VINÍCIUS CONEGLIAN SANTOS

**Estudo da via de sinalização da apoptose de
neutrófilos em atletas praticantes de meia maratona
suplementados ou não com óleo de peixe**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo
2015**

VINÍCIUS CONEGLIAN SANTOS

**Estudo da via de sinalização da apoptose de
neutrófilos em atletas praticantes de meia maratona
suplementados ou não com óleo de peixe**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Tania Cristina Pithon-Curi

Versão Original

**São Paulo
2015**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Vinícius Coneglian.

Estudo da via de sinalização da apoptose de neutrófilos em atletas praticantes de meia maratona suplementados ou não com óleo de peixe / Vinícius Coneglian Santos. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Tania Cristina Pithon-Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle do metabolismo e função de leucócitos.

Versão do título para o inglês: Apoptosis signaling pathway study in the neutrophils of marathon runners supplemented or not supplemented with fish oil.

1. Meia maratona 2. Neutrófilos 3. Ácidos graxos ômega-3 4. Morte celular programada I. Curi, Profa. Dra. Tania Cristina Pithon II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB037/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vinícius Coneglian Santos.

Título da Tese: Estudo da via de sinalização da apoptose de neutrófilos em atletas praticantes de meia maratona suplementados ou não com óleo de peixe.

Orientador(a): Profa. Dra. Tania Cristina Pithon- Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

PARECER 979/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 26.10.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Efeito da suplementação com óleo de peixe na via de sinalização da apoptose de neutrófilos de maratonistas na fase pré-competição"* sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **TANIA CRISTINA PITHON-CURI** e o aluno **VINÍCIUS CONEGLIAN SANTOS**.

Cabe a pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em

26.10.2011

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família e meus amigos, especialmente à minha mãe e meu pai, que sempre me apioaram e incentivaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado saúde e por todas as coisas maravilhosas que realizou e tem realizado em minha vida.

Aos meus pais (Josué de Souza Santos e Vera Lúcia Coneglian Santos) pela educação e amor incondicional que sempre me deram.

À minha noiva Valéria do Santos Dantas, minha irmã Aniely Coneglian Santos e minha sobrinha Maria Valentina Coneglian por sempre estarem ao meu lado nos momentos de dificuldade.

Aos meus familiares (especialmente meus tios Dagoberto Rodrigues e Maria de Lourdes Rodrigues) e amigos por sempre me incentivarem.

À minha orientadora Profa. Tania Cristina Pithon-Curi pelo exemplo de pesquisadora e acima de tudo um exemplo de ser humano a ser seguido.

A todos os meus amigos (graduandos e pós-graduandos) especialmente à Fernanda de Almeida Gutierrez, Maysa Barros Braga, Kim Guimarães Caçula, André Luiz Lacerda Bachi, Maria Elizabeth Pereira Passos, César Miguel Momesso dos Santos, Fábio Takeo Sato e Ana Paula Renno Sierra pelo companheirismo e pela inestimável ajuda para realização deste trabalho.

Aos professores Rui Curi, Maria Fernanda Cury-Boaventura, Renata Gorjão e Adriana Crisitina Levada-Pires pelo exemplo de como deve ser a conduta de um pesquisador, por sempre me apoiarem em toda minha jornada acadêmica e por toda amizade.

A secretária do programa de pós graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Cruzeiro do Sul Valéria Gomes Campos Silva.

A Universidade Cruzeiro do Sul onde a maioria das análises foram realizadas.

Aos atletas que participaram do estudo, por toda adesão e paciência para realização de todas as análises. Sem vocês nada disso seria possível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Muito obrigado por tudo!

“E agora, eis o que diz o Senhor, aquele que te criou, Jacó, e te formou, Israel: Nada temas, pois eu te resgato, eu te chamo pelo nome, és meu. Se tiveres de atravessar a água, estarei contigo. E os rios não te submergirão; se caminhares pelo fogo, não te queimarás, e a chama não te consumirá. Pois eu sou o Senhor, teu Deus, o Santo de Israel, teu salvador. Dou o Egito por teu resgate, a Etiópia e Sabá em compensação. Porque és precioso a meus olhos, porque eu te aprecio e te amo, permuto reinos por ti, entrego nações em troca de ti. Fica, tranquilo, pois estou contigo, do oriente trarei tua raça, e do ocidente eu te reunirei”

Isaías 43:1-5 (Bíblia sagrada)

RESUMO

SANTOS, V. C. **Estudo da via de sinalização da apoptose de neutrófilos em atletas praticantes de meia maratona suplementados ou não com óleo de peixe.** 2015. 173 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O exercício físico intenso está associado à mudanças na quantidade, na função e na morte de neutrófilos. Tem sido proposto que a suplementação com óleo de peixe minimiza os efeitos imunossupressivos do exercício físico e que a fosfatidilcolina também poderia exercer importantes efeitos sobre a função de leucócitos. O objetivo do estudo foi o de investigar os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na apoptose de neutrófilos de atletas amadores. Quarenta e seis atletas amadores, foram avaliados antes e após duas competições de meia maratona. Na primeira meia maratona, os atletas não foram suplementados. As coletas de sangue dos atletas foram realizadas nas seguintes condições: Em repouso e imediatamente após a competição. No primeiro dia, após a primeira meia maratona, iniciou-se a suplementação. Os indivíduos foram suplementados diariamente com 3g de óleo de peixe ou lecitina de soja, por 60 dias, e divididos em 3 grupos: 1) Lecitina, 2) DHA e 3) EPA. Os atletas foram reavaliados 8 semanas após o início da suplementação. Já na segunda meia maratona, com todos os atletas suplementados, as coletas de sangue foram realizadas nas mesmas condições da primeira corrida. Neste estudo avaliamos os receptores da apoptose de neutrófilos (Fas e TRAIL), as moléculas de adesão (L-selectina e ICAM-1), a fragmentação de DNA e a externalização de fosfatidilserina. Além disso, foi avaliada a concentração plasmática das citocinas TNF-alfa, IL-8, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-1beta. As enzimas creatina quinase e lactato desidrogenase, a concentração de mioglobina, proteína C reativa e o número de leucócitos e neutrófilos também foi determinada. A meia maratona aumentou a atividade das enzimas CK e LDH e a concentração de mioglobina em todos os grupos estudados, sendo que a suplementação não apresentou nenhum efeito sobre estes parâmetros. Já o número de neutrófilos e leucócitos, aumentaram após a meia maratona em todos os grupos, e a suplementação provocou este aumento somente nos grupos EPA e Lecitina. Em neutrófilos de atletas, a meia maratona diminuiu a expressão dos receptores Fas e TRAIL e das moléculas de adesão ICAM-1 e L-selectina em todos os grupos, por outro lado, aumentou a fragmentação de DNA (somente no

grupo DHA) e a externalização de FS (DHA, EPA e Lectina). A meia maratona também elevou a concentração das citocinas IL-8, IL-6 e IL-10 em todos os grupos. Já a suplementação (DHA, EPA ou lecitina de soja) diminuiu a fragmentação de DNA e a expressão do receptor Fas em neutrófilos. Além disso, aumentou a expressão de TRAIL, ICAM-1, L-selectina e a externalização de fosfatidilserina. Em relação a concentração plasmática de citocinas a suplementação reduziu a concentração de TNF-alfa e aumentou a de IL-10 em todos os grupos. Enquanto que, a concentração de IL-4 aumentou somente nos grupos DHA e EPA. Concluímos que a suplementação com lecitina de soja apresenta efeitos semelhantes aos dos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a função de leucócitos em atletas amadores.

Palavras-chave: Meia maratona. Neutrófilos. Ácidos graxos ômega-3. Morte celular programada.

ABSTRACT

SANTOS, V. C. Apoptosis signaling pathway study in the neutrophils of marathon runners supplemented or not supplemented with fish oil. 2015. 173 p. Ph Thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Intense physical exercise is associated with changes in the number, function and death of neutrophils. It has been proposed that supplementation with fish oil rich minimizes the immunosuppressive effects induced by intense physical exercise and phosphatidylcholine could also have significant effects on leukocytes function. The aim of this study was to investigate the effects of a half-marathon and fish oil supplementation rich in EPA or DHA or soy lecithin supplementation on neutrophils apoptosis of amateur athletes. Forty-six recreational athletes were evaluated before and after two half marathons. In the first competition the athletes did not receive supplementation. Blood samples were collected in the following conditions: In rest and immediately after competition. On the first day, after the first half-marathon, supplementation began. The subjects were supplemented with 3 g of fish oil or soy lecithin daily for 60 days and divided into 3 groups: 1) Lecithin 2) DHA 3) EPA. The athletes were assessed 8 weeks after the start of supplementation. In the second half-marathon, with all the supplemented athletes, blood samples were collected under the same conditions of the first competition. In this study were evaluated the receptors of neutrophils apoptosis (Fas and TRAIL), adhesion molecules (L-selectin and ICAM-1), DNA fragmentation and phosphatidylserine externalization. Moreover, the plasma concentration of TNF-alpha, IL-8, IL-6, IL-4, IL-10 and IL-1beta cytokines was evaluated. The enzymatic activity of creatine kinase and lactate dehydrogenase, plasma concentration of myoglobin, and C-reactive protein and blood counts was also determined. The half-marathon increased the enzymatic activity of CK and LDH and the myoglobin concentration in all groups studied, and the supplementation had no effect on these parameters. The number of neutrophils and leucocytes increased in all groups after half marathon, and the supplementation caused this increase only in the EPA and Lecithin groups. In athletes neutrophils, the half-marathon decreased the expression of Fas and TRAIL receptors and of ICAM-1 and L-selectin adhesion molecules. On the other hand, it increased DNA fragmentation (only in the DHA group) and phosphatidylserine externalization (DHA, EPA and Lecithin groups). The half-marathon also increased concentrations of IL-8, IL-6 and IL-10 cytokines in all groups. The Supplementation (DHA

or EPA or soy lecithin) decreased DNA fragmentation and Fas receptor expression in neutrophils. Moreover, increased expression of TRAIL, ICAM-1, L-selectin and phosphatidylserine externalization. In relation to cytokines plasma concentration the supplementation decreased TNF- α and increased the concentration of IL-10 in all groups. Whereas, IL-4 concentration increased only DHA and EPA groups. In conclusion, supplementation with soy lecithin has similar effects to the fish oils rich in EPA or DHA on leukocyte function amateur athletes.

Keywords: Half-marathon. Neutrophils. N-3 fatty acids. Programmed cell death.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo da curva do J	25
Figura 2 – Proposta em formato S	27
Figura 3 – Hematopoiese.....	28
Figura 4 – Sequência esquemática da migração de neutrófilos	30
Figura 5 – Sequência esquemática da migração de neutrófilos	30
Figura 6 – Esquema das vias de apoptose	35
Figura 7 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na atividade plasmática da enzima LDH (U/L) de atletas amadores.....	53
Figura 8 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na atividade plasmática da enzima CK (U/L) de atletas amadores.....	54
Figura 9 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática da enzima mioglobina de atletas amadores.....	55
Figura 10 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na atividade plasmática da enzima PCR de atletas amadores....	56
Figura 11 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de neutrófilos de atletas amadores.	59
Figura 12 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície de neutrófilos de atletas amadores.....	60
Figura 13 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão de L-selectina (CD62) na superfície de neutrófilos de atletas amadores.	61
Figura 14 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão de ICAM-1 (CD54) na superfície de neutrófilos de atletas amadores.	62

Figura 15 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na porcentagem de neutrófilos com externalização de FS em atletas amadores.	63
Figura 16 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na porcentagem de neutrófilos com fragmentação de DNA de atletas amadores.	64
Figura 17 – E Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de TNF-alfa de atletas amadores. .	67
Figura 18 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-8 de atletas amadores.....	68
Figura 19 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-6 de atletas amadores.....	69
Figura 20 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-4 de atletas amadores.....	70
Figura 21 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-10 de atletas amadores.....	71
Figura 22 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-1 beta de atletas amadores .	72
Figura 23 – Cascata de citocinas liberadas durante a sepse e o exercício físico	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos atletas antes da suplementação	42
Tabela 2 – Características dos atletas após a suplementação	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a composição de ácidos graxos livres no plasma de atletas.	50
Quadro 2 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre o número de leucócitos e neutrófilos de atletas amadores.	51
Quadro 3 – Resumo dos resultados dos parâmetros bioquímicos.	57
Quadro 4 – Resumo dos resultados das análises realizadas no citômetro de fluxo.	65
Quadro 5 – Resumo dos resultados da análise da concentração de citocinas plasmáticas.	73
Quadro 6 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de ácido aracdônico no plasma (grupo DHA).	96
Quadro 7 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de EPA no plasma (grupo DHA).	97
Quadro 8 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de DHA no plasma (grupo DHA).	98
Quadro 9 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de ácido aracdônico no plasma (grupo EPA)	99
Quadro 10 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de EPA no plasma (grupo EPA)	100
Quadro 11 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de DHA no plasma por HPLC (grupo EPA)	101
Quadro 12 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de ácido aracdônico no plasma (grupo Lecitina)	102
Quadro 13 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de EPA no plasma (grupo Lectina).	103
Quadro 14 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de DHA no plasma (grupo Lecitina).	104
Quadro 15 – Dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação (grupo DHA).	105
Quadro 16 – Dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação (grupo EPA)	106

Quadro 17 – Dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação (grupo Lectina).....	107
Quadro 18 – Dados individuais da avaliação física dos atletas após a suplementação (grupo DHA).....	108
Quadro 19 – Dados individuais da avaliação física dos atletas após a suplementação (grupo EPA).....	109
Quadro 20 – Dados individuais da avaliação física dos atletas após a suplementação (grupo Lecitina).....	110
Quadro 21 – Dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas (grupo DHA). .	111
Quadro 22 – Dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas (grupo EPA). .	112
Quadro 23 – Dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas (grupo Lecitina).....	113
Quadro 24 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise do número de neutrófilos circulantes.....	114
Quadro 25 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise do número de neutrófilos circulantes.....	114
Quadro 26 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise do número da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase.....	114
Quadro 27 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da atividade máxima da enzima creatina desidrogenase.....	118
Quadro 28 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de mioglobina	114
Quadro 29 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de proteína C reativa	122
Quadro 30 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão do receptor Fas (CD95) na superfície do neutrófilo.....	124
Quadro 31 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície do neutrófilo.....	126
Quadro 32 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão de L-selectina (CD62) na superfície do neutrófilo.	128
Quadro 33 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão de ICAM-1 (CD54) na superfície do neutrófilo	130

Quadro 34 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da externalização de fosfatidilserina em neutrófilo.....	132
Quadro 35 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da fragmentação de DNA do neutrófilo.....	134
Quadro 36 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de TNF-alfa.....	136
Quadro 37 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-8.....	137
Quadro 38 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-6.	139
Quadro 39 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-4.....	141
Quadro 40 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-10.	143
Quadro 41 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-1beta.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido aracdônico

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

ADP – adenosina difosfato

AG – ácidos graxos

AIF – fator indutor de apoptose

AMP – adenosina monofosfato

APAF-1 – Fator 1 ativador de proteases apoptóticas

APC – aloficocianina

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina sérica bovina

Ca⁺² – cálcio

Caspases – *cysteine Aspartate Proteases*

CK – creatina quinase

cm – centímetros

cm² – centímetro quadrado

ConA – concanavalina A

COX – ciclooxigenase

DHA – ácido docosahexenóico

Diablo – proteína ligadora direta de proteínas inibidoras de apoptose com baixo ponto isoelétrico

DISC – complexo de sinalização indutor de morte

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EI – episódio infeccioso

EPA – ácido eicosapentaenóico

EROs – espécies reativas de oxigênio

FasL – Fas ligante

FC – frequência cardíaca

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FS – Fosfatidilserina

g – gramas

HLA – *human leukocyte antigens*

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

ICAM-1 – molécula de adesão intracelular-1

Ig – imunoglobulinas

IL – interleucina

IMC – índice de massa corporea

INF – interferon

ITRS – infecção do tracto respiratório superior

Kg – quilo

K²⁺ – potássio

LDH – lactato desidrogenase

LPS – lipopolissacarídeo

mg – miligramas

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

mL – mililitros

mM – milimolar

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NETs – partículas dos neutrófilos

NF-AT – fator nuclear das células T ativadas

NK – *natural Killer*

nm – nanômetro

TNF – fator de necrose tumoral

NO – espécies reativas de nitrogênio

Omi/HtrA2 – *High Temperature Requirement*

OP – óleo de peixe

O₂⁻ – superóxido

PAD – pressão arterial distólica

PAS – pressão arterial sistólica

PBS – tampão salino fosfato

PCR – proteína C reativa

PE – ficoertrina

pH – potencial hidrogeniônico

PI – iodeto de propídeo

PI3K – fosfatidilinositol 3 kinase

PKB – proteína Kinase B

PUFA – ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados

rpm – rotações por minuto

Smac – segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria

TNF – fator de necrose tumoral

TNF-R – receptor do fator de necrose tumoral

TRAIL – ligante indutor da apoptose relacionado ao TNF

VO_{2máx} – volume máximo de oxigênio

VR – valor relativo*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

β – beta

ω – ômega

°C – graus Celsius

μL – microlitros

U/L – unidades por litro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Sistema Imune e exercício físico.....	25
1.2 Origem e características dos neutrófilos.....	27
1.3 Funções dos neutrófilos	29
1.4 Neutrófilos e exercício físico.....	30
1.5 Processo de morte dos neutrófilos.....	32
<i>1.5.1 Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.....</i>	<i>32</i>
1.6 Morte do neutrófilo e exercício físico.....	36
1.7 Exercício físico e ácidos graxos ω-3	37
1.8 Comparação entre óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a função imune.....	38
1.9 Lecitina de soja.....	38
2 JUSTIFICATIVA	40
3 OBJETIVO	41
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivo específico.....	41
4 MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 Casuística.....	42
4.2 Suplementação.....	42
4.3 Desenho experimental	42
4.4 Teste cardiopulmonar	44
4.5 Coleta de sangue	44
4.6 Exames hematológicos e bioquímicos	44
<i>4.6.1 Hemograma</i>	<i>44</i>
<i>4.6.2 Avaliação da atividade máxima da enzima creatina quinase.....</i>	<i>44</i>
<i>4.6.3 Avaliação da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase</i>	<i>44</i>
<i>4.6.4 Avaliação da concentração de proteína C reativa no plasma</i>	<i>44</i>
<i>4.6.5 Avaliação da concentração de mioglobina no plasma</i>	<i>44</i>
4.7 Obtenção dos Neutrófilos	46
4.8 Determinação da produção de citocinas no plasma por perfil de múltiplos analitos.....	47
4.9 Determinação da expressão de moléculas de adesão de neutrófilos por citometria de fluxo	47
4.10 Análise da expressão de receptores de superfície relacionados a apoptose de neutrófilos por citometria	48
4.11 Análise da fragmentação do DNA dos neutrófilos por citometria	48

4.12	Análise da externalização de fosfatidilserina dos neutrófilos por citometria	48
4.13	Análise da composição de ácidos graxos livres no plasma por Cromatografia gasosa	49
4.14	Expressão dos resultados e tratamento estatístico	49
5	RESULTADOS.....	50
5.1	Análise da composição de ácidos graxos livres no plasma.	50
5.2	Hemograma e análises bioquímicas	50
5.2.1	<i>Efeitos da meia maratona e da suplementação na quantidade de leucócitos de atletas...</i>	51
5.2.2	<i>Efeitos da meia maratona e da suplementação na quantidade de neutrófilos de atletas..</i>	51
5.2.3	<i>Determinação da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase no plasma.</i>	53
5.2.4	<i>Determinação da atividade máxima da enzima creatina quinase no plasma</i>	54
5.2.5	<i>Determinação da concentração plasmática de mioglobina</i>	55
5.2.6	<i>Determinação da concentração de proteína C reativa no plasma</i>	56
5.2.7	<i>Quadro resumindo os efeitos da meia maratona e da suplementação na atividade máxima das enzimas LDH e CK e na concentração de mioglobina e PCR.</i>	57
5.3	Resultados das análises citometria de fluxo.....	59
5.3.1	<i>Análise da expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de neutrófilos</i>	59
5.3.2	<i>Análise da expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície de neutrófilos</i>	60
5.3.3	<i>Análise da expressão de L-selectina (CD62) na superfície de neutrófilos</i>	61
5.3.4	<i>Análise da expressão de I-CAM-1 (CD54) na superfície de neutrófilos</i>	62
5.3.5	<i>Avaliação da externalização de fosfatidilserina de neutrófilos</i>	63
5.3.6	<i>Avaliação da fragmentação de DNA dos neutrófilos</i>	64
5.3.7	<i>Quadro resumindo os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe enriquecidos com EPA ou DHA nos marcadores da apoptose e ativação de neutrófilos de maratonistas amadores.</i>	65
5.4	Análises da concentração de citocinas no plasma dos atletas	67
5.4.1	<i>Determinação da concentração plasmática de TNF-alfa</i>	67
5.4.2	<i>Determinação da concentração plasmática de IL-8</i>	68
5.4.3	<i>Determinação da concentração plasmática de IL-6 em maratonistas</i>	69
5.4.4	<i>Determinação da concentração plasmática de IL-4</i>	70
5.4.5	<i>Determinação da concentração plasmática de IL-10</i>	71
5.4.6	<i>Determinação da concentração plasmática de IL-1beta</i>	72
5.4.7	<i>Quadro resumindo os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe enriquecidos com EPA ou DHA na concentração de citocinas no plasma de atletas amadores.</i>	73
6	DISCUSSÃO.....	75

7 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	
A - Dados individuais dos atletas para análise da composição de ácidos graxos livres no plasma	96
B - Quadros contendo os dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação.....	105
C - Quadros contendo os dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas.....	111
D - Quadros contendo os dados individuais dos atletas utilizados para análises hematológicas e bioquímicas.....	114
E - Quadros contendo os dados individuais dos atletas utilizados para análise de citometria de fluxo.....	126
F - Quadros contendo os dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de citocinas.....	137
G - Artigo 1 - SANTOS, V. C. et al. Effect of regular exercise on leukocyte function in young and middle-aged women. J. Exerc. Sci. Fit., v. 11, n. 2, p. 57-62, 2013.....	149
H - Artigo 2 - SANTOS, V. C. et al. Effects of DHA-Rich Fish Oil Supplementation on Lymphocyte Function Before and After a Marathon Race. Inter. J. Sport Nutr. Exerc. metabolism, v. 23, n. 2, p. 161-169, 2013.....	156
I - Artigo 3 - SANTOS, V. C. et al. Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. Cell Bioch Func., v. 31, n. 3, p. 237-243, 2013	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 Função Imune e exercício físico

Em atletas de *endurance* o treinamento físico intenso e prolongado, assim como a competição, alteram a função imune desses atletas, principalmente quando combinados com outros fatores de estresse, como ar seco ou poluentes aéreos, que aumentam a incidência de infecções (NIEMAN, 2007).

Sabe-se há algum tempo que o exercício físico modula a função imune e a susceptibilidade a infecções (NIEMAN, 2007). Nieman (1994) propôs o modelo da curva do “J”, para descrever a correlação entre susceptibilidade a infecções, principalmente do trato respiratório superior, e a intensidade do exercício físico (**Figura 1**). De acordo com este modelo, o exercício físico de intensidade moderada protegeria o indivíduo de infecções, enquanto que o exercício físico prolongado e intenso aumentaria o número de episódios infecciosos. O fenômeno é comumente referido como “janela aberta” para a entrada dos patógenos (NIEMAN, 1994). Sugere-se que as infecções observadas em atletas podem ser devido ao aumento da susceptibilidade do atleta a patógenos ou ao agravamento dos sintomas de uma infecção já estabelecida, mas com pouca sintomatologia (MALM, 2006).

Figura 1 – Modelo da curva do J: relação entre intensidades variadas de exercício físico e risco de infecções do trato respiratório superior (ITRS).

Fonte: Adaptado de Nieman (1994).

Pedersen e Ullum (1994) também propuseram uma teoria onde o aumento na susceptibilidade a infecções, logo após a realização de exercício físico, seria proporcional à intensidade com que este é realizado (PEDERSEN; ULLUM, 1994). Isto é, quanto mais intenso o exercício físico, maior o tempo necessário para a “normalização” do metabolismo e da função dos leucócitos. Tal fato levaria a um quadro transitório de imunossupressão. Portanto, este período denominado de “janela aberta” poderia permanecer por até 72 horas dependendo do tipo de exercício físico, duração e condicionamento físico do praticante (NIEMAN; PEDERSEN, 1999). É observado, em seres humanos e animais experimentais, que, após a realização de exercícios físicos intensos e prolongados, ocorre aumento do número de ocorrências de infecções do trato respiratório superior (ITRS) (EKBLUM; EKBLUM; MALM, 2006; GANI et al., 2003; MEEUSEN et al., 2013; SCHERR et al., 2011; WALSH et al., 2011). Acredita-se que a elevação na frequência e no risco de infecções se dá em uma a duas semanas após a participação do atleta em uma competição (NIEMAN et al., 2006). Um em cada sete maratonistas relataram um episódio de ITRS uma semana após a maratona de Los Angeles, realizada em 1987. Quando esses atletas foram comparados aos não atletas, observou-se um episódio de ITRS em cada 50 indivíduos (NIEMAN et al., 1990). Ekblom, Ekblom e Malm (2006) relataram que entre os corredores 33% apresentavam um episódio infeccioso (EI) antes da corrida. Por outro lado, a incidência de EI após a competição entre corredores sem o EI antes da corrida foi de apenas 16%.

Em humanos, durante e após as sessões de exercício físico, alguns leucócitos como linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK) apresentam alterações funcionais e metabólicas comprometendo as respostas imunológica e inflamatória (GLEESON, 2007; KIMSA et al., 2014; MORO-GARCIA et al., 2014), principalmente nos exercícios físicos realizados de modo intenso e extenuante (MALM, 2006). Na competição de maratona, as alterações mais evidentes ocorrem nas células NK, macrófagos e neutrófilos (MOOREN et al., 2012; NIEMAN, 1997).

