

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE DOUTORADO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**A SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3
REDUZIU A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE EICOSANÓIDES PRÓ-
INFLAMATÓRIOS, DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE E DE LESÕES
MUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS A SESSÕES DE NATAÇÃO**

LEANDRO LOPES HAIDAMUS
Farmacêutico e Bioquímico
Mestre em Ciências de Alimentos

ORIENTADOR: PROF.DR. ADMAR COSTA DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. ROBERTO CARLOS BURINI

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS, SP - 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

H124s Haidamus, Leandro Lopes
A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 reduziu a concentração plasmática de eicosanóides pró-inflamatórios, da enzima lactato desidrogenase e de lesões musculares em ratos submetidos a sessões de natação / Leandro Lopes Haidamus. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
Co-orientador: Roberto Carlos Burini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácidos graxos – Ômega-3. 2. Exercícios. 3. Histologia.
4. Eicosanóides. 5. Músculos – Ferimentos e lesões. I.
Oliveira, Admar Costa de. II. Burini, Roberto Carlos. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. IV. Título.

Titulo em ingles: The supplementation with fatty poliinsaturated omega-3 acids reduced the plasmatic concentration of pro-inflammatory eicosanoids of the lactate desidrogenase enzyme and muscular lesions in rats submitted to sessions of swimming

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fatty acids – Omega-3, Exercise, Histology, Eicosanoids, Muscles - Wounds and injuries

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutorado em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Admar Costa de Oliveira

Miguel Arcanjo Areas

Glaucia Maria Pastore

Flávia Queiroga Aranha de Almeida

José Carlos Silva Camargo Filho

Luiz Carlos Marques Vanderlei

Programa de Pós-Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

LEANDRO LOPES HAIDAMUS

**A SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA-3
REDUZIU A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE EICOSANÓIDES PRÓ-
INFLAMATÓRIOS, DA ENZIMA LACTATO DESIDROGENASE E DE LESÕES
MUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS A SESSÕES DE NATAÇÃO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição – Área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Profa. Dra. Flávia Queiroga Aranha de Almeida
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP-BOTUCATU

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP-PRES.PRUDENTE

Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Vanderlei
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP-PRES.PRUDENTE

A minha esposa Silvia, meus filhos Murilo e Pedro,
pelo incentivo e compreensão que tiveram durante a minha ausência,
aos meus pais, pela formação que me deram.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pela sua presença tanto nos momentos bons e difíceis da minha vida.

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira, pela acolhida e orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Carlos Burini, pela orientação no início deste trabalho.

À Reitora da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Ana Cardoso Maia de Oliveira Lima, pelo apoio incondicional na realização deste trabalho.

À RP Scherer do Brasil encapsuladora Ltda, pela doação do ômega-3, utilizados na suplementação dos animais do experimento.

À Profa. Eloah dos Santos Lopes Acencio, pela ajuda na realização das dosagens plasmáticas dos eicosanóides.

Às alunas da Unesp, Bruna Corral Garcia e Taciana Alcará de Soza, pela ajuda na realização das análises histológicas deste trabalho.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pela orientação e treinamento da técnica de gavagem, utilizada na realização do experimento.

Aos meus colegas de trabalho, Wilson e Rosângela, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Aos membros examinadores desta Tese, por aceitarem o convite em fazer parte da banca examinadora.

SUMÁRIO

ÍNDICE.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	03
3 OBJETIVOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5 RESULTADOS.....	36
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....	69

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 EXERCÍCIO FÍSICO E LESÃO MUSCULAR.....	03
2.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E ÔMEGA-3.....	08
2.3 AÇÃO BIOLÓGICA DOS EICOSANÓIDES.....	12
2.4 EFEITO DA DIETA EM AGPI NA SÍNTESE DE MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO.....	14
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 GERAIS.....	24
3.2 ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	25
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
4.3 PROTOCOLO DA SUPLEMENTAÇÃO.....	26
4.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	27

4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	30
4.5.1 Sangue.....	30
4.5.2 Músculo sóleo.....	31
4.6 MORFOLOGIA GERAL DAS FIBRAS MUSCULARES.....	33
4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS.....	33
4.8 DOSAGEM DOS EICOSANÓIDES.....	33
4.9 DOSAGEM DAS ENZIMAS PLASMÁTICAS.....	34
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 PESO MÉDIO DOS RATOS (g).....	36
5.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CK E LDH.....	37
5.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS EICOSANÓIDES.....	38
5.4 MORFOLOGIA GERAL DAS FIBRAS MUSCULARES.....	41
5.5 ANÁLISE DO MENOR DIÂMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES.....	44
6 DISCUSSÃO.....	49
6.1 PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	49
6.2 VARIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS ANIMAIS.....	50
6.3 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DAS ENZIMAS CK E LDH.....	51
6.4 PRODUÇÃO DOS EICOSANÓIDES.....	52
6.5 MORFOLOGIA GERAL E DIÂMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES.....	53
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

ANEXOS..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treinamento por meio de natação.....	28
Tabela 2. Incremento de carga a ser utilizada no protocolo de treinamento.....	29
Tabela 3. Concentração plasmática (U/L) das enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LH), nos grupos experimentais, G1: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G2: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; G3: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G4: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3.....	37
Tabela 4. Valores médios, seguidos dos erros padrões das médias, mediana, valor mínimo e valor máximo do diâmetro das fibras, micrômetros (μ m), dos animais dos grupos estudados.....	45
Tabela 5. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, G1: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3 (ANEXO).....	70
Tabela 6. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, G2: grupo controle, sem treinamentos diários e com suplementação com AGPI ω -3 (ANEXO).....	70

Tabela 7. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, G3: grupo com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3 (ANEXO).....	71
Tabela 8. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, G4: grupo com treinamentos diários e com suplementação com AGPI ω -3 (ANEXO).....	71
Tabela 9. Concentração plasmática (U/L) das enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LH), nos animais dos grupos experimentais, G1: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G2: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; G3: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G4: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3 (ANEXO).....	72
Tabela 10. Concentrações plasmáticas do eicosanóide prostaglandina E ₂ (PGE ₂), nos animais dos grupos experimentais, G1: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G2: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; G3: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G4: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3 (ANEXO).....	73

Tabela 11. Concentrações plasmáticas do eicosanóide tromboxano B₂ (TXB₂), nos animais dos grupos experimentais, **G1:** grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2:** animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3:** animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4:** animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3 (**ANEXO**)..... 74

Tabela 12. Concentrações plasmáticas do eicosanóide leucotrieno B₄ (LTB₄), nos animais dos grupos experimentais, **G1:** grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2:** animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3:** animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4:** animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3 (**ANEXO**)..... 75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados.....	10
Figura 2. Via metabólica da síntese dos eicosanóides a partir dos ácidos graxos poliinsaturados.....	12
Figura 3. Animal sendo suplementado pelo método de gavagem.....	27
Figura 4. Tanque de natação utilizado no experimento.....	28
Figura 5. Carga presa (P) à região dorsal do animal.....	29
Figura 6. Caixa de luz para aquecimento dos animais.....	30
Figura 7. Procedimento para retirada do músculo sóleo.....	31
Figura 8. Micrótomo criostato - HM 505 E Microm com blocos de tecido muscular fixados.....	32
Figura 9. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem nos grupos experimentais, G1 : grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G2 : animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; G3 : animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; G4 : animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3.....	36

Figura 10. Concentração plasmática (pg/mL) da prostaglandina E₂ (PGE₂) ± erro padrão da média (n=9), nos grupos experimentais, **G1:** grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2:** animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3:** animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4:** animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3. As letras a,b e c demonstram diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos.....

Figura 11. Concentração plasmática (pg/mL) do tromboxano B₂ (TXB₂) ± erro padrão da média (n=9), nos grupos experimentais, **G1:** grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2:** animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3:** animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4:** animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3. As letras a,b e c demonstram diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos.....

Figura 12. Concentração plasmática (pg/mL) do leucotrieno B₄ (LTB₄) ± erro padrão da média (n=9), nos grupos experimentais, **G1:** grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2:** animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3:** animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4:** animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3. As letras a,b e c demonstram diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos.....

Figura 13. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE

200x. Animal pertencente ao grupo 1 . Observam-se fibras com formato poligonal, núcleos periféricos (p), pequeno número de fibra muscular arredondada (ar) e polimórficas (pm).....	42
Figura 14. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE	
200x. Animal pertencente ao grupo 2 . Observam-se fibras com formato poligonal, núcleos periféricos (p), pequeno número de fibra muscular arredondada (ar), polimórficas (pm) e atroficas (a).....	43
Figura 15. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE	
200x. Animal pertencente ao grupo 3 . Observa-se a presença de fibras musculares polimórficas (pm), arredondadas (ar), atroficas (a), angulares (ag), áreas com fibras hipertróficas (h), <i>splitting</i> (sp) e fibras em processo de fagocitose (f).....	43
Figura 16. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE	
200x. Animal pertencente ao grupo 4 . Observam-se contornos poligonais, poucas fibras com tendência a arredondamento (ar), polimórficas (pm) e algumas áreas com fibras angulares (ag), hipertróficas (h) e hialinizadas.....	44
Figura 17. Box-plot representativo do menor diâmetro das fibras musculares do músculo sóleo dos animais dos grupos analisados.....	46
Figura 18. Distribuição percentual da quantidade de fibras musculares nos vários diâmetros das fibras entre os grupos sedentários e treinados, suplementados e sem suplementação.....	47
Figura 19. Distribuições percentuais da quantidade de fibras musculares nos	

vários diâmetros das fibras entre os grupos treinados e sedentários, com e sem suplementação de ω -3.....	48
Figura 20. Curva padrão da prostaglandina E_2 (ANEXO).....	73
Figura 21. Curva padrão do tromboxano B_2 (ANEXO).....	74
Figura 22. Curva padrão do leucotrieno B_4 (ANEXO).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
AST – Aspartato transaminase
CK – Creatina quinase
DHA – Ácido docosahexaenóico
EIA – Método de enzima imunoensaio
EPA – Ácido eicosapentaenóico
GLA – Ácido gama-linolênico
HDL₂ – Lipoproteína de alta densidade tipo 2
HE – Método hematoxilina e eosina
IL – Interleucinas (citocinas)
LDH – Lactato desidrogenase
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LTB₄ – Leucotrieno B₄
NK cells – Células destruidoras naturais
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGI₂ – Prostaciclina I₂
T-LSD – Teste estatístico T de Student
TNF – Fator necrose tumoral
TXA₂ – Tromboxano A₂
TXB₂ – Tromboxano B₂

RESUMO

O uso de drogas antiinflamatórias é comum entre atletas nos quais a prevalência de lesões musculares é elevada tanto nos períodos de treinamento e competição. Entretanto, algumas dessas drogas possuem ação imunossupressiva, que quando utilizadas em grande quantidade ou por tempo prolongado pode provocar queda nas respostas imunológicas. O objetivo da presente Tese foi verificar se a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 ocasionaria uma redução, tanto nas concentrações plasmáticas dos indicadores de lesão muscular (enzima lactato desidrogenase e creatina quinase) como dos mediadores químicos da inflamação da série “2” (prostaglandina E₂, tromboxano B₂ e leucotrieno B₄) derivados do ácido araquidônico (C20:4, ω-6) e das alterações morfológicas do músculo esquelético. O experimento foi desenvolvido com 36 ratos Wistar distribuídos ao acaso em quatro grupos experimentais com nove ratos. Os grupos formados eram os seguintes: **Grupo 1** - ratos sedentários sem suplementação; **Grupo 2** - ratos sedentários com suplementação; **Grupo 3** - ratos submetidos às sessões de natação (60 minutos diários), com carga de peso extra crescente, sem suplementação e **Grupo 4** - ratos submetidos às sessões de natação, com carga de peso extra crescente, com suplementação. A suplementação era feita por gavagem utilizando-se 3,0 g diárias de óleo de peixe contendo AGPI ω-3 (EPA: 187,0 mg/g e DHA: 140,0 mg/g) durante 28 dias. Os grupos não suplementados receberam 3,0 g de azeite de oliva diariamente (grupo controle). Os ratos receberam dieta não purificada de fórmula fechada (MP-77-Primor) e água à vontade, sendo os pesos avaliados semanalmente. Os indicadores de lesão muscular (LDH e CK), análise histológica e morfométrica das fibras musculares

esqueléticas bem como os mediadores do processo inflamatório (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4) foram determinados no final do experimento. Os resultados obtidos indicam que a suplementação com AGPI ω -3 reduziu a concentração plasmática da enzima LDH, tanto nos animais sedentários como nos submetidos ao treinamento físico ($p < 0,05$). Com relação aos mediadores químicos da inflamação (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4) as concentrações plasmáticas reduziram significativamente ($p < 0,05$) nos animais sedentários, mas não reduziram nos animais submetidos ao exercício físico. No entanto, ao se observar esse resultado, verificou-se que em todos os mediadores químicos houve uma redução nos valores absolutos nos animais suplementados com AGPI ω -3. Pela análise histológica das fibras musculares mostrou que nos grupos treinados, os ratos não suplementados apresentaram as seguintes alterações morfológicas: presença de processo de fagocitose de fibra muscular, fibra atrófica e fibras polimórficas, enquanto que nos ratos suplementados, a análise histológica mostrou uma redução acentuada dessas alterações o que resultou na quase inexistência de lesões musculares. Tendo em vista os resultados obtidos, pode ser sugerido de que ação antiinflamatória dos AGPI ω -3 nos ratos e por extensão em atletas, seria maior se a suplementação fosse realizada diariamente independentemente do período de treinamento.

ABSTRACT

The use of antiinflammatory drugs is common among athletes in which the prevalence of muscular lesions is elevated in training and competition periods. However, some of those drugs have an immunosuppression action, and when used in high dosages or for long time can provoke a decrease in the immunological responses. The objective of the present Thesis was to verify if the supplementation with polyunsaturated fatty acids omega-3 would cause a reduction, in the plasmatic concentrations of the indicators of muscular lesion (lactate dehydrogenase enzyme and creatine kinase) as well as in the chemical mediators of the inflammation of the series "2" (prostaglandin E2, thromboxane B2 and leukotriene B4) derived of arachidonic acid (C20:4, ω -6) and the morphologic alterations of skeletal muscle. The experiment was developed with 36 Wistar rats distributed at random in four experimental groups with nine rats. The formed groups were the following: **Group 1** - sedentary rats without supplementation; **Group 2** - sedentary rats with supplementation; **Group 3** - rats submitted to swimming sessions (60 minutes daily), with load of gaining extra weight, without supplementation and **Group 4** - rats submitted to swimming sessions, with load of gaining extra weight, with supplementation. The supplementation was made daily by "gavage" using 3,0g of fish oil containing AGPI ω -3 (EPA: 187,0 mg/g and DHA: 140,0 mg/g) for 28 days. The groups not supplemented received 3,0g of olive oil daily (control group). The rats received a non-purified diet of closed formula (MP-77-Primor) and water was *ad libitum*, with their weight being checked weekly. The indicators of muscular lesion (LDH and CK), histological and morphometric analyses of the skeletal

muscular fibers as well as the mediators of the inflammatory process (PGE₂, TXB₂ and LTB₄) were determined at the end of the experiment. The obtained results indicate that the supplementation with AGPI ω-3 did reduce the plasmatic concentration of the LDH enzyme in the sedentary animals as well as in the animals submitted to the physical training (p<0,05). With respect to the chemical mediators of the inflammation (PGE₂, TXB₂ and LTB₄) the plasmatic concentrations were reduced significantly (p < 0,05) in the sedentary animals, but were not reduced in the animals submitted to the physical exercise. However, by observing this results, it was verified that in all of the chemical mediators there was a reduction in the absolute values in the supplemented animals with AGPI ω-3. By the histological analysis of the muscular fibers showed that in the trained groups, the no supplemented rats had the following morphologic alterations: presence of the process of phagocytosis of muscular fiber, atrophic fiber, polymorphic fibers, while that in the supplemented rats, the histological analysis showed an accentuated reduction of those alterations that resulted in an almost inexistence of muscular lesions. Having in mind the obtained results, it can be suggested that the antiinflammatory action of AGPI ω-3 in the rats and for extension in athletes, would be improved if the supplementation was administered daily independently of the training period.

1 INTRODUÇÃO

Em atletas de elite, a prevalência de lesões musculares é elevada tanto nos períodos de treinamento quanto em competição, ocorrendo particularmente quando o exercício é relativamente intenso, de longa duração e/ou inclui uma contração excêntrica. No início são microlesões e freqüentemente ocorrem em proporções pequenas das fibras em um músculo, ocasionando reduções temporárias na produção de força e inflamação muscular, as quais ambos podem afetar a performance do atleta (ARMSTRONG, 1990).

Assim sendo, a utilização de drogas antiinflamatórias é comum entre os atletas. Algumas destas drogas possuem também uma ação imunossupressiva e portanto, a sua utilização em grande quantidade ou por tempo prolongado, pode provocar uma queda das respostas imunológicas (LAPOINTE; FRENETTE; CÔTÉ, 2002).

Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser classificados em ômega-9 (ω -9), ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3), de acordo com a localização da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metil terminal da molécula. Os ácidos graxos poliinsaturados ácido linoléico (ω -6) e o ácido α -linolênico (ω -3), quando metabolizados formam outros poliinsaturados como ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico (EPA), respectivamente (CALDER, 2003). Vários estudos têm demonstrado efeitos benéficos dos ω -3 à saúde: no metabolismo lipídico,

provocam uma diminuição nos níveis plasmáticos dos triacilgliceróis e um aumento da HDL₂ (NESTEL, 2000), e possuem também uma ação antiinflamatória, provocada pela diminuição da síntese de potentes mediadores químicos da inflamação, derivados do ácido araquidônico: prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano A₂ (TXA₂), prostaciclina (PGI₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (KREMER, 2000). Portanto, pode-se supor que uma suplementação com os ácidos graxos EPA e DHA (ω -3) em atletas, poderia atenuar os efeitos do processo inflamatório no músculo lesionado, através da diminuição da síntese dos eicosanóides PGE₂, TXA₂, PGI₂ e LTB₄, diminuindo com isso o tempo de recuperação dos atletas, e ao mesmo tempo diminuindo os efeitos imunossupressivos das drogas antiinflamatórias normalmente usadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EXERCÍCIO FÍSICO E LESÃO MUSCULAR

A atividade física é uma conhecida como forma de estresse e a exposição crônica a ela é chamada de treinamento físico (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Diante de uma atividade física o organismo pode responder produzindo várias alterações anatomofisiológicas, dentre elas destacam-se as alterações que podem ser produzidas no sistema muscular (BEHM, 1998; GREEN et al., 1999).

Uma das alterações da musculatura é a presença de microlesões, que, de acordo com Armstrong (1990), podem ser desencadeadas por um exercício muscular intenso de longa duração, o qual ocasiona lesões das fibras musculares, sendo estas de natureza subcelular que ocorrem normalmente em pequena quantidade de fibras musculares. Segundo este mesmo autor, a rápida destruição da fibra muscular lesada e do tecido conectivo é acompanhada pela difusão de componentes intracelulares dentro do interstício e plasma (ARMSTRONG, 1990).

Essas alterações musculares também foram estudadas por Carlsson e Faulkner (1983) que afirmam que em geral, o músculo esquelético tem a capacidade de se adaptar às diferentes modalidades de treinamento reagindo de maneiras variadas a cada uma delas. Porém, qualquer alteração, seja no aspecto

morfológico ou histoquímico, proverá um déficit de funcionamento no segmento afetado, caracterizando uma lesão.

Acredita-se que a lesão em um músculo, principalmente, após ter ocorrido uma série de contrações excêntricas, pode ser explicada através de dois mecanismos: ruptura do sistema miofibrilar do sarcômero e falha no processo acoplado excitação-contração (E-C). Neste tipo de exercício durante o alongamento do músculo, os sarcômeros são estendidos repetitivamente, ocorrendo sua ruptura. Quando a região de ruptura é extensa, a membrana é danificada, podendo ocorrer o rompimento dos túbulos T e destruição do retículo sarcoplasmático. Isto acarreta uma liberação de grandes quantidades de Ca^{+2} no citossol, afetando o processo acoplado E-C (PROSKE; MORGAN, 2001).

Além de ocorrer ruptura do sistema miofibrilar do sarcômero, outras alterações morfológicas do músculo a nível celular, tais como estiramento do disco Z e ruptura da banda A, estão também associadas com a contração excêntrica (FRIDÉN, 1984; OGILVIE et al., 1988). Estas microlesões provocam dores musculares e uma redução da força muscular, afetando a performance do atleta (ARMSTRONG, 1984).

Segundo Armstrong (1990), uma lesão muscular envolve quatro etapas. Na primeira etapa ocorre a ruptura do sistema miofibrilar do sarcômero, e imediatamente após esta fase inicia-se a fase autogenética, ocorrendo uma

proteólise e lipólise na membrana das células musculares, iniciando assim, um processo de degradação das estruturas celulares. Nesta etapa o aumento intracelular de Ca^{+2} ativa a fosfolipase A_2 induzindo a produção de prostaglandinas, leucotrienos e de radicais livres. Após 4 a 6 horas de ter ocorrido a primeira etapa, inicia-se a terceira etapa, a fagocítica, que é marcada por uma típica resposta inflamatória no tecido lesionado. Na quarta e última etapa, ocorre a regeneração do sistema miofibrilar do músculo lesionado, sendo que esta etapa poder ser evidenciada de 4 a 6 dias após o exercício.

Durante o processo inflamatório, três subseqüentes estágios podem ser identificados de acordo com as diferentes populações de células inflamatórias presentes no tecido lesionado. Primeiro, neutrófilos rapidamente invadem o local da lesão e promovem a liberação de citocinas que podem ativar e atrair outras células inflamatórias. Em seguida, macrófagos invadem a fibra muscular lesionada e fagocitam os fragmentos celulares. No final, há um aumento de uma segunda população de macrófagos que está associada com o processo de regeneração (LAPOINTE; FRENETTE; CÔTÉ, 2002; STAUBER et al., 1988; TIDBALL, 1995).

Além da resposta celular no processo inflamatório, alguns sinais clínicos como elevação de enzimas plasmáticas (CK, LDH e AST), citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e TNF- α), proteína C reativa (PCR) e eicosanóides (PG, TX, LT e PGI), também são freqüentes nas lesões musculares (ALMEKINDERS; BANES; BALLENGER, 1992; ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983; HIROSE et al.,

2004; KARAMIZRAK et al., 1994; KÖNIG et al., 1997; NOSAKA; CLARKSON, 1996; PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000). Segundo Pedersen e Hoffman-Goetz (2000) a produção e liberação de citocinas pelos neutrófilos e macrófagos, principalmente IL-6, estimula a produção de prostaglandinas (PGE_2), e que o acúmulo de citocinas, PGE_2 e CK no local da inflamação, provoca a dor e edema no músculo.

O dano tecidual também pode ser gerado pelo estresse oxidativo presente em atividades que levem ao desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros predominem (SIES, 1986). Além disso, o estresse oxidativo pode gerar danos a proteínas e ao DNA, provocando diversas alterações na função celular e, portanto, tecidual. Confirmando essa afirmação, Nies et al. (1996) ao estudarem humanos, demonstraram a ocorrência de dano ao DNA nos leucócitos circulantes após exercício exaustivo em esteira.

Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar em 35 vezes a demanda de repouso (ASTRAND et al., 2003). Dessa forma, durante a sua realização ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio, na sua maior parte em decorrência do aumento de trabalho muscular. Pelo fato dos radicais livres serem produzidos através do metabolismo intermediário, o exercício provoca aumento da sua produção. A ativação de leucócitos pode estimular a produção de radicais livres para melhorar os mecanismos de defesa do

hospedeiro em resposta ao dano muscular induzido pelo exercício. Em particular, os neutrófilos podem reduzir o oxigênio molecular a radical superóxido via NADPH oxidase, a qual está inativa nas células em repouso. Processos similares têm sido observados em monócitos e eosinófilos; Sendo assim, durante o metabolismo aeróbio, a possibilidade de ocorrer lesão oxidativa nos tecidos vai depender de um preciso equilíbrio entre a geração de radicais de oxigênio e a eficácia dos mecanismos antioxidantes.

Vindo de encontro a essas informações, Oh-Ishi et al. (1997) avaliaram se o treinamento de resistência, em esteira rolante por nove semanas, ou se o exercício agudo melhora a habilidade do músculo diafragma para resistir ao estresse oxidativo induzido pelo exercício. Os resultados demonstram que o treinamento de resistência pode elevar o ajuste da atividade de certas enzimas antioxidantes no músculo diafragma de ratos, indicando potencial melhora na resistência a espécies de reações de oxigênio intracelular, também sugerem que o exercício agudo pode causar lesão oxidativa no diafragma de rato, através da ativação de caminhos de inflamação, e que o treinamento de resistência pode minimizar o estresse oxidativo extracelular devido ao exercício agudo.

Apesar dos efeitos benéficos do exercício físico, o mesmo quando executado de forma contínua e intensa é acompanhado pela produção de radicais livres que produzem alterações das membranas celulares, o que causa uma lesão

associada a um processo inflamatório nas das fibras musculares (CÓRDOVA; NAVAS, 2000).

Sendo assim, para que o exercício físico seja totalmente benéfico, são desejados níveis eficientes de defesa antioxidante e conseqüentemente baixos níveis de estresse oxidativo o que evitaria ao máximo a instalação de processos de lesão. Essa resposta poderia manter o desempenho pouco alterado, bem como evitar o aparecimento de lesões musculares ocasionadas por este tipo de estresse (ZOPPI et. al., 2003).

2.2 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E ÔMEGA-3

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são classificados em quatro tipos de famílias: ômega-9 (ω -9), ômega-7 (ω -7), ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3), sendo que esta classificação refere-se a posição da primeira insaturação (dupla ligação) na cadeia carbônica a partir do carbono terminal. Os mamíferos são capazes de sintetizar os ácidos graxos saturados e ácidos graxos monoinsaturados das séries ω -7 e ω -9, mas não podem sintetizar os AGPI linoléico (ω -6) e α -linolênico (ω -3) pela falta das enzimas delta 12 e delta 15 dessaturase, com isso são considerados ácidos graxos essenciais.

As grandes fontes alimentares do ácido linoléico são os óleos de soja, girassol e milho, e do α -linolênico são os óleos de linhaça, canola e peixes (CALDER, 2003; JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000). Uma vez consumido estes ácidos graxos, eles podem formar outros AGPI (**Figura 1**). Assim, o ácido linoléico é dessaturado, formando o ácido γ -linolênico (ω -6), que sofre um alongamento da sua cadeia carbônica, originando o ácido dihomo- γ -linolênico (ω -6), o qual é dessaturado, formando o ácido araquidônico (ω -6). Os ácidos graxos ω -3 são alongados e dessaturados pelas mesmas enzimas, levando a formação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA; ω -3) e docosahexaenóico (DHA; ω -3) a partir do ácido α -linolênico (**Figura 1**). Com isso existe uma competição entre os AGPI ω -3 e ω -6, porém sabe-se que a enzima delta-6-dessaturase possui mais afinidade pelo ácido α -linolênico (SUCHNER; SENFTLEBEN, 1994). Comparados com os ácidos linoléico e α -linolênico, a ingestão de dietas contendo os ácidos graxos EPA e DHA é pequena, que são encontrados principalmente nos óleos de peixes (CALDER, 2003; KÖNIG et al., 1997; JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000).

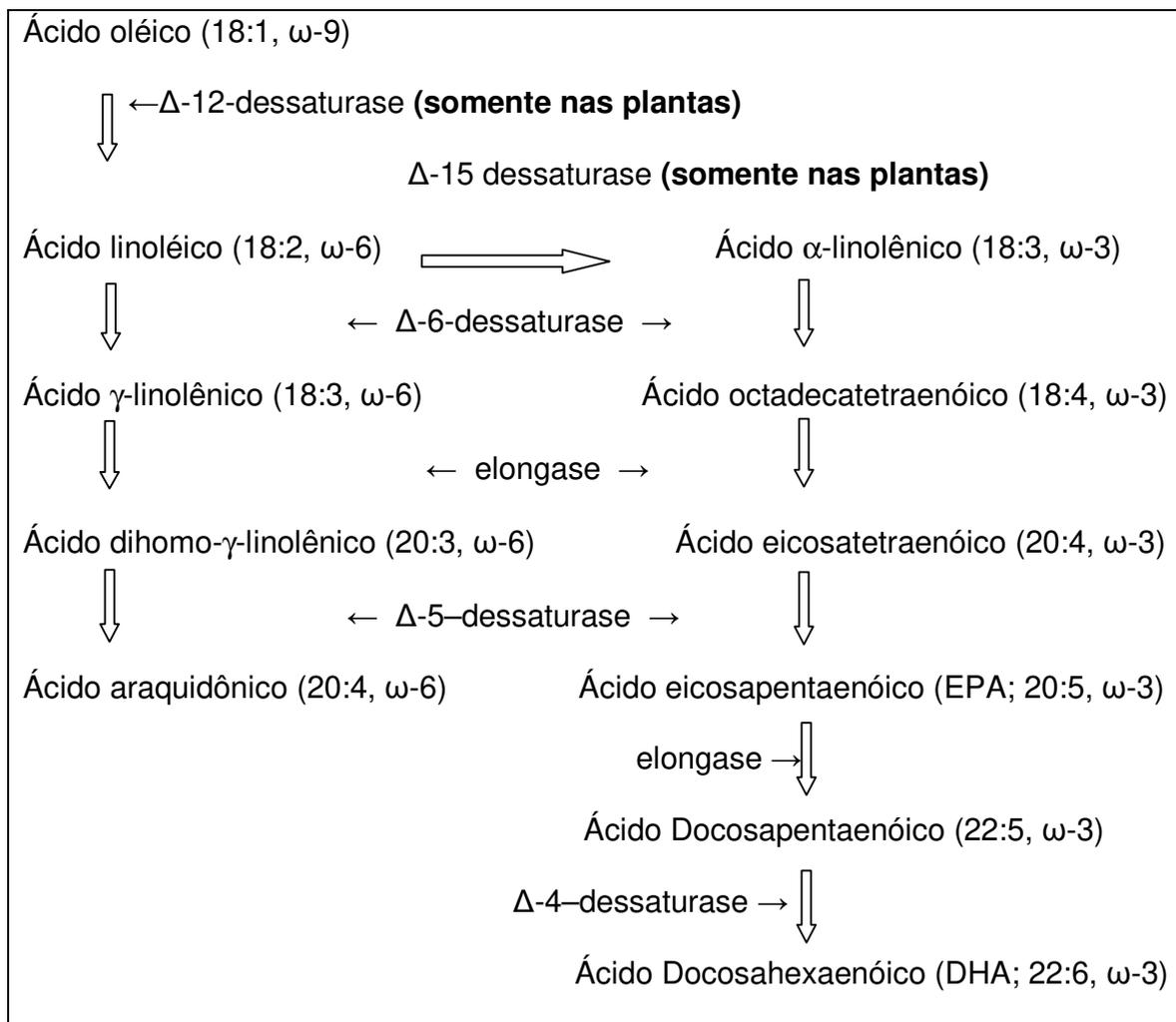


Figura 1. Biossíntese dos ácidos graxos poliinsaturados.
 Fonte: König et al. (1997, p. 4).

Calder (2003) destaca três principais importâncias dos AGPI. A primeira envolve a regulação do metabolismo e transporte dos lipídeos. Neste caso sabe-se que os AGPI ω-3 inibem a síntese hepática do triacilglicerol, contribuindo para que ocorra uma hipotriacilglicerolemia e uma diminuição na concentração sanguínea da LDL colesterol. A segunda importância, é que os AGPI constituem

os fosfolípídeos, que são os principais componentes das membranas de todas as células. A presença de grande quantidade de AGPI na membrana aumenta a sua fluidez, tendo com isso, um papel importante na regulação da atividade das proteínas da membrana. A terceira, é que alguns tipos de AGPI são substratos para a síntese de metabólitos bioativos conhecidos como eicosanóides. A família desses metabólitos inclui prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), prostaciclina (PGI) e derivados hidroxilados dos ácidos graxos (HETEs e HPETE).

Os substratos para a formação dos eicosanóides são os ácidos: dihomo- γ -linolênico, araquidônico e o eicosapentaenóico (EPA). Na síntese dos eicosanóides, seu ácido graxo precursor é clivado dos fosfolípídeos da membrana pela fosfolipase A_2 ou C. Os ácidos graxos livres resultantes são então metabolizados pela enzima ciclooxygenase, resultando em PG, PGI, TX. Estes eicosanóides quando derivados do ácido araquidônico, são da série “2” (PGE_2 , TXA_2 e PGI_2), e quando derivados do ácido eicosapentaenóico (EPA), são da série “3” (PGE_3 , TXA_3 e PGI_3). O ácido dihomo- γ -linolênico não é convertido em tromboxano e prostaciclina, ele dá origem as prostaglandina E_1 (PGE_1) (CALDER, 2003; KÖNIG et al., 1997) (**Figura 2**).

Um outro caminho metabólico na síntese dos eicosanóides é a síntese dos leucotrienos (LT) através do metabolismo dos ácidos graxos livres, clivados dos fosfolípídeos pela ação da enzima 5-lipoxigenase, onde o ácido araquidônico dá

origem aos leucotrienos da série “4” (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) e o eicosapentaenóico (EPA) forma os da série “5”. Os leucotrienos derivados do ácido dihomo- γ -linolênico são da série “3”, tendo até o momento, pouca informação sobre sua importância bioquímica e clínica (CALDER, 2003; KÖNIG et al., 1997; SUCHNER; SENFTLEBEN, 1994)(Figura 2).

