio Fernandes¹****RESUMO**

Ácidos graxos são importantes constituintes das células exercendo funções estruturais, energéticas, sinalizadoras, entre outras. Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa da família n-6 e n-3 são essenciais ao organismo, pois sua ausência leva a déficit funcional do desenvolvimento do organismo como um todo e, portanto devem ser providos na dieta. Metabólitos provenientes de AGPI n-3 tem sido correlacionados com distúrbios inflamatórios e modulação do sistema imunitário. Como a atividade física também pode ser um fator causador de modificações na função imunitária, neste trabalho investigamos os efeitos da suplementação com óleo de peixe, fonte de AGPI n-3, (2g/dia) durante 60 dias, administrada a jogadores de futebol amador. Foram avaliados parâmetros bioquímicos séricos e características funcionais das células imunitárias sanguíneas destes indivíduos. Dois grupos experimentais foram utilizados, controle não suplementado (n=9) e suplementado com de óleo de peixe 2g/dia por 60 dias (n=19). Após o período de suplementação, dentro dos parâmetros séricos, apenas a concentração de colesterol total apresentou diminuição significativa (157,8±7,2 vs. 142,4±8,0 mg/dL, p<0,05). Desta maneira, os valores de repouso da glicemia, lactatemia, triacilglicerolemia e colesterol-HDL permaneceram inalterados, p>0,05. O índice de proliferação das células mononucleares sanguíneas não foi modificado pela suplementação. Dentre as características analisadas em células polimorfonucleares sanguíneas (PMNS), somente o conteúdo de vesículas catiônicas foi alterado significativamente. Este sofreu aumento de 20% quando comparada ao período pré-suplementação. Em conjunto os resultados revelam, que no tempo e dose utilizados neste estudo, não existiram grandes mudanças nas características analisadas. Contudo, a diminuição das concentrações séricas de colesterol total e o aumento do conteúdo de vesículas catiônicas em PMNS podem representar potenciais benefícios à saúde dos indivíduos.

Palavras-chave: Futebol. Sistema Imunitário. Óleo de peixe. Atividade Física.

ABSTRACT

Functional profile of blood leukocytes from amateur soccer players after two months of fish oil supplementation

Fatty acids are important components of human cells. They play a key role in structural, energetic functions as well as signal transduction, among others. Long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) from n-3 and n-6 family are essential to human body and their deficiency causes functional deficit for body development. Therefore, they must be provided in the diet. N-3 polyunsaturated fatty acid's metabolites have been related to the control of inflammatory disorders and immune system modulation response. Physical activity is a stimulus which also modifies immune system response. In this study, we investigated the effect of fish oil supplementation, rich in n-3 PUFA, to amateur soccer players for 60 days. Serum biochemical parameters and immune system function were determined. Volunteers were divided in two experimental groups: not supplemented (n=9); and supplemented with n-3 (2g/day) for 60 days (n=19). After 60 days, according to serum biochemical parameters, only total cholesterol concentration presented a significant decrease (157,8±7,2 vs. 142,4±8,0 mg/dL, p<0,05). Levels of resting blood glucose, lactate, triacylglycerols and HDL-cholesterol were similar to control, p>0.05. Supplementation did not alter the proliferation capacity of mononuclear cells. Among the analyzed parameters of blood polymorphonuclear cells (PMNS), only cationic vesicles content was significantly altered. This content suffered an increase of 20% when compared to pre supplementation period. Taking in account the time and fish oil dose used here, there were not relevant modifications in the investigated parameters. However, reduction in the total cholesterol concentration and the increase of cationic vesicles content in PMNS can represent potential benefits for people's health.

Key Words: Football. Immune System. Fish oil. Physical Activity

INTRODUÇÃO

Múltiplos são os fatores com potencial de modificar a funcionalidade de células imunitárias, assim como toda resposta imunitária de um indivíduo. Entre estes fatores temos a atividade física e a dieta como grandes protagonistas (Biondo e colaboradores, 2008).

Dentre os vários tipos de atividade física, a prática de esportes coletivos como o futebol é bastante comum pela população em geral (Stolen e colaboradores, 2005).