Malm (2006) postulou um modelo adicional ao da “curva do J” que inclui os atletas de elite e originou o “formato S”. Acredita-se que atletas profissionais se adaptam ao exercício físico o que protegeria o seu sistema imunológico, diminuindo a susceptibilidade a infecções (MALM, 2006) (veja a **Figura 2** apresentada a seguir).

Figura 2 – Proposta em formato S. Relação entre a intensidade do exercício físico e o risco de infecção.

Fonte: Adaptado de Malm (2006).

1.2 Origem e características dos neutrófilos

Os granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) representam a maioria dos leucócitos, sendo que os neutrófilos constituem cerca de 60 a 70% do total de leucócitos circulantes. Os neutrófilos originam-se de células primordiais pluripotentes localizadas na medula óssea (**Figura 3**), as quais são também precursoras de leucócitos, eritrócitos e plaquetas (THEILGAARD-MONCH et al., 2005). O desenvolvimento dos neutrófilos é controlado pelo microambiente no qual a hematopoiese ocorre e por fatores de crescimento hematopoiéticos. Este processo envolve vários estágios, incluindo diferenciação, proliferação, maturação e, por fim, a liberação dos neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea (THEILGAARD-MONCH et al., 2005).

Figura 3 - Hematopoiese. Células pluripotentes produzem as células progenitoras mielóides e linfóides. Os neutrófilos se originam das células progenitoras mielóides.

natural killer (NK).

Fonte: Adaptado de Kuby e Goldsby (2003).

Os neutrófilos podem ser diferenciados dos linfócitos e de outros leucócitos circulantes pela presença de grânulos característicos no citoplasma, núcleo multilobulado e a

presença de marcadores de superfície específicos (KENNEDY; DELEO, 2009). Os grânulos citoplasmáticos são de fundamental importância para função dos neutrófilos. Estes grânulos podem ser divididos em primários ou azurófilos, secundários ou específicos e terciários (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Sua função não é somente fornecer enzimas para degradação hidrolítica do substrato, como no caso dos lisossomos clássicos, mas também eliminar as bactérias ingeridas e regular a inflamação. O desenvolvimento dos neutrófilos envolve fatores de transcrição diferentes daqueles que facilitam a maturação dos linfócitos. Muitos destes fatores de transcrição são fundamentais para maturação das proteínas dos grânulos e para ativação dos ligantes na superfície dos neutrófilos (THEILGAARD-MONCH et al., 2005). Os neutrófilos circulam nos vasos sanguíneos por cerca de 10 a 24 horas antes de migrarem para os tecidos onde mantém atividade funcional adequada por cerca de um a dois dias, sendo então fagocitados por macrófagos (BAINTON; ULLYOT; FARQUHAR, 1971).

1.3 Funções dos neutrófilos

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos ou substâncias “não próprias” que penetram por meio das barreiras físicas do corpo (CONCHA et al., 2014; KOBAYASHI; VOYICH; DELEO, 2003). Seus alvos incluem bactérias, vírus, protozoários, fungos e células tumorais. Neutrófilos ingerem microorganismos invasores, por meio de fagocitose e os atacam com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas lisossomais (CONCHA et al., 2014). Estas células sintetizam proteínas que participam de suas próprias funções efetoras e polipeptídeos pró e anti-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e interferon.

A resposta dos neutrófilos à lesão ou inflamação envolve a produção de mediadores inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral (TNF)-alfa ou a liberação de substâncias derivadas dos patógenos, desencadeando aumento na expressão das moléculas de adesão do endotélio vascular e, assim, iniciando o extravasamento dos neutrófilos para a área inflamada (TULL et al., 2009).

No desenvolvimento do processo inflamatório, os neutrófilos presentes na circulação são atraídos por quimiotaxia para o local da inflamação por células secretoras (mastócitos e basófilos), bactérias e corpos estranhos.

A aderência dos neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares é decorrência da intervenção direta de moléculas de adesão presentes nos neutrófilos e nas células endoteliais, resultando na liberação e/ou ativação de mediadores químicos inflamatórios (DELVES; ROITT, 2000). Após a adesão, ocorre a diapedese dos neutrófilos, ou seja, a migração dessas

células aderentes para o exterior do vaso, por meio das junções interendoteliais. A seguir, há o deslocamento para o meio extravascular e o acúmulo de neutrófilos no local da lesão (DELVES; ROITT, 2000). Ao chegar ao local de lesão, o neutrófilo entra em contato com o microorganismo invasor, o qual é rodeado por pseudópodes, formando assim o fagossomo.

A internalização do microorganismo inicia-se a partir da interação entre receptores específicos localizados na superfície do neutrófilo com ligantes presentes na superfície do microorganismo. Isso leva à polimerização da actina no sítio de ingestão e à consequente internalização do microorganismo por um mecanismo dependente de actina. Este processo leva à formação de um vacúolo (fagossoma) delimitado por uma membrana derivada da superfície celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; MUDD et al., 1934).

A fagocitose é acompanhada pela produção de EROs, formados a partir da ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998) e espécies reativas de nitrogênio (NO), produzidas a partir da atividade da óxido nítrico sintase (CEDERGREN et al., 2003) em conjunto com as enzimas dos grânulos dos neutrófilos eliminam os microorganismos fagocitados (KLEBANOFF, 2005).

Figura 4 - Sequência esquemática da migração de neutrófilos. (1) Marginação, (2) Rolling, (3) (4) Diapedese, (5) Quimiotaxia e (6) Fagocitose.

Fonte: Adaptado de Fox (2011).

1.4 Neutrófilos e exercício físico

O exercício físico modula a quantidade de leucócitos circulantes em humanos e isto depende da duração e da intensidade do esforço realizado. As alterações mais evidentes são

observadas após o exercício físico intenso e de longa duração (MOOREN et al., 2012; NIEMAN, 1994; WALSH et al., 2011).

O aumento da quantidade de neutrófilos em resposta ao exercício físico intenso (CHINDA et al., 2003; SHIN; LEE, 2013) ocorre, especialmente, em sessões de exercício físico que elevam a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), β -endorfina e cortisol (NIEMAN, 1997). Vale destacar que a elevação da concentração plasmática do cortisol aumenta proporcionalmente com a intensidade do esforço (BACHI et al., 2015), principalmente nas modalidades realizadas em intensidade superior a 75% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}).

Durante a maratona há elevação da concentração plasmática de cortisol por muitas horas, retornando aos valores basais cerca de uma semana após a competição (BACHI et al., 2015; KARKOULIAS et al., 2008). O cortisol tem um papel importante na supressão da resposta imune e na neutrofilia (MOREIRA et al., 2007). Esta imunossupressão é caracterizada pela inibição da atividade das células NK, proliferação de linfócitos, diminuição da fagocitose e da atividade microbicida de neutrófilos (KOWATARI et al., 2001).

Ao contrário do exercício físico moderado, após as sessões de exercícios físicos intensos e extenuantes há diminuição na liberação de substâncias quimioatraentes e de citocinas no tecido lesionado (MALM, 2006; NIEMAN et al., 2001; PEAKE et al., 2005), produção de imunoglobulinas (Ig) A (NIEMAN et al., 2006) IgG e IgM (TVEDE et al., 1989) e indução da morte de neutrófilos (LAGRANHA et al., 2007; LEVADA-PIRES et al., 2008; TUAN et al., 2008). Contudo, os resultados referentes aos efeitos do exercício físico intenso sobre a fagocitose são controversos. Há estudos demonstrando a manutenção e/ou aumento na atividade fagocitária após uma única sessão de exercício (PYNE, 1994; SMITH et al., 1990). Enquanto outros descreveram que, após sessões de exercícios físicos intensos e extenuantes, há redução da fagocitose de neutrófilos (LAGRANHA et al., 2005; SANTOS et al., 2013; SAXTON et al., 2003). Durante a fagocitose, há aumento no consumo de oxigênio. A maior parte do oxigênio consumida pelos neutrófilos é convertida em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-) pela enzima NADPH-oxidase. O O_2^- produzido é rapidamente convertido em H_2O_2 e radical hidroxil, que contribuem para a atividade microbicida dentro do fagossomo e no meio extracelular, sendo, portanto, um dos principais responsáveis pela morte de microorganismos fagocitados (DUSI; DONINI; ROSSI, 1996).

1.5 Processo de morte dos neutrófilos

A formação diária de neutrófilos em seres humanos é cerca de $0,8-1,6 \times 10^9$ células por quilo (Kg) de massa corpórea. Para que seja mantida a homeostase dessas células na corrente sanguínea é necessário que a mesma quantidade de neutrófilos entre em apoptose (morte constitutiva).

A morte celular exacerbada de neutrófilos leva a uma diminuição da sua quantidade (neutropenia), aumentando o risco de um indivíduo apresentar infecções por bactérias e fungos e prejudicando a resolução de tais infecções. A diminuição da morte de neutrófilos aumenta a sua quantidade (neutrofilia), o que está associada a ocorrência de infecções bacterianas, leucemia mieloide e infarto agudo do miocárdio (MAIANSKI et al., 2004).

A apoptose (morte celular programada) de neutrófilos é um evento essencial para manutenção da quantidade destas células na circulação em condições de infecção e inflamação. As enzimas e EROs produzidas pelos neutrófilos em condições de infecção e inflamação podem ser tóxicas para células e tecidos próximos a este local, o que as vezes intensifica o processo inflamatório. Assim, a apoptose dos neutrófilos e sua consequente remoção pelos macrófagos ou células dendríticas induz alteração na expressão de RNA mensageiro nesses fagócitos, favorecendo a liberação e/ou produção de mediadores anti-inflamatórios (LUO; LOISON, 2008).

A morte celular pode ocorrer por mecanismos diferentes, dentre estes destacam-se a “necrose”, “NETose” e “apoptose” (KENNEDY; DeLEO, 2009; MACFARLANE, 2009).

A necrose é uma morte celular na qual os fatores clássicos de apoptose não estão presentes (GOLSTEIN; KROEMER, 2007). Este tipo de morte celular geralmente acomete um grupo de células adjacentes e envolve inflamação. As principais características morfológicas da necrose são: tumefação da membrana, ruptura da membrana plasmática, tumefação das organelas citoplasmáticas, incluindo a mitocôndria, o retículo endoplasmático, e a condensação moderada da cromatina (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

Na NETose ocorre a liberação de partículas dos neutrófilos (NETs) que eliminam uma grande variedade de bactérias, fungos e parasitas. Os NETs são formados por cromatina e proteínas dos grânulos, os quais fornecem uma alta quantidade local de moléculas antimicrobicas (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007; FUCHS et al., 2007). Esta via de morte dos neutrófilos depende da ativação do *burst* respiratório e é caracterizada por mudanças morfológicas, diferentes daquelas descritas na apoptose e na necrose, tais como a desintegração do envelope nuclear, a mistura dos materiais citoplasmáticos e nucleares, a

perda de organelas citoplasmáticas e da membrana interna (BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007; FUCHS et al., 2007).

A apoptose é um termo originalmente introduzido por Kerr, Wyllie e Currie (1972). Nestas ocorrem alterações morfológicas específicas como redução do núcleo e do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, externalização de fosfatidilserina (FS), alteração do potencial de membrana mitocondrial e poucas modificações nas organelas citoplasmáticas (MACFARLANE, 2009). Neutrófilos em apoptose reduzem a sua função, como quimiotaxia, desgranulação, fagocitose e a produção de EROs, assim como dos receptores de superfície e as moléculas de adesão (MACFARLANE, 2009; PITHON-CURI et al., 2003).

O processo de apoptose pode ocorrer em situações fisiológicas adaptativas como na embriogênese, menopausa, reabsorção de tecido mamário após desmame, morte de leucócitos, maturação do sistema nervoso central ou em situações patológicas como deleção de células em proliferação, infecções virais, estímulos nocivos, radiação, agentes químicos e grandes variações de potencial hidrogeniônico (pH) (JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997).

Existem duas vias distintas, mas interligadas, que regulam o processo de apoptose, estas podem ser divididas em intrínseca e extrínseca. A apoptose de neutrófilos pode ser iniciada por qualquer uma destas vias (DANIAL; KORSMEYER, 2004).

A fragmentação do DNA desencadeia a apoptose principalmente pela via intrínseca. Por sua vez, células citotóxicas levam à apoptose principalmente pela via extrínseca (MACFARLANE, 2009). As duas vias levam à ativação de caspases (*Cysteine Aspartate Proteases*), as quais são responsáveis pela manutenção do sinal pró-apoptótico. Estas proteases fazem parte da família de cisteína proteases que clivam proteínas a partir de um resíduo de ácido aspártico. De acordo com sua função na apoptose, as caspases são classificadas como executoras, ou seja, aquelas que iniciam a cascata apoptótica (caspases 8 e 9) e efetoras (caspases 3, 6 e 7) que são ativadas pelas caspases executoras (CABRINI; NAHMOD; GEFFNER, 2010). A ativação das caspases efetoras conduz à clivagem de várias proteínas celulares que determinam as características morfológicas e bioquímicas da apoptose (MACFARLANE, 2009).

As proteínas da família BCL-2, localizadas no citoplasma e na membrana mitocondrial externa, regulam a via intrínseca da apoptose que inclui membros pró- e anti-apoptóticos (DANIAL; KORSMEYER, 2004).

As proteínas anti-apoptóticas incluem a BCL-2, BCL-X_L, MCL-1, BCL-2A1 e BCL-W. As proteínas pró-apoptóticas incluem a Bax, Bak, Bad, Bid, Bim/Bod, Blk, p193, Bcl-G, Puma, Noxa, Hrk/DP95, Binip3L, BiK/Nbk e Binip3/Nix, e atuam como “sentinelas” que, seletivamente, respondem aos sinais de sobrevivência ou de morte celulares (DANIAL; KORSMEYER, 2004).

1.5.1 Vias extrínseca e intrínseca da apoptose

A via extrínseca é desencadeada pela ativação dos receptores de superfície como o TNF-R (receptor do fator de necrose tumoral), o Fas (CD95/Apo1) e o TRAIL (ligante indutor da apoptose relacionado ao TNF), que transmitem sinais apoptóticos após estímulos de ligantes específicos: ligante Fas (FasL), TNF-alfa e TRAIL, respectivamente (CABRINI; NAHMOD; GEFFNER, 2010). O estímulo destes receptores leva a formação do complexo DISC (complexo de sinalização indutor de morte) que consiste do receptor de morte, uma proteína adaptadora (FADD e TRADD) e uma caspase iniciadora (pró-caspase 8). O recrutamento da pró-caspase 8 ao DISC desencadeia sua ativação e induz uma série de eventos, incluindo a ativação da caspase 3 e a clivagem de múltiplos substratos levando a morte da célula (KENNEDY; DELEO, 2009) (**Figura 5**).

Já a via intrínseca é mediada pela mitocôndria e envolve alteração do potencial de membrana mitocondrial. O estímulo apoptótico despolariza a membrana mitocondrial, induz a formação de poros e, conseqüentemente, a liberação de citocromo c. Além do citocromo c, outras proteínas pró-apoptóticas são liberadas para o citossol, como o fator indutor de apoptose (AIF), pró-caspase 9, Smac/Diablo (Smac – segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria e diablo – proteína ligadora direta de proteínas inibidoras de apoptose com baixo ponto isoelétrico) e a Omi/HtrA2 (*High Temperature Requirement*).

O citocromo c interage com o domínio triptofano aspartato do Fator 1 ativador de proteases apoptóticas (APAF-1) conduzindo à oligomerização da APAF-1 e a formação do apoptossomo, o qual recruta a caspase 9 e ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 (CABRINI; NAHMOD; GEFFNER, 2010).

As proteínas pró-apoptóticas desencadeiam apoptose de duas maneiras: induzindo diretamente a oligomerização da BAX e/ou BAK ou por se ligarem e inibirem a ação das proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 (MACFARLANE, 2009).

Neutrófilos não expressam o fator anti-apoptótico BCL-2, entretanto, apresentam proteínas da família BCL-2 como a MCL-1, BCL2-A1 e BCL-X_L (AKGUL; MOULDING; EDWARDS, 2001). A expressão da proteína MCL-1 está reduzida durante a apoptose,

levando a liberação da BAX do complexo heterodimérico MCL-1:BAX e o subsequente deslocamento da BAX para a membrana mitocondrial, a qual forma os poros na membrana e a consequente liberação do citocromo c e ativação de caspases, conforme já mencionado. Os eventos das vias intrínseca e extrínseca da apoptose estão sumarizados na **Figura 5**.

Figura 5 - Esquema das vias de apoptose. Representação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose de neutrófilos. Na via representada à esquerda está a ativação dos receptores de morte (via extrínseca), e outra, à direita, representada por um estímulo de estresse na mitocôndria (via intrínseca).

Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK), proteína inibidora de apoptose ligada-X (XIAP), intermediário reativo de oxigênio (ROI), proteína quinase A (PKA), proteína quinase B (PKB), fator ativador de proteínas apoptóticas-1 (APAF-1), complexo de sinalização indutor de morte (DISC), fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), fator nuclear Kappa B (NF-kb).

Fonte: Adaptado de Witko-Sarsat et al. (2011).

Um dos mecanismos que regulam a mitocôndria dos neutrófilos é o efluxo de potássio (K^+). A elevação da concentração extracelular de K^+ promove a sobrevivência dos neutrófilos por impedir a disfunção mitocondrial e a liberação de fatores pró-apoptóticos. Outro mecanismo importante de sobrevivência dos neutrófilos está relacionado à fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e a proteína quinase B (PKB), as quais são inibidores da apoptose de neutrófilos.

É importante observar que tanto a via intrínseca quanto a extrínseca convergem para a ativação da caspase 3. Entretanto, existem outras vias de morte independentes da ativação de caspases, envolvendo a proteína Omi/HtrA2 e uma outra via relacionada ao TNF-alfa (CHEN et al., 2006).

1.6 Morte do neutrófilo e exercício físico

O nosso grupo foi o primeiro a demonstrar a apoptose de neutrófilos após o exercício físico intenso, verificada por externalização de FS, despolarização de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA (LAGRANHA et al., 2004; LEVADA-PIRES et al., 2008). Verificamos que a competição de *triathlon* induz apoptose de neutrófilos em atletas de elite, uma vez que aumenta a externalização de FS e a fragmentação de DNA. Neste mesmo estudo foi, observada, após a competição, diminuição na expressão da proteína BCL-X_L (anti-apoptótica) e aumento da BAX (pró-apoptótica), da produção de EROs e da despolarização mitocondrial. As alterações na expressão destas proteínas estão entre os principais mecanismos responsáveis pela indução da apoptose de neutrófilos após o exercício físico intenso (LEVADA-PIRES et al., 2008).

Anteriormente, já havíamos verificado que uma única sessão de exercício físico realizado em esteira ergométrica, por 1 hora, induz apoptose em neutrófilos de ratos com 90 (maturados) e 60 (imaturados) dias de vida. Após o exercício físico intenso houve aumento da fragmentação de DNA, a condensação de cromatina e a externalização de FS nos neutrófilos, sugerindo que o processo de morte induzido pelo exercício físico é a apoptose (LAGRANHA et al., 2004).

Os mecanismos responsáveis pela indução de apoptose, durante e após a realização do exercício físico intenso, ainda não foram estabelecidos. Há evidências de que fatores modulados pelo exercício físico intenso, tais como, produção de EROs, concentração plasmática de hormônios (glicocorticóides, catecolaminas ou cortisol) e citocinas (PITHON-CURI et al., 2003), estão envolvidos na regulação da apoptose de vários tipos celulares

(MASTALOUDIS et al., 2004; PHANEUF; LEEUWENBURGH, 2001; SANTOS et al., 2013).

1.7 Exercício físico e ácidos graxos ω -3

O óleo de peixe (OP) é um suplemento que possui propriedades anti-inflamatórias. Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA) são os principais ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados (PUFA) da série ω -3 presentes no OP. O aumento no consumo destes ácidos graxos (AG) leva a uma diminuição da produção de prostaglandinas da série-2 e leucotrienos da série-4, eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA), os quais possuem propriedades pró-inflamatórias, formam prostaglandinas e tromboxanos da série-3 e leucotrienos da série-5 que possuem propriedades anti-inflamatórias (CALDER, 2007).

O EPA apresenta efeitos antiinflamatórios mais potentes do que DHA, entretanto, o DHA além de suas propriedades antiinflamatórias também aumenta a função de neutrófilos, tais como a capacidade de fagocitose e quimiotaxia (GORJÃO et al., 2006). Os PUFA ω -3 apresentam efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças auto-imunes (CALDER, 2004; DE CATARINA et al., 2005; MOZAFFARIAN; JASON, 2011; SIMOPOULOS, 2007; TULL et al., 2009).

Poucos estudos têm avaliado o efeito da suplementação com OP em indivíduos praticantes de exercício físico intenso e de longa duração. Andrade et al. (2007) demonstraram que a suplementação de OP por 6 semanas, na fase de treinamento pré-competição em nadadores de elite, reduziu a concentração plasmática de TNF-alfa e interferon (INF)-gama. Neste mesmo estudo foi observado que a suplementação com OP aumentou a concentração plasmática de PUFA ω -3 e diminuiu a de AA, modulando a resposta inflamatória após o treinamento exaustivo. Em contraste, Toft et al. (2000) e Nieman et al. (2009) observaram aumento da concentração plasmática de TNF-alfa, interleucina (IL)-6, IL-8 e IL-1ra após a maratona e ainda relataram que a suplementação com OP não foi capaz de reduzir a resposta inflamatória.

Nosso grupo observou que o treinamento pré-competição para maratona aumenta a apoptose de neutrófilos dos atletas (SANTOS et al., 2013). A suplementação com OP rico em DHA previne parcialmente este processo. No entanto, o efeito da suplementação com óleos de peixe ricos em EPA e DHA, na expressão dos receptores da via extrínseca da apoptose e moléculas de adesão na superfície de neutrófilos ainda não foram estudados. Assim, é importante investigar, em corredores amadores, as vias de sinalização da apoptose de

neutrófilos para a compreensão da ocorrência do processo de morte celular desencadeado pelo exercício físico intenso e os possíveis efeitos da suplementação com OP.

1.8 Comparação entre óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a função imune

Em estudo de WELDON et al. (2007), o pré tratamento com 100 μ M de EPA ou DHA diminuiu a produção de TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), comparado as células controle. Ambos os AG também reduziram a expressão do RNAm para TNF-alfa, IL-1beta e IL-6 (WELDON et al., 2007). Entretanto em, todos os casos, os efeitos do DHA foram significativamente mais potentes do que os do EPA. Ao contrário dos resultados obtidos em macrófagos, Klalfoun et al. (1997) relataram redução mais potente na produção de IL-6 por linfócitos tratados com EPA quando comparados ao DHA. Em uma linhagem de linfócitos B, o EPA e o DHA reduziram a produção de TNF-alfa, IL-10 e INF-gama. Nestes estudos os efeitos supressivos do EPA foram mais pronunciados do que os do DHA.

A suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA também apresenta diferentes efeitos sobre as funções de neutrófilos, linfócitos e monócitos *in vivo*. Kew et al. (2004) demonstraram que a suplementação com OP rico em DHA (4 g/dia) diminui a ativação de linfócitos T, verificada pela expressão de CD69, enquanto que a suplementação com OP rico em EPA não teve efeito significativo. Os óleos de peixe ricos em EPA ou DHA não tiveram efeitos na atividade fagocitária de neutrófilos e monócitos, produção de citocinas e expressão de moléculas de adesão em células mononucleares do sangue periférico. Entretanto, em estudo de Gorjão et al. (2006), a suplementação com OP rico em DHA (1,6 g/dia) aumentou em 40% a capacidade proliferativa de linfócitos, além de elevar a atividade fagocitária de neutrófilos e monócitos. Outros autores demonstraram que o OP rico em EPA não altera a fagocitose de neutrófilos (KEW et al., 2003). Provavelmente, diferentes doses e composições dos óleos usados nos estudos podem explicar estes diferentes resultados. Deste modo, observamos que a suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA apresentam características antiinflamatórias e que o DHA, além disso, também modula a função de algumas células do sistema imune.

1.9 Lecitina de soja

A fosfatidilcolina é o principal componente da lecitina de soja. Este fosfolipídio é muito ativo no sistema digestório, exercendo importantes efeitos sobre a absorção lipídica (NISHIMUKAI; HARA, 2004) e secreção de lipídeos biliares (NAVDER; BARAONA; LIEBER, 1997; NAKAJIMA et al., 2001). A lecitina reduz a colesterolemia e a ingestão

alimentar em animais de laboratório. Além disso, pacientes hiperlipidêmicos apresentam melhora do perfil lipídico no sangue após suplementação com lecitina (MEDIC et al., 2003). Jiang et al. (2001) demonstraram diminuição na absorção de colesterol a partir de uma dieta rica em fosfatidilcolina. Os autores sugerem que o alto grau de saturação dos grupos acil da fosfatidilcolina diminui a absorção intestinal do colesterol.

Em relação a resposta imune, linfócitos e macrófagos incorporam ativamente a fosfatidilcolina *in vitro* (NISHIYAMA; CURI 2000). Em cultura de linfócitos, o tratamento com fosfatidilcolina diminuiu sua atividade proliferativa e a produção de IL-2 em resposta a concanavalina A (NISHIYAMA et al., 2000). Já em estudo de Miranda et al. (2008), a suplementação com lecitina de soja (2 g/Kg de massa corpórea) em animais durante 7 dias aumentou a capacidade de fagocitose de macrófagos. Modificações nas funções das células do sistema imune não são dependentes de redução nas concentrações plasmáticas de lipídeos associados a lecitina, outros mecanismos podem estar envolvidos como por exemplo mudanças em enzimas relacionadas à formação de moléculas bioativas (FRENKEL; CANETTI; HALPERN, 2004) e/ou mudanças em microdomínios da membrana, o que poderia modificar a atividade de cascatas de sinalização intracelular (MIRANDA et al., 2008). Entretanto, faltam estudos sobre os efeitos da suplementação com lecitina de soja sobre a função imune em atletas após exercício físico intenso e de longa duração.

2 JUSTIFICATIVA

A meia maratona é classificada como sendo um exercício físico intenso e agudo. Como já citado, o exercício físico intenso e de longa duração está associado com imunossupressão, que é caracterizada pela redução da atividade da célula *NK*, da proliferação de linfócitos, da fagocitose e da atividade microbicida de neutrófilos.