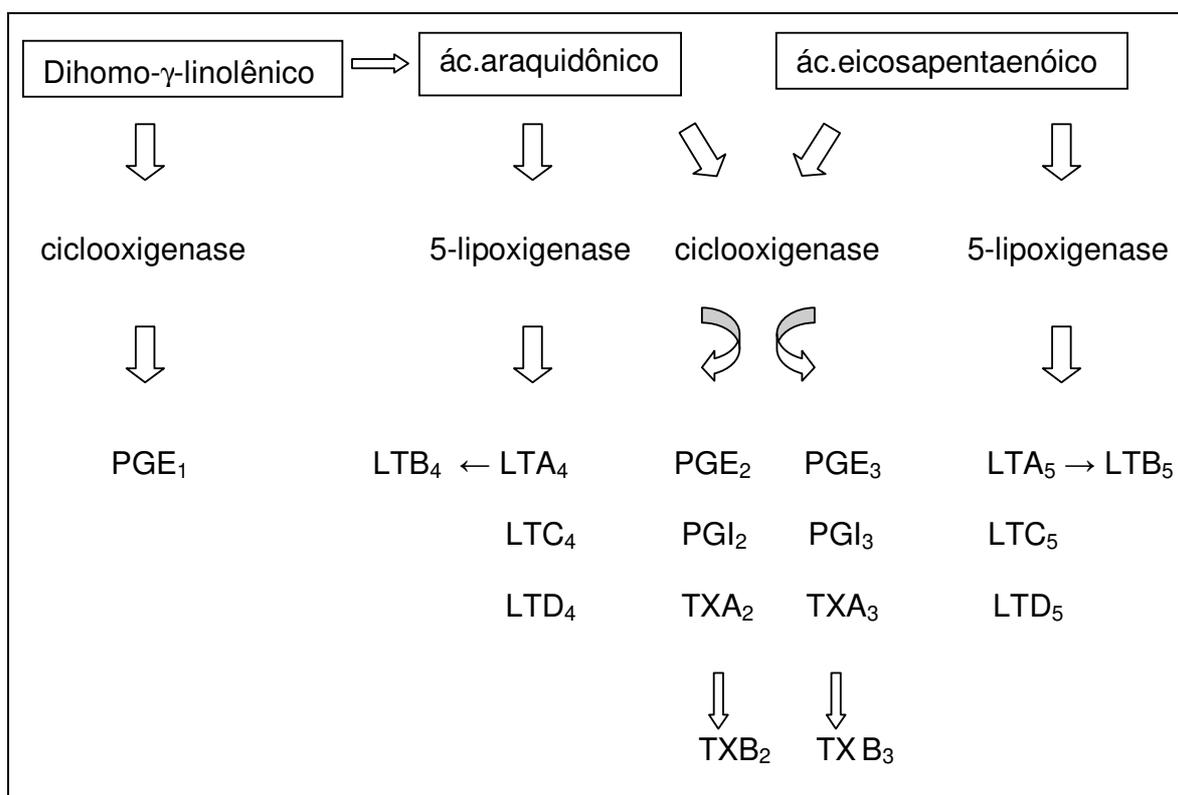


Figura 2. Via metabólica da síntese dos eicosanóides a partir dos ácidos graxos poliinsaturados.

Fonte: Calder (2003, p. 436).

2.3 AÇÃO BIOLÓGICA DOS EICOSANÓIDES

As prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos, dependendo de sua estrutura exercem vários efeitos nas respostas inflamatórias e

imunes, atuando como mediadores químicos. Segundo Bonta e Parnham (1982), a prostaglandina E₂ (PGE₂) aumenta os níveis de AMPc nos leucócitos, linfócitos T e linfócitos B, e com isso exerce um efeito imunossupressor, através da diminuição das funções dos linfócitos B e T, diminuição na produção de antígenos, inibição da migração e proliferação dos linfócitos. Tem sido também demonstrado que a PGE₂ inibe a atividade das células destruidoras naturais (NK cells), diminui a atividade fagocitária, a quimiotaxia, a agregação e o metabolismo oxidativo dos leucócitos (AYALA; CHAUDRY, 1995; KÖNIG et al., 1997; POMPÉIA et al., 2000).

Segundo Calder (2003) com relação ao processo inflamatório, a PGE₂ aumenta a permeabilidade vascular e vasodilatação, induz a febre, a dor e edema. A PGE₂ também possui uma ação antiinflamatória ao diminuir a produção de TNF- α e IL-1. Apesar da PGE₃ ter o mesmo efeito da PGE₂, existem trabalhos que comprovam que a PGE₃ é menos imunossupressora do que a PGE₂, e que tem mostrado efeitos positivos no sistema imune (GUARNER; VILASECA; MALAGELADA, 1992); já a PGE₁ possui efeitos como vasodilatação e inibição das funções dos leucócitos, como por exemplo a quimiotaxia e a liberação de enzimas dos lisossomos (JOHNSON et al., 1997).

O papel do tromboxano A₂ (TXA₂) no processo inflamatório é de vasoconstritor e estimulador da agregação plaquetária, sendo que o TXA₃ exerce os mesmos efeitos, porém menos intensos, e ambos são rapidamente convertidos em seus respectivos metabólitos inativos TXB₂ e TXB₃; já as prostaciclina (PGI₂ e

PGI₃) possuem efeitos contrários dos TX(s), promovendo a vasodilatação e inibindo a agregação plaquetária (PALOMBO et al., 1996).

Os leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) são chamados de substâncias de reação lenta (SRS), estão envolvidas na contração da musculatura lisa gastrointestinal e respiratória, onde possui efeitos quimiostático e promovem a liberação de enzimas lisossomais. O LTB₄ é produzido principalmente pelos monócitos, mastócitos, basófilos e neutrófilos, e estimula a agregação e migração celular, possuindo alta atividade quimiostática nos tecidos, estimula a liberação de enzimas lisossomais, e aumenta a formação de radicais livres de oxigênio, e aumenta a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 (AYALA; CHAUDRY, 1995; CALDER, 2003), sendo que o LTB₅ possui uma baixa bioatividade em relação ao LTB₄ (CALDER, 1998a; SPURNEY et al., 1994).

2.4 EFEITO DA DIETA EM AGPI NA SÍNTESE DE MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO

Da mesma forma da competição da enzima delta-6-dessaturase, os ácidos graxos essenciais competem pela ciclooxigenase e 5-lipoxigenase; embora o ácido araquidônico seja preferencialmente metabolizado pela ciclooxigenase, os ácidos graxos ω -3 e principalmente o EPA, inibe competitivamente a ciclooxigenase (AYALA; CHAUDRY, 1995; CALDER, 1998a, 2003; JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000). Com isso uma ingestão de grande quantidade de

peixes ricos em ácidos graxos poliinsaturados ω -3 ou pela suplementação com ω -3, resulta em uma diminuição da concentração do ácido araquidônico nos tecidos e sangue (BELL et al., 1996; BOUDREAU et al., 1991), levando a uma diminuição da síntese dos eicosanóides derivados do araquidônico (PGE_2 , TXA_2 e PGI_2) e aumentando a formação dos eicosanóides derivados do EPA (PGE_3 , TXA_3 e PGI_3) que são menos ativos do que os eicosanóides da série “2”.

Comparando com o ácido araquidônico, o EPA é o substrato preferencial da 5-lipoxigenase, desta maneira uma ingestão maior de ácidos ω -3, leva também a uma diminuição da síntese de LTB_4 e um aumento na produção de LTB_5 , que é menos ativo que o leucotrieno da série “4” (KIM et al., 1991; SPURNEY et al., 1994).

Uma outra maneira de controlar a síntese dos eicosanóides é de aumentar a ingestão do ácido γ -linolênico (ω -6), que após formar o dihomô γ -linolênico (ω -6) compete também com o ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase, levando com isso a um aumento da síntese de PGE_1 , a qual inibe a síntese do LTB_4 e diminui a relação entre TXA_2 / PGI_2 (JOHNSON et al., 1997; PALOMBO et al., 1996).

Vários estudos têm mostrado que a ingestão de ácidos graxos ω -3 e ácidos γ -linolênico (ω -6) diminui a síntese de potentes mediadores químicos da

inflamação, derivados do ácido araquidônico (PGE_2 , TXA_2 , PGI_2 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) em animais e humanos:

Calder (1998b) relata as principais conclusões tiradas do Simpósio “Lipídeos e Sistema Imune”; onde o autor destaca a importância dos ácidos graxos no sistema imune e finalmente conclui que:

1- A quantidade e o tipo de eicosanóides podem ser afetados pelo tipo de gordura consumida na dieta.

2- Os eicosanóides e ácidos graxos poliinsaturados são potentes moduladores das funções dos linfócitos in vitro.

3- Dietas ricas em ácidos graxos ω -3 possuem ação antiinflamatória e imunossupressora in vivo.

4- Embora os ácidos graxos ω -3 exerçam uma ação moduladora na síntese dos eicosanóides, alguns dos efeitos provocados por estes ácidos graxos podem ser explicados por mecanismos independentes dos eicosanóides, incluindo uma ação no mecanismo da sinalização intracelular e na transcrição de fatores ativos da resposta imunológica.

5- Os ácidos graxos ω -3 podem ser usados na terapia de inflamações agudas e crônicas, e nos casos em que a resposta imune está sendo ativada inadequadamente.

Estudando o efeito dos ácidos graxos ω -3 na síntese de eicosanóides em ratos, Brouard e Pascaud (1990) observaram que uma dieta contendo óleo de

peixe, que contém grande quantidade de EPA e DHA (ω -3), diminuiu significativamente a síntese dos eicosanóides (PGI_2 , TXB_2 , PGE_2 e LTB_4) comparada com uma dieta contendo óleo de linhaça, rico em ácido graxo α -linolênico (ω -3).

Kim et al. (1991) realizaram um estudo em suínos alimentados com 3 tipos de dietas: 1- dieta rica em gordura e colesterol; 2- Dieta 1 mais óleo de peixe (30 mL/dia) e 3- dieta pobre em gordura e colesterol. Os autores observaram uma diminuição significativa nos níveis dos eicosanóides: tromboxano B_2 , prostaciclina I_2 e leucotrieno B_4 , nos animais alimentados com a dieta-3.

Hamazaki (1992) realizando uma infusão intravenosa de ácidos graxos ω -3 em coelhos, obteve uma diminuição de 40% de leucotrieno B_4 e uma diminuição da atividade das células destruidoras naturais (NK cells)

Bunce, Soad e Berdanier (1992) estudaram o efeito de uma alimentação com dietas (2% ou 10% de gordura) contendo óleo de milho, carne de boi gordurosa ou óleo de cozinha, nos níveis de eicosanóides no cérebro, plasma e medula renal de ratos; observaram que os níveis LTB_4 foram significativamente mais altos no cérebro dos ratos alimentados com baixa quantidade de carne de boi gordurosa do que no cérebro de ratos alimentados com altas quantidades de carne de boi ou com baixa quantidade de óleo de milho ou óleo de cozinha, e que

os níveis de PGI_2 foram altas em ratos alimentados com dietas contendo 10% de óleo de milho.

Com objetivos de estudar experimentalmente a influência de dietas ricas em ácidos graxos ω -6 ou ω -3 nas inflamações intestinais; Guarner, Vilaseca e Malagelada (1992) usaram o ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos, com a finalidade de induzir uma colite inflamatória, observaram que aqueles animais que ingeriram uma dieta rica em ácidos ω -3 (óleo de fígado de bacalhau), apresentaram uma menor síntese de eicosanóides pelo lúmen em relação aos animais que ingeriram uma dieta rica em ω -6 (óleo de açafrão); avaliando macroscopicamente e microscopicamente, observaram também uma diferença significativa da lesão entre os grupos, sugerindo que uma dieta com óleo de peixe diminui a severidade da lesão.

Blair et al. (1993) em um estudo com mulheres ingerindo duas dietas com quantidades diferentes de ácido linoléico (ω -6), observaram que a excreção urinária do metabólito 6-oxo-prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ (metabólito derivado da PGI_2) não alterou em ambas as dietas, enquanto que a excreção do 2,3-dinor-tromboxano B_2 (metabólito resultante do TXA_2) foi menor na ingestão da dieta rica em linoléico; com relação à excreção da PGE_2 , ela foi maior nas pessoas que ingeriram grande quantidade de ácido linoléico.

Outros trabalhos confirmam a influência da dieta na biossíntese dos eicosanóides: Prakash et al. (1994) observaram que dietas com salmão (rico em ácidos graxos ω -3), a excreção urinária de 2,3-dinor-tromboxano foi significativamente menor em relação a dietas padrões consumidas nos Estados Unidos, porém a excreção urinária de 2,3-dinor-6-oxo-prostaglandina $F_{1\alpha}$ não foi significativamente diferente entre as pessoas que ingeriram uma dieta rica em salmão e dieta padrão. Em um outro estudo Nordoy et al. (1994) comparando o efeito de uma dieta rica em gorduras saturadas e de outra rica em óleo de peixe na biossíntese de eicosanóides, concluíram que a produção de tromboxano A_2 e prostaciclina I_2 foi menor em homens que ingeriram a dieta rica em óleo de peixe.

Os ácidos graxos ω -3 podem ter um papel importante nas doenças auto-imunes; durante um estudo com ratos portadores de lupus nefrite (doença auto-imune), Spurney et al. (1994) observaram uma melhora das funções renais e da histologia glomerular em ratos alimentados com óleo de peixe quando comparados aos animais alimentados com óleo de açafrão e concluíram que os ácidos ω -3 diminuem a síntese de leucotrieno B_4 pelos macrófagos.

Suchner e Senftleben (1994) em uma revisão dos principais trabalhos relacionando à interação farmacológica entre os ácidos graxos poliinsaturados, eicosanóides e sistema imune, concluíram que uma alteração nas dietas contendo ácidos graxos ω -3 e ω -6 pode influenciar na síntese e na ação dos mediadores

químicos do sistema imune, e que os eicosanóides derivados dos ácidos ω -3 comparados daqueles derivados dos ω -6, possuem similares efeitos, mas com menor intensidade.

Relacionando ainda os ácidos ω -3 com o sistema imune, Ayala e Chaudry (1995) comentam a importância de determinar com precisão a quantidade e a duração da suplementação com ω -3 após um trauma, com objetivo de se prevenir à destruição de tecidos pela resposta imune, mas sem afetar as funções imunes normais.

Uma dieta com ácidos graxos ω -3 e gama-linolênico (GLA; ω -6) pode alterar rapidamente a composição química dos fosfolídeos dos macrófagos; Palombo et al. (1996) observaram que ratos alimentados enteralmente com dietas enriquecidas com 5,3% (em peso) de EPA (ω -3) e também com 1,2% ou 4,6% de GLA, em 3 dias ocorreram modificações dos fosfolídeos dos macrófagos aveolares, pulmão e fosfolídeos das células endoteliais. Bell et al. (1996) também observaram alterações na composição química dos fosfolídeos presentes no rim e brânquias de salmões, quando estes foram alimentados com dietas ricas óleos de peixe; com relação à síntese de eicosanóides, observaram um aumento da concentração de $\text{PGF}_{3\alpha}$ nas brânquias de salmões alimentados com óleo de peixe marinho e uma concentração reduzida de PGE_3 no homogeneizado de rins dos salmões alimentados com óleos de plantas (rico em

ω -6). Um outro estudo em humanos, Johnson et al. (1997) suplementaram 29 voluntários com doses de 1,5 a 6,0 g/d de ácido gama-linolênico (GLA), observaram um acúmulo do dihomogama-linolênico nos glicerolípídeos dos neutrófilos, os quais atenuaram a biossíntese dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico, indicando que uma dieta com GLA pode exercer um efeito antiinflamatório. No entanto, Barham et al. (2000) observaram que uma suplementação com EPA e GLA exerce uma ação antiinflamatória mais eficaz do que somente com GLA, isto se deve ao fato que o EPA inibe a enzima delta-5-dessaturase que converte o ácido dihomogama-linolênico em araquidônico.

Ferretti et al. (1997) realizou um estudo contrário aos de Johnson et al. (1997) e Barham et al., (2000), suplementando 10 homens saudáveis com dois tipos de dieta: uma dieta com pequena quantidade de ácido araquidônico e a outra com grande quantidade desse ácido, sendo o estudo realizado em crossover; no final do estudo concluíram que a excreção urinária dos eicosanóides vasoativos: 11-dehidrotromboxano B_2 e 2,3-dinor-6-oxo-PGF $_{1\alpha}$ aumentaram em 41% e 27% respectivamente, quando as pessoas foram alimentadas com uma dieta rica em ácido araquidônico.

Em um outro estudo com ratos, Broughton e Wade (2002) estudaram a influência da relação ω -3: ω -6 presente na gordura total de dietas, na composição dos ácidos graxos nos tecidos e na produção de eicosanóides pelas células

peritoneais; observaram que o aumento da ingestão de ácidos graxos ω -3 está associada com um aumento de ω -3 e uma diminuição de ω -6 nos tecidos, e também com a diminuição da síntese de LTC₄, LTD₄, LTE₄, PGI₂ e PGE₂, e aumento da síntese de LTs da série “5” pelas células peritoneais. Utilizando-se também de células peritoneais, Doshi et al. (2004) injetaram Zymosan A no peritônio de ratos para induzir um processo inflamatório, observaram que as concentrações de LTE₄ e PGE₂ na cavidade peritoneal foram significativamente menores nos ratos suplementados com dietas ricas em ácidos graxos ω -3.