Contudo, pouco conhecimento foi gerado a respeito das modificações proporcionadas pela prática e treinamento para o futebol aliado a intervenções dietéticas sobre a função imunitária.

Apesar de existir estudos mostrando potenciais efeitos deletérios da atividade física sobre a função imunitária, também existem muitos estudos colocando que a prática de exercício realizada com períodos adequados de recuperação, boa periodização das cargas de treinamento e alimentação adequada podem proporcionar modificações positivas (Moreira e colaboradores, 2009).

Contudo, os estudos em imunologia do exercício geralmente focam sua atenção para indivíduos envolvidos em atividades individuais (Chen e colaboradores, 2008; Murakami e colaboradores, 2009).

Desta maneira, os esportes coletivos apresentam carência de atenção quanto a este foco. Neste contexto, a falta de informações vai além quando são buscados acompanhamentos longitudinais da função imunitária neste tipo de amostra.

O consumo de ácidos graxos essenciais, como os n-3, tem recebido atenção na área da imunologia do exercício devido aos efeitos imunomoduladores destes compostos (Hill e colaboradores, 2007; Andrade e colaboradores, 2007).

Estudos indicam que ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-3, como o eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), presentes em óleos extraídos de peixes de águas frias, podem servir como moduladores da função imunitária, promovendo atenuação, ou melhor, controle da resposta inflamatória dependendo do status imunitário do indivíduo (Calder 2008).

Vários estudos sugerem que a excessiva quantidade de AGPI n-6 e a redução na de AGPI n-3 na dieta de humanos, levou a uma razão desproporcional de n-6/n-3, exacerbando o aparecimento de distúrbios inflamatórios. Na dieta ocidental esta razão pode chegar até 30:1 (Simopoulos, 2001).

Utilizando ratos, Benquet e colaboradores (1994), investigaram efeitos da atividade física intensa somada à suplementação de n-3 por oito semanas. Com esta abordagem, os autores concluíram que os AGPI n-3 atenuaram a diminuição nas concentrações de imunoglobulina M (IgM) causada pelo protocolo de treinamento ao final do período proposto (oito semanas).

Com a intenção de investigar potenciais variações nas funções de leucócitos sanguíneos, mononucleares e polimorfonucleares, decorrentes do treinamento para a prática de futebol aliado a ingestão adicional de óleo de peixe (contendo os AGPI n-3, EPA e DHA), este trabalho acompanhou indivíduos praticantes de futebol amador pelo período de dois meses. Parte dos participantes recebeu cápsulas de óleo de peixe (2g/dia) durante o período experimental.

Parâmetros bioquímicos séricos e a capacidade funcional, de células mononucleares e polimorfonucleares sanguíneas, foram avaliados nos grupos em dois momentos, tempo zero e dois meses após o início da abordagem. Após a valiação laboratorial os resultados foram confrontados para encontrar possíveis alterações intragrupos.

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 qualquer efeito deletério causado pela rotina de treinamento à qual os indivíduos em estudo são submetidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Vinte oito homens adultos (entre 20 a 40 anos de idade), provenientes da cidade de São José dos Pinhais-PR, foram convidados a participar deste estudo.

Todos os participantes assinaram termo de consentimento concordando com os procedimentos utilizados no estudo. O comitê de ética em pesquisa, do Setor de Ciências

Biológicas da universidade federal do Paraná (UFPR), aprovou todos os procedimentos e técnicas aplicados.

Os voluntários faziam 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.

Todos os participantes participavam de treinamentos três dias por semana, 2h por dia. Antes do início do estudo, os voluntários foram orientados a manter a mesma rotina de treinamento e padrão de alimentação durante a duração do estudo. Também foram instruídos a comunicar qualquer alteração nestes e em outros parâmetros geradores de prejuízo aos resultados da pesquisa.