O EPA e o DHA são os principais AG da série ω -3 dos óleos de peixe. Os PUFA ω -3 possuem ação antiinflamatória e efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças auto-imunes. Já a fosfatidilcolina é um dos principais componentes da membrana celular, exercendo importantes efeitos sobre a absorção lipídica e capacidade funcional de células do sistema imune. Contudo, permanece sem ser investigado o efeito comparativo dos óleos de peixe e a fosfatidilcolina sobre a função de leucócitos em atletas durante o treinamento e uma competição.

É observado em seres humanos e animais experimentais que os exercícios físicos intensos promovem inflamação exacerbada e aumento na apoptose de neutrófilos. Nosso grupo observou que o treinamento pré-competição para maratona elevou a concentração plasmática das citocinas inflamatórias e a apoptose de neutrófilos dos atletas (SANTOS et al., 2015). A suplementação com OP rico em DHA preveniu parcialmente este processo.

No presente trabalho, avaliou-se a apoptose de neutrófilos em corredores de longa distância, antes e após meia maratona, e o efeito da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em DHA ou EPA. Portanto, comparou-se os efeitos da suplementação com lecitina de soja com aqueles causados pelos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA que apresentam propriedades antiinflamatórias bem estabelecidas.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi o de investigar os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na apoptose de neutrófilos de atletas amadores.

3.2 Estratégia experimental

Nesse estudo investigamos os seguintes parâmetros em neutrófilos de atletas amadores:

- A expressão de moléculas de adesão intracelular (ICAM)-1 e L-selectina na superfície de neutrófilos.
- A expressão dos receptores Fas e TRAIL da superfície dos neutrófilos.
- A porcentagem de neutrófilos com DNA fragmentado.
- A porcentagem de neutrófilos com externalização de fosfatidilserina..
- A atividade das enzimas creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e mioglobina.
- A concentração de proteína C reativa (PCR).
- O número de leucócitos totais e neutrófilos.
- A concentração de AG livres no plasma.

Além disso, investigamos os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática das citocinas TNF-alfa, IL-10, IL-6, IL-1beta, IL-8 e IL-4.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Casuística

Neste estudo foram avaliados quarenta e seis atletas amadores, do sexo masculino, que participaram da meia maratona de São Paulo, em 23 de fevereiro de 2014 (antes da suplementação). As características dos atletas está sumarizada na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Características dos atletas antes da suplementação.

Meia-maratona (N=46)	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura total (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura (Petroski)	% gordura (Bioimpedância)	VO ₂ máx (ml/min/Kg)
	38,9 ± 1,0	74,1 ± 1,5	172 ± 0,007	24,7 ± 0,4	18,1 ± 0,6	18,2 ± 0,7	47,4 ± 5,4

Na meia maratona de São Paulo, realizada em 13 de abril de 2014 (após a suplementação), os mesmos atletas foram avaliados, porém esses foram divididos em 3 grupos, a saber:

Grupo 1) Treze atletas suplementados com lecitina de soja

Grupo 2) Vinte e um atletas suplementados com OP rico em DHA.

Grupo 3) Doze atletas suplementados com OP rico em EPA

Na **Tabela 2** está sumarizada as características de cada grupo.

Tabela 2 - Características dos atletas após a suplementação.

Meia-maratona (N=46)	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura total (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura (Petroski)	% gordura (Bioimpedância)	VO ₂ máx (ml/min/Kg)
DHA	39,2 ± 2,0	73,3 ± 2,2	172 ± 0,01	24,5 ± 0,6	19,4 ± 0,9	19,0 ± 1,4	46,5 ± 5,1
EPA	41,5 ± 2,1	75,2 ± 3,2	172 ± 0,02	25,1 ± 0,9	19,5 ± 1,0	20,2 ± 1,7	46,5 ± 7,0
Lecitina	36,8 ± 2,0	75,9 ± 2,9	173 ± 0,01	25,2 ± 0,9	18,4 ± 1,5	17,0 ± 2,1	49,3 ± 4,4

Os critérios utilizados para exclusão dos indivíduos participantes do estudo foram os seguintes: a utilização de qualquer tipo de medicamento durante o período do estudo, sinais ou sintomas de doenças inflamatórias ou infecto-contagiosas, fumantes, participantes em competições de maratona por um período inferior a dois anos.

4.2 Suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA

Os atletas foram suplementados diariamente com 3 gramas (g) de OP contendo 1500 miligramas (mg) de DHA (22:6, n-3) e 300 mg de EPA (20:5, n-3) (OMEGA-3 DHA, Naturalis, São Paulo, Brasil) ou com a mesma quantidade de OP, entretanto, contendo 1620 mg de EPA (20:5, n-3) e 300 mg de DHA (22:6, n-3) (HIOMEGA-3 EPA, Naturalis, São

Paulo, Brasil). O grupo Lecitina foi suplementado com 3 g de lecitina de soja contendo 1500 mg de fosfatidilcolina (LECITINA DE SOJA, Naturalis, São Paulo, Brasil).

Em nosso estudo não foi realizada a suplementação placebo, pois o placebo normalmente utilizado para pesquisa envolvendo suplementação com OP em humanos é o óleo mineral (NIEMAN et al., 2009, ANDRADE et al., 2007), entretanto, têm sido observado que este é de difícil absorção e causa muito desconforto intestinal aos voluntários.

4.3 Desenho experimental

Na primeira meia maratona, os atletas não foram suplementados. As coletas de sangue desses atletas foram realizadas nas seguintes condições:

Em repouso (1 dia antes da competição), com pelo menos 12 horas sem treinamento (Fase I) e imediatamente após a competição (Fase II).

No primeiro dia, após a primeira meia maratona, iniciou-se a suplementação. Todos os atletas receberam, de maneira duplo cego, a lecitina de soja, óleo de peixe rico em DHA ou óleo de peixe rico em EPA. Os maratonistas foram reavaliados 8 semanas após o início da suplementação.

Já na segunda meia maratona, com todos os atletas suplementados, as coletas de sangue novamente foram realizadas no repouso (1 dia antes da competição), com pelo menos 12 horas sem treinamento (Fase III) e imediatamente após a competição (Fase IV), conforme apresentado na figura a seguir (**Figura 6**):

Figura 6 - Desenho experimental do estudo.

Para analisarmos o efeito da meia maratona realizamos comparações entre as Fases II e I e entre as Fases IV e III. Para análise do efeito da suplementação, realizamos comparações entre as Fases III e I e entre as Fases IV e II.

4.4 Teste cardiopulmonar

O teste cardiopulmonar foi realizado na esteira ergométrica, com inclinação fixa de 1% e incremento de carga (1 km/h) a cada minuto até a velocidade máxima da esteira (20 km/h) (TEB, São Paulo, Brasil). O protocolo foi iniciado com 10 km/h (para atletas com tempo inferior à 35 minutos em uma prova de 10 km), 9 km/h (para atletas com tempo entre 35 e 46 minutos em uma prova de 10 km) ou 8 km/h (para atletas com tempo superior a 46 minutos em uma prova de 10 Km).

Este protocolo de teste máximo foi interrompido quando o atleta apresentava sintomas de cansaço físico intenso. Durante o teste, utilizamos o analisador de gases (Kb4, COSMED, Itália) para avaliar os seguintes parâmetros: o consumo máximo de oxigênio, a produção de dióxido de carbono, o quociente respiratório e a ventilação pulmonar. A frequência cardíaca e a respiratória foram determinadas no primeiro limiar, no segundo limiar e no pico máximo do teste.

4.5 Coleta de sangue

As amostras de sangue 20 mililitros (mL) foram obtidas da veia antecubital, por punção venosa em tubos a vácuo, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 0,004%) como anticoagulante. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 400 g por 10 minutos para obtenção do plasma. Após a coleta, os neutrófilos foram isolados do sangue por meio do método de Boyum (1968).

4.6 Exames hematológicos e bioquímicos

Os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, com metodologia automatizada, de rotina. O hemograma foi realizado em até 24 horas após a coleta. Os demais tubos com amostras de sangue foram centrifugados a 2500 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos e 0,5 mL de soro e plasma foram congelados a -80 °C para posteriores análises. Os seguintes exames foram realizados:

4.6.1 Hemograma

Realizado por método citoquímico/isovolumétrico com equipamento ABX PENTRA 80 e ABX 120 (ABX, Kyoto, Japão).

4.6.2 Avaliação da atividade máxima da enzima creatina quinase

A CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual age com a glicose na presença da hexoquinase formando glicose-6 fosfato. Esta na presença da glicose-6 fosfato desidrogenase é oxidada a 6 fosfogluconato e reduz o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) à NADH, aumentando a absorbância proporcionalmente à atividade da CK.

As reações enzimáticas foram realizadas utilizando o *kit* CK-NAC cinético da Bioclin (Minas Gerais, Brasil). Foram adicionados 20 µL de plasma para 1 mL da solução de reação (acetato de magnésio 100 milimolar (mM), glicose 20 mM, N-acetilcisteína 20 mM, adenosina difosfato (ADP) 2mM, adenosina monofosfato (AMP) 5 mM, NAD 2 mM, diadenosina pentafofato 10 µM, hexoquinase > 2000 U/L, creatina fosfato 30 mM e azida 15 mM). Em seguida, a solução e as amostras foram homogeneizadas e transferidas para uma placa, incubada por 2 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância inicial foi realizada a 340 nanômetros (nm) no espectrofotômetro (SpectraMax Plus, Molecular Devices, CA, EUA) e repetida a cada 1 minuto por 3 vezes. A atividade da CK foi obtida a partir da diferença de absorbância vezes o fator 8095 (U/L).

4.6.3 Avaliação da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase

A LDH catalisa a conversão do piruvato na presença de NADH. O decréscimo da absorbância devido a diminuição do NADH é proporcional a atividade da LDH. A determinação da atividade da lactato desidrogenase foi realizada por meio do *kit* da Bioclin (Minas Gerais, Brasil). Foram adicionados 20 µL de plasma para 1 mL da solução de reação (piruvato de sódio 1,2 mM, NADH 300 µM e azida sódica 15 mm/L). Em seguida, o plasma e a solução de reação foram homogeneizados e transferidos imediatamente para uma placa termostatizada a 37 °C. Posteriormente, a placa foi incubada por 2 minutos e feita a leitura da absorbância inicial a 340 nm no espectrofotômetro (SpectraMax Plus, Molecular Devices, CA, EUA). Esta leitura foi repetida a cada 1 minuto por 3 vezes. A atividade da LDH foi obtida a partir da diferença de absorbância vezes o fator 8016 (U/L).

4.6.4 Avaliação da concentração de proteína C reativa no plasma

A determinação de PCR foi realizada por meio da imunoturbidimetria por reação antígeno-anticorpo *kit* da Bioclin (Minas Gerais, Brasil). Na presença de um polímero ativador, que aumenta a sensibilidade e a velocidade do ensaio, a PCR forma um complexo insolúvel com o anticorpo específico, gerando turbidez, cuja intensidade aumenta proporcionalmente à concentração de PCR na amostra. Foram adicionados a amostra uma mistura com uma parte do Reagente Nº 1 (HEPES 10 mmol/L, polietilenoglicol, NaCl, azida sódica 15,38 mmol/L, detergentes e estabilizantes) com uma parte do Reagente Nº 2 (tampão borato 3,2 mmol/L, anticorpos monoclonais e policlonais anti-PCR humano ligados a partículas de poliestireno, polietilenoglicol, NaCl, azida sódica 15,38 mmol/L, detergentes e estabilizantes). Homogeneizamos a amostra, o Reagente Nº 1, o Reagente Nº 2 e incubamos por 5 minutos, a 37 °C. Foi realizada a leitura a 505 nm imediatamente após o período recomendado (5 minutos), contra o branco. A concentração de PCR foi obtida a partir da absorbância da amostra vezes o fator de calibração, o qual é encontrado a partir da relação da concentração do calibrador/absorbância da amostra. Os resultados estão expressos em mg/L.

4.6.5 Avaliação da concentração de mioglobina no plasma

A determinação de mioglobina foi realizada por Imunocromatografia *kit* da Bioclin (Minas Gerais, Brasil). O método utiliza anticorpos monoclonais de camundongo antimióglobina, que reagem com a mioglobina presente na amostra de soro, plasma ou sangue total. As amostras movem-se através de uma membrana cromatográfica por ação capilar. Amostras positivas para mioglobina formam uma linha de cor vermelha na região onde o anticorpo monoclonal de camundongo antimióglobina está imobilizado. As amostras continuam sendo absorvidas pela membrana até a região do anticorpo controle, com a formação de outra linha vermelha, confirmando o processamento correto do teste. Foram adicionados 100 µL de sangue total sobre o centro da janela de aplicação do cassete (Kit Bioclin). Em seguida, aguardaram-se 15 minutos para a formação das linhas. O teste foi considerado positivo quando formaram-se duas linhas vermelhas, uma na região teste e outra na região do controle. O teste foi considerado negativo quando se formou uma linha vermelha na região controle e ausência completa de linha vermelha na região teste.

4.7 Obtenção dos Neutrófilos

Para obtenção e isolamento dos neutrófilos foi empregado o reagente Histopaque - 1077 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) que possibilita a separação de diferentes células de

acordo com sua densidade (BOYUM, 1968). Os neutrófilos (6×10^6 células/mL) foram isolados do sangue, e utilizados para as análises em citômetro de fluxo.

4.8 Determinação de citocinas no plasma por perfil de múltiplos analitos

Foram determinadas as concentrações plasmáticas de TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-10, IL-8 e IL-4 por meio do *Kit Milliplex map high sensitivity human cytokine panel* (Millipore) segundo as instruções do fabricante.

A reação foi realizada em placa de 96 poços com membrana semipermeável que permite somente a retirada do líquido presente em cada poço. O primeiro passo da reação consistiu em adicionar 200 µL da solução de ensaio em cada poço e, após 10 minutos de incubação, a temperatura ambiente e sob agitação, foram retirados por sucção a vácuo. Na segunda etapa, 25 µL do tampão de ensaio foram adicionados a todos os poços da placa. Em seguida, 25 µL dos controles (branco - sem a amostra e controle positivo), padrões e amostras de plasma foram adicionados aos poços correspondentes. Posteriormente, 25 µL das partículas de látex (*beads*), já sensibilizadas com anticorpos específicos para cada citocina, foram adicionados em cada poço da placa.

Assim, manteve-se a placa protegida da luz *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, todo líquido contido em cada poço da placa foi removido e a placa foi lavada duas vezes com 200 µL de tampão de lavagem. Após este processo, 25 µL de anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados aos poços e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente, sob agitação.

Na etapa seguinte, 25 µL da estreptavidina associada a ficoeritrina (PE), foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada nas mesmas condições da etapa anterior. Por fim, cada poço da placa foi novamente lavado e 100 µL da solução foram adicionados aos poços. As amostras foram incubadas por 5 min em agitação. A leitura da fluorescência foi realizada no equipamento *MagPix - Software xPonent/Analyst* versão 4.2.

4.9 Determinação da expressão de moléculas de adesão em neutrófilos por citometria de fluxo

A determinação, na superfície dos neutrófilos, da expressão das moléculas de adesão ICAM-1 (CD54 - isotiocianato de fluoresceína -FITC) e L-selectina (CD62 -FITC) foi realizada por citometria de fluxo.

As células (1×10^6 células/mL) foram ressuspensas em 100 µL de tampão salina fosfato (PBS) e albumina sérica bovina (BSA) (1%) e 5 µL do anticorpo conjugado com FITC ou PE. Os neutrófilos foram incubados por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante retirado. Os neutrófilos foram homogeneizados em 200 µL de PBS e BSA (1%).

A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo (*BD Accuri cytometer*) no comprimento de onda 530/30 nm (FITC). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas por meio do *BD FACSDiva Software*.

4.10 Análise da expressão de receptores de superfície relacionados a apoptose de neutrófilos por citometria

A determinação da expressão dos receptores Fas (CD95 – alofococianina -APC) e TRAIL (CD253 - PE) na superfície dos neutrófilos foi avaliada por citometria de fluxo. As células (1×10^6 neutrófilos/mL) foram ressuspensas em 100 µL de PBS e BSA (1%) e 5 µL do anticorpo conjugado a FITC, PE ou APC.

As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante retirado. Os neutrófilos foram homogeneizados em 200 µL de PBS e BSA (1%).

A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo (*BD Accuri cytometer*) nos comprimentos de onda de 530/30nm (FITC), 660/20 nm (APC) ou 695/40 nm (PE). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas por meio do *BD FACS Diva Software*.

4.11 Análise da fragmentação de DNA dos neutrófilos por citometria

Os neutrófilos foram homogeneizados em 300 µL de uma solução hipotônica contendo iodeto de propídio (PI) 50 µg/mL a 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100. Os tubos foram incubados por 1 h a 20 °C no escuro. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo (*BD Accuri cytometer*) no comprimento de onda 530/30 nm (PI). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas por meio do *BD FACS Diva Software*.

4.12 Análise da externalização de fosfatidilserina dos neutrófilos por citometria

A externalização de FS foi analisada em neutrófilos por citometria de fluxo após a marcação da FS com anexina V de acordo com o método descrito por Vermes et al. (1995). Os neutrófilos foram ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer* – 10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) do *kit Annexin V-FITC* (*Clontech Laboratories, Inc*, Estados Unidos).

Foram adicionados 5 µL de anexina V conjugada com fluoresceína (*annexin V-FITC* 20µg/mL em Tris-NaCl) e incubados por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Posteriormente, 10 µL de PI e 400 µL de tampão de ligação foram adicionados nas amostras e

estas foram analisadas em citometria de fluxo. A fluorescência foi determinada no filtro 1 (FL1, fluorescência verde – 530/30 nm) e o PI no filtro 2 (FL2, fluorescência laranja-avermelhado – 585/42 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em gráfico de pontos (*dot plot*) e analisados por meio do *BD FACS Diva Software*.

4.13 Análise da composição de ácidos graxos livres no plasma por cromatografia gasosa

Os ésteres metílicos do óleo foram pereparados de acordo com Hartman e Lago (1973). A análise da composição de AG livres no plasma foi realizada em cromatógrafo marca Aglient, modelo 6890 N, dotada de coluna *Innovax* de 30 m x 2,5 mm x 0,25 mm de espessura de filme, com fluxo de gases: H₂, 2 µL/minuto; ar, 350 mL/minuto e N₂, 30 mL/minuto; temperatura da coluna, 195 °C; do injetor, 270 °C e do detector 270 °C; com a seguinte programação: tempo inicial de 15 minutos a 1 °C/minuto; atingindo a temperatura final de 215 °C após 40 minutos. O volume injetado foi de 2 µL.

4.14 Expressão dos resultados e tratamento estatístico

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Levene foram utilizados para verificar os pré requisitos para análise paramétrica. As variáveis que apresentaram distribuição normal e variância homogênea foram comparadas por meio do teste estatístico de análise de variância de medidas repetidas.

As variáveis que apresentaram distribuição não normal foram comparadas com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (diferenças entre os grupos), seguido por testes de Mann-Whitney, quando observado a diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis.

Para verificar diferenças entre os tempos (pré e pós meia maratona com e sem suplementação) utilizou-se a análise de variância de Friedman (um teste similar não paramétrico da análise de variância de medidas repetidas). O teste de Wilcoxon foi utilizado a fim de identificar entre quais tempos estavam as diferenças.

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$). A análise estatística foi conduzida no *software* SPSS 20.0 (SPSS Inc., IL, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da composição de ácidos graxos livres no plasma

Após o período de suplementação (Fases III e IV), houve um aumento significativo de DHA, EPA e total de AG ω -3 (%) no plasma dos atletas suplementados com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA (**Quadro 1**). Observou-se uma diminuição na concentração de AA e total de AG ω -6 (%) quando comparado ao período sem suplementação (Fases I e II), o que não ocorreu no grupo que recebeu a lecitina de soja (**Quadro 1**).

Quadro 1 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a composição de ácidos graxos livres no plasma de atletas

AG livres no plasma (%)	Fase I (Lecitina)	Fase II (Lecitina)	Fase III (Lecitina)	Fase IV (Lecitina)
20:4n-6	10,2 $\pm$ 0,5	9,75 $\pm$ 0,6	10,6 $\pm$ 0,3	10,4 $\pm$ 0,4
20:5n-3	0,96 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,04	1,09 $\pm$ 0,05
22:6n-3	3,02 $\pm$ 0,2	2,98 $\pm$ 0,1	2,84 $\pm$ 0,2	3,02 $\pm$ 0,3
Total n-3 (%)	5,20 $\pm$ 0,29	5,09 $\pm$ 0,20	5,23 $\pm$ 0,29	5,54 $\pm$ 0,42
Total n-6 (%)	40,5 $\pm$ 1,41	39,5 $\pm$ 1,62	40,3 $\pm$ 1,0	39,8 $\pm$ 1,01

AG livres no plasma (%)	Fase I (DHA)	Fase II (DHA)	Fase III (DHA)	Fase IV (DHA)
20:4n-6	10,3 $\pm$ 0,5	10,2 $\pm$ 0,4	8,2 $\pm$ 0,3\$	8,2 $\pm$ 0,2&
20:5n-3	0,60 $\pm$ 0,04	0,61 $\pm$ 0,05	2,24 $\pm$ 0,2\$	1,77 $\pm$ 0,1&
22:6n-3	2,8 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 0,3\$	6,8 $\pm$ 0,3&
Total n-3 (%)	4,55 $\pm$ 0,18	4,46 $\pm$ 0,30	10,5 $\pm$ 0,61\$	9,79 $\pm$ 0,47&
Total n-6 (%)	39,6 $\pm$ 1,28	39,7 $\pm$ 1,03	34,7 $\pm$ 1,01\$	35,5 $\pm$ 0,91&

AG livres no plasma (%)	Fase I (EPA)	Fase II (EPA)	Fase III (EPA)	Fase IV (EPA)
20:4n-6	11,0 $\pm$ 0,5	10,2 $\pm$ 0,4	8,33 $\pm$ 0,3\$	8,67 $\pm$ 0,4
20:5n-3	1,02 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,04	4,73 $\pm$ 0,3\$	3,9 $\pm$ 0,3&
22:6n-3	3,20 $\pm$ 0,2	2,93 $\pm$ 0,2	4,89 $\pm$ 0,3\$	4,94 $\pm$ 0,3&
Total n-3 (%)	5,49 $\pm$ 0,30	5,12 $\pm$ 0,31	11,8 $\pm$ 0,78\$	11,1 $\pm$ 0,79&
Total n-6 (%)	39,6 $\pm$ 1,28	39,7 $\pm$ 1,28	34,7 $\pm$ 1,01\$	35,5 $\pm$ 0,91&

Os valores estão apresentados como M $\pm$ EP de 46 indivíduos. \$p<0,001 comparação entre atletas Fase III com Fase I. & p<0,001 comparação entre atletas Fase IV com Fase II.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

Ácidos graxos (AG), ácido aracdônico (20:4 n-6), ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3), ácido docosahexaenóico (22:6 n-3).

5.2 Hemograma e análises bioquímicas

5.2.1 Efeitos da meia maratona e da suplementação na quantidade de leucócitos de atletas

No grupo DHA, a quantidade de leucócitos aumentou ao final das duas meia maratonas (Fases II e IV) comparado aos respectivos valores basais (Fase I e III). O mesmo foi observado para o grupo EPA e no grupo que recebeu a lecitina de soja (**Quadro 2**). No entanto, nestes dois últimos grupos, foi observado aumento na quantidade de leucócitos ao final da meia maratona na condição suplementada (Fase IV) comparada à condição não suplementada (Fase II) (**Quadro 2**).

5.2.2 Efeitos da meia maratona e da suplementação na quantidade de neutrófilos de atletas

No grupo DHA e no que recebeu a lecitina de soja foi observado um aumento significativo no número de neutrófilos ao final da meia maratona nas condições sem (Fase II) e com suplementação (Fase IV), quando comparado aos respectivos valores basais (Fases I e III, respectivamente). O mesmo foi observado para os voluntários suplementados com óleo de peixe rico em EPA (**Quadro 2**). Além disso, neste último, observou-se também um aumento significativo na quantidade de neutrófilos após a meia maratona na condição suplementada (Fase IV) comparada ao final da meia maratona sem a suplementação (Fase II) (**Quadro 2**).

Quadro 2 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre o número de leucócitos e neutrófilos de atletas amadores

Subpopulação	Suplementação				
Leucócitos (mil/mm ³)		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
	DHA	5,6 ± 0,39	10,2 ± 0,69#	5,8 ± 0,28	12,7 ± 0,95*
	EPA	5,6 ± 0,24	9,9 ± 0,89#	6,3 ± 0,21	13,7 ± 0,86*&
	Lecitina	5,5 ± 0,29	11,6 ± 1,0#	6,4 ± 0,49\$	14,7 ± 1,31*&
Subpopulação	Suplementação				
Neutrófilos (mil/mm ³)		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
	DHA	3,1 ± 0,29	8,4 ± 0,65#	3,2 ± 0,19	10,2 ± 0,80*
	EPA	3,2 ± 0,18	8,1 ± 0,86#	3,5 ± 0,15	11,1 ± 0,84*&
	Lecitina	3,2 ± 0,19	10,1 ± 0,94#	3,8 ± 0,39	12,0 ± 1,28*

Os valores estão apresentados como M ± EP de 46 indivíduos. #P<0,001 comparação entre atletas Fase II com Fase I. *p<0,05 comparação entre os atletas Fase IV com Fase III. & p<0,001 comparação entre atletas Fase IV com Fase II.

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

O número de leucócitos e neutrófilos aumentou após a meia maratona tanto antes (Fase II) como após o período de suplementação (Fase IV). Sendo que no grupo EPA a suplementação aumentou significativamente o número de leucócitos e neutrófilos (Fase IV).

5.2.3 Determinação da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase no plasma

Ao realizar a meia maratona sem estarem suplementados (Fases I e II) os atletas dos grupos DHA e Lecitina apresentaram um aumento significativo na atividade de LDH (29% e 23%, respectivamente) (**Figura 7**). Com a suplementação (Fases III e IV) todos os grupos aumentaram a atividade de LDH após a meia maratona (~29%) em relação aos valores basais na mesma condição (**Figura 7**).