Além da ação moduladora dos ácidos ω -3 na biossíntese dos eicosanóides, trabalhos mostram que os mesmos também atuam inibindo a produção da IL-1 β e do TNF α (CAUGHEY et al., 1996; JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000).

Nas artrites reumáticas onde há um envolvimento do TNF α , Kremer (2000) sugere que uma suplementação com ácidos graxos ω -3 por 3 a 4 meses por pacientes com esta patologia, poderiam tentar reduzir suas doses de drogas antiinflamatórias não esteróides. König et al. (1997) em um trabalho de revisão sobre a interação entre ácidos graxos essenciais, função imune e exercício, fizeram as seguintes observações: o exercício provoca alterações no sistema imune (liberação de mediadores da inflamação, ativação dos leucócitos e complementos e produção de proteínas da fase aguda); o exercício muito intenso pode provocar uma ação imunossupressora (diminuição das funções dos linfócitos

T e B e também da atividade fagocítica e citotóxica); os ácidos graxos essenciais ajudam na regulação do processo inflamatório, modulando a liberação de citocinas e as respostas da fase aguda e finalmente, que futuros estudos devem ser realizados para avaliar melhor o efeito da composição dos ácidos graxos no sistema imune e no processo inflamatório, durante um exercício intenso.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

1. Verificar se ocorre alterações nas concentrações plasmáticas de indicadores de lesão muscular, dos mediadores químicos da inflamação e alterações das características morfológicas do músculo esquelético em ratos treinados com sessões de natação, suplementados com ácidos graxos ω -3, eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA).

3.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar as concentrações plasmáticas de enzimas lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK).
2. Determinar as concentrações plasmáticas dos mediadores químicos da inflamação: prostaglandina E₂ (PGE₂), tromboxano B₂ (TXB₂, metabólito inativo do tromboxano A₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄) pelo método de enzima imunoensaio (EIA).
3. Analisar as alterações histológicas (posicionamento do núcleo, características e contornos das fibras e tecido conjutival) e morfométrica das fibras musculares esqueléticas dos ratos submetidos à experimentação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo foi realizado com trinta e seis ratos (*Rattus albinus*, Wistar) machos, com 100 dias de idade, pesando entre 250 e 300 g, no início do experimento.

Esses animais foram mantidos em uma sala climatizada com controle de temperatura entre 24^oC a 28^oC em um ciclo regular diário com 12 h de luminosidade.

Os animais permaneceram sob condições higiênicas, dentro de gaiolas plásticas (1 rato por gaiola) durante o período de adaptação (7 dias). Água e ração para roedores (MP-77 – Primor) foram fornecidas a vontade e os pesos dos animais foram avaliados semanalmente.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos ao acaso em quatro grupos compostos por 9 animais cada, seguintes:

- Grupo 1 (controle) – animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água a vontade sem suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ω -3.
- Grupo 2 (sedentários com suplementação) – animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água a vontade, suplementados com AGPI ω -3.
- Grupo 3 (treinados sem suplementação) – animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água a vontade, com treinamentos diários de natação em tanque e sem suplementação com AGPI ω -3.
- Grupo 4 (treinados com suplementação) - animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água a vontade, com treinamentos diários de natação em tanque e suplementados com AGPI ω -3.

4.3 PROTOCOLO DA SUPLEMENTAÇÃO

Os animais foram suplementados com 3,0 g/dia de óleo de peixe (RP Scherer do Brasil encapsuladora Ltda, Sorocaba, São Paulo-Brasil), contendo ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ω -3 (EPA: 187,0 mg/g e DHA: 140,0 mg/g), dados estes tirados de laudo fornecido pelo fabricante. A suplementação foi realizada por gavagem (**Figura 3**) durante um período de quatro semanas (BARHAM et al., 2000; DOSHI et al., 2004), com vitamina E através do fármaco EPHINAL[®], em quantidade equivalente a 5,52 mg/dia de acetato de DL- α -tocoferol, em vista a evitar a autoxidação dos ácidos graxos poliinsaturados

(JAMES et al., 1991). Os animais do Grupo 1 (controle) e Grupo 3 (treinados sem suplementação) foram suplementados com azeite de oliva como placebo e com a mesma quantidade de vitamina E dos demais grupos.



Figura 3. Animal sendo suplementado pelo método de gavagem.

4.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Os animais dos grupos treinados (3 e 4) foram submetidos a sessões de natação em um tanque de inox medindo 100 cm x 50 cm x 60 cm (**Figura 4**), contendo água a $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a uma profundidade de 50 cm, suficiente para evitar que os animais encostem a cauda no fundo do mesmo (MARCONDES et al., 1996). Em cada sessão, os animais do grupo experimental foram colocados simultaneamente para nadar no mesmo tanque.



Figura 4. Tanque de natação utilizado no experimento.

O programa de treinamento constituiu-se de sessões diárias de natação, 5 dias por semana (LINARDI, 1992; OSTMAN-SMITH, 1979), num total de 20 sessões, como ilustra a **Tabela 1**. Na primeira semana correspondente à fase de adaptação, foram executadas cinco sessões de 10, 20, 30, 40 e 50 min, respectivamente. A partir da 6^a sessão os animais foram submetidos a sessões de natação por 60 min contínuos e diários, os quais se mantiveram até o final da quarta semana.

Tabela 1. Protocolo de treinamento por meio de natação.

Semana de treinamento	Duração das sessões (min)
1	10, 20, 30, 40, 50
2	60, 60, 60, 60, 60
3	60, 60, 60, 60, 60
4	60, 60, 60, 60, 60

A partir da segunda semana, a intensidade de treinamento dos animais foi aumentada por meio de um chumbo preso com elástico na região dorsal dos animais (**Figura 5**). O incremento de peso foi de 5% do peso corporal, aumentando gradativamente até o início da 4ª semana, como pode ser visualizado na **Tabela 2**.

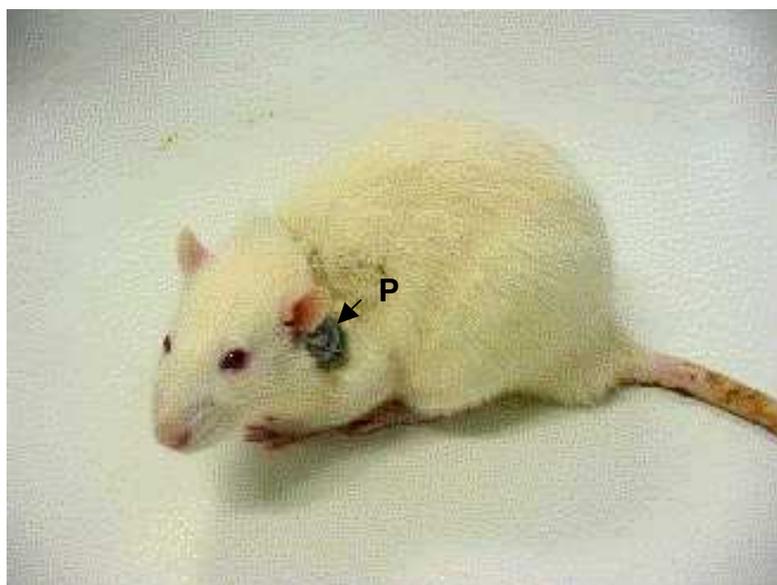


Figura 5. Carga presa (P) à região dorsal do animal.

Tabela 2. Incremento de carga a ser utilizada no protocolo de treinamento.

Semana de treinamento	Carga (peso do chumbo)
1	Sem carga
2	5% do peso corpóreo semanal
3	5% do peso corpóreo semanal
4	5% do peso corpóreo semanal

Ao término de cada sessão de natação, os animais foram colocados em caixas plásticas no interior de uma caixa de madeira aquecida por 2 lâmpadas incandescente de 100 watts, onde permaneceram por aproximadamente 20 - 30 minutos até estarem secos, retornando em seguida para suas gaiolas (**Figura 6**).



Figura 6. Caixa de luz para aquecimento dos animais.

4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

4.5.1 Sangue

O animais foram anestesiados com 1,0 mL de hidrato cloral (10%) logo após a última atividade física, no momento em que foi feita a retirada de sangue diretamente do coração por punção em câmara cardíaca, e também do músculo

sóleo. O sangue foi centrifugado para obtenção do plasma e soro que foram conservados à -70°C .

4.5.2 Músculo sóleo

Para a retirada do músculo sóleo foi realizada uma incisão na região posterior do membro pélvico esquerdo, retirando toda a pele deste local com posterior retirada do músculo (**Figura 7**). As amostras musculares foram retiradas com tamanho próximo a 2,0 cm de comprimento x 0,5 cm de diâmetro, de modo que, suas fibras ficassem dispostas longitudinalmente, para serem, posteriormente, realizados cortes transversais às mesmas, possibilitando assim sua análise morfométrica e histológica.



Figura 7. Procedimento para retirada do músculo sóleo.

Imediatamente após a retirada dos fragmentos do músculo sóleo, estes foram congelados através do sistema de imersão em n-Hexana resfriada a -70°C em nitrogênio pelo *Método de Congelamento de Tecido Não Fixado* (DAL PAI, 1995). Para realização deste procedimento foi colocado de 30 a 50 mL de n-Hexana em um béquer amarrado a um fio isolante para imersão em nitrogênio. Por meio de um bastão de vidro o líquido intermediário foi agitado até atingir um estado pastoso (-70°C a -80°C), onde foram imersos os blocos de tecido muscular por 20 a 30 segundos. Após tal procedimento, os blocos congelados foram transferidos a câmara do micrótomo criostato “HM 505 E Microm” (-20°C) (**Figura 8**) e mantidos na câmara até que se estabeleceu o equilíbrio térmico (20 a 30 min), sendo posteriormente colocados em cápsulas plásticas identificados e armazenados em botijão de nitrogênio a -180°C para posteriores análises.



Figura 8. Micrótomo criostato - HM 505 E Microm com blocos de tecido muscular fixados.

4.6 MORFOLOGIA GERAL DAS FIBRAS MUSCULARES

Cortes transversais de 8 μm de espessura de fibras musculares do músculo sóleo foram efetuados no criostato à -20°C . Esses cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina (HE) (McMANUS; MOWRY, 1960), permitindo avaliar o posicionamento do núcleo na célula, as características das fibras: tamanho (normal, atrófica e hipertrófica) e forma (poligonais, arredondadas e angulares) e o tecido conjuntivo (endomísio e perimísio).

4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS FIBRAS

A partir das lâminas coradas pela HE foi avaliado o grau de hipertrofia das fibras musculares, através do método de mensuração do menor diâmetro, seguindo-se os critérios preconizados por Dubowitz, Brooke e Neville (1973), tendo sido utilizado um sistema de análise de imagem computadorizada. Para cada animal, foram mensuradas (μm) de 100 a 150 fibras musculares do músculo sóleo.

4.8 DOSAGEM DOS EICOSANÓIDES

As concentrações plasmáticas de PGE_2 , TXB_2 e LTB_4 foram determinadas pelo método de enzima imunoensaio (EIA) utilizando-se dos kits Biotrak

Enzymeimmunoassay System (Amersham Biosciences Ltd) (PRADELLES; GRASSI; MACLOUF, 1990). Sendo que a PGE₂ plasmática foi determinada diretamente, e os eicosanóides TXB₂ e LTB₄ foram inicialmente extraídos das amostras de plasma através de extração em fase sólida nas colunas tipo Amprep C2 etil (Amersham Biosciences Ltd), o qual foi sequencialmente lavada com 5,0 mL de cada um dos solventes: água destilada, etanol 10% e hexano. No final, o TXB₂ e LTB₄ foram eluídos da coluna com 5,0 mL de acetato de etila com 1% de metanol, que após a evaporação do eluente sob nitrogênio (TP 019-Tecnal), o extrato final contendo TXB₂ e LTB₄ foi redissolvido em tampão fosfato 0,1M (pH=7,5) e analisado por EIA.

4.9 DOSAGEM DAS ENZIMAS PLASMÁTICAS

As enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) foram dosadas no soro espectrofotometricamente – U.V. (Cobas Mira – Roche) utilizando Kits Invitro Diagnóstica (Human) (GRADY et al, 1996, p. 84-85).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das concentrações sanguíneas das enzimas e dos eicosanóides, e a variação do peso dos animais dos diferentes grupos estudados

foram agrupados em valores médios e erros padrão da média e, posteriormente, foram comparados por análise de variância (ANOVA one-way). Com relação aos dados obtidos em ratos suplementados ou não, estes foram comparados através do teste de Tukey para as variáveis dependentes. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Para tanto foi utilizado o Software “GraphPad Prism 3” (San Diego, Califórnia-USA).

Para análise dos dados morfométricos das fibras musculares foi utilizado o método estatístico descritivo e os resultados foram apresentados com valores de médias seguidos de seus respectivos erros padrões da média, mediana, valores mínimos e máximos, percentuais e números absolutos. Os valores do menor diâmetro das fibras musculares foram comparados por análise de variância bifatorial, também com os fatores estado de treinamento (sedentário e treinado) e suplementação (com e sem ω -3), seguida do teste T-LSD para comparação das médias. Valores de p menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 PESO MÉDIO DOS RATOS (g)

Pode-se observar, na **Figura 9**, que a variação do ganho de peso médio dos ratos durante o experimento, não foram significativamente diferentes ($p>0,05$) entre os grupos experimentais.

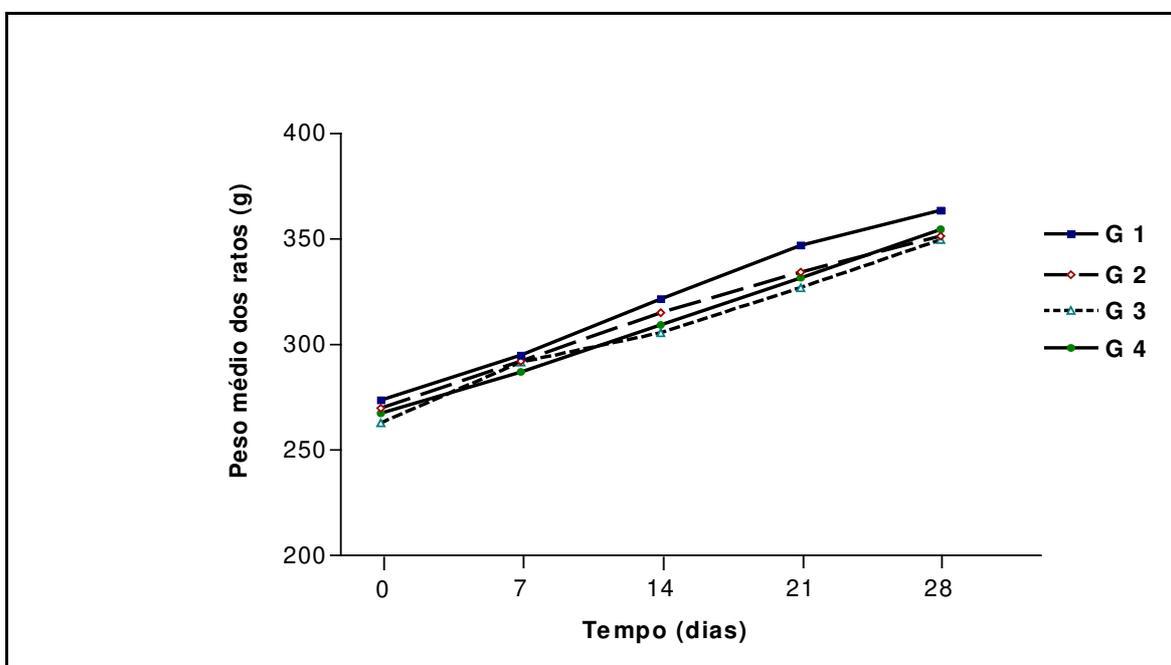


Figura 9. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem nos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3.

5.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CK E LDH

Na **Tabela 3**, está demonstrando que as concentrações plasmáticas da enzima creatina quinase (CK) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p>0,05$), porém, em relação à lactato desidrogenase, as concentrações plasmáticas foram significativamente mais elevadas no grupo controle (G1) quando comparada com os demais grupos ($p<0,05$). Nos grupos com treinamentos diários (G3 e G4), os animais que foram suplementados com AGPI ω -3 (G4) apresentaram uma concentração plasmática da LDH significativamente menor em relação aos animais não suplementados com ω -3 (G3). Tanto nos grupos de animais sedentários como treinados, a suplementação com ω -3 diminuiu significativamente a concentração plasmática de LDH em relação aos demais grupos.

Tabela 3. Concentração plasmática (U/L) das enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LH), nos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3.