Os jogadores foram divididos em 2 grupos: indivíduos treinados não suplementados (controle) (n= 9), e indivíduos treinados suplementados com óleo de peixe (n=3) (n=19). No grupo n-3, os indivíduos foram suplementados com 2g de óleo de peixe (2 cápsulas de 1g - mistura marinha de triacilglicerol contendo 180 mg de ácido eicosapentanoico e 120 mg de ácido docosahexanoico por cápsula), por 60 dias. Esses foram orientados a ingerir uma (1) cápsula de óleo de peixe (1g) durante o almoço e outra durante o jantar, totalizando 2g de óleo de peixe/dia. O início do período experimental é referido como T0, enquanto que o fim, após 60 dias, é indicado como T60.

Estimativa do percentual de gordura corporal

Para a estimativa do percentual de gordura, adotou-se o método das dobras cutâneas, medidas pelo plicômetro da marca Lange© - Estados Unidos da América. Para tanto, o protocolo aplicado foi o de três dobras, de Jackson e Pollock (1978), para homens. O cálculo do % de gordura foi realizado com auxílio da equação de Siri, 1961.

Avaliação do nível de atividade física

Todos os indivíduos foram requisitados a responder questionário IPAQ (Questionário Internacional de Atividade Física) na versão longa. A variável usada para análise foi atividade física total em METs.minuto/semana. 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 três 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 três 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. Os minutos foram registrados em 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, foram considerados perdidos e codificados como zero (Matsudo e colaboradores, 2001).

Reagentes e soluções

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 estreptomina) e o soro fetal bovino da Gibco-Brasil. A [2-14C]- timidina (50 mCi/mmol) foi obtida da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company - Biotechnology Systems - EUA). Solução de tampão fosfato salina pH 7,4, 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes.

Determinações plasmáticas

A concentração de glicose circulante foi determinada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o Kit Glicose da BioTécnica e quantificada pela medida de absorbância em 505 nm. A concentração do colesterol total, HDL colesterol e triacilglicerol foi medida pelo Kit específico da Bioliquid e com leitura de absorbância a 500 nm (colesterol) e 540 nm (triacilglicerol) respectivamente.

O lactato sérico foi determinado pelo método enzimático segundo Eagle e Jones (1978), e com leitura de absorbância a 340 nm. Todos os kits foram utilizados seguindo as informações do fabricante, cujos procedimentos técnicos utilizados seguiram os protocolos descritos nos kits comercialmente disponíveis.

Coleta e separação das células sanguíneas

O sangue venoso dos indivíduos 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 aliquoteado e o restante transferido para outro tubo 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 (constituída por células mononucleares) para outro tubo, seguido de 2 lavagens com PBS.

A camada inferior, constituída de hemáceas e células polimorfonucleares, foi transferida para outro tubo. O volume do tubo contendo células polimorfonucleares foi completado com solução hemolítica e deixado em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Após a lise, as células foram lavadas 2 vezes em PBS. As células mononucleares (na maioria linfócitos) e as plomorfonucleares (na maioria neutrófilos) foram ressuspensas em PBS e encaminhadas para contagem em câmara de Neubauer.

Cultivo das células mononucleares sanguíneas

As células mononucleares (linfócitos - $1,4 \times 10^5$ células por poço) foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μ L) a 37° 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). 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 em contador Beckman LS 6500. Os resultados estão apresentados como percentual de alteração entre os momentos T0 e T60

Metodologias aplicadas nos ensaios com células polimorfonucleares**Soluções**

Para fixar as células, quando necessário, foi utilizado fixador 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 μ L 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.

Capacidade fagocítica

Utilizou-se o método descrito por Bonatto e colaboradores (2004), na solução de células polimorfonucleares foram depositados 100 µL contendo 105/mL células em placa de 96 poços e adicionou-se 10 µL de zymosan corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de fixador Baker e se guardou mais 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm.

O vermelho neutro que está dentro dos fagossomos foi então solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração (ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada) e após 30 minutos procedeu-se a leitura a 550 nm em leitor de microplacas (Bench Mark .Biorad). Os resultados estão apresentados como percentual de alteração entre os momentos T0 e T60.