Figura 7 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na atividade plasmática da enzima LDH (U/L) de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EP$ de 46 indivíduos. # $P < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. * $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III.
 Fase I = pré meia maratona sem suplementação.
 Fase II = pós meia maratona sem suplementação.
 Fase III = pré meia maratona com suplementação.
 Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.2.4 Determinação da atividade máxima da enzima creatina quinase no plasma

Antes da suplementação (Fases I e II), somente o grupo DHA apresentou um aumento de 30% na concentração plasmática de CK ao final da primeira meia maratona (**Figura 8**). Quando receberam a suplementação (Fases III e IV) com óleos de peixe ricos em DHA ou EPA ou lecitina de soja todos os atletas dos grupos aumentaram a concentração de CK após a segunda meia maratona (~35,3%) comparado aos valores basais (pré meia maratona) (**Figura 8**).

Figura 8 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na atividade plasmática da enzima CK (U/L) de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EP$ de 46 indivíduos. # $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I * $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.2.5 Determinação da concentração plasmática de mioglobina

Ao realizar a meia maratona antes do período de suplementação (Fases I e II), todos os grupos apresentaram um aumento significativo na concentração de mioglobina (~83%) ao final da primeira meia maratona comparado aos valores basais (pré meia maratona) (**Figura 9**). O mesmo comportamento foi observado com a suplementação (Fases III e IV) (~85,6%) (**Figura 9**).

Figura 9 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática da enzima mioglobina de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EP$ de 46 indivíduos. # $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I * $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III.
 Fase I = pré meia maratona sem suplementação.
 Fase II = pós meia maratona sem suplementação.
 Fase III = pré meia maratona com suplementação.
 Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.2.6 Determinação da concentração de proteína C reativa no plasma

Não foram observadas diferenças significativas na concentração plasmática de PCR entre os grupos em todas as condições analisadas (**Figura 10**).

Figura 10 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática da enzima PCR de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EP$ de 46 indivíduos.

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.2.7 Quadro resumando os efeitos da meia maratona e da suplementação na atividade máxima das enzimas LDH e CK e na concentração de mioglobina e PCR

A seguir, detacamos o quadro resumando os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na atividade máxima das enzimas LDH e CK e na concentração plasmática de mioglobina e PCR (**Quadro 3**). A meia maratona, aumentou a concentração plasmática de mioglobina e a atividade máxima da LDH (Fase II em relação a Fase I) em todos os grupos estudados, enquanto que a atividade máxima de CK aumentou somente no grupo DHA. Entretanto, não observamos nenhum efeito da suplementação. Quando observamos o efeito da meia maratona após o período de suplementação, notamos um aumento na concentração plasmática de mioglobina e na atividade máxima das enzimas CK e LDH, em todos os grupos que participaram do estudo. A meia maratona e a suplementação não provocaram alterações na concentração de PCR no plasma dos atletas (**Quadro 3**).

Quadro 3 – Resumo dos resultados dos parâmetros bioquímicos

LDH	Suplemento	Meia maratona	Suplementação	Meia maratona + Suplementação
	Lecitina	↑	-	↑
	DHA	↑	-	↑
	EPA	↑	-	↑
CK				
	Lectina	-	-	↑
	DHA	↑	-	↑
	EPA	-	-	↑
Mioglobina				
	Lectina	↑	-	↑
	DHA	↑	-	↑
	EPA	↑	-	↑
PCR				
	Lecitina	-	-	-
	DHA	-	-	-

	EPA	-	-	-
--	-----	---	---	---

Legenda: - Igual; ↑ Aumento

Lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK), proteína C reactiva (PCR), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA).

5.3 Resultados das análises realizadas no citômetro de fluxo

5.3.1 Análise da expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de neutrófilos

Nos grupos que receberam a lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA a expressão do receptor Fas (CD95) apresentou uma redução ao final da segunda meia maratona (Fase IV), quando comparados aos momentos pós meia maratona sem suplementação (Fase II) (~59,3%) e pré meia maratona com suplementação (Fase III) (~74%) (Figura 11).

Figura 11 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de neutrófilos de atletas amadores. Os valores estão apresentados como média de fluorescência $\pm$ EP de 46 indivíduos. (Valor relativo (VR) valor absoluto/valor controle negativo)* $p < 0,001$ comparação entre atletas nas fases IV e III. & $p < 0,05$ comparação entre atletas nas fases IV e Fase II.
 Fase I = pré meia maratona sem suplementação.
 Fase II = pós meia maratona sem suplementação.
 Fase III = pré meia maratona com suplementação.
 Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.3.2 Análise da expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície de neutrófilos

Na condição sem suplementação (Fases I e II), a expressão do receptor TRAIL (CD253) diminuiu em todos os grupos após a primeira meia maratona (~85,6%) (**Figura 12**). Ao contrário, após o período de suplementação (Fases III e IV), observou-se um aumento significativo na expressão do receptor TRAIL (CD253) (~70,3%) após a segunda meia maratona (**Figura 12**).

Figura 12 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície de neutrófilos de atletas amadores. Os valores estão apresentados como média de fluorescência $\pm$ EP de 46 indivíduos. (Valor relativo (VR) valor absoluto/valor controle negativo). # $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. * $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III. Fase I = pré meia maratona sem suplementação. Fase II = pós meia maratona sem suplementação. Fase III = pré meia maratona com suplementação. Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.3.3 Análise da expressão de L-selectina (CD62) na superfície de neutrófilos

Na condição sem suplementação (Fases I e II) e após a primeira meia maratona, houve diminuição significativa na expressão de L-selectina (CD62) na superfície dos neutrófilos dos atletas de todos os grupos (~78,6%) (**Figura 13**). Após a meia maratona, os voluntários que receberam a suplementação (Fase IV) apresentaram uma maior expressão de L-selectina (CD62) na superfície de neutrófilos (~87,3%), quando comparados aos valores após a meia maratona sem suplementação (Fase II) (**Figura 13**).

Figura 13 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão de L-selectina (CD62) na superfície de neutrófilos de atletas amadores. Os valores estão apresentados como média de fluorescência $\pm$ EP de 46 indivíduos. (Valor relativo (VR) valor absoluto/valor controle negativo). # $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. & $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase II.
 Fase I = pré meia maratona sem suplementação.
 Fase II = pós meia maratona sem suplementação.
 Fase III = pré meia maratona com suplementação.
 Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.3.4 Análise da expressão de I-CAM-1 (CD54) na superfície de neutrófilos

Na condição sem suplementação (Fases I e II) a realização da meia maratona foi suficiente para diminuir a expressão de ICAM-1 (CD54) na superfície de neutrófilos dos maratonistas que receberam a lecitina de soja (63%) (**Figura 14**). Quando esses indivíduos foram suplementados (Fases III e IV), seus neutrófilos reduziram a expressão desse receptor após a meia maratona em todos os grupos (~57,6%) (**Figura 14**). Comparando a condição sem (Fase I) e com a suplementação (Fase III), todos os grupos aumentaram a expressão de CD54 após a suplementação (~74,3%) antes da meia maratona (**Figura 14**).

Figura 14 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão de ICAM-1 (CD54) na superfície de neutrófilos de atletas amadores. Os valores estão apresentados como média de fluorescência $\pm$ EP de 41 indivíduos. (Valor relativo (VR) valor absoluto/valor controle negativo). [#] $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. ^{*} $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III ^{\$} $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase III com Fase I.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.3.5 Avaliação da externalização de fosfatidilserina de neutrófilos

Antes de receberem a suplementação (Fases I e II) foi observado aumento na externalização de FS de neutrófilos após a primeira meia maratona em todos os grupos de atletas (~85,3%) (**Figura 15**). A porcentagem de neutrófilos com externalização de FS na condição basal (pré meia maratona) foi maior quando os voluntários receberam a suplementação (Fase III) (~94,3%) comparado aos valores basais sem a suplementação (Fase I) (**Figura 15**). Depois da meia maratona (Fase IV) este aumento foi observado somente no grupo que recebeu a suplementação com óleo de peixe rico em EPA (57%) (**Figura 15**).

Figura 15 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na porcentagem de neutrófilos com externalização de FS em atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EP$ de 40 indivíduos. # $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. \$ $p < 0,001$ comparação entre os atletas na Fase III com Fase I. & $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase II.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.3.6 Avaliação da fragmentação de DNA dos neutrófilos

A meia maratona, no grupo DHA, aumentou em 79% a fragmentação de DNA na situação sem suplementação (Fases I e II). Por outro lado, após o período de suplementação (Fases III e IV), houve uma diminuição na porcentagem de fragmentação do DNA de neutrófilos após a meia maratona em todos os grupos investigados (~98,8%). Também observamos que na condição suplementados (Fase IV) todos os grupos apresentaram redução na porcentagem de fragmentação do DNA de neutrófilos (~96,3%) quando comparado aos valores sem suplementação (Fase II).

Figura 16 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na porcentagem de neutrófilos com fragmentação de DNA de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EP$ de 24 indivíduos. # $p < 0,001$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. * $P < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III. & $P < 0,001$ comparação entre atletas Fase IV com Fase II.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.3.7 Quadro summarizando os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA nos marcadores da apoptose e ativação de neutrófilos de maratonistas amadores

N condição sem a suplementação (Fases I e II), a meia maratona, diminuiu a expressão do receptor TRAIL (CD253) (~85,6%) e L-selectina (CD62) (~78,6%) na superfície de neutrófilos de atletas em todos os grupos estudados. Após o período de suplementação a meia maratona diminuiu a expressão do receptor Fas (CD95) (~74%) e ICAM-1 (CD54) (~57,6%) e aumentou a expressão do receptor TRAIL (~70,3%). Já a suplementação por si, aumentou a expressão de L-selectina e ICAM-1 e diminui a expressão do receptor Fas. (**Quadro 4**).

A meia maratona antes do início da suplementação, aumentou a fragmentação de DNA de neutrófilos somente no grupo de atletas que posteriormente foi suplementado com o óleo de peixe rico em DHA (79%), enquanto que a externalização de FS foi aumentada em neutrófilos de todos os grupos (~85,3%). Após a suplementação, a meia maratona reduziu a fragmentação do DNA de neutrófilos. Já o efeito suplementação, inibiu a fragmentação de DNA de neutrófilos dos maratonistas (~96,3%), entretanto, aumentou a externalização de FS em neutrófilos de todos os grupos investigados (~94,3%) (**Quadro 4**).

Quadro 4 – Resumo dos resultados das análises realizadas no citômetro de fluxo.

Fas CD95	Suplemento	Meia-maratona	Suplementação	Meia maratona + suplementação
	DHA	-	↓	↓
	EPA	-	↓	↓
	Lecitina	-	↓	↓
TRAIL CD253				
	DHA	↓	-	↑
	EPA	↓	-	↑
	Lecitina	↓	-	↑
L-selectina CD62				
	DHA	↓	↑	-

	EPA	↓	↑	-
	Lecitina	↓	↑	-
ICAM-1 CD54				
	DHA	-	↑	↓
	EPA	-	↑	↓
	Lecitina	↓	↑	↓
Fragmentação de DNA				
	DHA	↑	↓	↓
	EPA	-	↓	↓
	Lecitina	-	↓	↓
Externalização de FS				
	DHA	↑	↑	-
	EPA	↑	↑	-
	Lecitina	↑	↑	-

Legenda: - Igual; ↑ Aumento; ↓ Redução.

Ligante indutor da apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), molécula de adesão intercelular (ICAM), fosfatidilserina (FS), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA).

5.4 Análises da concentração de citocinas no plasma dos atletas

5.4.1 Determinação da concentração plasmática de TNF-alfa

Em todos os grupos ocorreu uma redução significativa na concentração de TNF-alfa na condição suplementados (Fases III e IV) comparado à condição não suplementados (Fase I e II) (**Figura 17**). O grupo, que recebeu lecitina de soja, apresentou um aumento na concentração de TNF-alfa ao final da meia maratona tanto na condição não suplementada (Fase II - 28%) quanto após receberem a lecitina (Fase IV - 47%) (**Figura 17**).

Figura 17 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de TNF-alfa de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EPM$ de 37-38 indivíduos. * $p < 0,05$ comparação entre atletas nas Fases IV com Fase III. \$ $p < 0,001$ comparação entre atletas nas Fase III com Fase I. & $p < 0,001$ comparação entre atletas na Fase IV com a Fase II.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.4.2 Determinação da concentração plasmática de IL-8

Um aumento significativo na concentração de IL-8, após a meia maratona em comparação com os valores basais (pré meia maratona) foi observado em todos os grupos tanto antes (Fase II) como após o período de suplementação (Fase IV) (**Figura 18**).

Figura 18 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-8 de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EPM$ de 37-38 indivíduos. # $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase II com Fase I * $p < 0.05$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.4.3 Determinação da concentração plasmática de IL-6 em maratonistas

A suplementação com OP rico em EPA aumentou em 71% a concentração de IL-6 na na condição basal (Fases I e III) (**Figura 19**). Um aumento significativo da concentração desta citocina após a meia maratona, em comparação com os valores basais, foi observado em todos os grupos antes do período de suplementação (Fase I e II) (~87%), assim como após o período de suplementação (Fases III e IV) (~94,3%) (**Figura 19**).

Figura 19 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-6 de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EPM$ de 37-38 indivíduos. # $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. * $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III. \$ $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase III com Fase I.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.4.4 Determinação da concentração plasmática de IL-4

Após a meia maratona houve uma aumento na concentração de IL-4 nos indivíduos suplementados com óleos de peixe ricos em DHA ou EPA comparado aos valores pós meia maratona sem a suplementação (Fases II e IV - 68% e 82% para DHA e EPA, respectivamente) (**Figura 20**).

Figura 20 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-4 de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EPM$ de 37-38 indivíduos. & $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase IV com Fase II.
 Fase I = pré meia maratona sem suplementação.
 Fase II = pós meia maratona sem suplementação.
 Fase III = pré meia maratona com suplementação.
 Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.4.5 Determinação da concentração plasmática de IL-10

Comparado aos valores basais (pré meia maratona), a concentração de IL-10 após a meia maratona apresentou cerca de 98% de aumento em todos os grupos tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV) (**Figura 21**). Além disso, os valores basais (fase pré meia maratona) foram maiores na condição suplementada (Fase III) comparado aos valores basais sem a suplementação (Fase I) (**Figura 21**). Após a meia maratona, somente o grupo que recebeu a suplementação com óleo de peixe rico em EPA (Fase IV) apresentou um aumento de 76% na concentração de IL-10 comparado ao final da meia maratona sem a suplementação (Fase II) (**Figura 21**).

Figura 21 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-10 de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EPM$ de 37-38 indivíduos. # $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase II com Fase I. * $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase IV com Fase III. \$ $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase III com Fase I. & $p < 0,05$ comparação entre atletas Fase IV com Fase II.

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.4.6 Determinação da concentração plasmática de IL-1beta

Nenhuma alteração nas diferentes condições experimentais foi observada na concentração de IL 1-beta (**Figura 22**).

Figura 22 – Efeito da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração plasmática de IL-1 beta de atletas amadores. Os valores estão apresentados como $M \pm EPM$ de 36-38 indivíduos.
 Fase I = pré meia maratona sem suplementação.
 Fase II = pós meia maratona sem suplementação.
 Fase III = pré meia maratona com suplementação.
 Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

5.4.7 Quadro resumando os efeitos da meia maratona e da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na concentração de citocinas no plasma de atletas amadores

Sem a suplementação, a meia maratona aumentou a concentração de TNF-alfa somente no grupo de atletas que recebeu a lecitina de soja. Enquanto que as concentrações de IL-6, IL-8 e IL-10 aumentaram após a meia maratona tanto sem a suplementação como após o período de suplementação. A suplementação com OP rico em EPA aumentou a concentração basal de IL-6. Além disso, em todos os grupos a suplementação aumentou a concentração basal de IL-10, e nos grupos que receberam óleos de peixe ricos em EPA ou DHA aumentou a concentração de IL-4. A concentração de IL-1beta não foi alterada nem pela meia maratona nem pela suplementação (**Quadro 5**).

Quadro 5 – Resumo dos resultados da análise da concentração de citocinas plasmáticas

TNF-alfa	Suplemento	Meia maratona	Suplementação	Meia maratona + suplementação
	DHA	-	↓	
	EPA	-	↓	
	Lecitina	↑	↓	↑
IL-8				
	DHA	↑	-	↑
	EPA	↑	-	↑
	Lecitina	↑	-	↑
IL-6				
	DHA	↑	-	↑
	EPA	↑	↑	↑
	Lecitina	↑	-	↑
IL-4				
	DHA	-	↑	-
	EPA	-	↑	-
	Lecitina	-	-	-

IL-10				
	DHA	↑	↑	↑
	EPA	↑	↑	↑
	Lecitina	↑	↑	↑
IL-1beta				
	DHA	-	-	
	EPA	-	-	
	Lecitina	-	-	

Legenda: - Igual; ↑ Aumento; ↓ Redução

Fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA).

6 DISCUSSÃO

Os PUFA ω -3 (EPA e DHA) contidos no OP são precursores de prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5, os quais possuem menores propriedades inflamatórias. EPA e DHA também alteraram a transcrição de alguns genes envolvidos no metabolismo e inflamação tais como o PPAR-alfa, PPAR-gama e NFkB (LAPILLONNE; CLARKE; HEIR, 2004). Além disso, os PUFA ω -3 também são incorporados na membrana plasmática, podendo alterar suas propriedades físico-químicas.

Para verificarmos a eficiência da suplementação, foram realizadas análises da composição de AG livres no plasma por cromatografia gasosa, no laboratório do Prof^o Dr. Philip Calder (*Human Development & Health Academic Unit, Faculty of Medicine, University of Southampton, England*).

A suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA aumentou a concentração de EPA, DHA e total de ω -3 e diminuiu a concentração de AA no plasma dos atletas amadores dos grupos DHA e EPA. Esta condição favorece a incorporação destes AG na membrana celular. Mickleborough et al. (2003) demonstraram que após a suplementação com OP rico em EPA, durante 3 semanas, em atletas houve significativa incorporação destes AG na membrana de neutrófilos e redução de AA, o que poderia induzir alterações na função destas células, além do estabelecimento de um quadro antiinflamatório. Já em relação ao grupo suplementado com lecitina de soja, não houve alteração na concentração de EPA, DHA, AA, total de ω -3 e ω -6, ou seja, a suplementação com lecitina não alterou o perfil de ácidos graxos ω -3 e ω -6 na membrana plasmática. Deste modo, a lecitina de soja pode modular a função imune por um mecanismo que envolva alterações na concentração de fosfatidilcolina na membrana.

A quantidade de leucócitos circulantes pode ser alterada pelo exercício físico exaustivo, como por exemplo, a maratona (LIPPI et al., 2014; REID et al., 2004). Em estudo de Mooren et al. (2012), foi demonstrado aumento no número de leucócitos e neutrófilos após a maratona, sendo que estes retornaram aos valores basais cerca de 24 horas após a realização da prova. Resultados semelhantes foram obtidos em nosso estudo, onde a meia maratona aumentou o número de leucócitos totais e de neutrófilos no sangue em todos os grupos estudados, o que indica aumento no recrutamento destas células da medula óssea, ou uma inflamação secundária ocasionada por lesão tecidual (KRATS et al., 2006). Chinda et al. (2003) relataram que o aumento no número de neutrófilos circulantes estaria diretamente associado a um mecanismo compensatório devido à diminuição na capacidade funcional

dessas células. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a diminuição na capacidade funcional está positivamente correlacionada com o aumento no número de neutrófilos após exercício intenso (CHINDA et al., 2003). Esta alteração estaria ligada a um aumento na concentração de alguns hormônios de estresse como o cortisol e as catecolaminas, o que aumentaria a mobilização de neutrófilos, principalmente da medula óssea desses atletas.

Em relação ao efeito da suplementação, os grupos que receberam a lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA aumentaram o número de neutrófilos após a prova, possivelmente, a suplementação pode provocar uma ativação do sistema imune na tentativa de compensar esta diminuição em sua capacidade funcional que ocorre devido a competição.

Além das alterações no número de células circulantes, o exercício intenso causou aumento na atividade máxima das enzimas LDH, CK total, frações (CK-MM e MB, respectivamente) e mioglobina. Durante o exercício físico excêntrico ocorrem microlesões no músculo como por exemplo fragmentação e inchaço no citoesqueleto, sarcolema e retículo sarcoplasmático (ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983; ARMSTRONG, 1984). Dependendo do protocolo e da intensidade do exercício físico realizado, a atividade plasmática de alguns marcadores de lesão muscular, como a CK e LDH, pode variar e isso é provocado em decorrência de causas metabólicas e mecânicas. Na realidade, fibras musculares metabolicamente exaustas exibem uma diminuição na resistência da membrana, seguidos de um aumento na concentração extracelular de cálcio (Ca^{+2}) promovendo, assim, ativação dos canais de K^{+} (BRANCACCIO et al., 2008). Além disso, o dano tecidual pode induzir degeneração do sarcômero pela fragmentação do disco Z (BRANCACCIO et al., 2008). O exercício físico exaustivo está associado com microlesões musculares, elevando a atividade de CK cerca de 2 a 5 vezes mais imediatamente após a maratona (HOWATSON et al., 2010; PAULSEN et al., 2012) e de 13 a 15 vezes 24 horas após, retornando aos valores basais somente uma semana após a corrida (KOBAYASHI et al., 2005). Em nosso estudo, a meia maratona aumentou a atividade de CK, LDH e a concentração de mioglobina no plasma dos corredores, indicando a ocorrência de lesão do músculo esquelético. Entretanto, a suplementação (lecitina, DHA ou EPA) não foi capaz de prevenir a lesão muscular no período pós competição. A suplementação com PUFA ω -3 induz efeitos antiinflamatórios por alterações nas vias da ciclooxigenase (COX)-2 e lipooxigenase 5, modulando também a produção de citocinas imunorregulatórias, diminuindo a resposta inflamatória e a liberação de marcadores de lesão tecidual. Entretanto, este mecanismo não foi observado em nosso estudo. Além disso, a lecitina de soja apresentou efeito semelhante ao da suplementação com OP

indicando que provavelmente apresenta efeito antiinflamatório, mas não previne a lesão muscular.

A liberação de citocinas pode ser ocasionada a partir de microlesões musculares provocadas pelo exercício físico exaustivo. Citocinas são proteínas solúveis diretamente relacionadas a modulação da resposta inflamatória (SEEMATTER et al., 2004). As alterações nas concentrações plasmáticas de citocinas dependem da modalidade, duração e intensidade do exercício físico (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000). Segundo a revisão de Pedersen e Febbraio (2008), na maioria das pesquisas não se observa alteração na concentração plasmática de TNF-alfa, um marcador de inflamação, após o exercício físico. O fato das citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL1-beta) não se elevarem no plasma com o exercício físico indica que a cascata de citocinas ativada pelo exercício físico difere da cascata ativada por infecções, como demonstra a **Figura 23**.

Figura 23 – Cascata de citocinas liberadas durante a sepse e o exercício físico.

Fonte: Adaptado de Pedersen, Petersen, 2005.

Na infecção, a citocina que inicia o processo inflamatório é o TNF-alfa seguido da produção de IL-1 beta, IL-6, IL-1ra e IL-10 (AKIRA, TAGA, KISHIMOTO, 1993). Já, no exercício físico, acredita-se que a inflamação sistêmica primariamente provoca aumento na produção de IL-6 seguido de elevação em IL-1ra e IL-10 (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

A dificuldade de detecção de TNF-alfa e IL-1 beta pode ocorrer devido ao fato destas citocinas serem produzidas localmente (PETERSEN; PEDERSEN, 2005) e serem retiradas rapidamente da circulação. Apenas exercícios físicos extenuantes e prolongados podem resultar em um pequeno aumento na concentração plasmática de TNF-alfa (KOCTURK et al., 2008). Em nosso estudo, antes de iniciarmos a suplementação, a meia maratona aumentou a concentração plasmática de TNF-alfa somente no grupo Lecitina. Entretanto, após o período de suplementação, a concentração de TNF-alfa diminuiu em todos os grupos comparado ao período sem suplementação. Assim, notamos que a lecitina de soja apresenta efeito similar aos

óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a produção de TNF-alfa. Toft et al. (2000) observaram aumento de TNF-alfa após a maratona que manteve-se mesmo após a suplementação com OP. Estes resultados podem ter ocorrido devido ao fato de diferentes indivíduos possuírem diferentes sensibilidades aos efeitos supressivos dos PUFA ω -3 na produção de TNF-alfa (GRIMBLE et al., 2002). Indivíduos que apresentam concentrações mais elevadas de TNF-alfa, antes de iniciarem a suplementação, apresentam redução significativa dessas após o consumo de ω -3. Ao contrário, aqueles com concentrações plasmáticas reduzidas reagem com aumento exacerbado de TNF-alfa. Assim, as diferentes respostas observadas entre os indivíduos podem ser atribuídas às características pessoais de cada um (GRIMBLE et al., 2002). Características do genótipo, que influenciam a produção de TNF-alfa e a resposta ao ω -3, relacionam-se ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II, em particular à região *human leukocyte antigens* (HLA)-DR. Indivíduos que expressam HLA-DR15 apresentam menor sensibilidade à suplementação do que aqueles com HLA-DR3 e DR4, deste modo, apresentando respostas mais favoráveis (GRIMBLE, 2002).

Em relação a IL-6, tem sido demonstrado que, após o exercício físico, sua concentração aumenta de forma exponencial mesmo sem a ocorrência de dano muscular. Esta alteração depende da intensidade, duração e da massa muscular recrutada durante o exercício físico (COMASSI et al., 2015; NEUBAUER; KÖNIG; WAGNER, 2008). O RNAm da IL-6 é ativado em resposta à contração do músculo esquelético (FEBRAIO et al., 2003; REIHMANE; DELA, 2014) havendo aumento na sua transcrição após o exercício físico (KELLER et al., 2001). Observamos que, após as duas meia maratonas estudadas, houve um aumento significativo na concentração plasmática de IL-6 em todos os grupos. Além disso, a suplementação com OP rico em EPA aumentou a concentração basal (pré meia maratona) de IL-6 após 8 semanas de suplementação. Ao contrário, Nieman et al. (2009) e Toft et al. (2000) propõem que a suplementação com OP (2,4 g/dia durante 6 semanas e 6 g/dia durante 6 semanas, respectivamente) não altera as concentrações desta citocina após o exercício físico intenso. Possivelmente, estes diferentes resultados devem-se aos distintos períodos de suplementação, tipo de OP, diferentes modelos de exercício físico e métodos de dosagem empregados nos estudos.