Grupos	LDH (U/L)*	CK (U/L)*
G1	1015,9 \pm 27,32 ^a	30,3 \pm 2,3 ^a
G2	343,8 \pm 14,0 ^b	20,8 \pm 1,5 ^a
G3	548,6 \pm 26,0 ^c	23,4 \pm 2,3 ^a
G4	311,8 \pm 33,5 ^b	28,8 \pm 4,0 ^a

* Os resultados mostram a média \pm erro padrão da média (n=9)
^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$)

5.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS EICOSANÓIDES

As **Figuras 10, 11 e 12** mostram as concentrações plasmáticas da prostaglandina E_2 (PGE_2), tromboxano B_2 (TXB_2) e leucotrieno B_4 (LTB_4), onde pode ser observado que a concentração plasmática de PGE_2 no grupo controle (G1) foi significativamente superior ($p < 0,05$) quando comparados com os demais grupos (**Figura 10**). Observou-se também que entre os animais dos grupos treinados (G3 e G4), a suplementação com ω -3 não provocou alterações significativas ($p > 0,05$) na concentração plasmática de PGE_2 , e que também não diferiram significativamente com o grupo de animais sedentários suplementados com ω -3. Em relação a concentrações plasmáticas de TXB_2 e LTB_4 nos animais treinados foram significativamente superiores em relação ao grupo sedentário suplementado com ω -3, sendo que a concentração plasmática de TXB_2 nos animais treinados suplementados com ω -3 (G4) não foi significativamente maior em relação ao grupo controle, enquanto que os animais treinados não suplementados com ω -3 (G3) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (**Figura 11**); já em relação à concentração plasmática de LTB_4 nos animais do grupo controle foram significativamente maiores aos dos grupos sedentário e treinado suplementados com ω -3 (G2 e G4), e quando comparados com os animais do grupo treinado não suplementado com ω -3 não apresentaram diferenças significativas (**Figura 12**).

Nas **Figuras 10, 11 e 12** mostram também que dos eicosanóides (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4), somente a concentração plasmática de TXB_2 dos animais do grupo controle não foi significativamente maior em relação ao grupo sedentário suplementado com ω -3 (G2), e que a concentrações plasmáticas de todos os eicosanóides não foram significativamente diferentes entre os animais treinados com e sem suplementação com ω -3 (G3 e G4).

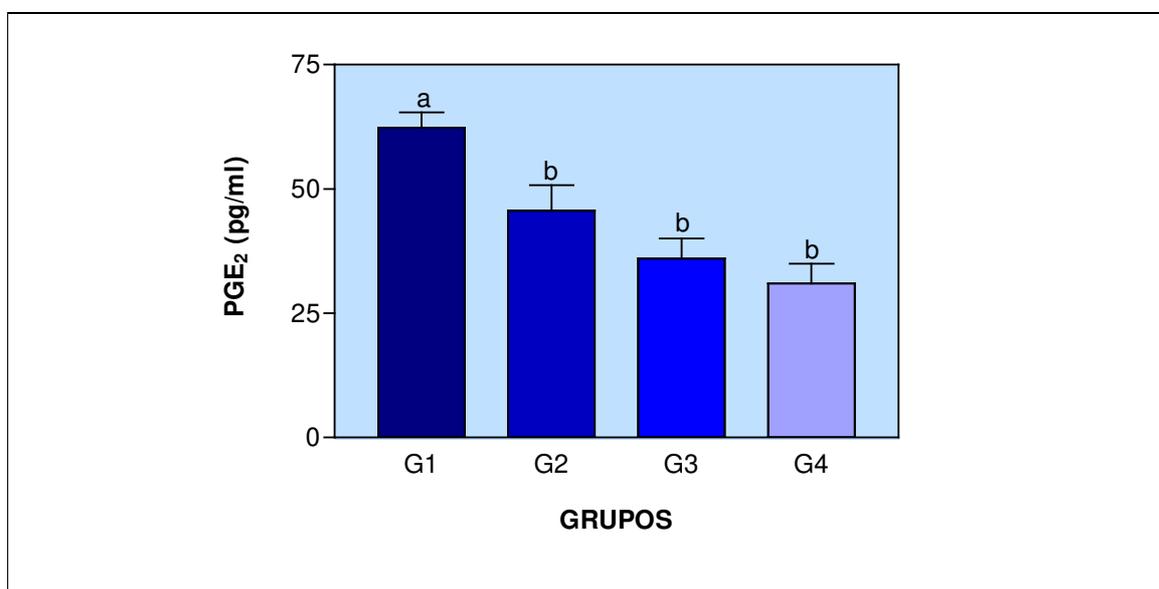


Figura 10. Concentração plasmática (pg/mL) da prostaglandina E_2 (PGE_2) \pm erro padrão da média ($n=9$), nos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3. As letras a,b e c demonstram diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos.

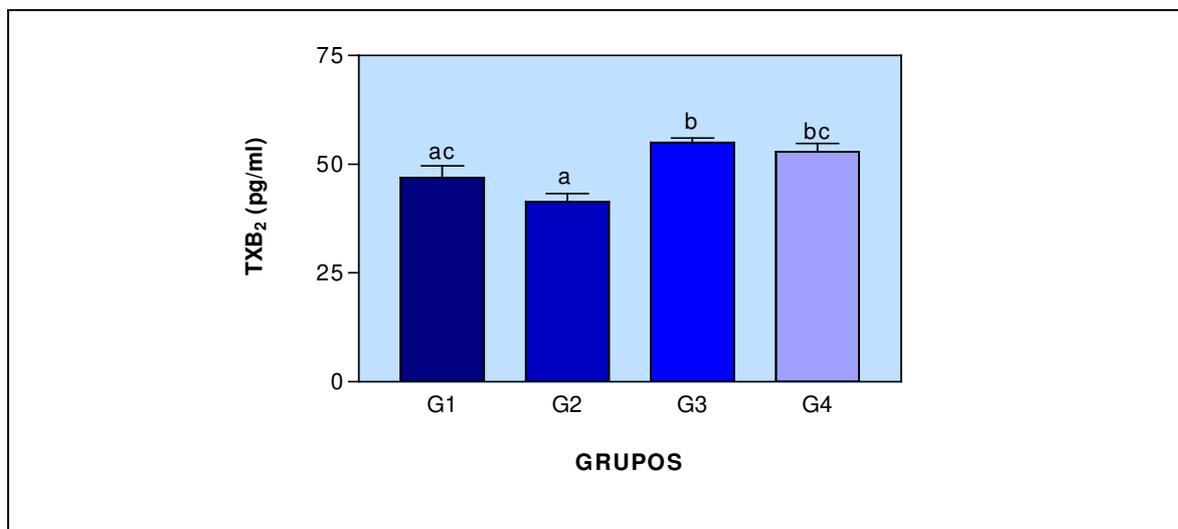


Figura 11. Concentração plasmática (pg/mL) do tromboxano B₂ (TXB₂) ± erro padrão da média (n=9), nos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3. As letras a,b e c demonstram diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos.

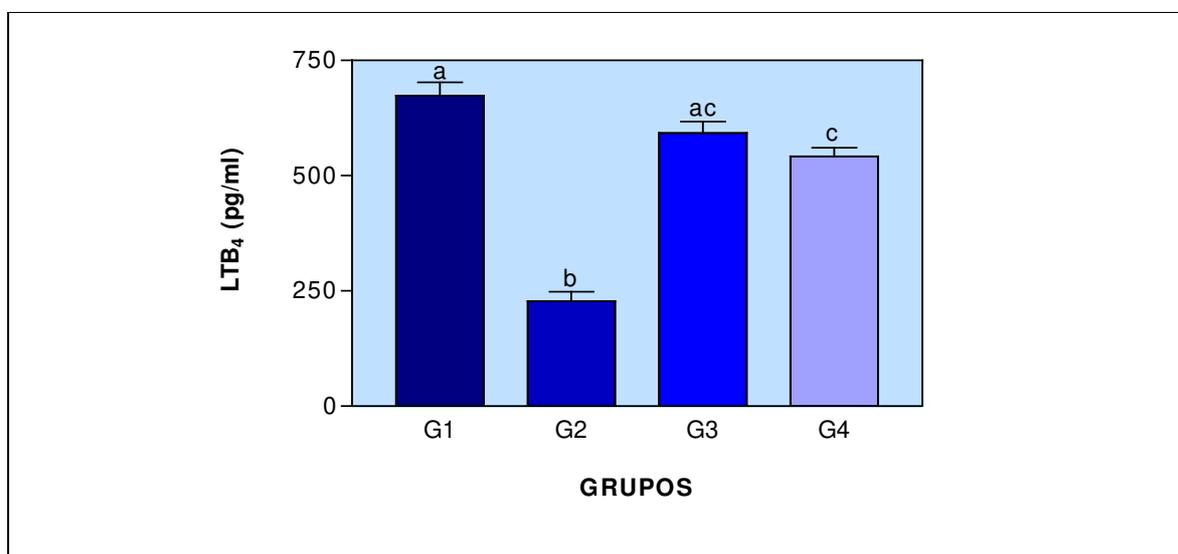


Figura 12. Concentração plasmática (pg/mL) do leucotrieno B₄ (LTB₄) ± erro padrão da média (n=9), nos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3. As letras a,b e c demonstram diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos.

5.4 MORFOLOGIA GERAL DAS FIBRAS MUSCULARES

A morfologia geral das células foi analisada através de cortes corados com HE. Segue abaixo a descrição dos achados para cada grupo estudado.

Grupo 1 – Estes animais apresentaram um aspecto morfológico normal com as fibras com formato poligonal, núcleos periféricos e padrão fascicular. Alguns animais apresentaram de forma geral, um menor grau de alterações morfológicas das fibras musculares do que o apresentado pelos animais treinados. Foram observados pequenos números de modificações de formato, como fibras polimórficas, processos atróficos, caracterizando metabolismo celular normal da fibra muscular (**Figura 13**).

Grupo 2 – Em alguns animais e em pequenas áreas, observou-se a ocorrência de fibras polimórficas, angulosas e discreto aumento do tecido conjuntivo endomisial. Nas demais áreas foram observadas núcleos em posição periférica, contornos poligonais (**Figura 14**).

Grupo 3 – De um modo geral, os animais deste grupo apresentaram um grau visivelmente acentuado de modificações das fibras musculares. Foram observados estágios iniciais e completos do processo de fagocitose em algumas fibras musculares, fibras angulares, atróficas, núcleos centralizados e perda do sarcolema, denotando a ocorrência de degeneração. Foram observados ainda,

aumento do tecido endomisial, fibras em *splitting* e muitas fibras em processo de arredondamento (**Figura 15**).

Grupo 4 – A maioria dos animais analisados apresentou fibras musculares com contornos poligonais, com pouquíssimas modificações dos formatos e com tendência a arredondamento, núcleos em posição periférica e algumas áreas com fibras hipertróficas e hialinizadas. Também pode ser observada a ausência do aumento de tecido conjuntivo endomisial. Estes animais apresentaram um grau de alteração morfológica das fibras mais acentuado do que o observado nos animais dos grupos 1 e 2. Por outro lado, tal quantificação foi menor que aquela observada junto aos animais do grupo 3 (**Figura 16**).

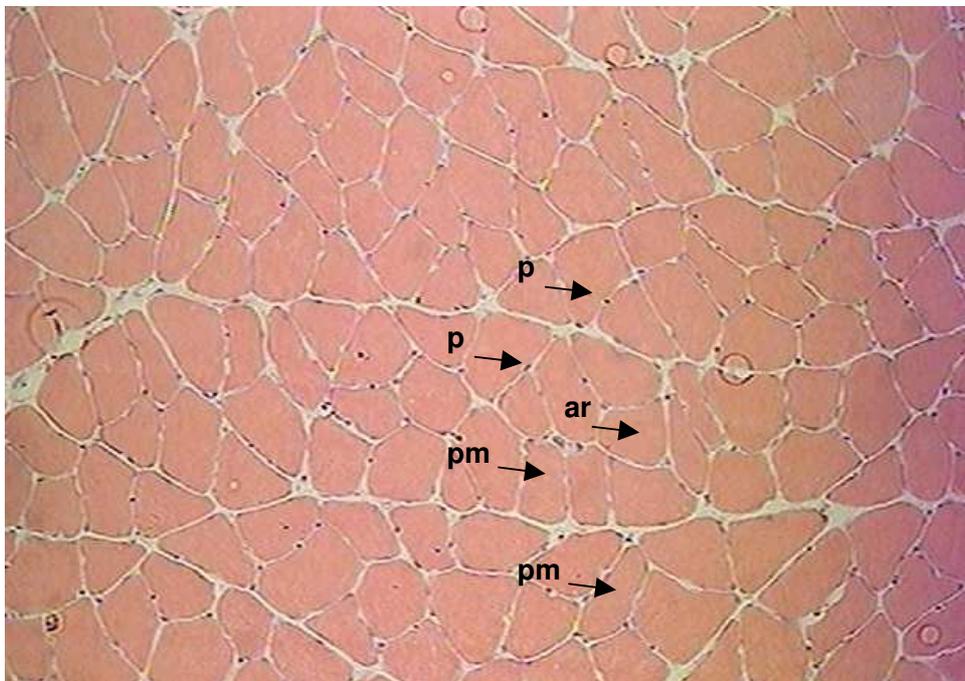


Figura 13. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE 200x. Animal pertencente ao **grupo 1**. Observam-se fibras com formato poligonal, núcleos periféricos (p), pequeno número de fibra muscular arredondada (ar) e polimórficas (pm).

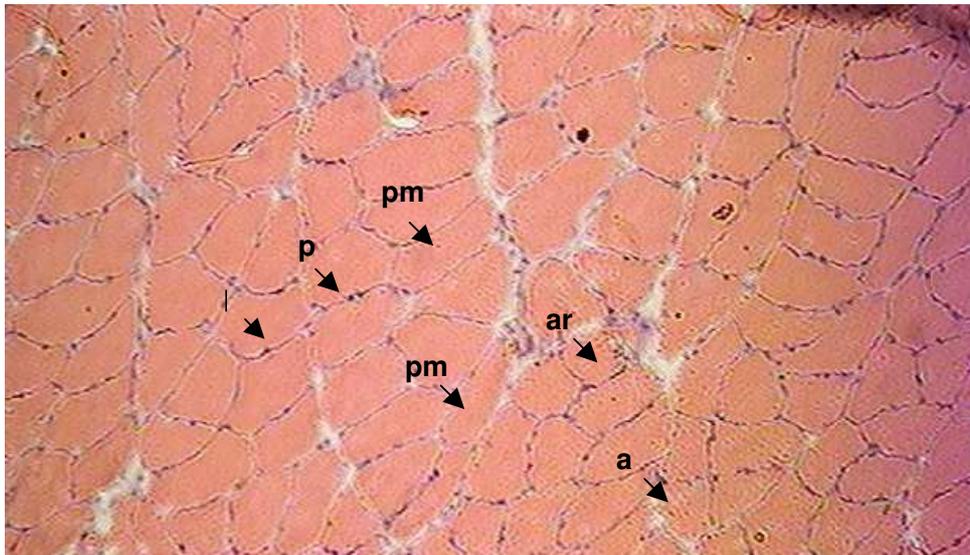


Figura 14. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE 200x. Animal pertencente ao **grupo 2**. Observam-se fibras com formato poligonal, núcleos periféricos (p), pequeno número de fibra muscular arredondada (ar), polimórficas (pm) e atróficas (a).

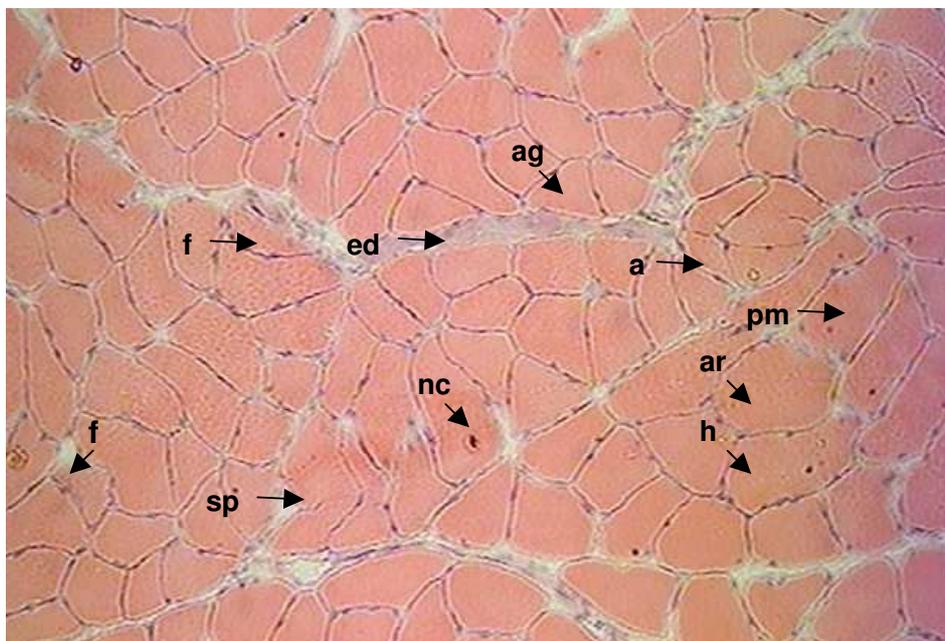


Figura 15. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE 200x. Animal pertencente ao **grupo 3**. Observa-se a presença de fibras musculares polimórficas (pm), arredondadas (ar), atróficas (a), angulares (ag), áreas com fibras hipertróficas (h), *splitting* (sp) e fibras em processo de fagocitose (f).