Conteúdo de vesículas catiônicas

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Pipe e colaboradores (1995), onde em placa do tipo ELISA depositou-se 100 µL da solução de neutrófilos e se adicionou 20 µL 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 µL 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). Os resultados estão

apresentados como percentual de alteração entre os momentos T0 e T60.

Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por Pick e Mizel (1981), modificado. Através da oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H₂O₂. Alíquotas de 100 µL de solução de células (neutrófilos) e 10 µL de éster de forbol miristato acetato (PMA – 20 mM) foram colocadas em placas de ELISA. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os poços receberam 100 µL da solução de vermelho fenol contendo peroxidase (horseradish) e zymosan. Em seguida os neutrófilos foram incubados por mais 30 minutos e após o término deste tempo foi executada a leitura a 620 nm em espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os resultados estão apresentados como percentual de alteração entre os momentos T0 e T60.

Estatística

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (DP) e foram submetidos ao teste "t" de student pareado, para comparar os parâmetros analisados nas situações T0 e T60. Foi adotado o nível de significância para p < 0,05.

RESULTADOS

Ao início do protocolo experimental (T0), os dois grupos apresentaram características antropométricas (altura, peso, índice de massa corporal, percentual de gordura) e biológicas (sexo e idade) equivalentes (Tabela 1).

Segundo os critérios de avaliação do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) na versão longa, qualquer indivíduo que apresente gasto energético com atividade física maior que 1500 METs-minuto/semana é considerado muito ativo. Como os dois grupos experimentais apresentaram média de METs-minuto/semana superior a 1600, a classificação para o grau atividade física de ambos foi de indivíduos muito ativos (Tabela 1).

Revista Brasileira de Futsal e Futebol.

ISSN 1984-4956 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbff.com.br

Tabela 1 - Caracterização dos grupos experimentais segundo a idade (anos), altura (m), massa corporal (kg), índice de massa corporal (IMC) (kg/m²), percentual de gordura (%G) e grau de atividade (METs-minuto/semana) de jogadores de futebol amador dos grupos controle e suplementado com 2g óleo de peixe/dia (n-3) no início do período experimental (T0).

	Controle (n=9)	n-3 (n=19)
Idade (anos)	33,0 ± 5,9	30,2 ± 6,4
Altura (m)	1,73 ± 0,06	1,72 ± 0,07
Peso (kg)	74,0 ± 9,1	73,5 ± 11,5
IMC (kg/m ²)	24,6 ± 2,2	24,8 ± 3,3
%G	16,33 ± 5,40	17,67 ± 4,05
Grau de atividade (METs-minuto/semana)	1625 ± 20,0	1689 ± 10,0

Os dados representam a média ± EPM de 9 (controle) e 19 (n-3) indivíduos por grupo.

A avaliação dos parâmetros séricos dos voluntários revelou que a suplementação com óleo de peixe foi capaz de diminuir os valores de colesterol total em aproximadamente 10% (P<0,05). Contudo, nenhum outro parâmetro sérico sofreu alteração. Todos os resultados das análises séricas estão resumidos na tabela 2.

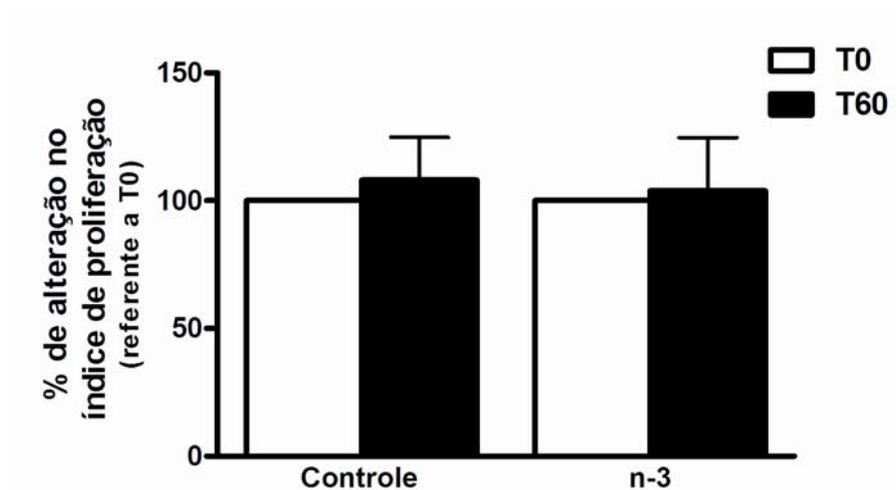
Tabela 2 - Valores de repouso de glicemia (mg/dL), lactatemia (µmol/mL), triacil glicerol (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e colesterol HDL (mg/dL) dos jogadores de futebol amador não suplementados (controle) e suplementados com 2g óleo de peixe/dia (n-3) no tempo 0 (T0) e 60 dias após (T60) o início do protocolo experimental.