Suzuki et al. (2003) e Nieman et al. (2001) propuseram que durante o exercício físico, a IL-6 inibe a liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β e estimula outras citocinas antiinflamatórias tais como IL-1 α e IL-10. A IL-6 também aumenta o recrutamento de neutrófilos da medula óssea e atua de maneira semelhante a um hormônio regulando a

liberação de AG durante o exercício físico (NIEMAN et al., 2001; SUZUKI et al., 2003). Esta regulação ocorre por aumento na lipólise, inibição da lipoproteína lipase e aumento na liberação de AG livres e glicerol, independentemente da modulação de catecolaminas, glucagon e insulina (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Em nosso estudo, as duas meias maratonas induziram aumento da concentração de IL-10 em todos os grupos e no grupo suplementado com OP rico em EPA este aumento foi ainda maior comparado ao mesmo grupo antes da suplementação, o que não ocorreu nos grupos suplementados com óleo de peixe rico em DHA ou lecitina de soja. Provavelmente, o aumento na concentração de IL-6 no plasma representou um estímulo para liberação de IL-10 para minimizar o processo inflamatório desencadeado pelo exercício físico exaustivo e a suplementação com OP rico em EPA pode ter amplificado esta resposta. A infusão de IL-6 recombinante em humanos aumenta a produção de IL-10, independente de alterações na concentração plasmática de TNF-alfa (STEENBERG et al., 2003), ou seja, o aumento na concentração de IL-6 induz uma resposta antiinflamatória como a que foi observada em nosso estudo.

Os grupos suplementados com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA apresentaram aumento significativo na concentração de IL-4 após o período de suplementação, no pós meia maratona, confirmando o efeito antiinflamatório do OP. O fator nuclear das células T ativadas (NF-AT) é um fator de transcrição necessário para a expressão dos genes da IL-4 além de outras citocinas (PROKSCH et al., 2005). O NF-AT está no citoplasma dos linfócitos T em repouso na forma inativa, pela fosforilação de uma serina. A fosfatase calmodulina-calcineurina- Ca^{2+} -dependente desfosforila o NF-AT citoplasmático, permitindo a este translocar-se para o núcleo (FIEDLER et al., 2002). Uma vez no núcleo, o NF-AT ativo liga-se às regiões promotoras dos genes que codificam a IL-4, geralmente em associação com outros fatores de transcrição, como AP-1 (SHAPIRO; MOLLENAUER; WEISS, 1998). A suplementação com ω -3 em humanos e animais ativa os linfócitos T, consequentemente estimulando a produção de IL-4. (THIES et al., 2001). Já a suplementação com lecitina de soja, inibe a proliferação de linfócitos (NISHIYAMA et al., 2000), deste modo, não induz aumento na concentração plasmática de IL-4, assim como observado em nossos resultados mencionados acima.

A IL-8 é uma citocina com características quimioatrativas, sendo produzida por neutrófilos, macrófagos e monócitos (GERSZTEN et al., 1999). Após o exercício físico exaustivo (maratona, ultra-maratona), envolvendo principalmente o componente excêntrico e

o dano muscular, há aumento substancial na concentração plasmática de IL-8, possivelmente pela sua liberação a partir de células do endotélio microvascular, contribuindo assim para à ativação de selectinas, moléculas diretamente envolvidas com a adesão de neutrófilos à parede do endotélio vascular (FEHRENBACH et al., 2000; NIEMAN et al., 2001). Nossos resultados confirmam estes achados, pois, após a meia maratona (tanto antes como após o período de suplementação), observamos aumento na concentração plasmática de IL-8 em todos os grupos. Entretanto, a suplementação não apresentou efeito. Há uma correlação direta entre o aumento na concentração de IL-8 e a neutrofilia ocasionada pelo exercício intenso, ou seja, a IL-8 estaria envolvida com a resposta inflamatória sistêmica.

Esse processo inflamatório provocado pelo exercício físico exaustivo pode induzir ativação de neutrófilos, o que pode ocorrer por uma variedade de fatores, incluindo dano muscular, hormônios de crescimento e produção de citocinas (NIEMAN, 2009; PEAKE, 2005; SUZUKI et al., 2003). O aumento da expressão de L-selectina e ICAM-1 é de fundamental importância para que o neutrófilo possa migrar pela parede do endotélio para o local de inflamação (SIMON et al., 1992). No foco inflamatório, os neutrófilos fagocitam e produzem EROs para a eliminação do patógeno (NATHAN, 2006). Neste contexto, durante a resolução da fase inflamatória, os neutrófilos morrem por apoptose e são fagocitados por macrófagos ou células dendríticas, que liberam mediadores anti-inflamatórios (DUFFIN et al., 2009). Os efeitos da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na expressão destas moléculas de superfície no neutrófilo, após o exercício físico de alta intensidade, ainda não foram avaliados, e a maior parte dos estudos existentes demonstram que ocorre diminuição na expressão destas moléculas de adesão em macrófagos, monócitos e linfócitos em animais tratados com PUFA ω -3 (DE CATERINA et al., 1994; DE CATERINA; LIBBY, 1996; GOUA et al., 2008). Demonstramos neste estudo que a suplementação (EPA, DHA ou lecitina) aumentou a expressão de ICAM-1 e L-selectina nos neutrófilos em todos os grupos. Alguns estudos relatam que o mecanismo de ação dos AG da família ω -3 (EPA e DHA) está envolvido com a transcrição de genes relacionados a moléculas de adesão endotelial como ICAM-1 e L-selectina (DE CATERINA; MASSAO, 2005). Em nosso estudo, a suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA provavelmente aumentou a expressão destes genes, consequentemente modulando a ação destas moléculas na parede do endotélio e superfície dos neutrófilos. A lecitina de soja, por sua vez, produziu efeitos similares sobre a expressão destas moléculas, entretanto seu mecanismo de ação permanece a ser esclarecido.

Em relação ao efeito do exercício físico per se, observamos que, imediatamente após a primeira meia maratona, houve diminuição na expressão de L-selectina em todos os grupos, e que a expressão de ICAM-1 reduziu somente no grupo que posteriormente recebeu lecitina de soja. Resultados semelhantes foram observados por Nielsen e Lyberg (2004) onde, após uma corrida de maratona, houve diminuição na expressão de L-selectina, quando comparado aos valores pré competição. Percebe-se que após exercício físico extenuante, existe um aumento no consumo de oxigênio. E, deste modo, uma diminuição na capacidade do neutrófilo de migrar ao tecido periférico poderia ser um mecanismo protetor, prevenindo o aumento na produção de EROs por essas células (NIELSEN; LYBERG, 2004).

São poucos os estudos relacionados à apoptose de neutrófilos após o exercício físico intenso. O nosso grupo foi o primeiro a investigar o efeito de uma única sessão de exercício físico em esteira ergométrica por 1 hora na apoptose de neutrófilos de ratos com 90 (maturados) e 60 (imaturados) dias. Foi observado aumento na fragmentação de DNA, condensação de cromatina, externalização de FS nos neutrófilos, sugerindo que o processo de morte induzido pelo exercício físico é a apoptose (LAGRANHA et al., 2004).

Em outro estudo realizado pelo nosso grupo em humanos, demonstramos que a competição de *triathlon* induz apoptose de neutrófilos obtidos de atletas de elite, uma vez que aumentou a externalização de FS e fragmentação de DNA (LEVADA-PIRES et al., 2008). Esses dados corroboram com os achados do presente estudo, onde a meia maratona aumentou a porcentagem de neutrófilos com DNA fragmentado no grupo DHA antes do período de suplementação. Entretanto, em estudo realizado também por nosso grupo foi observado que em outra modalidade esportiva, a corrida de maratona, houve inibição da apoptose e aumento da porcentagem de neutrófilos viáveis de atletas amadores (SANTOS et al., 2015). Vale ressaltar que os estudos diferem em relação à condição de treinamento dos atletas, elite vs amadores, e a intensidade de treinamento e do esforço realizado por cada grupo de atletas durante as diferentes competições.

Não há estudos sobre o efeito da suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA na fragmentação de DNA de neutrófilos após o exercício intenso. Os efeitos dos AG ω -3 na função de neutrófilos foram investigados *in vitro* (PASCHOAL et al., 2012). Koller et al. (1997) verificaram que o EPA (5-40 mM) inibe a fragmentação de DNA dos neutrófilos (estudo realizado *in vitro*). Em nosso estudo, a suplementação com lecitina de soja ou com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA inibiu a fragmentação de DNA de neutrófilos. Competições esportivas de alta intensidade como a

meia maratona, aumentam a concentração de AG no plasma (HOLY et al., 1986). É sabido que os AG podem modular a função de leucócitos *in vitro* (CALDER, 2001; GORJÃO et al., 2007). Portanto, em nosso estudo, alterações na concentração plasmática de EPA, DHA e de fosfatidilcolina na membrana do neutrófilo, provavelmente produziram alterações na fluidez e consequentemente na expressão de proteínas envolvidas com a apoptose, produzindo deste modo, uma ação protetora contra a morte de neutrófilos. Entretanto, em relação a FS, observamos que a primeira meia maratona aumentou a porcentagem de neutrófilos com externalização de FS em todos os grupos, e que a suplementação, na condição basal (pré meia maratona), apresentou o mesmo efeito. Assim é provável que a suplementação (EPA, DHA ou lecitina) induza externalização de FS, mas por outro lado, inibe a fragmentação do DNA dos neutrófilos, apresentando um efeito protetor parcial sobre a apoptose do neutrófilo.

Em relação aos possíveis mecanismos de indução de apoptose pelo exercício físico, a produção de EROs, variações nas concentrações de hormônios (glicocorticóides, catecolaminas ou cortisol) e citocinas (IL-6, IL-10) estão envolvidos na regulação da apoptose de vários tipos celulares (HARTMANN et al., 1994; MASTALLOUDIS et al., 2004; PHANEUF; LEEUWENBURGH, 2001).

A via de sinalização da apoptose induzida pelo exercício físico ainda está sendo investigada. Hsu et al. (2002) foram os primeiros a verificar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial em leucócitos de indivíduos submetidos a diferentes intensidades de exercício aeróbio em esteira. Os indivíduos foram submetidos a 3 diferentes intensidades de exercício 35%, 60% e 85% do $VO_{2máx}$. Foi demonstrado que o potencial transmembrânico mitocondrial diminuiu nas intensidades mais altas do exercício físico (60 e 85% do $VO_{2máx}$), o que não ocorreu na intensidade de exercício físico moderado (35% do $VO_{2máx}$), indicando indução de apoptose a partir da via intrínseca durante a realização do exercício físico de alta intensidade. Estes achados estão de acordo com os observados por Levada-Pires et al. (2008) em neutrófilos de triatletas após a competição e por Lagranha et al. (2004) em neutrófilos de ratos que realizaram uma única sessão de exercício físico intenso (85% do $VO_{2máx}$) em esteira ergométrica. Esses pesquisadores também encontraram aumento na despolarização de membrana mitocondrial de neutrófilos após o exercício intenso. Porém, ainda não há estudos sobre a participação da via extrínseca da apoptose de neutrófilos induzida pelo exercício físico.

Nosso grupo demonstrou que a porcentagem de neutrófilos em apoptose antes da competição de maratona era significativamente maior do que no período após a maratona,

indicando que, provavelmente, estas células já estavam em apoptose devido ao treinamento intenso (SANTOS et al., 2015). Dando continuidade, agora analisando a via extrínseca da apoptose de neutrófilos, observamos que não ocorreram alterações na expressão do receptor Fas após a meia maratona (antes da suplementação). Resultados similares foram encontrados por Mooren et al. (2012) em que a expressão do receptor Fas de neutrófilos também não foi alterada pelo exercício físico intenso. Entretanto, a expressão do receptor TRAIL diminuiu após a meia maratona em todos os grupos (antes da suplementação), demonstrando que, provavelmente, a via extrínseca da apoptose não é ativada pelos receptores Fas e TRAIL após o exercício físico exaustivo.

Não existem estudos sobre as diferenças nos efeitos entre a suplementação com lecitina ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre leucócitos de atletas. Ao realizarem a meia maratona suplementados com lecitina ou óleos de peixe ricos em EPA ou DHA houve diminuição na expressão do receptor Fas, e aumento na expressão do receptor TRAIL nos neutrófilos dos atletas. Apesar da maioria dos estudos demonstrar que tanto o EPA quanto o DHA possuem efeitos anti-inflamatórios (GORJÃO et al., 2006; THIES et al., 2001; VIRELLA, 1990), aparentemente a suplementação (DHA, EPA ou lecitina de soja) induz à apoptose pela ativação do receptor TRAIL e previne a ativação do receptor Fas.

Alguns pesquisadores avaliaram a via intrínseca na apoptose de neutrófilos de triatletas após a competição. Levada-Pires et al. (2008) verificaram aumento na expressão da proteína pró-apoptótica bax e diminuição na expressão da proteína anti-apoptótica bcl-xL em neutrófilos de atletas após a prova de *triathlon*, o que demonstra aumento na apoptose de neutrófilos ocasionado por uma ativação da via intrínseca. Por outro lado, em estudo de Marfe et al. (2010), a corrida de maratona inibiu a via intrínseca, provocado por uma diminuição nos conteúdos de mRNA da bax e aumento da bcl-2 (proteína anti-apoptótica) de células polimorfonucleares. Estes resultados opostos provavelmente ocorreram devido às diferenças entre as modalidades esportivas e as variações na intensidade do esforço realizado na prova de *triathlon* e na maratona.

De modo geral, verificamos que a suplementação com lecitina de soja apresenta efeitos semelhantes aos do EPA e DHA sobre a função e morte de neutrófilos, entretanto seu mecanismo de ação provavelmente é diferente daqueles envolvidos a partir da suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA.

7 CONCLUSÃO

A meia maratona induziu ativação da apoptose do neutrófilo, determinada pela fragmentação de DNA e externalização de FS. A suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos com EPA ou DHA inibiram a fragmentação de DNA, entretanto, aumentaram a externalização de FS. Já a análise da via extrínseca da apoptose de neutrófilos, nos revelou que a meia maratona inibe a ativação da apoptose pelo receptor TRAIL, e que a suplementação com lecitina de soja ou óleos de peixe ricos com EPA ou DHA induz ativação desta via pelo mesmo receptor e inibe a ativação pelo receptor Fas. Assim, o exercício físico intenso causa apoptose do neutrófilo provavelmente a partir da ativação da via intrínseca. A suplementação com óleos de peixe ricos em DHA ou EPA ou lecitina de soja, por sua vez, reduz a fragmentação de DNA.

Além disso, a meia maratona induziu microlesões musculares e aumentou a liberação de IL-6, IL-10 e IL-8. Como era de se esperar, a suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA diminuíram a concentração plasmática de citocinas próinflamatórias (IL-6 e TNF-alfa) e aumentaram a de antiinflamatórias (IL-10), confirmando assim, seu reconhecido efeito antiinflamatório. Por sua vez, verificamos que a lecitina de soja apresenta efeitos semelhantes aos observados na suplementação com óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre estes parâmetros de inflamação.

Evidências são apresentadas pela primeira vez de que a suplementação com lecitina de soja apresenta efeitos semelhantes aos dos óleos de peixe ricos em EPA ou DHA sobre a função de leucócitos em atletas amadores. A lecitina de soja é um suplemento de mais fácil acesso e baixo custo que os óleos de peixe, o que favoreceria o seu uso por atletas. Entretanto, o mecanismo de ação da lecitina de soja sobre os função dos leucócitos precisa ainda ser elucidado.

REFERÊNCIAS*

- AKGUL, C.; MOULDING, D. A.; EDWARDS, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS letters**, v. 487, n. 3, p. 318-322, 2001.
- AKIRA, S.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv. Immunol.**, v. 54, p. 1-78, 1993.
- ANDRADE, P. M. M. et al. Effects of the fish-oil supplementation on the immune and inflammatory responses in elite swimmers. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 77, n. 3, p. 139-145, 2007.
- ARMSTRONG, R. B. et al. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. **J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.**, v.54, p.80-93, 1983.
- ARMSTRONG, R. B. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 16, n. 6, p. 529-538, 1984.
- BACHI, A. L. et al. Neuro-Immuno-Endocrine Modulation in Marathon Runners. **Neuroimmunomodulation**, v.22, p.196-202, 2015.
- BAINTON, D. F.; ULLYOT, J. L.; FARQUHAR, M. G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow origin and content of azurophil and specific granules. **J. Exp. Med.**, v. 134, n. 4, p. 907-934, 1971.
- BÖYUM, A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.**, v. 97, p. 9-29, 1968.
- BRANCACCIO, P. et al. Changes in skeletal muscle architecture following a cycloergometer test to exhaustion in athletes. **J. Sci. Med. Sport.**, v.11, n.6, p.538-541, 2008.
- BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 8, p. 577-582, 2007.
- CABRINI, M.; NAHMOD, K.; GEFFNER, J. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 17, n. 1, p. 31-35, 2010.
- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 1007-1024, 2001.
- CALDER, P. C. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. **Clin. Sci.**, v. 107, n. 1, p. 1-11, 2004.
- CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 77, n. 5, p. 327-335, 2007.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro. 2002.

CEDERGREN, J. et al. Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils. **Apmis**, v. 111, n. 10, p. 963-968, 2003.

CHEN, H. et al. Tumor necrosis factor- α induces caspase-independent cell death in human neutrophils via reactive oxidants and associated with calpain activity. **J. Biomed Sci.**, v. 13, n. 2, p. 261-273, 2006.

CHINDA, D. et al. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. **Luminescence**, v. 18, n. 6, p. 324-329, 2003.

COMASSI, M. et al. Acute effects of different degrees of ultra-endurance exercise on systemic inflammatory responses. **Intern. Med. J.**, v. 45, n. 1, p. 74-79, 2015.

CONCHA, C. et al. Oxidative response of neutrophils to platelet-activating factor is altered during acute ruminal acidosis induced by oligofructose in heifers. **J. Vet. Sci.**, v. 15, n. 2, p. 217-224, 2014.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DE CATERINA, R. et al. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. **Arterioscler. Thromb.**, v. 14, n. 11, p. 1829-1836, 1994.

DE CATERINA, R.; LIBBY, P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. **Lipids**, v. 31, n. 1, p. S57-S63, 1996.

DE CATERINA, R.; MASSARO, M. Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and pro-inflammatory genes. **J. Membr. Biol.**, v. 206, n. 2, p. 103-116, 2005.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 2, p. 108-117, 2000.

DUFFIN, R. et al. The CDK inhibitor, R-roscovitine, promotes eosinophil apoptosis by down-regulation of Mcl-1. **FEBS letters**, v. 583, n. 15, p. 2540-2546, 2009.

DUSI, S.; DONINI, M.; ROSSI, F. Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. **Biochem. J.**, v. 314, p. 409-412, 1996.

EKBLOM, B.; EKBLOM, Ö.; MALM, C.. Infectious episodes before and after a marathon race. **Scand. J. Med. Sci. Sports.**, v. 16, n. 4, p. 287-293, 2006.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FEBBRAIO, M. A. et al. Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. **J. Physiol.**, v. 549, n. 2, p. 607-612, 2003.

FEHRENBACH, E. et al. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. **J. Appl. Physiol.**, v. 89, n. 2, p. 704-710, 2000.

FIEDLER, B. et al. Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 17, p. 11363-11368, 2002.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRENKEL, A.L.; CANETTI, L.; HALPERN, Z. Effects of nutritional lipid on diabetic manifestations and D6-desaturase mRNA level in streptozotocin treated mice. **Nutr. Res.**, v. 24, p. 303– 312, 2004.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J. Cell Biol.**, v. 176, n. 2, p. 231-241, 2007.

GANI, F. et al. Sport, immune system and respiratory infections. **Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.**, v. 35, n. 2, p. 41-46, 2003.

GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718-723, 1999.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 103, n. 2, p. 693-699, 2007.

GOLSTEIN, P; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem. Sci.**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GORJÃO, R. et al. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. **Clin. Nutr.**, v. 25, n. 6, p. 923-938, 2006.

GORJAO, R. et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. **Cell Biochem. Funct.**, v. 25, n. 3, p. 305-315, 2007.

GOUA, M. et al. Regulation of adhesion molecule expression in human endothelial and smooth muscle cells by omega-3 fatty acids and conjugated linoleic acids: Involvement of the transcription factor NF-Kappa B?. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 78, n. 1, p. 33-43, 2008.

GRIMBLE, R. et al. The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor α production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor α production. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, n. 2, p. 454-459, 2002.

GRIMBLE, R. Use of n-3 fatty acid-containing lipid emulsions in the Intensive Care Unit environment: the scientist's view. **Clin. Nutr.**, v. 21, p. 15-21, 2002.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007-3017, 1998.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, n. 22, p. 475-6 passim, 1973.

HARTMANN, A. et al. Does physical activity induce DNA damage?. **Mutagenesis**, v. 9, n. 3, p. 269-272, 1994.

HOLLY, R. G., et al. Triathlete characterization and response to prolonged strenuous competition. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 18, n. 1, p. 123-127, 1986.

HOWATSON, G. et al. Influence of tart cherry juice on indices of recovery following marathon running. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 20, n. 6, p. 843-852, 2010.

HSU, T. et al. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 34, n. 3, p. 438-442, 2002.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R. O. **Basic histology**. 8th ed. Norwalk: Appleton and Lange, 1995. p. 191-204.

KARKOULIAS, K. et al. Hormonal responses to marathon running in non-elite athletes. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 19, n. 8, p. 598-601, 2008.

KELLER, C. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **FASEB J.**, v. 15, n. 14, p. 2748-2750, 2001.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol. Res.**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KEW, S. et al. The effect of eicosapentaenoic acid on rat lymphocyte proliferation depends upon its position in dietary triacylglycerols. **J. Nutr.**, v. 133, n. 12, p. 4230-4238, 2003.

KEW, S. et al. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 4, p. 674-681, 2004.

KIMSA, M. C. et al. Differential Expression of Inflammation-related Genes after Intense Exercise. **Prague Med. Rep.**, v. 115, n. 1-2, p. 24-32, 2014.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, 2003.

KOBAYASHI, Y. et al. Effect of a marathon run on serum lipoproteins, creatine kinase, and lactate dehydrogenase in recreational runners. **Res. Q. Exerc. Sport**, v. 76, n. 4, p. 450-455, 2005.

KOÇTÜRK, S. et al. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 102, n. 5, p. 515-524, 2008.

KÖLLER, M. et al. Arachidonic acid induces DNA-fragmentation in human polymorphonuclear neutrophil granulocytes. **Inflammation**, v. 21, n. 5, p. 463-474, 1997.

KOWATARI, K. et al. Exercise training and energy restriction decrease neutrophil phagocytic activity in judoists. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, n. 4, p. 519-524, 2001.

KRATZ, A. et al. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 118, n. 6, p. 856-863, 2002.

LAGRANHA, C. J. et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 2, p. 210-217, 2004.

LAGRANHA, C. J. et al. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 23, n. 2, p. 101-107, 2005.

LAGRANHA, C. J. et al. Glutamine supplementation prevents exercise-induced neutrophil apoptosis and reduces p38 MAPK and JNK phosphorylation and p53 and caspase 3 expression. **Cell Biochem. Funct.**, v. 25, n. 5, p. 563-569, 2007.

LAPILLONNE, A.; CLARKE, S. D.; HEIRD, W. C. Polyunsaturated fatty acids and gene expression. **Cur. O. Clin. Nutr. Met. Care**, v. 7, n. 2, p. 151-156, 2004.

LEVADA-PIRES, A. C. et al. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 40, n. 8, p. 1447-1454, 2008.

LIPPI, G., et al. Mean Platelet Volume (MPV) Predicts Middle Distance Running Performance. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112892, 2014.

LUO, H. R.; LOISON, F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. **Am. J. Hematol.**, v. 83, n. 4, p. 288-295, 2008.

MACFARLANE, M. Cell death pathways-potential therapeutic targets. **Xenobiotica**, v. 39, n. 8, p. 616-624, 2009.

MAIANSKI, N. A. et al. Apoptosis of neutrophils. **Acta Haematol.**, v. 111, n. 1-2, p. 56-66, 2004.

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. **Scand. J. Med. Sci. Sports**, v. 16, n. 1, p. 4-6, 2006.

MARFE, G. et al. The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners. **BMC Physiol.**, v. 10, n. 1, p. 7, 2010.

MASTALOUDIS, A. et al. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, n. 8, p. 966-975, 2004.

MEDIĆ, D. R. et al. Effect of soybean Leci-Vita product on serum lipids and fatty acid composition in patients with elevated serum cholesterol and triglyceride levels. **Nutr. Res.**, v. 23, n. 4, p. 465-477, 2003.

MEEUSEN, R. et al. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 45, n. 1, p. 186-205, 2013.

MICKLEBOROUGH, T. D. et al. Fish oil supplementation reduces severity of exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 168, n. 10, p. 1181-1189, 2003.

MIRANDA, D. T. S. Z. et al. Soy lecithin supplementation alters macrophage phagocytosis and lymphocyte response to concanavalin A: a study in alloxan-induced diabetic rats. **Cell Bioch. Func.**, v. 26, n. 8, p. 859-865, 2008.

MOOREN, F. C.; VÖLKER, K. Exercise-induced modulation of intracellular signaling pathways. **Exerc. Immunol. Rev.**, v. 7, p. 32-65, 2000.

MOOREN, F. C. et al. Exercise delays neutrophil apoptosis by a G-CSF-dependent mechanism. **J. Appl. Physiol.**, v. 113, n. 7, p. 1082-1090, 2012.

MOREIRA, A. et al. Nutritional modulation of exercise-induced immunodepression in athletes: a systematic review and meta-analysis. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 61, n. 4, p. 443-460, 2007.