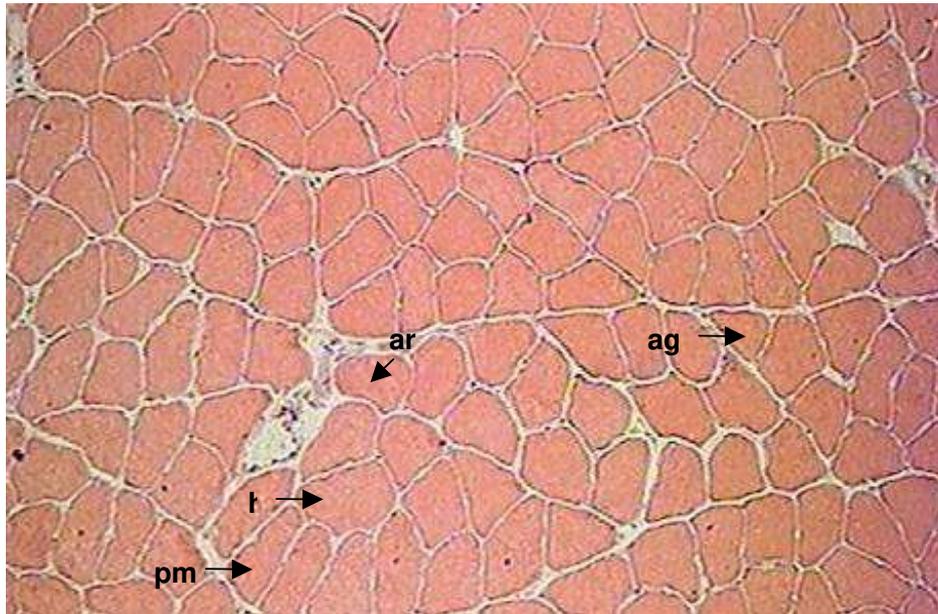


Figura 16. Secção transversal da região média do músculo sóleo de rato, HE 200x. Animal pertencente ao **grupo 4**. Observam-se contornos poligonais, poucas fibras com tendência a arredondamento (ar), polimórficas (pm) e algumas áreas com fibras angulares (ag), hipertróficas (h) e hialinizadas.

5.5 ANÁLISE DO MENOR DIÂMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES

A **Tabela 4** mostra os valores médios, seguidos dos respectivos erros padrões da média, mediana e valores mínimos e máximos do menor diâmetro das fibras musculares dos diferentes grupos sedentários e treinados utilizados nos experimentos. O box-plot representativo desta medida pode ser visualizado na **Figura 17**.

A análise de variância (ANOVA) bifatorial da medida do diâmetro das fibras do músculo sóleo dos animais estudados mostrou diferenças significativas para o fator estado de treinamento ($p < 0,05$), enquanto que não observamos diferenças

entre o fator suplementação ($p > 0,05$) e a interação estado de treinamento x suplementação ($p > 0,05$). O teste T-LSD mostrou que a medida do menor diâmetro das fibras musculares dos animais do grupo sedentário sem suplementação com AGPI ω -3 (G1) foi significativamente menor quando comparada com a do grupo treinado sem suplementação com AGPI ω -3 (G3) (**Tabela 4**). Não foram encontrados diferenças significativas nas comparações entre os outros grupos.

Tabela 4. Valores médios, seguidos dos erros padrões das médias, mediana, valor mínimo e valor máximo do diâmetro das fibras, micrômetros (μm), dos animais dos grupos estudados.

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Média	42,68 \pm 0,23 ^a	42,56 \pm 0,24 ^a	45,33 \pm 0,23 ^b	46,47 \pm 0,33 ^b
Mediana	42,46	42,46	44,33	45,06
Valor Mínimo	26,98	21,28	27,66	5,85
Valor máximo	70,37	63,24	66,35	88,14

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

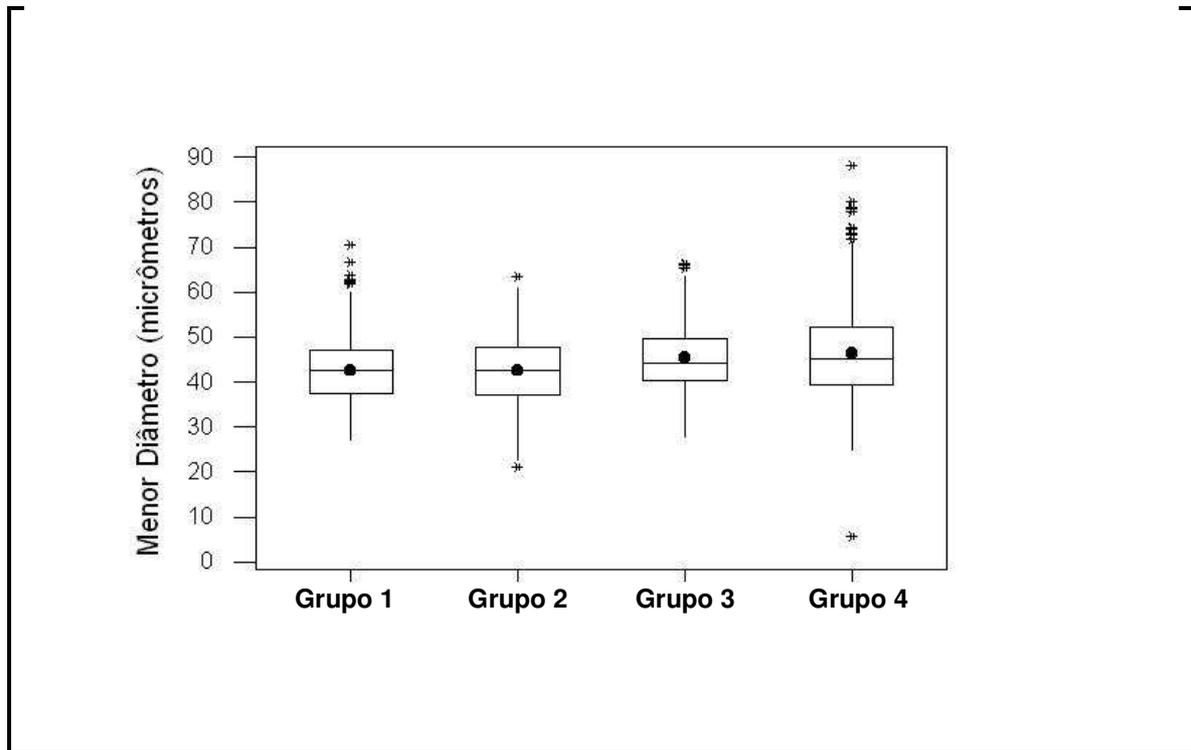


Figura 17. Box-plot representativo do menor diâmetro das fibras musculares do músculo sóleo dos animais dos grupos analisados.

A **Figura 18** mostra a distribuição, em valores percentuais, da quantidade de fibras musculares pelos vários diâmetros das fibras entre os grupos sedentários e treinados. Pela figura podemos observar que em todos os grupos estudados, há uma maior concentração das fibras musculares na faixa de 30 – 50 μm de diâmetro, sendo que na faixa que varia de 30 – 40 μm há predomínio dos grupos sedentários (G1 e G2) e na faixa de 50 – 60 μm dos grupos treinados (G3 e G4).

Também pode ser observado que, em diâmetros menores que 30 μm há maiores quantidades de fibras musculares dos grupos suplementados (G2 e G4) quando comparadas com os grupos sem suplementação (G1 e G2), os quais

apresentam pequena quantidade de fibras musculares deste diâmetro. Nas faixas de diâmetros maiores que 50 μm predominam um número maior de fibras dos grupos treinados (G3 e G4) quando comparado com os grupos sedentários (G1 e G2).

Diâmetro das Fibras Musculares (μm)
(%)

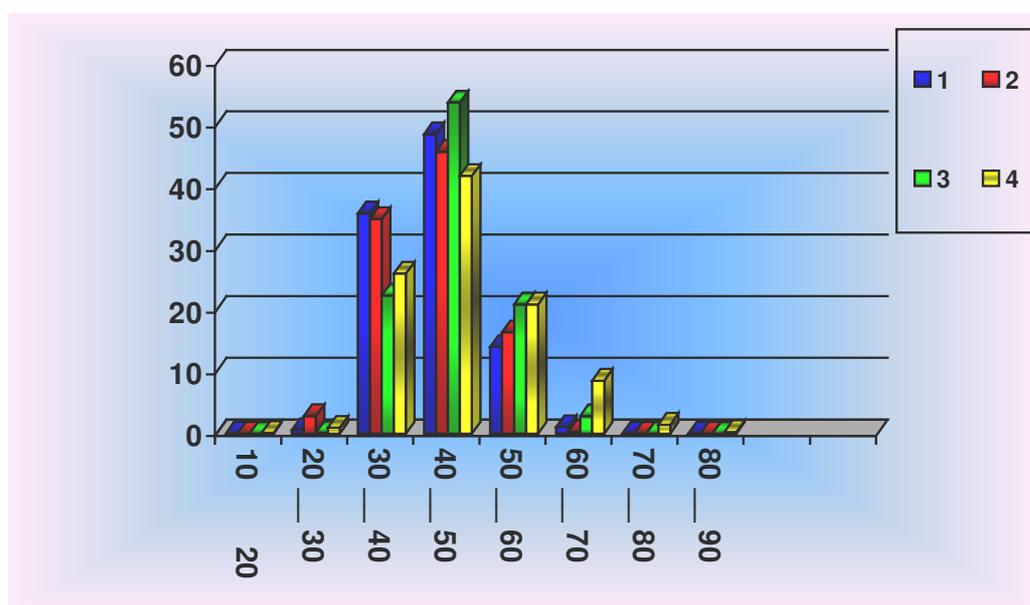


Figura 18. Distribuição percentual da quantidade de fibras musculares nos vários diâmetros das fibras entre os grupos sedentários e treinados, suplementados e sem suplementação.

Essa condição pode se melhor observada na **Figura 19**, onde o desvio da curva a direita nos diâmetros a partir de 50 μm dos grupos submetidos a treinamento físico, indica a hipertrofia das fibras musculares, sendo que essa hipertrofia foi maior nos animais submetidos à suplementação com ω -3.

Diâmetro das fibras musculares (μm)
(%)

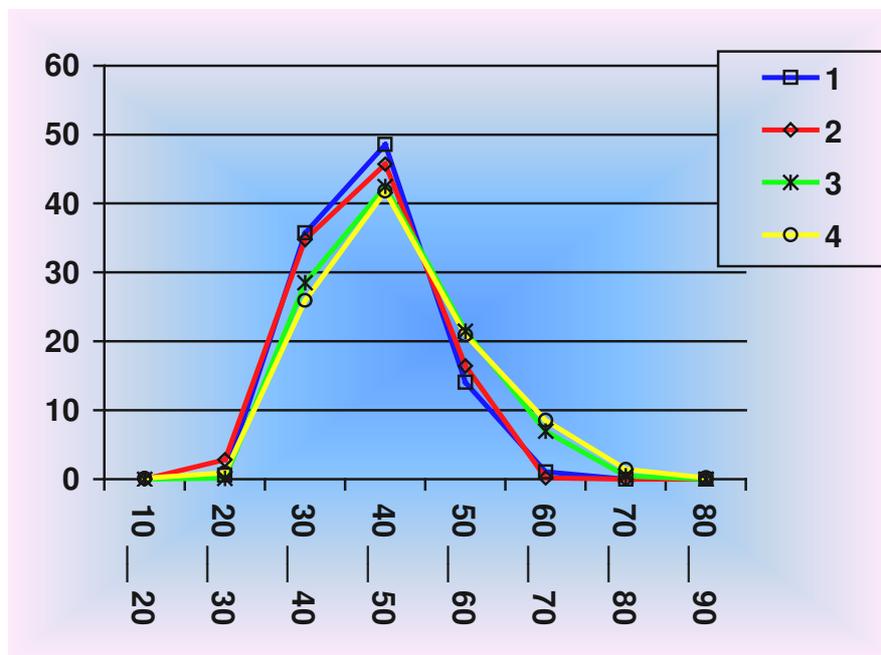


Figura 19. Distribuições percentuais da quantidade de fibras musculares nos vários diâmetros das fibras entre os grupos treinados e sedentários, com e sem suplementação de ω -3.

6 DISCUSSÃO

6.1 PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Inúmeros modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo das lesões musculares em diferentes tecidos humanos e animais. O presente trabalho utilizou um protocolo de treinamento de natação, um modelo experimental que, além da atividade física propriamente dita, produz também forte estímulo emocional que está relacionado ao tipo de atividade não habitual, à impossibilidade de fuga e à eminência de morte (AZEVEDO, 1994; OSTMAN-SMITH, 1979).

Em um estudo realizado por Camargo Filho et al. (2006), no qual estudaram o efeito do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico de natação, observaram que nos animais treinados as alterações histológicas e morfométricas das fibras foram maiores, quando comparadas com os animais não treinados.

A sobrecarga ventral foi realmente importante, pois a resistência oferecida pelo peso extra de chumbo, obrigava o animal a realizar esforço intenso e contínuo, principalmente, com os dois membros posteriores, e também forçavam

os animais a apoiar os membros pélvicos no fundo do tanque para impulsionar o corpo para cima. Com isso, no presente estudo observou-se nos ratos submetidos ao treinamento físico, alterações histológicas e morfométricas das fibras do músculo sóleo da região pélvica.

6.2 VARIAÇÃO DO PESO MÉDIO DOS ANIMAIS

Conforme os resultados, apresentados na **Figura 9**, a suplementação com AGPI ω -3 não provocou variações significativas de ganho de peso nos animais de nenhum dos grupos experimentais, que confirmam os achados em outros trabalhos (ALMEIDA, 2003; SONG; MIYAZAWA, 2001). Indicando que o peso não pode ser considerado fator de interferência nas demais análises, uma vez que os grupos analisados mostraram-se homogêneos.

Estudos mostram que os AGPI ω -3 e 6 possuem outra função metabólica distinta à da síntese de triacilgliceróis, que é a de fazerem parte da estrutura química dos fosfolípídeos presentes na membrana das células (BELL et al., 1996; CALDER, 2003; PALOMBO et al, 1996). Com isso, no presente trabalho, o ganho de peso nos animais suplementados ou não com ω -3 se deve principalmente a uma evolução normal dos animais, do que a um aumento dos depósitos de triacilglicerol no tecido adiposo.

6.3 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DAS ENZIMAS CK E LDH

Embora outros trabalhos (NOSAKA; CLARKSON, 1996; PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000) mostrem, que a concentração plasmática das enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) aumenta logo após um exercício agudo, atingindo seu pico máximo 2 horas após o exercício. Os resultados, encontrados no presente trabalho (**Tabela 3**), mostram que não houve nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) na concentração plasmática da enzima CK em nenhum dos grupos experimentais. Uma vez que, no presente estudo, os animais foram submetidos a um período de 4 semanas de treinamentos diários antes de ser coletado o sangue para as análises das enzimas, possivelmente o treinamento crônico acarretou uma adaptação do músculo ao exercício, diminuindo a produção e liberação da enzima CK no sangue (HIROSE et al., 2004). Porém em relação à enzima LDH, os resultados mostraram que a suplementação com ω -3 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a LDH plasmática tanto nos animais sedentários como nos treinados (**Tabela 3**), indicando possivelmente que o AGPI ω -3 diminui o número de lesões das células musculares durante o exercício físico, já que também houve diferenças significativas na concentração plasmática da LDH entre os animais treinados com e sem suplementação com ω -3.

6.4 PRODUÇÃO DOS EICOSANÓIDES

Estudos têm demonstrado que dietas ricas em AGPI ω -3 diminuem o conteúdo de ácido araquidônico (ω -6) nos fosfolípidos das membranas celulares, acarretando uma diminuição na síntese dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4) nos tecidos e sangue (BROUGHTON; WADE, 2002; CALDER, 2003; DOSHI et al., 2004; SPURNEY et al., 1994; SUCHNER; SENFTLEBEN, 1994). Porém, no presente trabalho, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na concentração plasmática de PGE_2 e LTB_4 foi observada principalmente nos animais suplementados com ω -3 dos grupos de animais sedentários (G1 e G2), o mesmo não ocorrendo com o TXB_2 (**Figura 11**), mostrando que nos animais sedentários, a resposta à ação do ω -3 foi mais acentuada.

Embora, as **Figuras 10, 11 e 12** mostrem que nos animais treinados, a suplementação com ω -3 não diminuiu significativamente ($p > 0,05$) as concentrações plasmáticas da PGE_2 , TXB_2 e LTB_4 , porém, em valores absolutos ocorreu uma redução nos animais suplementados (**Anexos: Tabelas 10, 11 e 12**). No presente trabalho observou-se também que somente a concentração de TXB_2 nos grupos de animais treinados (G3 e G4) foi significativamente maior em relação aos animais sedentários e sem suplementação com ω -3 (Grupo 1) (**Figura 11**), contrariando com isso, estudos que mostram que após um exercício físico intenso,

a concentração de PGE₂, TXB₂ e LTB₄ aumenta nos tecidos e sangue (KÖNIG et al., 1997). Observamos que possivelmente essa diferença nos resultados, se deve ao tipo de exercício que os nossos animais foram submetidos, ou seja, o protocolo de treinamento adotado no presente estudo pode ter provocado uma adaptação da célula muscular, reduzindo as lesões oxidativas, e acarretando uma diminuição na síntese dos eicosanóides pró-inflamatórios PGE₂ e LTB₄.