	Controle		n-3	
	T0	T60	T0	T60
Glicose (mg/dL)	91,7 ± 4,1	87,9 ± 6,8	89,8 ± 2,6	89,5 ± 4,6
Lactato (µmol/mL)	1,39 ± 0,1	1,29 ± 0,1	1,34 ± 0,1	1,22 ± 0,1
Triacilglicerol (mg/dL)	133,4 ± 22,0	133,4 ± 33,8	125,2 ± 16,0	137,6 ± 25,9
Colesterol Total (mg/dL)	157,3 ± 6,6	154,2 ± 11,9	157,8 ± 7,2	142,4 ± 8,0*
Colesterol-HDL (mg/dL)	31,9 ± 2,6	35,7 ± 1,5	39,9 ± 1,7	37,6 ± 3,6

Os dados representam a média ± EPM de 9 (controle) e 19 (n-3) indivíduos por grupo. * P<0,05 quando comparado a T0 para o mesmo grupo.

Não houve diferença significativa nos diferentes momentos (T0 e T60), quanto ao índice de proliferação linfocitária, P >0,05 (Figura 1).

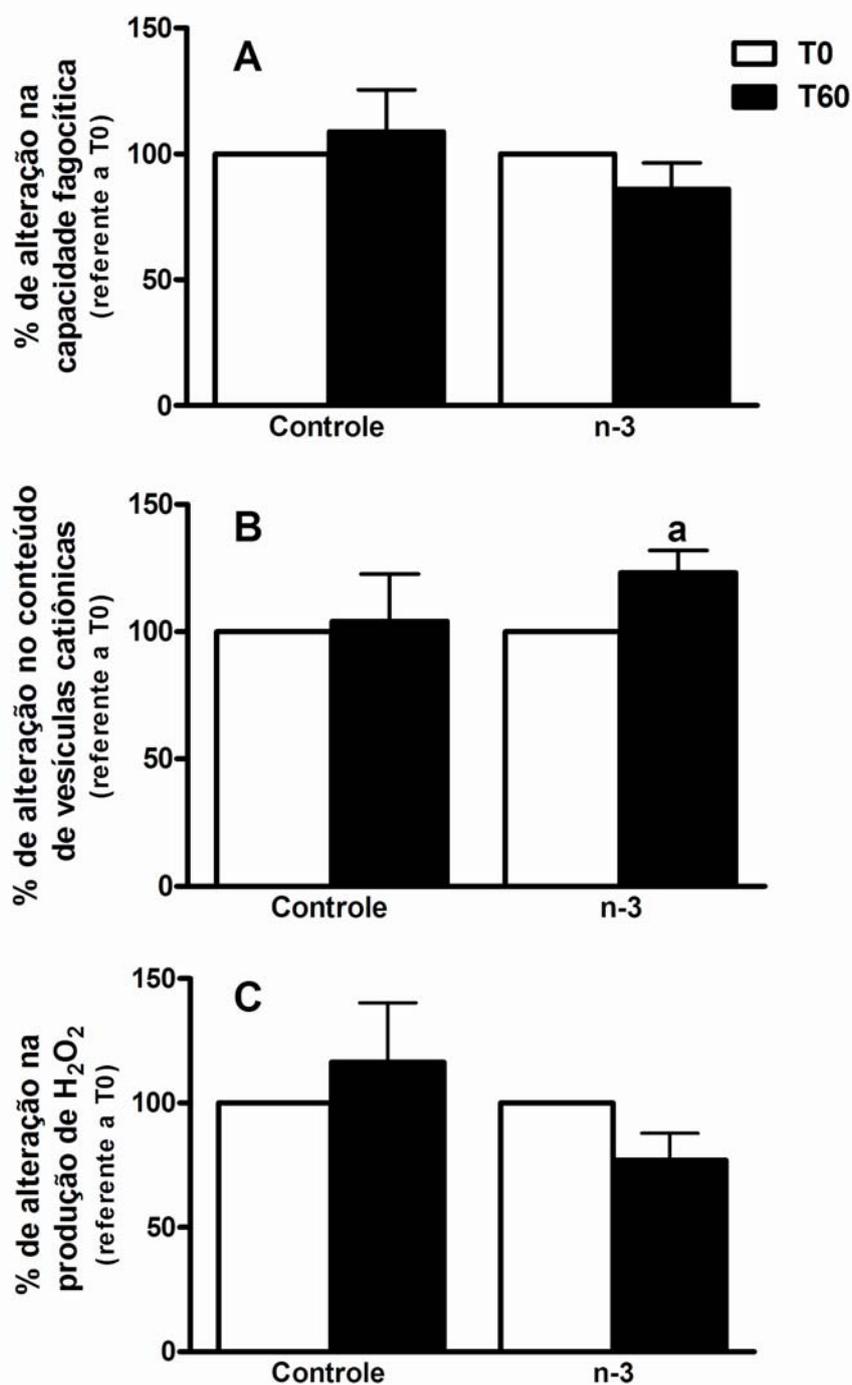
Figura 1 - Percentual de alteração no índice de proliferação de células mononucleares sanguíneas dos indivíduos treinados não suplementados (controle) e suplementados com 2g óleo de peixe/dia (n-3) no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60). Os dados representam a média \pm EPM de 9 (controle) e 19 (n-3) indivíduos por grupo.