MORO-GARCÍA, M. A. et al. Frequent participation in high volume exercise throughout life is associated with a more differentiated adaptive immune response. **Brain Behav. Immune.**, v. 39, p. 61-74, 2014.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 58, n. 20, p. 2047-2067, 2011.

MUDD, J. et al. Phagocytosis and Physiology Review, p.14-210, 1934.

NAKAJIMA, H. et al. Lecithinized copper, zinc-superoxide dismutase ameliorates ischemia-induced myocardial damage. **Life Sci.**, v. 69, n. 8, p. 935-944, 2001.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

NAVDER, K. P.; BARAONA, E.; LIEBER, C. S. Polyenylphosphatidylcholine decreases alcoholic hyperlipemia without affecting the alcohol-induced rise of HDL-cholesterol. **Life Sci.**, v. 61, n. 19, p. 1907-1914, 1997.

NEUBAUER, O; KÖNIG, D; WAGNER, K. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 104, n. 3, p. 417-426, 2008.

NIELSEN, H. G.; LYBERG, T. Long-Distance Running Modulates the Expression of Leucocyte and Endothelial Adhesion Molecules. **Scand. J. Immunol.**, v. 60, n. 4, p. 356-362, 2004.

NIEMAN, D. C. et al. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. **J. Sports Med. Phys. Fitness**, v. 30, n. 3, p. 316-328, 1990.

NIEMAN, D. C. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 26, n. 2, p. 128-139, 1994.

NIEMAN, D. C. Risk of upper respiratory tract infection in athletes: an epidemiologic and immunologic perspective. **J. Athl. Train.**, v. 32, n. 4, p. 344, 1997.

NIEMAN, D. C.; PEDERSEN, B. K. Exercise and immune function. **Sports Med.**, v. 27, n. 2, p. 73-80, 1999.

NIEMAN, D. C. et al. Cytokine changes after a marathon race. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 1, p. 109-114, 2001.

NIEMAN, D. C. et al. Relationship between salivary IgA secretion and upper respiratory tract infection following a 160-km race. **J. Sports Med. Phys. Fitness**, v. 46, n. 1, p. 158-162, 2006.

NIEMAN, D. C. Marathon training and immune function. **Sports Med.**, v. 37, n. 4-5, p. 412-415, 2007.

NIEMAN, D. C. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids do not alter immune and inflammation measures in endurance athletes. **Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.**, v.19, p.536-546, 2009.

NIEMAN, D. C. Immune function responses to ultramarathon race competition. **Med. Sport.**, v. 13, n. 4, p. 189-196, 2009.

NISHIMUKAI, M.; HARA, H. Enteral administration of soybean phosphatidylcholine enhances the lymphatic absorption of lycopene, but reduces that of α -tocopherol in rats. **J. Nutr.**, v. 134, n. 8, p. 1862-1866, 2004.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; CURI, R. Phosphatidylcholine participates in the interaction between macrophages and lymphocytes. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 278, n. 3, p. C554-C560, 2000.

NISHIYAMA, A. et al. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine inhibits lymphocyte proliferation and decreases interleukin-2 and interferon- γ production from concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1487, n. 1, p. 50-60, 2000.

PASCHOAL, V. A. et al. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. **Lipids**, v. 48, n. 2, p. 93-103, 2013.

PAULSEN, G. et al. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise. **Exerc. Immunol. Rev.**, v. 18, n. 1, p. 42-97, 2012.

PEAKE, J. M. et al. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 95, n. 5-6, p. 514-521, 2005.

PEDERSEN, B. K.; ULLUM, H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 26, n. 2, p. 140-146, 1994.

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

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 4, p. 1379-1406, 2008.

PETERSEN, A. M; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.98, p.1154-1162, 2005.

PHANEUF, S.; LEEUWENBURGH, C. Apoptosis and exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 33, n. 3, p. 393-396, 2001.

PITHON-CURI, T. C. et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 284, n. 6, p. C1355-C1361, 2003.

PROKSCH, P. et al. Rocaglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells. **J. Immunol.**, v. 174, n. 11, p. 7075-7084, 2005.

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

REID, S. A. et al. Study of hematological and biochemical parameters in runners completing a standard marathon. **Clin. J. Sport Med.**, v. 14, n. 6, p. 344-353, 2004.

REIHMANE, D.; DELA, F. Interleukin-6: Possible biological roles during exercise. **Eur. J. Sport Sci.**, v. 14, n. 3, p. 242-250, 2014.

SANTOS, V. C. et al. Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. **Cell Biochem. Funct.**, v. 31, n. 3, p. 237-243, 2013.

SANTOS, V. C. et al. Effects of DHA-rich fish oil supplementation on neutrophil function before and after a marathon race. **Food Nutr Sci** (submitted paper), 2015.

SAXTON, J. M. et al. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. **Clin. Sci.**, v. 104, n. 1, p. 69-78, 2003.

SCHERR, J. et al. Non-alcoholic Beer Reduces Inflammation And The Incidence Of Upper Respiratory Tract Infections After A Marathon. In: **Med. Sci. Sports Exerc.** 530 WALNUT ST, PHILADELPHIA, PA 19106-3621 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2011. p. 18-18.

SEEMATTER, G. et al. Relationship between stress, inflammation and metabolism. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 7, n. 2, p. 169-173, 2004.

SHAPIRO, V. S; MOLLENAUER, M. N; WEISS, A. Cutting edge: Nuclear factor of activated T cells and AP-1 are insufficient for IL-2 promoter activation: Requirement for CD28 up-regulation of RE/AP. **J. Immunol.**, v. 161, n. 12, p. 6455-6458, 1998.

SHIN, Y. O; LEE, J. B. Leukocyte chemotactic cytokine and leukocyte subset responses during ultra-marathon running. **Cytokine**, v. 61, n. 2, p. 364-369, 2013.

SIMON, S. et al. Neutrophil aggregation is 132-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. **J. Immunol.**, v. 149, n. 15, p. 2765-2771, 1992.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids and athletics. **Curr. Sports Med. Rep.**, v. 6, n. 4, p. 230-236, 2007.

SMITH, J. A. et al. Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. **Int. J. Sports Med.**, v. 11, n. 03, p. 179-187, 1990.

STEENSBURG, A. et al. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 283, n. 6, p. E1272-E1278, 2002.

STEENSBURG, A. et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.285, p.E433-437, 2003.

SUZUKI, K. et al. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 35, n. 2, p. 348-355, 2003.

THEILGAARD-MÖNCH, K. et al. The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1785-1796, 2005.

THIES, F. et al. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. **Lipids**, v. 36, n. 11, p. 1183-1193, 2001.

TOFT, A. D. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids do not affect cytokine response to strenuous exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 89, n. 6, p. 2401-2406, 2000.

TUAN, T. et al. Deleterious effects of short-term, high-intensity exercise on immune function: evidence from leucocyte mitochondrial alterations and apoptosis. **Br. J. Sports Med.**, v. 42, n. 1, p. 11-15, 2008.

TULL, S. P. et al. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLoS Biol.**, v. 7, n. 8, p. e1000177, 2009.

TVEDE, N. et al. Mechanisms of B-lymphocyte suppression induced by acute physical exercise. **J. Clin. Lab. Immunol.**, v. 30, n. 4, p. 169-173, 1989.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **J. Immunol. Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VIRELLA, G. Diagnostic evaluation of phagocytic function. **Immunol. Ser.**, v.50, p.323-340, 1990.

WALSH, N. P. et al. Position statement part one: immune function and exercise. **Exerc. Immunol. Rev.**, v.17, p.6-63, 2011.

WELDON, S. M. et al. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. **J. Nutr. Biochem.**, v. 18, n. 4, p. 250-258, 2007.

ANEXO A

1 Dados individuais dos atletas para análise da composição de ácidos graxos livres no plasma

1.1 Análise da concentração de ácido aracdônico no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 6** são referentes à concentração de ácido aracdônico (20:4n-6) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 6 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de ácido aracdônico no plasma (grupo DHA)

Número atleta	20:4n-6	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	9,06	11,60	7,77	7,76
5	DHA	6,43	11,94	6,74	7,32
6	DHA	11,06	6,61	11,48	9,96
7	DHA	11,03	10,40	10,69	9,44
10	DHA	12,67	11,66	8,32	8,60
12	DHA	10,86	8,41	7,38	8,21
15	DHA	12,54	12,47	10,07	10,47
19	DHA	8,11	9,30	7,27	7,98
21	DHA	6,86	11,74	6,29	8,14
23	DHA		7,23	7,66	7,99
28	DHA	11,43	10,98	7,98	8,00
29	DHA			9,60	
30	DHA	11,93	10,57		7,37
31	DHA			7,60	7,88
33	DHA	14,50	14,28	6,15	8,96
34	DHA	9,20	8,80		8,22
35	DHA	9,52	8,60	9,63	8,67
37	DHA	10,92	10,98	7,61	7,40
38	DHA	9,35	9,01	6,05	5,95
41	DHA	8,09	11,68	8,13	8,83
45	DHA	7,42	7,26		7,44
46	DHA			9,11	
49	DHA	14,68	12,32	10,04	9,49

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.2 Análise da concentração de EPA no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 7** são referentes à concentração de EPA (20:5n-3) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 7 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de EPA no plasma (grupo DHA)

Número atleta	20:5n-3	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	0,74	0,57	1,81	1,41
5	DHA	0,36	0,48	1,30	1,16
6	DHA	0,52	0,29	1,98	1,72
7	DHA	0,53	0,52	1,57	1,32
10	DHA	0,72	0,70	2,06	2,01
12	DHA	0,59	0,43	2,02	2,03
15	DHA	0,62	1,15	1,59	1,21
19	DHA	0,36	0,40	0,91	0,73
21	DHA	1,11	0,73	3,21	3,54
23	DHA		0,92	2,56	2,68
28	DHA	0,84	0,98	1,99	1,98
29	DHA			5,21	
30	DHA	0,42	0,44		1,70
31	DHA			1,77	1,59
33	DHA	0,61	0,47	2,36	1,41
34	DHA	0,34	0,35		0,99
35	DHA	0,48	0,54	3,29	2,47
37	DHA	0,88	0,76	1,38	1,51
38	DHA	0,41	0,33	2,34	1,67
41	DHA	0,45	0,84	1,13	0,90
45	DHA	0,70	0,48		4,00
46	DHA			5,19	
49	DHA	0,82	0,87	1,19	1,19

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.3 Análise da concentração de DHA no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 8** são referentes à concentração de DHA (22:6n-3) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 8 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de DHA no plasma (grupo DHA)

Número atleta	22:6n-3	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	3,67	2,72	8,42	6,83
5	DHA	1,73	3,34	7,44	7,16
6	DHA	2,82	1,52	6,65	5,97
7	DHA	2,84	2,57	8,63	7,01
10	DHA	1,84	1,57	6,46	6,82
12	DHA	2,97	1,97	5,55	6,56
15	DHA	3,03	5,35	9,18	8,51
19	DHA	1,94	1,83	5,98	6,46
21	DHA	4,59	1,49	7,27	3,65
23	DHA		5,13	9,66	10,82
28	DHA	2,68	2,79	7,31	7,42
29	DHA			4,48	
30	DHA	3,50	2,77		5,63
31	DHA			9,37	
33	DHA	3,57	3,59	6,51	9,34
34	DHA	2,73	2,17		8,25
35	DHA	3,05	2,81	7,66	4,44
37	DHA	3,81	3,71	5,79	7,60
38	DHA	2,29	1,94	6,49	6,15
41	DHA	2,10	2,25	5,80	6,28
45	DHA	1,71	1,69		6,16
46	DHA			5,81	
49	DHA	3,63	2,96	6,09	8,19

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.4 Análise da concentração de ácido aracdônico no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 9** são referentes à concentração de ácido aracdônico (20:4n-6) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com EPA. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 9 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de ácido aracdônico no plasma (grupo EPA)

Número atleta	20:4n-6	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
2	EPA	14,00	9,52	9,81	9,57
9	EPA	7,43		8,28	8,82
11	EPA	8,56	11,76	6,65	6,85
13	EPA	10,90	10,70	9,90	9,79
17	EPA	10,73	7,97	7,02	7,41
24	EPA		10,82	7,29	6,92
25	EPA	11,86	7,79	10,45	11,02
26	EPA	13,23	13,47	7,34	7,16
29	EPA	10,89	9,74		8,78
42	EPA	12,30	11,15	9,19	8,30
44	EPA	12,57	10,76		
45	EPA			7,48	
46	EPA	8,45	9,19		8,41
47	EPA	11,34	10,22	8,29	11,02

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.5 Análise da concentração de EPA no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 10** são referentes à concentração de EPA (20: 5n-3) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com EPA. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 10 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de EPA no plasma (grupo EPA)

Número atleta	20:5n-3	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
2	EPA	0,40	0,58	5,04	3,98
9	EPA	0,68		3,18	2,24
11	EPA	0,46	0,77	4,70	4,50
13	EPA	0,90	0,77	4,45	3,59
17	EPA	0,77	0,36	5,81	5,36
24	EPA		0,63	4,39	3,41
25	EPA	0,56	1,65	5,59	4,78
26	EPA	0,97	0,86	6,84	4,91
29	EPA	0,84	0,98		4,77
42	EPA	0,37	0,35	3,29	2,08
44	EPA	0,85	0,76		
45	EPA			4,07	
46	EPA	0,62	0,68		4,41
47	EPA	0,43	0,59	4,70	2,86

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.6 Análise da concentração de DHA no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 11** são referentes à concentração de DHA (22: 6n-3) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com EPA. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 11 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de DHA no plasma por HPLC (grupo EPA)

Número atleta	22:6n-3	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
2	EPA	2,43	3,68	4,46	4,15
9	EPA	3,01		2,89	3,14
11	EPA	2,29	1,74	3,55	4,17
13	EPA	4,42	2,92	5,16	4,97
17	EPA	2,91	1,40	4,20	4,47
24	EPA		2,27	4,07	8,35
25	EPA	2,62	3,74	5,38	5,74
26	EPA	3,52	3,45	5,67	5,67
29	EPA	3,33	3,22		4,32
42	EPA	3,03	2,58	5,02	4,50
44	EPA	4,53	3,49		
45	EPA			7,92	
46	EPA	3,34	3,62		5,21
47	EPA	3,04	3,06	5,48	4,60

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.7 Análise da concentração de ácido aracdônico no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 12** são referentes à concentração de ácido aracdônico (20:4n-6) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu a lecitina de soja. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 12 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de ácido aracdônico no plasma (grupo Lecitina).

Número atleta	20:4n-6	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
4	Lecitina	11,40	14,11	11,14	12,02
8	Lecitina	9,79	10,19	9,98	
14	Lecitina	12,43	10,01	10,00	10,01
16	Lecitina	8,47	12,22	8,46	8,47
18	Lecitina	9,61	9,50	8,68	9,31
20	Lecitina	13,22	8,41	12,16	11,95
27	Lecitina	8,92	8,21	10,76	10,80
32	Lecitina	8,87	8,74	11,09	10,98
36	Lecitina	10,97	9,44	11,01	11,04
39	Lecitina	5,83	5,73	11,45	11,55
40	Lecitina	11,53	11,38	9,16	9,53
43	Lecitina	11,94		12,67	11,40
48	Lecitina	9,77	9,11	11,85	7,67

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.8 Análise da concentração de EPA no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 13** são referentes à concentração de EPA (20:5n-3) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu a lecitina de soja. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 13 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de EPA no plasma (grupo Lactina)

Número atleta	20:5n-3	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
4	Lecitina	0,48	0,42	0,58	0,76
8	Lecitina	0,54	0,49	0,57	
14	Lecitina	1,37	0,61	0,65	0,87
16	Lecitina	0,32	0,74	0,39	0,49
18	Lecitina	0,35	0,72	0,48	0,72
20	Lecitina	0,69	0,35	0,92	0,93
27	Lecitina	0,73	0,69	0,86	1,00
32	Lecitina	0,66	0,61	0,55	0,62
36	Lecitina	0,94	1,15	1,32	2,61
39	Lecitina	0,35	0,43	0,70	0,75
40	Lecitina	0,80		0,39	0,35
43	Lecitina	0,66	0,56	0,51	0,76
48	Lecitina	0,41	1,33	1,94	4,28

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.9 Análise da concentração de DHA no plasma por HPLC

Os dados apresentados no **Quadro 14** são referentes à concentração de DHA (22:6n-3) no plasma (%) de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu a lecitina de soja. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 14 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração de DHA no plasma (grupo Lecitina)

Número atleta	22:6n-3	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
4	Lecitina	3,36	2,37	3,49	3,94
8	Lecitina	2,80	2,56	3,01	
14	Lecitina	4,74	4,06	3,67	3,81
16	Lecitina	1,56	2,61	1,63	1,84
18	Lecitina	2,05	2,62	2,20	2,67
20	Lecitina	1,85	2,08	1,52	1,58
27	Lecitina	3,70	3,36	2,51	2,66
32	Lecitina	2,90	2,69	2,60	2,86
36	Lecitina	3,79	3,87	4,34	4,68
39	Lecitina	2,65	2,41	1,90	2,02
40	Lecitina	2,30		2,29	2,32
43	Lecitina	3,92	3,37	3,75	2,97
48	Lecitina	3,76	3,84	4,07	4,94

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

ANEXO B

1. Quadros contendo os dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação

1.1 Avaliação física dos atletas antes de iniciarem a suplementação com óleo de peixe enriquecido com DHA

Os dados apresentados no **Quadro 15** são referentes às características físicas de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA. As análises foram realizadas antes do atletas iniciarem a suplementação (Fase I).

Quadro 15 – Dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação (grupo DHA)

Número atleta	Suplemento	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura total (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura Petroski 7 dobras	% gordura Bioimpedância
33	DHA	43	66,5	170	23,0	13,9	11,7
10	DHA	41	74,1	164	27,6	19,0	20,1
31	DHA	44	72,5	173	24,2	20,8	23,9
30	DHA	27	68,9	167	24,7	17,5	14,4
23	DHA	41	50,3	166	18,3	13,7	13,5
37	DHA	35	75,7	175	24,7	15,0	12,2
41	DHA	45	100,5	175	32,8	23,1	28,7
1	DHA	47	79,05	179	24,7	19,3	20,4
19	DHA	33	61,6	172	20,8	15,3	18,3
21	DHA	36	66,9	170	23,1	14,3	14,3
49	DHA	36	72,4	173	24,2	16,6	16,3
5	DHA	45	82,9	178	26,2	16,6	15,8
6	DHA	40	79,2	176	25,6	21,0	20,3
7	DHA	28	79	176	25,5	18,0	20,9
12	DHA	48	72,1	173	24,1	16,5	11,7
15	DHA	40	62,6	173	20,9	18,9	19,9
28	DHA	45	65,8	162	25,1	19,3	17,4
34	DHA	44	90,35	180	27,9	29,2	26,1
35	DHA	33	71,1	174	23,5	20,6	15,2
38	DHA	45	68,2	174	22,5	15,5	16,9
45	DHA	29	74,8	177	23,9	11,0	11,6

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.2 Avaliação física dos atletas antes de iniciarem a suplementação com óleo de peixe enriquecido com EPA

Os dados apresentados no **Quadro 16** são referentes às características físicas de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com EPA. As análises foram realizadas antes do atletas iniciarem a suplementação (Fase I).

Quadro 16 – Dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação (grupo EPA)

Número atleta	Suplemento	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura total (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura Petroski 7 dobras	% gordura Bioimpedância
29	EPA	30	71,8	174	23,7	21,9	17,1
13	EPA	49	85,8	179	26,8	22,9	25,5
26	EPA	34	70,1	171	24,0	16,1	16,6
47	EPA	41	58,5	172	19,8	22,0	20,3
17	EPA	38	68,7	156	28,2	21,7	24,7
24	EPA	43	63,6	161	24,5	16,3	14,9
25	EPA	50	77,0	177	24,6	17,2	20,3
2	EPA	45	76,6	183	22,9	21,2	14,9
9	EPA	43	71,9	173	24,0	16,1	18,0
11	EPA	29	81,1	181	24,8	13,1	12,8
46	EPA	53	73,9	174	24,4	17,1	19,0
42	EPA	43	106,95	171	36,6	33,5	31,5

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.3 Avaliação física dos atletas antes de iniciarem a suplementação com lecitina de soja

Os dados apresentados no **Quadro 17** são referentes às características físicas de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu a lecitina de soja. As análises foram realizadas antes do atletas iniciarem a suplementação (Fase I).

Quadro 17 – Dados individuais da avaliação física dos atletas antes do início da suplementação (grupo Lецitina)

Número atleta	Suplemento	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura total (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura Petroski 7 dobras	% gordura Bioimpedância
8	Lecitina	27	72	179	22,5	12,0	13,2
14	Lecitina	28	69,4	170	24,0	14,4	16,0
20	Lecitina	39	70,5	168	25,0	15,0	14,7
48	Lecitina	35	105,1	177	33,5	30,3	29,7
16	Lecitina	47	83	173	27,7	23,9	21,9
18	Lecitina	36	78,1	176	25,2	13,5	13,4
27	Lecitina	34	71	167	25,5	19,1	19,7
32	Lecitina	44	77,5	174	25,6	22,1	25,9
36	Lecitina	28	82,8	171	28,3	13,8	23,5
39	Lecitina	49	70,9	177	22,6	21,0	15,6
40	Lecitina	29	72,7	180	22,5	11,1	7,8
41	Lecitina	41	65,5	167	23,5	12,6	11,7
4	Lecitina	42	65,8	173	22,0	20,0	21,2

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.4 Avaliação física dos atletas após a suplementação com óleo de peixe enriquecido com DHA

Os dados apresentados no **Quadro 18** são referentes às características físicas de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA. As análises foram realizadas após a suplementação (Fase III).

Quadro 18 – Dados individuais da avaliação física dos atletas após a suplementação (grupo DHA)

Número atleta	Suplemento	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura Petroski 7 dobras	% gordura Bioimpedância
33	DHA	43	68,9	170	23,6	13,1	14,9
10	DHA	41	74,4	164	27,7	19,8	20,7
31	DHA	44	72,0	173	24,1	22,7	19,7
30	DHA	27	70,5	167	25,6	17,1	13,6
23	DHA	41	52,3	166	19,0	16,9	
37	DHA	35	76,7	175	25,0	19,1	16,4
41	DHA	45	99,6	175	32,2	31,1	35,9
1	DHA	47	79,8	179	24,9	19,8	23,2
19	DHA	33	60,9	172	20,6	16,8	17,3
21	DHA	36	67,0	170	23,2	13,7	18,5
49	DHA	36	74,3	173	25,4	17,9	13,5
5	DHA	45	82,9	178	25,9	20,1	16,1
6	DHA	40	76,9	176	24,8	21,4	18,8
7	DHA	28	78,7	176	25,4	18,9	17,3
12	DHA	48	72,0	173	24,1	16,9	12,6
15	DHA	40	64,1	173	21,4	17,7	15,1
28	DHA	45	67,0	162	25,2	22,0	17,3
34	DHA	44	90,0	180	27,8	27,6	25,7
35	DHA	33	70,9	174	23,4	21,2	17,3
38	DHA	45	67,9	174	22,4	15,2	27,3

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.5 Avaliação física dos atletas após a suplementação com óleo de peixe enriquecido com EPA

Os dados apresentados no **Quadro 19** são referentes às características físicas de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com EPA. As análises foram realizadas após a suplementação (Fase III).

Quadro 19 – Dados individuais da avaliação física dos atletas após a suplementação (grupo EPA)

Número atleta	Suplemento	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura Petroski 7 dobras	% gordura Bioimpedância
29	EPA	30	70,5	174	23,3	19,5	22,3
13	EPA	49	83,2	179	26,3	26,0	25,6
26	EPA	34	69,5	171	23,8	17,5	13,9
47	EPA	41	59,1	172	20,0	21,4	16,9
17	EPA	38	70,5	156	29,0	23,7	27,5
24	EPA	43	64,7	161	25,0	16,5	14,9
25	EPA	50	74,8	177	23,9	16,7	28,2
2	EPA	45	78,6	183	24,8	23,2	15,9
9	EPA	43	72,4	173	23,9	17,5	20,4
11	EPA	29	80,0	181	24,4	14,5	12,0
46	EPA	53	75,0	174	24,8	18,9	15,9
42	EPA	43	104,8	171	33,1		29,4

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.6 Avaliação física dos atletas após a suplementação com lecitina de soja

Os dados apresentados no **Quadro 19** são referentes às características físicas de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu a lecitina de soja. As análises foram realizadas após a suplementação (Fase III).

Quadro 20 – Dados individuais da avaliação física dos atletas após a suplementação (grupo Lecitina)

Número atleta	Suplemento	Idade (anos)	Massa corpórea (Kg)	Estatura (cm)	IMC Kg/cm ²	% gordura Petroski 7 dobras	% gordura Bioimpedância
8	Lecitina	27	72,2	179	22,5	15,0	11,9
14	Lecitina	28	67,4	170	23,9	12,7	13,4
20	Lecitina	39	71,1	168	25,2	14,2	15,5
48	Lecitina	35	105,8	177	33,8	28,5	27,6
16	Lecitina	47	83,8	173	27,7	22,8	26,6
18	Lecitina	36	78,4	176	25,3	13,4	10,2
27	Lecitina	34	73,6	167	26,4	23,3	
32	Lecitina	44	76,6	174	25,3	22,4	24,9
36	Lecitina	28	81,9	171	28,0	19,3	26,4
39	Lecitina	49	72,3	177	23,1	22,9	
40	Lecitina	29	72,1	180	22,3	12,9	6,4
41	Lecitina	41	65,1	167	23,3	11,8	8,7
4	Lecitina	42	66,4	173	21,2	21,1	16,4

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

ANEXO C

1 Quadros contendo os dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas.

1.1 Análise da capacidade cardiorrespiratória dos atletas

Os dados apresentados no **Quadro 21** são referentes a avaliação cardiorrespiratória de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com DHA. As análises foram realizadas antes dos atletas iniciarem a suplementação (Fase I).