Com relação a esta hipótese, Oh-Ishi et al. (1997) observaram que o treinamento de resistência pode elevar o ajuste da atividade de certas enzimas antioxidantes no músculo diafragma de ratos, indicando potencial melhora na resistência a espécies reativas de oxigênio intracelular, e com isso, minimizando o estresse oxidativo, também sugerem que o treinamento de resistência pode reduzir as lesões oxidativas do músculo diafragma, e conseqüentemente do processo inflamatório causado por um exercício agudo.

6.5 MORFOLOGIA GERAL E DIAMETRO DAS FIBRAS MUSCULARES

O exercício físico excessivo provoca um aumento de alterações morfológicas e estruturais das fibras musculares (ARMSTRONG, 1990; GUARNER; VILASECA; MALAGELADA, 1992; PROSKE; MORGAN, 2001). Além disso, com exercícios extenuantes e prolongados ocorre um aumento da formação

de radicais livres de oxigênio (NAGLE, 1991) que são espécies intermediárias do metabolismo do oxigênio, que podem influenciar processos intracelulares importantes já que uma vez formados, podem oxidar lipídios, proteínas, ácidos nucleicos ou quaisquer outras biomoléculas que estiverem próximas a eles. Dessa maneira, a atividade dos radicais livres pode ser limitada pelos antioxidantes, como a vitamina E e enzimas antioxidantes.

Qualquer circunstância, em que prevaleça a formação de oxidantes aos antioxidantes, tal como exercício físico, envelhecimento ou patologias (cânceres, diabete, arteriosclerose, entre outras), pode induzir a instalação de uma condição chamada *estresse oxidativo* (GANDRA et al., 2004). Nesse caso, o acúmulo de reações de oxidação pode induzir alterações severas em várias estruturas celulares, provocando modificações da função e da estrutura celular, e podendo levar a célula à morte (FRANCISCO NETO et al., 2005).

As **Figuras de 13 a 16** mostram que em relação às análises histológicas os animais pertencentes aos grupos 1 e 2 (sedentários) apresentaram de forma geral, um grau leve de lesão quando comparados ao grupo 3 (treinado), envolvendo as fibras musculares por meio de estágios distintos do processo de fagocitose e por poucas modificações de formato (polimorfismo), com poucas células atroficas e núcleos periféricos com fascículos normais.

Os animais do grupo 4 (treinado) apresentaram núcleos periféricos com pouca presença de fagocitose e polimorfismo menos acentuado quando comparados ao grupo treinado sem suplementação e ausência de aumento do tecido endomisial.

Já pela análise morfométrica (**Tabela 4 e Figura 17**), este trabalho demonstrou que o treinamento físico por meio da natação foi capaz de influenciar o menor diâmetro das fibras musculares dos grupos treinados quando comparados com os grupos sedentários ($p < 0,05$), indicando que o treinamento induziu hipertrofia do músculo sóleo nestes animais. Já quanto à suplementação não houve influências no menor diâmetro nos diferentes grupos analisados ($p > 0,05$). Além disso, a análise entre os fatores treinamento x suplementação com AGPI ω -3 mostrou que não houve diferenças significativas nesses animais. Entretanto, apesar de não ter sido estatisticamente significativa ($p > 0,05$), os animais treinados e suplementados com ω -3 obtiveram maiores diâmetros em suas fibras musculares.

Nos grupos treinados (G3 e G4), há predominância de fibras com diâmetro entre 50 e 60 μm , enquanto que nos grupos sedentários (G1 e G2) foi de 40 a 50 μm (**Figura 18**). Embora, a **Figura 19** mostre que fibras hipertróficas superiores a 50 μm de diâmetro foram encontradas principalmente nos grupos treinados suplementados com ω -3, não podemos afirmar que os AGPI ω -3 possam exercer algum efeito na hipertrofia das fibras musculares.

A hipertrofia muscular é um processo adaptativo resultante de um aumento da área de secção transversa do músculo, assim como também da área de secção transversa da fibra muscular (BRITO et al., 2006; SEMSARIAN et al. 1999), como resposta ao aumento da síntese protéica, do número e tamanho das miofibrilas, e também da adição de sarcômeros, o que resulta em um aumento no volume das fibras musculares individuais, aumentando o número de elementos contráteis e a tensão máxima que o músculo esquelético pode produzir em resposta ao exercício de alta resistência (CARSON; NETTLETON; REECY, 2002).

Sendo a hipertrofia, um processo oriundo de uma maior demanda funcional, e uma alteração adaptativa à sobrecarga física (BRITO et al., 2006), pode-se sugerir que nestes animais a sobrecarga sobre o sistema muscular foi suficiente para produzir hipertrofia desta musculatura, uma vez que o fator treinamento físico influenciou as fibras musculares através de seus menores diâmetros analisados.

A maior hipertrofia e menos alterações das fibras musculares nos animais suplementados pode estar relacionado às propriedades antiinflamatórias do AGPI ω -3, através da redução da síntese dos eicosanóides pró-inflamatórios (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4), e da manutenção do equilíbrio do sistema de antioxidante/oxidante, prevenindo assim a exarcebação da resposta inflamatória frente ao processo de lesão muscular induzido pelo estresse físico decorrente da natação.

Esta hipótese recebe sustentação no fato de termos observado na análise histológica que as fibras musculares dos grupos suplementados apresentaram-se com menos alterações celulares quando comparada aos animais do grupo controle, o que pode estar relacionado com essa propriedade antiinflamatória do AGPI ω -3.

Uma das teorias para explicar o aumento nos níveis de lesão muscular induzida pelo exercício físico propõe que a perda de integridade da membrana celular ocorra principalmente como consequência de um ataque dos radicais livres (GANDRA et al., 2004).

Dessa maneira, tem sido proposto que os radicais livres podem causar lesão oxidativa induzida pelo exercício em músculos ativos. Um aumento no consumo de oxigênio, assim como a ativação de vias metabólicas específicas durante ou após o exercício, resulta na produção de radicais livres de oxigênio, sendo que estas moléculas estão aumentadas em exercício de alta intensidade e extenuantes (GANDRA et al., 2004).

Estudos mostram que a redução da síntese de PGE_2 e LTB_4 a partir da ação das enzimas ciclooxigenase e 5-lipoxigenase presentes na membrana das células musculares, provoca uma diminuição na liberação de enzimas proteolíticas lisossomais e dos radicais livres, e conseqüentemente do estresse oxidativo

intracelular (ARMSTRONG, 1990; CALDER, 2003). Isso sugere que a suplementação com ω -3 pode ter influenciado a manutenção da homeostase do sistema muscular e no equilíbrio do sistema antioxidante/oxidante, modulando as respostas inflamatórias e o ataque dos radicais livres decorrentes do estresse físico, prevenindo o aparecimento de lesões celulares no músculo esquelético.

Para que o exercício físico seja totalmente benéfico, portanto, são desejados níveis eficientes de defesa antioxidante e conseqüentemente baixos níveis de estresse oxidativo, evitando, assim, ao máximo a instalação de processos de fadiga. Essa resposta poderia manter os níveis de desempenho pouco alterados, bem como evitar o aparecimento de lesões musculares ocasionadas por este tipo de estresse (ZOPPI et al., 2003).

Logo, esse estudo mostrou a ação do ω -3 no sentido de minimizar as lesões induzidas pelo exercício físico por meio da natação, através da manutenção do equilíbrio intracelular entre oxidante/antioxidante e pela sua ação antiinflamatória decorrente da redução da síntese dos eicosanóides pró-inflamatórios (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4), permitindo o desenvolvimento de uma maior hipertrofia muscular nos animais treinados e suplementados com ω -3.

Portanto, sugerimos que a suplementação com AGPI ω -3 poderia ser utilizada em atletas, com o objetivo de diminuir os sintomas de um processo

inflamatório, e como o seu efeito na síntese dos eicosanóides derivados do ácido araquidônico (PGE_2 , TXB_2 e LTB_4) foi mais evidente entre os animais sedentários, achamos que a ação antiinflamatória do ω -3 nos ratos, e, por extensão em atletas, seria maior se a suplementação fosse realizada diariamente, independente do período de treinamento. Para confirmar essa hipótese, futuros trabalhos poderiam ser realizados comparando a ação dos ω -3 em exercícios físicos agudos e crônicos.

7 CONCLUSÕES

1. Na ação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI ω -3), a concentração plasmática da enzima lactato desidrogenase (LDH) mostrou-se um indicador de lesão muscular que se altera mais rapidamente do que a enzima creatina quinase (CK).

2. Apesar das análises estatísticas não indicarem diferenças significativas ($p > 0,05$) da ação dos AGPI ω -3 na redução da concentração plasmática dos eicosanóides PGE_2 , TXB_2 e LTB_4 nos ratos treinados, os valores absolutos mostraram diferenças.

3. O protocolo de treinamento físico por meio da natação utilizado foi suficiente para induzir alterações histológicas e de menor diâmetro das fibras musculares do sóleo de ratos.

4. A análise histológica mostrou que dentre os grupos treinados, o maior grau de lesão foi verificada no grupo 3 (sem suplementação de ω -3), que apresentou alterações morfológicas (sobretudo sinais de lesão) de maior intensidade e frequência quando comparados ao grupo 4 (suplementados com ω -3), indicando que o ω -3 minimizou as lesões induzidas pelo exercício por meio da natação.

5. Com relação à medida do menor diâmetro das fibras musculares do sóleo, os grupos treinados apresentaram valores maiores que observados nos animais sedentários, o que permite concluir que este aumento ocorreu em função do exercício físico e não da suplementação com ω -3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

ALMEIDA, F. Q. A. **Ação antioxidante da vitamina E sobre a oxidação lipídica sérica e hepática de ratos Wistar suplementados com ácidos graxos poliinsaturados ômega-3.** 2003. 137f. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ALMEKINDERS, L. C.; BANES, A. J.; BALLENGER, C.A. Effects of repetitive motion on human fibroblasts. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianápolis, v. 25, n. 5, p. 603-607, May. 1992.

ARMSTRONG, R. B.; OGILVIE, R. W.; SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 54, n. 1, p. 80-93, 1983.

ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianápolis, v. 16, n. 6, p. 529-538, 1984.

_____. Initial events in exercise-induced muscular injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianápolis, v. 22, n. 4, p. 429-435, 1990.

ÅSTRAND P.O. et al. Textbook of work physiology. **Physiological basis of exercise.** 4th ed. Champaign: Human Kinetics, 2003.

AZEVEDO, J.R.M. **Determinação de parâmetros bioquímicos em ratos sedentários e treinados, durante e após o exercício agudo de natação.** 1994. 172f. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

AYALA, A.; CHAUDRY, I. H. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid modulation of immune cell function before or after trauma. **Nutrition**, Washington, v. 11, n. 1, p. 1-11, Jan./Feb. 1995.

BARHAM, J. B. et al. Addition of eicosapentaenoic acid to γ -linolenic acid-supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans. **The Journal of Nutrition**, Pennsylvania, v. 130, n. 1, p. 1925-1931, 2000.

¹CRUZ, A.C. **Trabalhos acadêmicos, dissertações e teses: estrutura e apresentação** (NBR 14724/2002) / Anamaria da Costa Cruz, Maria Tereza Reis Mendes. 2. ed. Niterói: Intertexto, 2004. 134 p.

BEHM, M.G. Age related alterations in muscular endurance. **Sports Medicine**, Auckland, v. 25, n.4, p.259-269, 1998.

BELL, J. G. et al. Modification of membrane fatty acid composition, eicosanoid production, and phospholipase A activity in atlantic salmon (*Salmo salar*) gill and kidney by dietary lipid. **Lipids**, Champaign, v. 31, n. 11, p. 1163-1171, 1996.

BLAIR, I. A. et al. Dietary modification of ω -6 fatty acid intake and its effect on urinary eicosanoid excretion. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 2, p. 154-160, 1993.

BONTA, I. L.; PARNHAM, M. J. Immunomodulatory-antiinflammatory of E-type prostaglandins: Minireview with emphasis on macrophage-mediated effects. **International Journal of Immunopharmacology**, Omaha, v. 4, n. 2, p. 103-109, 1982.

BOUDREAU, M. D. et al. Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidinic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 1, p. 111-117, Jul. 1991.

BRITO, M.K.M. et al. Dimensões geométricas das fibras do músculo sóleo de ratos exercitados em esteira rolante: a importância da análise por meio de imagens digitalizadas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.12, n.2, p.103-107, 2006.

BROUARD, C.; PASCAUD, M. Effects of moderate dietary supplementations with n-3 fatty acids on macrophage and lymphocyte phospholipids and macrophage eicosanoid synthesis in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, Orlando, v. 1047, n. 1, p. 19-28, Oct. 1990.

BROUGHTON, K. S.; WADE; J. W. Total fat (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice. **The Journal of Nutrition**, Pennsylvania, v. 132, n. 1, p. 88-94, 2002.

BUNCE, O. R.; SOAD, H. A. E.; BERDANIER, C. D. Long-term feeding of corn oil, beef tallow, or menhaden oil and eicosanoid level in BHE/cdb rats. **Nutrition**, Washington, v. 8, n. 6, p. 421-425, Nov./Dec. 1992.

CALDER, P. C. Immunoregulatory and antiinflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 4, p. 467-490, 1998a.

_____. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 57, n. 4, p. 487-502, 1998b.

_____. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 4, p. 433-446, 2003.

CAMARGO FILHO, J.C.S. Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.12, n.5, p.243-247, Set/Out. 2006.

CARLSON, B.M.; FAULKNER, J.A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianápolis, v.15, p.187-198, 1983.

CARSON, J.A.; NETTLETON, D.; REECY, J.M. Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.16, n.2, p.207-209, 2002.

CAUGHEY, G. E. et al. The effect on human tumor necrosis factor α and interleukin 1β production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, n. 1, p. 116-122, 1996.

CÓRDOVA, A.; NAVAS, J.F. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.6, n.5, p.204-208, 2000.

CRUZ, A.C. **Trabalhos acadêmicos, dissertações e teses: estrutura e apresentação** (NBR 14724/2002) / Anamaria da Costa Cruz, Maria Tereza Reis Mendes. 2. ed. Niterói: Intertexto, 2004. 134 p.

DAL PAI, V. **Histologia: teoria e prática**. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1995. 50 p (Apostila).

DOSHI, M. et al. Effect of Dietary Enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) or n-9 PUFA on arachidonate metabolism in vivo and experimentally induced inflammation in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 3, p. 319-323, 2004.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H.; NEVILLE, H. **Muscle Biopsy: a modern approach**. London: Saunders Company Ltda, 1973, p.471.

FERRETTI, A. et al. Increased dietary arachidonic acid enhances the synthesis of vasoactive eicosanoids in humans. **Lipids**, Champaign, v. 32, n. 4, p. 435-439, 1997.

FRANCISCO NETO, A. et al. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.20, n. 2, p. 134-139, 2005.

FRIDÉN, J. Changes in human skeletal muscle induced by long-term eccentric exercise. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 236, n. 2, p. 365-372, 1984.

GANDRA, P. G. et al. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 980-985, 2004.

GRADY, H. J.; JACOBS, D. S.; OLSOWKA, E. S. Chemistry. In: JACOBS, D. S. et al. **Laboratory test handbook**. 4. ed. Cleveland: Lexi-comp INC, 1996. p. 84-85.

GREEN, H. et al. Regulation of fiber size, oxidative potencial, and capillarization in human muscle by resistance exercise. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 276, n.2, p.591-596, 1999.

GUARNER, F.; VILASECA, J.; MARAGELADA, J. R. Dietary manipulation in experimental inflammatory bowel disease. **Agents and Actions, Special Conference Issue**, Basel, p. C10-C14, 1992.

HAMAZAKI, T. Intravenous infusion of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, New Jersey, v. 200, p. 171-173, 1992.

HIROSE, L. et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exercise Immunology Review**, Champaign, v. 10, p. 75-79, 2004.

JAMES, M. J. et al. Interaction between fish and vegetable oils in relation to rat leucocyte leukotriene production. **The Journal of Nutrition**, Pennsylvania, v. 121, n. 5, p. 631-637, 1991.

JAMES, M. J.; GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 3435-3485, 2000.

JOHNSON, M. M. et al. Dietary supplementation with γ -linolenic acid alters fatty acid content and eicosanoid production in healthy humans. **The Journal of Nutrition**, Pennsylvania, v. 127, n. 8, p. 1435-1444, 1997.

KARAMIZRAK, S. O. et al. Changes in serum creatine kinase, lactate dehydrogenase and aldolase activities following supramaximal exercise in athletes. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, Turin, v. 34, n. 2, p. 141-146, 1994.