O conteúdo de vesículas catiônicas foi o único parâmetro alterado em PMNS pela suplementação com 2g de óleo de peixe por 60 dias na amostra utilizada. Como pode ser observado na figura 2B, o grupo suplementado com n-3 apresentou aumento do conteúdo relativo de vesículas quando comparado ao

momento inicial do estudo ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) sobre a capacidade fagocítica nem sobre a produção de peróxido de hidrogênio com a suplementação nos jogadores de futebol amador (Figuras 2A e 2C, respectivamente).

Figura 2 - (A) Capacidade fagocítica, (B) Conteúdo de vesículas catiônicas e (C) produção de peróxido de hidrogênio por células polimorfonucleares sanguíneas (PMNS) de indivíduos treinados não suplementados (controle) e suplementados com 2g óleo de peixe/dia (n-3) no dia zero (T0) e ao final de 60 dias (T60). Os dados representam a média \pm EPM de 9 (controle) e 19 (n-3) indivíduos por grupo. ^a $p < 0,05$ vs. T0.



DISCUSSÃO

Em nosso protocolo experimental, os indivíduos treinados foram aconselhados a seguir a mesma rotina de treinamento e hábitos de dieta durante todo o período de acompanhamento. Esta peculiaridade pode explicar o porquê da ausência de modificações em algumas das variáveis analisadas. Além da ausência de alteração nas variáveis imunitárias, os parâmetros séricos também não apresentaram qualquer alteração em decorrência do treinamento padrão para a prática do futebol.

Contudo, a suplementação com óleo de peixe, fonte rica de ácidos graxos n-3, modificou a concentração de colesterol total sérico e o conteúdo de vesículas catiônicas em PMNS.

As modificações ocasionadas pela prática de atividade física (em especial o futebol) na função de células imunitárias de seres humanos ainda não estão bem descritas na literatura, poucas são as investigações publicadas com este foco (Sureda e colaboradores, 2009).