Quadro 21 – Dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas (grupo DHA)

		FC máxima predita	FC submáxima predita	FC repouso	PAS repouso	PAD repouso	VO2 máx	MET	FC máx
33	DHA	177	150	78	120	80	50,0	14,3	187
10	DHA	179	152	74	120	80	50,0	14,3	187
31	DHA	176	149	58	110	70	47,3	13,5	167
30	DHA	193	164	56	120	80	52,5	15,0	200
23	DHA	179	152	62	120	80	47,3	13,5	187
37	DHA	185	157	75	120	80	42,5	12,1	187
6	DHA	180	152	46	110	70	44,8	12,8	167
41	DHA	176	149	116	120	80	32,3	9,2	185
1	DHA	173	147	45	120	80	42,5	12,1	150
21	DHA	184	156	51	110	70	54,7	15,6	189
38	DHA	175	148	52	130	80	54,7	15,6	178
19	DHA	187	158	74	120	90	47,3	13,5	189
15	DHA	180	152	54	120	80	42,5	12,1	150
12	DHA	172	146	79	120	80	47,3	13,5	185
45	DHA	191	162	84	130	80	44,8	12,8	181
35	DHA	187	158	78	120	80	44,8	12,8	185
5	DHA	175	148	58	140	80	47,3	13,5	169
7	DHA	192	163	81	120	70	50,0	14,3	189
34	DHA	176	149	61	120	80	47,5	12,1	166
28	DHA	175	148	71	120	90	40,0	11,4	183

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

1.2 Análise da capacidade cardiorrespiratória dos atletas

Os dados apresentados no **Quadro 22** são referentes a avaliação cardiorrespiratória de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu óleo de peixe enriquecido com EPA. As análises foram realizadas antes dos atletas iniciarem a suplementação (Fase I).

Quadro 22 – Dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas (grupo EPA)

		FC máxima predita	FC submáxima predita	FC repouso	PAS repouso	PAD repouso	VO2 max	MET	FC máx
29	EPA	190	161	64	110	70	50,0	14,3	187
24	EPA	177	150	62	130	80	44,8	12,8	187
13	EPA	171	145	64	110	80	47,3	13,5	169
26	EPA	186	158	59	120	80	52,5	15,0	185
17	EPA	182	154	66	120	80	37,3	10,6	169
11	EPA	191	162	59	120	90	59,7	17,0	183
2	EPA	175	148	69	120	80	47,3	13,5	189
46	EPA	167	141	53	120	80	44,8	12,8	166
42	EPA	177	150	77	150	100	34,8	9,9	157
25	EPA	170	144	53	140	90	47,3	13,5	150

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

1.3 Análise da capacidade cardiorrespiratória dos atletas

Os dados apresentados no **Quadro 23** são referentes a avaliação cardiorrespiratória de cada atleta pertencente ao grupo que recebeu a lecitina de soja. As análises foram realizadas antes dos atletas iniciarem a suplementação (Fase I).

Quadro 23 – Dados individuais da avaliação cardiorrespiratória dos atletas (grupo Lecitina)

		FC máxima predita	FC submáxima predita	FC repouso	PAS repouso	PAD repouso	VO2 máx	MET	FC máx
8	Lecitina	193	164	63	120	80	52,5	15,0	187
14	Lecitina	192	163	74	110	70	42,5	12,1	187
20	Lecitina	181	153	63	130	80	44,8	12,8	187
4	Lecitina	178	151	78	110	70	50,0	14,3	193
39	Lecitina	171	145	88	120	80	52,5	15,0	183
27	Lecitina	186	158	59	120	70	54,7	15,6	185
	Lecitina	177	150	79	130	80	44,8	12,8	185
32	Lecitina	176	149	74	120	80	44,8	12,8	187
40	Lecitina	191	169	40	120	80	54,7	15,6	178
36	Lecitina	192	163	68	120	80	44,8	12,8	180
16	Lecitina	173	147	50	120	80	50,0	14,3	168
41	Lecitina	179	152	69	130	80	54,7	15,6	187
18	Lecitina	185	157	51	130	80	50,0	14,3	176

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

ANEXO D

1 Quadros contendo os dados individuais dos atletas utilizados para análises hematológicas e bioquímicas

1.1 Análise do número de neutrófilos circulantes dos atletas antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 24** são referentes a análise do número de neutrófilos circulantes de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 24 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise do número de neutrófilos circulantes

Número atleta	Suplemento	NEUTRÓFILOS (mil/mm ³)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	2,45	11,91	3,42	12,36
2	EPA	3,53	11,81	3,38	10,45
4	Lecitina	3,27	10,48	2,7	13,66
5	DHA	2,53	13,28	2,4	15,54
6	DHA	2,29	5,77	2,38	11,58
7	DHA	3,1	7,77	3,03	9,59
8	Lecitina	2,77	11,58	5,11	5,18
9	EPA	3,61	11,89	3,45	12,13
10	DHA	5,58	12,27	5,32	9,49
11	EPA	2,66	3,34	3,45	5,94
12	DHA		7,28	3,05	9,48
13	EPA	2,2	5,58	2,52	11,01
14	Lecitina	3,41	13,99	3,31	19,00
15	DHA	2,9	11,34	2,8	16,3
16	Lecitina	3,44	8,09	3,99	13,32
17	EPA	2,73	4,42	2,94	13,76
18	Lecitina	3,7	3,79	1,21	3,03
19	DHA	3,03	10,42	2,76	12,45
20	Lecitina	2,45	14,65		17,88
21	DHA	3,41	8,2	3,09	4,25
23	DHA	1,57	3,14	2,44	4,48
24	EPA	3,45	10,02	3,56	11,66
25	EPA	2,79	12,12	4,05	16,24
26	EPA	3,07	6,31	4,07	5,94

27	Lecitina	4,3	8,81	6,79	10,93
28	DHA	4,85	7,42	3,16	7,26
29	EPA	2,66	4,45	3,45	11,09
30	DHA	2,42	6,23	3,77	6,39
31	DHA		7,88	3,38	12,07
32	Lecitina	2,26	11,12	3,39	13,84
33	DHA	1,71	8,63		7,16
34	DHA	3,14	4,21	3,49	11,24
35	DHA	4,47	13,45	4,2	13,64
36	Lecitina	3,71	13,08	4,1	14,93
37	DHA	2,24	7,67	2,21	12,95
38	DHA	3,4	5,49	2,32	5,55
39	Lecitina	3,1	11,56	4,5	14,85
40	Lecitina	3,56		3,67	7,92
41	DHA	5,2	7,35	4,8	9,15
42	EPA	4,38	9,11	4,57	12,1
43	Lecitina	4,27	5,86	3,87	11,14
44	EPA	2,87	10,8		
45	DHA		8,19	3,33	14,05
46	EPA	3,91	7,35	3,23	12,79
47	EPA	3,88	8,09	3,38	10,39
48	Lecitina	2,19	8,13	3,64	10,97

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.2 Análise do número de leucócitos circulantes antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 25** são referentes a análise do número de leucócitos circulantes de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 25 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise do número de leucócitos circulantes

Número atleta	Suplemento	LEUCÓCITOS (mil/mm ³)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	4,96	13,23	6,86	15,07
2	EPA	6,08	15,2	6,28	13,45
4	Lecitina	5,42	11,77	4,7	16,65
5	DHA	5,00	15,09	4,85	18,95
6	DHA	5,19	8,5	5,31	13,31
7	DHA	5,74	9,61	6,00	11,65
8	Lecitina	5,27	12,86	8,23	8,23
9	EPA	6,01	13,67	7,18	15,96
10	DHA	8,05	15,15	8,33	11,97
11	EPA	5,12	5,38	7,2	8,92
12	DHA		9,27	5,13	11,15
13	EPA	5,02	6,72	5,59	12,37
14	Lecitina	6,04	15,72	5,5	22,33
15	DHA	6,06	13,9	5,55	20,63
16	Lecitina	6,06	9,58	7,04	15,66
17	EPA	4,87	6,7	5,61	16,66
18	Lecitina	3,7	3,79	3,57	4,95
19	DHA	5,58	12,12	4,82	14,64
20	Lecitina	5,01	16,27		21,04
21	DHA	5,99	10,46	5,44	6,87
23	DHA	2,94	4,36	4,01	5,77
24	EPA	5,02	10,02	5,33	13,25
25	EPA	5,29	13,77	7,01	18,66
26	EPA	5,31	8,56	6,53	8,29
27	Lecitina	7,41	11,14	10,3	14,18
28	DHA	7,93	9,15	6,24	9,05
29	EPA	5,05	6,65	6,68	13,72
30	DHA	4,23	7,69	6,7	8,36
31	DHA		9,27	5,45	15,67
32	Lecitina	4,14	12,63	5,71	15,9

33	DHA	4,17	9,7		9,03
34	DHA	5,06	5,67	6,16	12,6
35	DHA	6,53	15,46	6,57	17,05
36	Lecitina	5,62	14,53	5,91	17,99
37	DHA	3,87	9,35	3,99	15,99
38	DHA	6,28	7,34	4,62	7,57
39	Lecitina	5,19	13,29	6,75	16,5
40	Lecitina	6,92		6,98	11,7
41	DHA	9,16	9,93	8,37	11,52
42	EPA	7,72	11,2	7,25	13,86
43	Lecitina	6,46	7,99	6,2	13,87
44	EPA	5,02	13,27		
45	DHA		10,61	6,84	18,25
46	EPA	6,85	9,31	6,05	15,98
47	EPA	5,56	9,4	5,49	13,49
48	Lecitina	4,7	10,55	6,85	13,06

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.3 Análise da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 26** são referentes a análise da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 26 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase

Número atleta	Suplemento	LACTATO DESIDROGENASE (U/L)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	614	836	625	744
2	EPA	525	910	518	740
4	Lecitina	630	966	610	928
5	DHA	516	869	476	869
6	DHA	524	751	651	829
7	DHA		747	555	703
8	Lecitina	611	902	576	724
9	EPA	540	152	583	1053
10	DHA	615	1153	699	883
11	EPA	738	758	705	749
12	DHA	778	759	665	817
13	EPA	577	755	533	852
14	Lecitina	642	773	442	912
15	DHA	473	803	464	919
16	Lecitina	609	802	575	962
17	EPA	611	844	646	901
18	Lecitina	504	611	508	621
19	DHA	329	692	342	736
20	Lecitina	670	747		905
21	DHA	540	677	550	625
23	DHA	421	639	501	709
24	EPA	480	959	494	769
25	EPA	530	759	583	843
26	EPA	572	654	622	734
27	Lecitina	641	807	610	785
28	DHA	603	793	594	633
29	EPA	516	704	616	764
30	DHA	607	882	653	823

31	DHA		696	825	1200
32	Lecitina	829	931	616	987
33	DHA		764		831
34	DHA	650	710	657	842
35	DHA	528	778	491	978
36	Lecitina	653	898	570	999
37	DHA	492	605	529	802
38	DHA	391	620	441	589
39	Lecitina	545	744	761	881
40	Lecitina	549		623	817
41	DHA	791	829	585	1023
42	EPA	669	644	467	699
43	Lecitina	761	977	674	819
44	EPA	446	894		
45	DHA	424	791	480	701
46	EPA	577	813	672	805
47	EPA	803	782	729	792
48	Lecitina	658	893	645	978

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.4 Análise da atividade máxima da enzima creatina quinase antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 27** são referentes a análise da atividade máxima da enzima creatina quinase de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 26 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase

Número atleta	Suplemento	CREATINA QUINASE (U/L)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	125	265	154	516
2	EPA	92	125	116	136
4	Lecitina	639	457	207	245
5	DHA	90	97	114	234
6	DHA	224	249	285	268
7	DHA		206	148	174
8	Lecitina	172	192	188	192
9	EPA	204	336	229	434
10	DHA	180	290	239	399
11	EPA	655	638	302	313
12	DHA	368	369	209	545
13	EPA	197	269	151	226
14	Lecitina	306	383	97	197
15	DHA	66	116	95	237
16	Lecitina	179	267	122	185
17	EPA	247	283	355	395
18	Lecitina	354	346	188	263
19	DHA	78	96	100	116
20	Lecitina	172	247		238
21	DHA	293	448	164	215
23	DHA	77	109	107	113
24	EPA	73	105	85	125
25	EPA	299	241	101	201
26	EPA	120	139	174	212
27	Lecitina	305	314	138	209
28	DHA	299	270	126	169
29	EPA	177	308	232	336
30	DHA	177	287	235	221
31	DHA		81	29	66

32	Lecitina	162	194	45	211
33	DHA		306		366
34	DHA	118	141	108	118
35	DHA	69	172	101	217
36	Lecitina	167	302	111	369
37	DHA	94	108	105	142
38	DHA	107	172	100	179
39	Lecitina	49	103	79	132
40	Lecitina	304		199	218
41	DHA	165	476	162	363
42	EPA	123	152	84	140
43	Lecitina	458	877	355	815
44	EPA	82	126		
45	DHA	148	225	51	129
46	EPA	274	448	132	167
47	EPA	202	218	137	175
48	Lecitina	1377	851	301	277

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.5 Análise da concentração plasmática de mioglobina antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 28** são referentes a análise da concentração plasmática de mioglobina de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 27 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de mioglobina

Número atleta	Suplemento	MIOGLOBINA (ng/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	29,2	519,8	39,1	237,2
2	EPA	44,1	195,7	48,7	149
4	Lecitina	75,2	779,2	63,1	535,4
5	DHA	32,8	107,8	37,3	319,7
6	DHA	25,5	81	25,6	107,3
7	DHA	29	141,5	29,8	152,2
8	Lecitina	21,5	182,6	30,7	200,4
9	EPA	45,1	1219	72,8	874,6
10	DHA	42,6	315,9	53,6	253
11	EPA	63,6	298	49,9	149,5
12	DHA	67,6	231,3	48,6	600,1
13	EPA	53,8	232	52,7	254,4
14	Lecitina	87,8	416,4	23,6	271,4
15	DHA	25,1	231,6	31,4	202,6
16	Lecitina	84,4	132,6	36,2	226,6
17	EPA	38	145	30,8	314,7
18	Lecitina	49,8	493,2	34,7	199,6
19	DHA	24	155,9	32,2	237,7
20	Lecitina	22,1	187,8		290,1
21	DHA	80,9	188	50,3	139,4
23	DHA	32,1	216,9	26,2	184,4
24	EPA	21	111,3	36,6	121,8
25	EPA	62	256,3	38,8	309,5
26	EPA	33,2	139,8	34,9	101,8
27	Lecitina	49,3	303,9	54	153,4
28	DHA	54,8	294,5	33,9	276,8
29	EPA	36,2	202,9	39,9	119,4
30	DHA	55	294,1	50,5	151,5
31	DHA		78,6	25	185,9

32	Lecitina	49,3	384,3	24,7	839,5
33	DHA		311		197,3
34	DHA	23,9	48,5	20,8	99,4
35	DHA	30,7	525,6	25,2	468,4
36	Lecitina	42,2	212,1	46,3	180,6
37	DHA	27,6	167,9	25,2	223
38	DHA	28,2	162,9	35,4	138,4
39	Lecitina	27,9	301,6	45,5	394,3
40	Lecitina	48,8		30,2	104,3
41	DHA	59,7	394	46,1	559,6
42	EPA	35,8	180,2	27,5	168,6
43	Lecitina	38,9	160,5	42,5	197,7
44	EPA	27,8	107		
45	DHA	28,4	192,1	18,7	337,7
46	EPA	124	210,1	50,2	256,5
47	EPA	52,1	159,3	41,9	422,2
48	Lecitina	131,2	513	39,2	374,8

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.6 Análise da concentração plasmática de proteína C reativa antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 29** são referentes a análise da concentração plasmática de proteína C reativa de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 29 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de proteína C reativa

Número atleta	Suplemento	PROTEÍNA C REATIVA (mg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	0,5	0,5	0,5	0,6
2	EPA	0,5	1	0,5	0,6
4	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,5
5	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
6	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
7	DHA		0,5	0,5	0,5
8	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,5
9	EPA	0,5	0,5	0,5	0,6
10	DHA	0,5	0,5	0,5	0,7
11	EPA	0,5	0,5	0,5	0,5
12	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
13	EPA	0,5	0,5	0,5	0,5
14	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,8
15	DHA	0,5	0,5	0,5	0,6
16	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,5
17	EPA	0,5	0,5	0,5	0,5
18	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,5
19	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
20	Lecitina	0,5	0,5		0,7
21	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
23	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
24	EPA	1	0,7	0,6	0,8
25	EPA	0,5	0,5	0,8	0,8
26	EPA	0,5	0,5	0,9	1
27	Lecitina	0,7	0,6	0,7	0,8
28	DHA	0,5	0,5	0,7	0,5
29	EPA	0,5	0,5	0,5	0,5
30	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
31	DHA		0,5	0,5	0,5

32	Lecitina	0,7	0,5	0,5	0,6
33	DHA		0,5		0,6
34	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
35	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
36	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,9
37	DHA	0,5	0,5	0,6	0,6
38	DHA	0,5	0,5	0,5	0,6
39	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,5
40	Lecitina	0,5		0,5	0,5
41	DHA	0,8	0,8	0,8	1,2
42	EPA	0,7	0,6	0,5	0,5
43	Lecitina	0,5	0,5	0,5	0,5
44	EPA	0,5	0,5		
45	DHA	0,5	0,5	0,5	0,5
46	EPA	0,5	0,5	0,5	0,5
47	EPA	0,5	0,5	0,5	0,5
48	Lecitina	0,7	0,5	0,7	0,8

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

ANEXO E

1 Quadros contendo os dados individuais dos atletas utilizados para análise de citometria de fluxo.

1.1 Análise da expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de neutrófilos antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 30** são referentes a análise da expressão do receptor Fas (CD95) na superfície de neutrófilos de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 28 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão do receptor Fas (CD95) na superfície do neutrófilo

Número atleta	Suplemento	RECEPTOR FAS (CD-95) (Valor relativo)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	1,85	26,63	29,68	10,89
2	EPA	1,97	22,32	22,46	12,38
4	Lecitina	14,98	49,74	48,07	9,91
5	DHA	54,61	13,71	15,53	8,60
6	DHA	26,37	25,42	29,88	11,66
7	DHA	28,48	22,64	35,40	10,56
8	Lecitina	37,46	23,74	37,91	12,72
9	EPA	29,78	23,06	31,17	9,76
10	DHA	21,32	1,26	29,97	14,21
11	EPA	20,79	23,90	37,67	13,71
12	DHA	5,64	13,89	22,14	10,75
13	EPA	6,00	24,64	31,43	10,06
14	Lecitina	31,64	27,17	30,77	9,65
15	DHA	13,37	24,39	27,23	5,07
16	Lecitina	10,04	26,25	32,08	19,77
17	EPA	31	15,34	37,72	17,58
18	Lecitina	37,60	44,54	58,30	17,15
19	DHA	42,20	31,60	45,38	10,74
20	Lecitina	27,98	18,73	31,71	8,06
21	DHA	24,44	22,43	30,89	6,35
23	DHA	29,20	31,78	40,05	6,38
24	EPA	36,73	29,19	49,43	6,48
25	EPA	32,54	17,55	31,54	5,85

26	EPA	15,26	11,32	20,95	6,86
27	Lecitina	31,91	11,20	35,69	6,31
28	DHA	12,72	4,43	17,67	6,30
29	EPA	20,86	23,28	38,05	5,97
30	DHA	26,34	23,63	29,19	6,58
31	DHA		29,98	46,97	5,82
32	Lecitina	22,32	4,72	29,73	5,97
33	DHA	34,10	16,35		6,53
34	DHA	13,50	11,42	17,86	6,78
35	DHA	26,44	19,08	45,17	7,20
36	Lecitina	28,28	24,11	51,58	6,26
37	DHA	17,58	5,95	21,06	6,04
38	DHA	33,91	25,72	54,28	6,78
39	Lecitina	27,99	20,87	29,98	5,88
40	Lecitina	22,93		27,31	7,09
41	DHA	3,21	12,26	14,57	6,43
42	EPA	24,99	27,91	36,49	6,02
43	Lecitina	9,89	23,96	52,86	7,04
44	EPA	13,90	12,80		
45	DHA	31,78	26,27	31,97	6,42
46	EPA	13,96	27,91	24,54	7,96
47	EPA	21,93	18,54	33,04	6,87
48	Lecitina	26,40	17,13	37,39	6,38
49	DHA	26,97	29,41	57,64	

Fase I= pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.2 Análise da expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície de neutrófilos antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 31** são referentes a análise da expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície de neutrófilos de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 29 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão do receptor TRAIL (CD253) na superfície do neutrófilo

Número atleta	Suplemento	RECEPTOR TRAIL (CD-253) (Valor relativo)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	6,49	3,03	4,10	9,83
2	EPA	8,13	1,86	9,23	8,01
4	Lecitina	17,24	3,72	10,61	7,49
5	DHA	37,06	3,76	8,10	5,11
6	DHA	14,40	3,54	9,91	7,77
7	DHA	8,91	6,30	4,16	7
8	Lecitina	13,10	3,20	5,18	6,42
9	EPA	34,06	3,57	10,06	5,99
10	DHA	7,94	5,30	7,34	6,92
11	EPA	14,29	3,82	10,35	19,27
12	DHA	23,67	3,06	9,31	7,96
13	EPA	134,41	2,65	7,92	11,30
14	Lecitina	2,09	4,43	7,33	310,89
15	DHA	26,43	2,60	7,04	110,43
16	Lecitina	2,58	4,21	9,89	144,30
17	EPA	6,55	3,11	9,06	60,24
18	Lecitina	109,58	2,68	10,77	42,99
19	DHA	59,48	4,14	14,8	15,66
20	Lecitina	76,45	3,09	7,32	11,70
21	DHA	6,01	2,71	8,94	10,94
23	DHA	25,38	6,02	5,47	13,83
24	EPA	5,90	2,46	11,70	20,53
25	EPA	60,80	5,95	8,36	10,55
26	EPA	6,63	2,99	3,27	10,08
27	Lecitina	12,91	3,48	9,16	34,99
28	DHA	7,37	3,35	6,10	23,62
29	EPA	24,86	4,60	3,65	32,77
30	DHA	8,59	2,36	4,18	22,63

31	DHA			6,41	31,19
32	Lecitina	12,55	1,95	5,58	22,26
33	DHA	23,98	2,61		24,79
34	DHA	10,28	423	6,38	18,04
35	DHA	4,12	2,71	6,38	16,61
36	Lecitina	6,36	2,54	6,09	19,42
37	DHA	6,09	2,61	8,20	26,28
38	DHA	8,27	4,35	9,81	87,31
39	Lecitina	2,04	2,28	5,72	28,90
40	Lecitina	6,55	2,15	9,92	13,20
41	DHA	154,27	2,71	6,70	11,46
42	EPA	7,01	2,40	7,31	14,71
43	Lecitina	12,26	1,82	5,87	11,36
44	EPA	2,27	2,11		
45	DHA	4,58	2,52	6,31	12,41
46	EPA	2,73	2,63	6,38	17,08
47	EPA	6,61	3,57	7,36	13,27
48	Lecitina	10,74	2	5,85	21,60
49	DHA	16,44	1,16		

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.3 Análise da expressão de L-selectina na superfície de neutrófilos antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 32** são referentes a análise da expressão de L-selectina na superfície de neutrófilos de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 30 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão de L-selectina (CD62) na superfície do neutrófilo

Número atleta	Suplemento	L-SELECTINA (CD-62) (Valor relativo)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	17,60	0,56	4,18	5,82
2	EPA	38,10	1,27	9,93	5,90
4	Lecitina	4,30	1,02	7,67	5,95
5	DHA	1,54	1,14	4,40	3,98
6	DHA	3,95	1,37	6,32	6,03
7	DHA	0,60	0,45	6,60	3,55
8	Lecitina	2,52	0,99	7,70	6,87
9	EPA	8,36	1,17	8,06	4,05
10	DHA	0,97	0,76	5,14	7,63
11	EPA	0,92	0,52	6,34	12,32
12	DHA	13,82	0,85	4	5,94
13	EPA	8,26	0,62	7,71	6,01
14	Lecitina	3,61	0,99	5,13	4,08
15	DHA	5,92	0,92	8,01	6,45
16	Lecitina	3,72	1,17	8,93	5,57
17	EPA	3,07	1,34	12,34	3,74
18	Lecitina	1,39	0,66	7,26	6,09
19	DHA	5,90	0,82	6,47	3,56
20	Lecitina	6,69	1,20	4,97	3,38
21	DHA	0,23	0,17	5,37	4,50
23	DHA	2,95	0,73	4,16	4,90
24	EPA	1,16	0,59	7,82	7,85
25	EPA	1,44	0,30	4,85	3,96
26	EPA	0,68	0,37	3,23	3,34
27	Lecitina	0,70	0,42	4,84	7,72
28	DHA	0,22	0,15	4,13	7,70
29	EPA	9,78	1,40	4,44	9,58
30	DHA	1,12	0,44	4,45	7,98
31	DHA			5,17	7,76
32	Lecitina	3,95	2,37	6,26	6,62

33	DHA	5,23	0,30		6,89
34	DHA	3,66	0,39	4,34	7,72
35	DHA	0,60	0,42	5,30	5,52
36	Lecitina	1,40	0,58	5,44	4,66
37	DHA	1,20	0,77	3,48	10,41
38	DHA	0,89	0,26	4,92	9,28
39	Lecitina	0,08	0,07	3,19	5,77
40	Lecitina	0,72		4,94	3,13
41	DHA	6,41	0,50	3,07	
42	EPA	0,56	0,32	5,08	5,24
43	Lecitina	1,45	0,20	7,22	5,28
44	EPA	0,95	0,65		
45	DHA	0,77	0,45	8,79	4,33
46	EPA	1,52	1,15	9,28	5,28
47	EPA	0,32	0,18	4,84	6,98
48	Lecitina	1,72	0,67	3,12	5,92
49	DHA	1,76	0,11		

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.4 Análise da expressão de ICAM-1 na superfície de neutrófilos antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 33** são referentes a análise da expressão de ICAM-1 na superfície de neutrófilos de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 31 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da expressão de ICAM-1 (CD54) na superfície do neutrófilo