KIM, D. N. et al. Reductions in serum thromboxane, prostacyclin, and leukotriene B₄ levels in swine fed a fish oil supplement to an atherogenic diet. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 55, n. 1, p. 1-12, 1991.

KÖNIG, D. et al. Essential fatty acids, immune function, and exercise. **Exercise Immunology Review**, Champaign, v. 3, p. 1-31, 1997.

KREMER, J. M. n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 349S-351S, 2000.

LAPOINTE, B. M.; FRENETTE, J.; CÔTÉ, C. H. Lengthening contraction-induced inflammation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 92, n. 1, p. 1995-2004, 2002.

LINARDI, M. **Estudo da sensibilidade aos efeitos cronotrópico e inotrópico das catecolaminas em átrios isolados de ratos submetidos a treinamento físico**. 1992. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

MARCONDES, F. K. et al. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 74, n. 6, p. 663-669, 1996.

McMANUS, J. F. A.; MOWRY, R. W. **Staining methods: histologic and histochemical medical division**. New York: Harper e Brother, 1960, p. 283-310.

NAGLE, J. F. Solving complex photocycle kinetics: theory and direct method. **Biophysical Journal**, Bethesda, v.59, n.2, p. 476-487, 1991.

NESTEL, P.J. Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 228S-231S, 2000.

NIES, A.M. et al. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.17, n.6, p.397-403, 1996.

NORDOY, A.; HATCHER, L.; GOODNIGHT, S. Effects of dietary fat content, saturated fatty acids, and fish oil on eicosanoid production and hemostatic parameters in normal men. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St.Louis, v. 123, n. 6, p. 914-920, 1994.

NOSAKA, K.; CLARKSON, P. M. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianapolis, v. 28, n. 8, p. 953-961, 1996.

OGILVIE, R. W. et al. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 182, n. 4, p. 335-346, 1988.

OH-ISHI, S. et al. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content, and mRNA expression in rat muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology & physiology**, Oxford, v.24, n.5, p.326-332,1997.

ÖSTMAN-SMITH, I. Adaptative changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hipertrophy. **Acta Physiologica Scandinavica.Supplementum**. Stockholm, v. 477, p. 1-118, 1979.

PALOMBO, J. D. et al. Rapid modulation of lung and liver macrophage phospholipid fatty acids in endotoxemic rats by continuous enteral feeding with n-3 and γ -linolenic fatty acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, n. 2, p. 208-219, 1996.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, Washington, v. 80, n. 3, p.1055-1081, Jul. 2000.

POMPÉIA, C. et al. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 11, p. 1255-1268, 2000.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MARCLOUF, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase. **Methods in Enzymology**, New York, v. 187, p. 24-34, 1990.

PRAKASH, C. et al. Decreased systemic thromboxane A₂ biosynthesis in normal human subjects fed a Salmon-rich diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 60, n. 3, p. 369-373, 1994.

PROSKE, U.; MORGAN, D. L. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. **The Journal of Physiology**, London, v. 537, n. 2, p. 333-345, 2001.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v.10, n. 4, Jul/Ago, 2004.

SEMSARIAN, C. et al. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca^{2+} dependent calcineurin signaling pathway. **Nature**, London, v.400, n.6744, p. 576-581, 1999.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, Verlagsgesellschaft mbh, v.25, n.12, p.1058-71, 1986.

SONG, J. H.; MIYAZAWA, T. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 155, n. 1, p. 9-18, 2001.

SPURNEY, R. F. et al. Fish oil feeding modulates leukotriene production in murine lupus nephritis. **Prostaglandins**, New York, v. 48, n. 5, p. 331-348, 1994.

STAUBER, W. T. Characterization of muscles injured by forced lengthening. I. Cellular infiltrates. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianápolis, v. 20, n. 4, p. 345-353, 1988.

SUCHNER, U.; SENFTLEBEN, U. Immune modulation by polyunsaturated fatty acids during nutritional therapy: Interactions with synthesis and effects of eicosanoids. **Infusionstherapie und Transfusionsmedizin**, Basel, v. 21, n. 3, p. 167-182, 1994.

TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Indianápolis, v. 27, n. 7, p. 1022-1032, Jul. 1995.

ZOPPI, C.C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F.O.; GOULART, L.F.; MOTTA E MOURA, N.; MACEDO, D.V. de. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v.17, n.2, p.119-30, Jul./Dez. 2003.

ANEXOS

Tabela 5. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3.

PESO-GRUPO 1					
ANIMAL	0	7	14	21	28
1	272	294	324	350	368
2	255	277	296	323	333
3	282	300	326	345	365
4	280	294	312	340	359
5	277	299	323	337	363
6	276	299	324	351	365
7	259	267	298	321	331
8	280	311	353	390	410
9	282	313	339	367	378
PESO MÉDIO	273,7	294,9	321,7	347,1	363,6

Tabela 6. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, **G2**: grupo controle, sem treinamentos diários e com suplementação com AGPI ω -3.

PESO-GRUPO 2					
ANIMAL	0	7	14	21	28
1	257	282	294	303	325
2	288	306	333	349	365
3	282	297	330	354	385
4	257	270	300	315	335
5	262	291	320	338	355
6	270	287	300	311	321
7	271	294	310	340	350
8	288	322	350	374	389
9	253	280	299	325	338
PESO MÉDIO	269,8	292,1	315,1	334,3	351,4

Tabela 7. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, **G3:** grupo com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3.

PESO-GRUPO 3					
ANIMAL	0	7	14	21	28
1	258	288	295	313	335
2	255	275	291	311	320
3	261	293	302	334	352
4	265	295	305	333	365
5	254	281	292	305	338
6	273	297	314	336	358
7	274	301	319	343	362
8	257	286	302	320	340
9	269	308	330	348	376
PESO MÉDIO	262,9	291,6	305,6	327,0	349,6

Tabela 8. Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início da suplementação (tempo 0), 7, 14, 21 e 28 dias de suplementação por gavagem no grupo experimental, **G4:** grupo com treinamentos diários e com suplementação com AGPI ω -3.

PESO-GRUPO 4					
ANIMAL	0	7	14	21	28
1	280	302	330	352	376
2	295	321	327	340	360
3	265	281	289	301	310
4	282	315	344	375	400
5	257	281	302	332	362
6	256	262	312	338	360
7	252	260	299	317	342
8	259	274	291	307	325
9	261	287	291	322	356
PESO MÉDIO	267,4	287,0	309,4	331,6	354,6

Tabela 9. Concentração plasmática (U/L) das enzimas creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LH), nos animais dos grupos experimentais, **G1:** grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G2:** animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3; **G3:** animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω -3; **G4:** animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω -3.

LDH U/L					CK U/L			
ANIMAL	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1	974,10	320,40	555,70	234,10	40,00	20,00	27,00	16,00
2	1082,40	292,60	552,80	199,50	34,00	17,00	33,00	22,00
3	909,90	343,90	548,61	311,76	24,00	18,00	30,00	38,00
4	899,20	341,20	621,20	353,90	33,00	19,00	23,00	17,00
5	1127,60	439,00	678,50	433,00	37,00	26,00	23,00	44,00
6	1116,10	364,10	401,60	379,10	23,00	15,00	25,00	49,00
7	1002,00	343,77	474,80	311,76	36,00	19,00	25,00	22,00
8	1015,90	343,77	548,61	433,50	24,00	28,00	13,00	28,00
9	1015,90	305,20	555,70	149,20	22,00	25,00	12,00	23,00
MÉDIA	1015,90	343,77	548,61	311,76	30,33	20,78	23,44	28,78
SEM	27,38	14,00	26,00	33,50	2,30	1,50	2,30	4,00

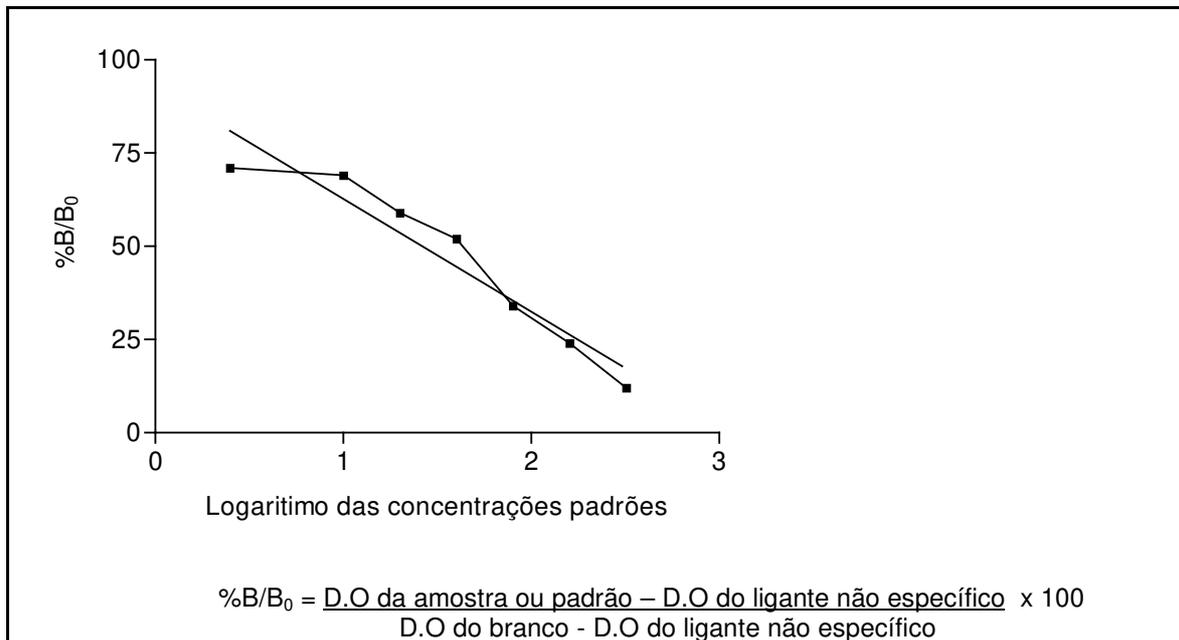


Figura 20. Curva padrão da prostaglandina E₂.

Tabela 10. Concentrações plasmáticas do eicosanóide prostaglandina E₂ (PGE₂), nos animais dos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3.

ANIMAL	PGE ₂ pg/mL			
	G1	G2	G3	G4
1	62,4	72,8	36,6	19,6
2	48,0	50,9	27,6	41,3
3	75,6	49,1	36,6	47,6
4	54,2	45,7	27,8	31,0
5	62,4	29,3	32,4	31,0
6	62,2	49,1	36,6	45,2
7	76,8	58,5	25,6	31,0
8	60,3	27,6	69,1	14,6
9	59,4	28,0	37,1	17,4
MÉDIA	62,4	45,7	36,6	31,0
SEM	3,1	5,1	4,0	4,0

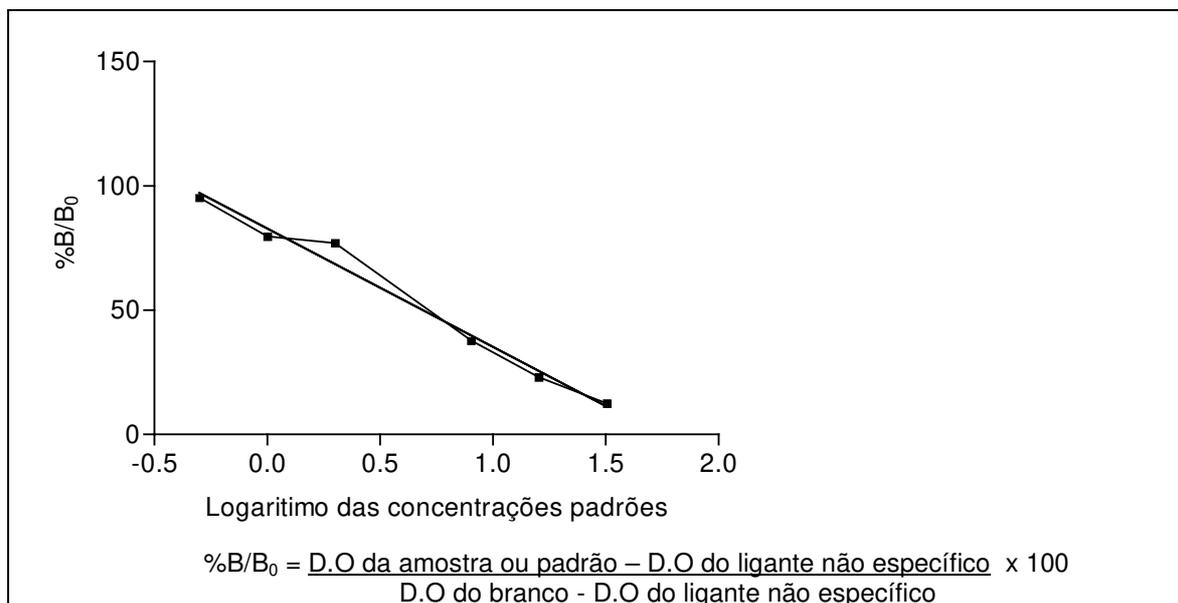


Figura 21. Curva padrão do tromboxano B₂.

Tabela 11. Concentrações plasmáticas do eicosanóide tromboxano B₂ (TXB₂), nos animais dos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3.

	TXB ₂ pg/mL			
ANIMAL	G1	G2	G3	G4
1	38,6	41,4	49,5	52,9
2	47,0	49,2	55,1	47,7
3	41,5	41,4	57,2	53,3
4	47,0	34,2	54,3	52,9
5	60,0	41,4	51,4	44,7
6	50,6	49,7	58,7	60,0
7	58,2	34,2	55,1	58,5
8	42,3	44,7	60,4	47,1
9	37,7	36,2	54,5	59,1
MÉDIA	47,0	41,4	55,1	52,9
SEM	2,7	1,9	1,0	1,9

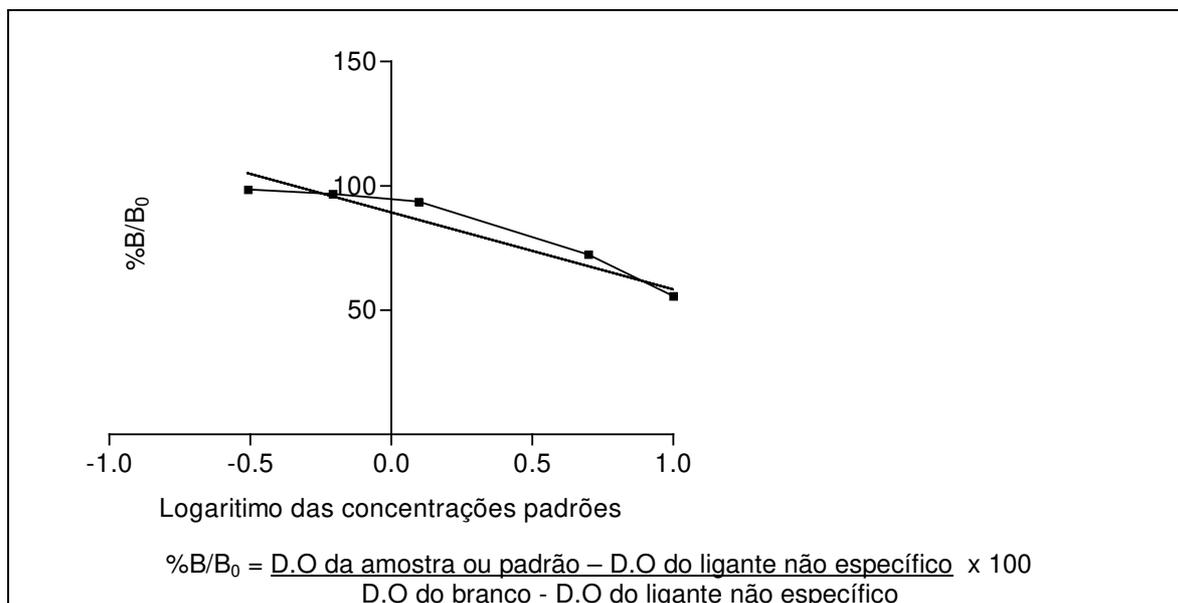


Figura 22. Curva padrão do leucotrieno B₄.

Tabela 12. Concentrações plasmáticas do eicosanóide leucotrieno B₄ (LTB₄), nos animais dos grupos experimentais, **G1**: grupo controle, sem treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G2**: animais sem treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3; **G3**: animais com treinamentos diários e sem suplementação com AGPI ω-3; **G4**: animais com treinamentos diários e suplementados com AGPI ω-3.

LTB ₄ pg/mL				
ANIMAL	G1	G2	G3	G4
1	673,2	227,0	593,0	549,0
2	566,0	291,1	663,7	542,2
3	673,2	146,7	647,5	473,3
4	576,9	261,4	548,6	542,2
5	566,0	291,1	636,9	631,6
6	789,2	99,6	691,6	505,6
7	680,3	227,0	593,0	576,9
8	757,3	267,9	493,2	457,9
9	776,3	231,0	469,4	601,1
MÉDIA	673,2	227,0	593,0	542,2
SEM	29,7	21,7	25,0	19,0