Os resultados de diferentes trabalhos envolvendo atividade física e função imunitária ainda são muito conflitantes e pouco conclusivos. Alguns autores defendem que a prática regular de atividade física sem a devida periodização das intensidades pode prejudicar a capacidade de defesa em geral de seres humanos. Enquanto outros colocam que a prática de exercício pode modular positivamente a função imunitária se o treinamento for prescrito de maneira a promover a devida recuperação (Moreira e colaboradores, 2009).

Os dados apresentados mostram que a adição de 2g de óleo de peixe/dia, por dois meses, a ingestão habitual lipídeos de jogadores de futebol amador não alterou de maneira significativa os parâmetros funcionais de PMNS, contudo o conteúdo de vesículas catiônicas em PMNS sofreu aumento após a suplementação. Neutrófilos representam 50-60% do pool de leucócitos circulantes e são a maioria dos PMNS em humanos. Estas células destroem o agente invasor fagocitado na maquinaria das vesículas catiônicas e pela produção de radicais livres derivados de oxigênio e nitrogênio (Medzhitov e Janeway, 2000).

O aumento no conteúdo de vesículas catiônicas pode ser resultado do efeito de mediadores inflamatórios derivado do metabolismo dos ácidos graxos n-3. Ácidos graxos de cadeia longa, como EPA e DHA, são os principais componentes do óleo de peixe. Esses possuem várias ações biológicas, sendo grande parte delas mediada por metabólitos gerados por múltiplas vias (Calder, 2007).

Os AGPI n-3 podem diminuir a síntese de leucotrienos da série 4, os quais são agentes inflamatórios desgranuladores. A inibição da síntese de leucotrienos da série 4 se dá pela competição natural entre AGPI n-3 e os AGPI n-6 pelas mesmas vias metabólicas (Curi e colaboradores, 2002).

A mensuração de leucotrienos não foi foco deste estudo, no entanto não podemos descartar a possibilidade de que diminuição de agentes desgranuladores promoverem o aumento no conteúdo de vesículas catiônicas nas células dos indivíduos suplementados.

Muitos estudos que se propõem a investigar a função de neutrófilos em humanos trazem resultados apenas de observação de efeitos agudos da atividade física (Ortega 1994; Peak 2002).

Nestas investigações os protocolos de exercício intenso e/ou prolongado mostram efeitos supressores sobre alguns parâmetros funcionais de neutrófilos. Em oposição, resultados do efeito crônico do treinamento sobre a função imunitária são escassos.

Corroborando nossos achados, Hill e colaboradores (2007), também não encontraram alterações significativas na função de neutrófilos decorrentes dos efeitos crônicos do exercício. No trabalho em questão os indivíduos realizaram caminhadas (45min a 75% da FC_{máx}), três vezes na semana durante 12 semanas.

CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados mostram que não existem modificações imunitárias significativas após a adição de 2g de óleo de peixe/dia, por 2 meses, a dieta de jogadores de futebol amador quando a rotina de treinamento não sofre modificações. A ingestão de óleo de peixe aumentou conteúdo de vesículas catiônicas nas PMNS. Contudo é difícil afirmar que este aumento possui alguma

repercussão positiva substancial. As concentrações séricas de colesterol total foram reduzidas após a suplementação. Fato que pode repercutir positivamente para a prevenção de doenças crônicas. Levando em consideração a grande gama de resultados benéficos do óleo de peixe descritos na literatura e os resultados apresentados aqui, sua ingestão por praticantes de atividade física deve ser encorajada.

REFERÊNCIAS

- 1- Andrade, P.M.; Ribeiro B.G.; Bozza M.T.; Costa Rosa L.F.; Tavares do Carmo M.G. Effects of the fish-oil supplementation on the immune and inflammatory responses in elite swimmers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Vol. 77. 2007. p.139-45.
- 2- Benquet, C.; Krzystyniak, K.; Savard, R.; Gertin, F. Modulation of exercise-induced immunosuppression by dietary 1994.
- 3- Biondo, P.D.; Robbins, S.J.; Walsh, J.D.; McCargar, L.J.; Harber, V.J.; Field C.J. A randomized controlled crossover trial of the effect of ginseng consumption on the immune response to moderate exercise in healthy sedentary men. *Appl Physiol Nutr Metab*. Vol. 33. 2008. p. 966-75.
- 4- Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Vol. 77. Num. 5-6. 2007.3p.27-35.
- 5- Calder, P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Vol. 79. 2008. p. 101-8.
- 6- Chen, Y.J.; Wong, S.H.; Wong, C.K.; Lam, C.W.; Huang, Y.J.; Siu, P.M. The effect of a pre-exercise carbohydrate meal on immune responses to an endurance performance run. *Br J Nutr*. Vol. 100. 2008. p.1260-8.
- 7- Curi, R.; Miyasaka, C.K.; Pompéia, C.; Procópio, J. Entendendo a gordura- Os ácidos graxos. São Paulo. Manole. 2002.
- 8- Engle, P.C.; Jones, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamine, L-lactate, and other metabolites. *Ann Biochem*. Vol. 88. 1978. p. 475-84.
- 9- Hill, A.M.; Worthley, C.; Murphy, K.J.; Buckley, J.D.; Ferrante A.; Howe P.R. N-3 Fatty acid supplementation and regular moderate exercise: differential effects of a combined intervention on neutrophil function. *Br J Nutr*. Vol. 98. 2007. p. 300-9.
- 10- Jackson, A. S.; Pollock, M. L. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr*. Vol. 40. 1978. p. 497-504.
- 11- Matsudo, S.; Araújo, T.; Matsudo, V.; Andrade, D.; Andrade, E. e colaboradores. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ): estudo de validade e reprodutibilidade no Brasil. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. Vol. 6. 2001. p. 5-12.
- 12- Medzhitov, R.; Janeway, C. Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. Vol. 343. 2000. p. 338-44.
- 13- Moreira, A.; Delgado L.; Moreira P.; Haahtela, T. Does exercise increase the risk of upper respiratory tract infections? *Br Med Bull*. Mar 31. 2009. (prelo).
- 14- Murakami, S.; Kurihara, S.; Koikawa, N.; Nakamura, A.; Aoki, K.; Yosigi H. e colaboradores. Effects of oral supplementation with cystine and theanine on the immune function of athletes in endurance exercise: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009; 73:817-21.
- 15- Ortega, R. E. Physiology and biochemistry: influence of exercise on phagocytosis. *Int J Sports Med*. Vol.15. 1994. p.172-178.
- 16- Peake, J.M. Exercise-induced alterations in neutrophils degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev*. Vol. 8. 2002. p.49-100.
- 17- Simopoulos, P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. Vol. 56. 2001.p. 365-379.

Revista Brasileira de Futsal e Futebol.

ISSN 1984-4956 *versão eletrônica*

Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício

www.ibpex.com.br / www.rbff.com.br

18- Pick, E., Mizel, M. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. Vol. 46. 1981. p. 211-226.

19- Pipe, R.K., Coles, J.A., Farley, S.R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. *Tech Fish Immunol*. Vol. 4. 1995. p. 93-100.

20- Siri, W. E. Body composition from fluid space and density. In: J. Brozek e A. Hanschel, E. D. *Techniques for measuring body composition*. Washington: National Academy of Science. 1961.

21- Stølen, T.; Chamari, K.; Castagna, C. ; Wisløff, U. Physiology of soccer: an update. *Sports Med*. Vol. 35. 2005. p. 501-36.

22- Sureda, A.; Ferrer, M.D. ; Tauler, P.E.; Romaguera, D.; Drobic F.; Pujol, P. e colaboradores. Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *Br J Sports Med*. Vol. 43. 2009. p. 186-90.

1 - Laboratório de metabolismo celular, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba - PR, Brasil.

mirnaclemente@yahoo.com
sandrobonatto@hotmail.com
lolihelena@yahoo.com.br
eanunes@ufpr.br
lcfpr@ufpr.br

Rua- Brasília Itiberê, 4270 apartamento 1110-
Água Verde
Curitiba- Paraná- Brasil- 80.240-060

Recebido para publicação em 10/08/2009
Aceito 12/08/2009