		ICAM-1 (CD-54) (Valor relativo)			
Número atleta	Suplemento	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	0,16	0,37	3,08	1,97
2	EPA	0,28	1,15	6,39	2,29
4	Lecitina	2,37	0,55	3,14	1,91
5	DHA	0,92	0,53	2,37	1,62
6	DHA	1,07	1,30	4,20	2
7	DHA	0,28	0,11	2,22	1,82
8	Lecitina	1,23	0,49	2,94	2,27
9	EPA	5,03	0,56	3,93	1,63
10	DHA	0,43	0,03	3,58	2,50
11	EPA	0,26	0,18	4,26	2,28
12	DHA	0,30	0,42	4,97	1,82
13	EPA	1,49	0,41	4,95	1,84
14	Lecitina	1,46	0,69	3,86	1,75
15	DHA	1,41	0,43	3,50	1,03
16	Lecitina	1,83	0,49	4,95	3,69
17	EPA	1,19	0,31	9,21	3,19
18	Lecitina	0,54	0,52	3,29	2,90
19	DHA	1,58	0,46	2,28	1,70
20	Lecitina	1,90	0,61	3,49	1,39
21	DHA	0,11	0,10	3,50	1,08
23	DHA	1,06	0,47	3,86	1,13
24	EPA	0,53	0,36	9,44	1,07
25	EPA	0,51	0,15	3,82	1,03
26	EPA	0,51	0,25	4,22	1,06
27	Lecitina	0,24	0,09	4,74	1,12
28	DHA	0,16	0,05	3,75	1,19
29	EPA	2,97	1,41	4,63	1,10
30	DHA	0,42	0,33	2,33	1,09
32	Lecitina	0,27	0,23	4,28	1

34	DHA	1,52	0,39	4,39	1,17
35	DHA	0,49	0,55	3,85	1,13
37	DHA	0,28	0,07	4,05	1,04
38	DHA	0,10	0,04	3,43	1,03
39	Lecitina	0,53	0,19	1,65	1,15
41	DHA	1,08	0,19	1,99	1,05
42	EPA	0,22	0,26	2,36	0,99
43	Lecitina	0,54	0,23	1,73	1,10
45	DHA	0,28	0,24	2,98	1,04
46	EPA	0,73	0,46	6,97	1,21
47	EPA	0,12	0,06	1,73	1,09
48	Lecitina	1,08	0,34	1,57	1,06
49	DHA	0,16	0,37	3,08	1,97

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.5 Análise da porcentagem de neutrófilos com externalização de fosfatidilserina antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 34** são referentes a análise da porcentagem de neutrófilos com externalização de fosfatidilserina de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 32 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da externalização de fosfatidilserina em neutrófilo

Número do atleta	Suplemento	EXTERNALIZAÇÃO DE FS (%)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
2	EPA	0,17	8,13	49,35	71,05
5	DHA	5,15	16,52	63,46	76,04
6	DHA	8,57	13,74	59,45	80,11
7	DHA	7,02	23,15	33,01	84,24
8	Lecitina	3,35	10,55	33,31	48,54
9	EPA	1,53	16,51	23,68	61,16
10	DHA	8,34	11,37	23,32	79,42
11	EPA	2,71	18,47	0,77	64,26
12	DHA	0,65	14,89	33,16	40,54
13	EPA	2,13	17,31	55,17	14,93
14	Lecitina	3,5	13,1	64,81	21,3
15	DHA	2,91	11,48	69,28	2,23
16	Lecitina	0,58	14,67	25,48	54,49
17	EPA	0,71	8,21	65,34	34,22
18	Lecitina	7,63	24,32	48,57	66,32
19	DHA	1	16,47	59,89	43,43
20	Lecitina	6,17	9,63	46,44	0,23
21	DHA	2,14	28,25	61,15	1,02
23	DHA	2,75	22,37	39,01	32,01
24	EPA	3,32	21,48	51,46	38,88
25	EPA	0,85	16,89	67,72	22,41
26	EPA	3,89	22,65	52,86	31,52
27	Lecitina	2,29	17,83	58,44	57,75
28	DHA	1,31	29,41	47,26	66,74
29	EPA	1,7	14,14	70,89	38,84
30	DHA	4,52	18,12	62,66	37,51
32	Lecitina	1,02	15,98	58,12	30,69
34	DHA	3,41	19,39	66,09	25,34
35	DHA	2,28	10,76	53,23	17,47
36	Lecitina	1,79	17,51	71,47	29,32

37	DHA	2,04	36,9	71,44	59,57
38	DHA	5,48	30,35	63,09	19,4
39	Lecitina	1,54	20,08	56,19	30,54
41	DHA	0,82	34,93	53,54	23,07
42	EPA	0,15	16,97	30,88	31,34
45	DHA	1,77	39,55	36,27	19,38
46	EPA	1,68	17,37	52,55	25
47	EPA	0,88	16,68	40,74	21,56
48	Lecitina	1,15	17,39	56,36	6,66

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.6 Análise da porcentagem de neutrófilos com DNA fragmentado antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 35** são referentes a análise da porcentagem de neutrófilos com DNA fragmentado de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 33 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da fragmentação de DNA do neutrófilo

Número atleta	Suplemento	FRAGMENTAÇÃO DE DNA (%)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	2,88	21	13,63	0,21
2	EPA	1,5	1,58	7,15	0,09
5	DHA	1,81	76,19	17,19	0,17
6	DHA	1,65	1,7	6,12	0,31
7	DHA	2,64	5,09	8,29	0,25
8	Lecitina	2,27	1,59	50,83	0,08
9	EPA	3,42	1,31	16,55	0,02
10	DHA	4,59	4,48	16,83	1,09
11	EPA	2,34	6,2	45,94	0,17
12	DHA	2,25	9,55	17,68	0,07
14	Lecitina	7,11	1,33	17,07	0,27
15	DHA	2,89	0,93	29,44	0,37
18	Lecitina	6,52	4,42	8,22	0,71
19	DHA	6,91	0,56	30,96	0,02
20	Lecitina	7,29	1,21	20,69	0,08
25	EPA	6,74	2,56	31,52	0,03
35	DHA	0,87	8,91	11,59	0,13
37	DHA	1,02	1,84	28,92	0,08
39	Lecitina	1,96	3,21	34,91	0,14
43	Lecitina	7,34	9,5	17,08	0,08
46	EPA	6,78	6,47	23,02	0,14
47	EPA	7,08	21,42	19,03	0,27

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

ANEXO F

1 Quadros contendo os dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de citocinas.

1.1 Análise da concentração plasmática de TNF-alfa antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 36** são referentes a análise da concentração plasmática de TNF-alfa de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 34 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de TNF-alfa

Número atleta	Suplemento	TNF-alfa (pg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	14,45	15,21	5,7	7,89
2	EPA	13,44	19,62	6,34	9,94
4	PL	10,56	16,06	7,47	6,31
5	DHA	4,01	5,66	2,01	2,02
6	DHA	7,89	9,99	4,79	5,32
7	DHA	17,25	11,13	9,31	7,36
9	EPA	11,8	11,34	5,75	3,25
10	DHA	11,18	14,8	6,88	8,66
11	EPA	8,15	9,78	3,22	6,73
13	EPA	8,26	12,26	5,05	6,99
14	PL	9,46	15,56	2,81	4,89
15	DHA	15,16	12,31	7,79	8,05
16	PL	7,84	18,19	6,43	10,19
17	EPA	13,59	12	7,3	8,78
18	PL	10,97	9,05	4,54	11,58
19	DHA	6,56	10,46	3,08	5,68
20	PL	13,13	16,06	4,24	6,24
21	DHA	9,46	11,39	5,02	9,29
23	DHA	7,78	9,88	6,73	8,6
24	EPA	13,99		4,12	8,12
25	EPA	8,47	9,41	3,07	6,56
26	EPA	14,55	15,26	4,29	6,33
27	PL	16,66	25,12	7,02	17,83
28	DHA	9,88	19,96	3,3	6,59
29	EPA	9,2	8,73	5,1	3,38
30	DHA	7,73	10,51	5,64	6,16
32	PL	9,05	9,41	2,33	3,25

34	DHA	12,11	6,99	7,44	7,84
35	DHA	12,21	16,61	5,03	6,26
36	PL	8,63	10,87	2,79	13,22
37	DHA	10,66	15,46	5,4	7,28
39	PL	8,05	16,36	3,16	11,26
41	PL	11,03	11,18		
42	EPA	12,36	15,11	4,45	7,39
43	PL	9,57	10,87		5,83
45	DHA	12,52	14,25	7,61	6,85
46	EPA	8,73	12,57	5,58	6,16
47	EPA	8,63	9,2	7,75	10,17
48	PL	10,35	10,25	5,35	5,46

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.2 Análise da concentração plasmática de IL-8 antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 37** são referentes a análise da concentração plasmática de IL-8 de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 35 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-8

Número atleta	Suplemento	IL-8 (pg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	12,03	22,14	5,3	7,78
2	EPA	10	21,76	6,07	10,51
4	Lecitina	6,36	34,79	6,34	8,04
5	DHA	6,85	20,39	4,83	7,11
6	DHA	7,57	21,26	5,65	9,19
7	DHA	9,25	13,06	5,94	10,77
9	EPA	11,32	14,78	4,02	7,65
10	DHA	4,97	10,87	4,13	9,77
11	EPA	10,29	21,02	5,28	12,47
13	EPA	7,37	22,26	4,61	17,75
14	Lecitina	7,34	24,96	4,23	7,41
15	DHA	7,76	14,91	4,24	10,44
16	Lecitina	8,35	17	5,06	10,88
17	EPA	8,61	12,83	5,79	9,72
18	Lecitina	22,82	64,77	8,31	17,32
19	DHA	31,44	49,15	13,38	25,63
20	Lecitina	8,54	16,68	3,27	11,8
21	DHA	7,31	14,01	4,62	19,7
23	DHA	4,9	10,48	6,44	12,57
24	EPA	12,48	10,23	4,45	12,85
25	EPA	5,81		2,96	5,92
26	EPA	10,81	13,06	4,48	6,1
27	Lecitina	10,42	28,41	5,13	15,66
28	DHA	5,23	25,61	8,3	20,55
29	EPA	4,48	18,57	6,33	8,31
30	DHA	21,02	41,59	5,98	9,94
32	Lecitina	10,03	15,29	6,86	10,97
34	DHA	13,89	8,87	7,48	13,43
35	DHA	10,74	24,19	6,69	12,4
36	Lecitina	5,16	24,68	3,24	28,09
37	DHA	8,41	23,19	7,39	9,96

39	Lecitina	10,03	19,51	3,38	11,33
41	Lecitina	11	14,33		
42	EPA	7,63	20,92	3,7	8,73
43	Lecitina	9,03	10,87		10,07
45	DHA	8,02	21,51	7,07	15,34
46	EPA	5,55	18,89	4,2	4,85
47	EPA	8,74	17,44	5,94	10,38
48	Lecitina	9,16	15,1	4,44	10,94

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.3 Análise da concentração plasmática de IL-6 antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 38** são referentes a análise da concentração plasmática de IL-6 de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 36 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-6

Número atleta	Suplemento	IL-6 (pg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	0,33	8,75	0,55	5,06
2	EPA	0,54	13,68	1,62	13,42
4	Lecitina	0,4	16,75	2,21	8,24
5	DHA	0,27	10,78	0,48	4,86
6	DHA	2,76	6,98	1,43	12,36
7	DHA	0,7	4,62	0,94	9,68
9	EPA	0,62	13,22	1,51	6,24
10	DHA	0,47	11,32	2,68	13,47
11	EPA	0,13	4,62	0,87	17,03
13	EPA	0,27	6,18	1,26	16,96
14	Lecitina	0,27	28,28	0,71	8,9
15	DHA	0,27	7,49	2,11	7,09
16	Lecitina	0,22	15,21	1,3	17,67
17	EPA	0,22	3,67	4,1	13,23
18	Lecitina	1,37	25,06	1,58	21,11
19	DHA	0,54	20,29	0,74	13,92
20	Lecitina	0,09	11,54	0,75	16,45
21	DHA	0,24	7,79	0,46	13,35
23	DHA	0,22	4,07	0,61	9,64
24	EPA	1,06		1,93	6,07
25	EPA	0,54	11,09	1,39	9,59
26	EPA	0,17	3,94	0,57	2,48
27	Lecitina	0,97	14,45	2,08	29,1
28	DHA	0,33	25,6	1,76	9,63
29	EPA	0,62	3,81	2,48	4,61
30	DHA	1,06	13,53	0,56	4,9
32	Lecitina	1,86	14,91	0,89	13,47
34	DHA	0,92	1,37	1,36	8,2
35	DHA	0,7	12,61	1,12	14,54
36	Lecitina	0,13	7,93	0,82	17,17
37	DHA	1,26	34,83	4,43	18,06

39	Lecitina	0,43	19,06	0,4	28,33
41	Lecitina	1,92	14,91		
42	EPA	0,83	9,43	0,92	7,81
43	Lecitina	0,27	2,52		13,55
45	DHA	1,98	15,68	1,07	11,04
46	EPA	0,4	24,44	3,82	16,89
47	EPA	0,62	6,9	0,98	8,69
48	Lecitina	0,13	6,4	1,8	13,41

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.4 Análise da concentração plasmática de IL-4 antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 39** são referentes a análise da concentração plasmática de IL-4 de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 39 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-4

Número atleta	Suplemento	IL-4 (pg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	2,84	2,84	4,84	11,53
2	EPA	0,34	0,83	3,47	2,9
4	Lecitina	0,2	1,8	14,95	11,53
5	DHA	0,34	0,72	0,52	0,91
6	DHA	18,39	4,45	5,24	6,26
7	DHA	1,49	0,95	2,18	3,09
9	EPA	0,34	0,34	0,2	0,06
10	DHA	0,51	0,51	6,05	3,66
11	EPA	0,61	0,61	3,66	8,35
13	EPA	0,03	0,34	0,64	0,06
14	Lecitina	0,34	0,2	0,91	1,84
15	DHA	0,42	0,51	30,84	18,56
16	Lecitina	0,72	0,34	2,18	6,05
17	EPA	0,72	0,34	16,23	0,64
18	Lecitina	67,43	1,35	57,16	78,51
19	DHA	0,61	1,21	5,04	9,83
20	Lecitina	0,51	0,51	5,04	2,18
21	DHA	1,96	1,08	1,2	22,15
23	DHA	0,72	0,34		
24	EPA	2,13		21,73	1,84
25	EPA	0,34	0,1	2,9	4,05
26	EPA	0,34	0,1	4,84	1,2
27	Lecitina	1,64	3,03	0,77	2,72
28	DHA	1,21	1,64	0,64	0,64
29	EPA	0,34	0,34	22,57	7,09
30	DHA	16,59	18,39	16,01	21,31
32	Lecitina	11,99	10,35	2,54	4,44
34	DHA	0	0,1	0,01	0
35	DHA	0,72	0,51	10,25	6,47
36	Lecitina	0,72	0,2	3,66	7,72
37	DHA	0,51	0,34	0,4	1,51

39	Lecitina	0,51	0,51	1,51	3,28
41	Lecitina	7,74	8,25		
42	EPA	1,8	0,95	7,3	14,73
43	Lecitina	0,34	0,2		8,56
45	DHA	8,25	6,75	11,53	11,96
46	EPA	2,48	1,49	1,51	3,28
47	EPA	4,03	2,84	3,28	6,88
48	Lecitina	0,2	0,2	10,89	20,46

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.5 Análise da concentração plasmática de IL-10 antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 40** são referentes a análise da concentração plasmática de IL-10 de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 37 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-10

Número atleta	Suplemento	IL-10 (pg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	1,78	83,23	6,17	135
2	EPA	2,41	93,88	6,91	147
4	Lecitina	0,11	367	3,15	47,01
5	DHA	1,15	97,87	1,86	470
6	DHA	7,91	875	9,34	341
7	DHA	1,78	11,19	4,19	117
9	EPA	0,57	74,55	4,36	144
10	DHA	0,52	128	4,72	350
11	EPA	1,02	91,95	6,08	381
13	EPA	0,38	69,33	4,36	806
14	Lecitina	0,22	63,99	0,88	223
15	DHA	4,85	96,45	11,8	613
16	Lecitina	0,9	137	4,81	305
17	EPA	0,78	9,85	14,17	111
18	Lecitina	2,91	328	29,5	194
19	DHA	1,86	126	4,19	245
20	Lecitina	0,73	183	4,01	1109
21	DHA	0,9	95,16	4,54	1069
23	DHA	0,78	19,29		
24	EPA	5,24		8,77	109
25	EPA	0,67	71,24	2,17	316
26	EPA	0,9	19,53	16,36	46,83
27	Lecitina	3,35	65,64	9,81	138
28	DHA	1,15	296	2,65	161
29	EPA	1,02	15,76	10,85	44,94
30	DHA	2,83	82,34	15,79	183
32	Lecitina	3,71	71,11	8,02	113
34	DHA	0,67	0,78	0,88	44,85
35	DHA	1,02	68,95	6,35	52,39
36	Lecitina	1,28	154	6,44	1151

37	DHA	2,17	274	2,65	486
39	Lecitina	0,57	195	1,57	1068
41	Lecitina	0,78	1,08		
42	EPA	1,49	26,15	3,84	45,66
43	Lecitina	0,38	2,17		15,41
45	DHA	6,65	32,15	22,97	151
46	EPA	0,9	38,09	6,26	213
47	EPA	2,25	54	2,17	239
48	Lecitina	1,42	26,64	16,74	277

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

1.6 Análise da concentração plasmática de IL-1beta antes e após a meia maratona e suplementação

Os dados apresentados no **Quadro 41** são referentes a análise da concentração plasmática de IL-1beta de cada atleta que participou do estudo. As análises foram realizadas tanto antes (Fases I e II) como após o período de suplementação (Fases III e IV).

Quadro 38 – Dados individuais dos atletas utilizados para análise da concentração plasmática de IL-1beta

Número atleta	Suplemento	IL1-Beta (pg/mL)			
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
1	DHA	0,57	0,75	0,23	0,95
2	EPA	0,45	0,57	0,33	0,14
4	Lecitina	0,27	0,66	0,88	0,52
5	DHA	0,27	0,34	0	0,01
6	DHA	3,44	1,86	0,2	0,39
7	DHA	0,85	1,27	0,08	0,02
9	EPA	0,21	0,21	0,15	0,06
10	DHA	0,34	0,18	0,17	0,06
11	EPA	0,57	0,27	0,14	0,31
13	EPA	0,11	0,49		0,01
14	Lecitina	0,27	0,34	0,18	0,33
15	DHA	0,57	0,45	0,88	0,85
16	Lecitina	0,57	0,27	0,11	0,52
17	EPA	0,45	0,16	0,41	0,01
18	Lecitina	1,5	0,27	1,71	1,84
19	DHA	0,49	0,49	0,2	0,29
20	Lecitina	0,41	0,27	0,33	0,12
21	DHA	0,49	0,41	0,29	1,32
23	DHA	0,27	0,11	0,08	0,07
24	EPA	1,05		1,29	0,56
25	EPA	0,27	0,34	0,03	0,92
26	EPA	0,04	0,21	1,2	0
27	Lecitina	1,05	1	0,28	0,31
28	DHA	0,41	0,34	0,47	0,87
29	EPA	0,27	0,37	0,39	0,44
30	DHA	1,38	1,67	0	0,06
32	Lecitina	1,8	1,98	0,29	0,36
34	DHA	0,85	0,21	0,62	0,25
35	DHA	0,41	0,41	0,7	0,33
36	Lecitina	0,34	0,34	0,36	0,29
37	DHA	0,57	0,21	0,39	0,41

39	Lecitina	0,34	0,41	0,08	0,14
41	Lecitina	0,85	0,85		0,36
42	EPA	0,57	0,57	0,11	1,23
43	Lecitina	0,34	0,21		
45	DHA	1,8	1,38	0,31	0,23
46	EPA	0,66	0,34	0,17	0,29
47	EPA	0,95	0,7	1,04	1,62
48	Lecitina	0,49	0,27	1,26	0,59

Fase I = pré meia maratona sem suplementação.

Fase II = pós meia maratona sem suplementação.

Fase III = pré meia maratona com suplementação.

Fase IV = pós meia maratona com suplementação.

ANEXO G

Artigo 1 - SANTOS, V. C. et al. Effect of regular exercise on leukocyte function in young and middle-aged women. **Journal of Exercise Science & Fitness**, v. 11, n. 2, p. 57-62, 2013.

Original article

Effect of regular exercise on leukocyte function in young and middle-aged women

Vinicius C. Santos, Izildinha R. Procida, Evelin A.A. Zicolau, Elaine Hatanaka, Cristina Borges-Silva, Tania C. Pithon-Curi, Maria F. Cury-Boaventura*

Institute of Physical Activity and Sports Sciences, Postgraduate Program in Human Movement Sciences, Cruzeiro do Sul University, Rua Galvão Bueno, 868 CEP 01506-000, São Paulo, SP, Brazil

Received 19 January 2012; revised 13 May 2013; accepted 13 May 2013

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of regular training on lymphocyte proliferation, plasma cytokine levels, and parameters of neutrophil and lymphocyte death in young women (YW) and middle-aged women (MAW). Thirteen untrained YW, 12 untrained MAW, 12 trained YW, and 17 trained MAW participated in this investigation. The characteristics measured were lymphocyte proliferation, plasma cytokine levels, and parameters of neutrophil and lymphocyte death (viability, DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization, and mitochondrial depolarization). The lymphocyte proliferation of untrained MAW was 30% lower than that of untrained YW. The YW had a significant decrease in the viability of lymphocytes and neutrophil compared with that of MAW ($p < 0.05$). The training prevented the loss of neutrophil viability observed in YW ($p < 0.05$). By contrast, regular exercise caused increases in lymphocyte apoptosis in both YW and MAW ($p < 0.05$) and neutrophil apoptosis in MAW only ($p < 0.05$). The plasma concentration of interleukin-1ra (IL-1ra) was increased (fourfold) by regular activity in YW, and the IL-2 plasma levels were increased (twofold) in the YW compared with those of MAW. Lymphocyte function and cytokine release were impaired in MAW, and regular activity partially prevented these alterations.

Copyright © 2013, The Society of Chinese Scholars on Exercise Physiology and Fitness. Published by Elsevier (Singapore) Pte Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cytokine; Lymphocyte; Middle-aged women; Neutrophil; Regular activity

Introduction

Research on aging is critical because of the enormous healthcare costs associated with supporting a rapidly increasing elderly population. Aging can trigger immune suppression and is associated with increased risk for infectious diseases, autoimmune disorders, and tumor occurrence.¹ Several studies have investigated various agents, such as lifestyle factors (diet, physical activity, and others), which may delay this process.

Researchers have demonstrated that age-specific immunological mechanisms are influenced by gender and that immunosenescence does not affect men and women in the same manner.^{2,3} The age-specific impairment in T cells is greater in women than in men.⁴ Postmenopausal women have decreased T-cell function compared with that in premenopausal women due to the estradiol-to-estrone change in circulating estrogen levels. These sexual hormones affect the activity of the immune system differently.²

Regular exercise has many benefits for older people, including improvements in cardiovascular fitness, increases in muscle mass, decreases in the risk factors associated with many life-threatening diseases (e.g., hypertension, cardiovascular diseases, diabetes, and obesity), and strengthening of natural immunity.^{5–9} However, further research on the changes in immune function as a consequence of physical exercise in aging is

* Corresponding author. Institute of Physical Activity and Sports Sciences, Postgraduate Program in Human Movement Sciences, Cruzeiro do Sul University, Rua Galvão Bueno, 868 CEP 01506-000, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: maria.boaventura@cruzeirodusul.edu.br (M.F. Cury-Boaventura).

required. Regular physical activity has beneficial effects on physical and psychological health, as well as on leukocyte function, in young and aged individuals.^{10,11} Many researchers have suggested that regular physical activity decreases the risk of respiratory infection. The “J hypothesis” suggests that low- and moderate-intensity exercise improves immune function, whereas strenuous exercise or overtraining suppresses it.¹² Therefore, regular exercise is of great importance, especially for older people. Nevertheless, no studies have so far evaluated the effect of regular low-intensity training on immune function in middle-aged people.

Leukocyte function and apoptosis are blood markers of immune function.¹³ The relationships between age, cytokines, and disease behavior have been studied.¹⁴ Production and release of cytokine play an important role in the first stages of the inflammatory response.¹⁵ Interleukin-2 (IL-2), which is primarily produced by T lymphocytes and natural killer (NK) cells, is a cytokine that participates in many regulatory effects in cells. IL-2 also plays a key role in humoral and inflammatory cellular responses.¹⁶ IL-1ra acts as an antagonist to two other cytokines, namely, IL-1 α and IL-1 β , which are among the first mediators of the acute-phase response of inflammation.¹⁷

The hypothesis of this study was that the immune system of middle-aged people is normally depressed and that regular exercise can improve neutrophil and lymphocyte function. Therefore, we investigated the effects of regular training on the lymphocyte and neutrophil function and the IL-1ra and IL-2 plasma levels in young women (YW) and middle-aged women (MAW).

Materials and methods

Study design

The study protocol was approved by the Human Ethical Committee of the Cruzeiro do Sul University. Written informed consent was obtained from all volunteers. A total of 144 healthy women who visited a school and fitness center were recruited. We excluded women who had metabolic or cardiovascular diseases, those who were following any specific diet program, and those who smoked. Finally, 54 women were selected. The volunteers were divided into the following four groups: (1) 13 untrained YW in the age group of approximately 20.8 ± 2.3 years; body weight of 54.3 ± 1.85 kg; height of 160.3 ± 2.1 cm; and body fat of $25.0 \pm 1.09\%$; (2) 12 untrained MAW in the age group of approximately 53.6 ± 1.89 years; body weight of 68.2 ± 2.8 kg; height of 157.6 ± 2.4 cm; and body fat of $33.3 \pm 1.26\%$; (3) 12 trained YW in the age group of approximately 25.9 ± 1.3 years; body weight of 58.1 ± 1.5 kg; height of 165.0 ± 1.6 cm; and body fat of $26.6 \pm 1.5\%$; and (4) 17 trained MAW in the age group of approximately 56.8 ± 2.12 years; body weight of 60.2 ± 2.0 kg; height of 157.6 ± 1.3 cm; and body fat of $30.6 \pm 0.93\%$. The untrained YW and MAW did not practice regular physical exercise, according to the Baecke questionnaire (questionnaire about habitual physical activity level) that was adapted from Voorrips et al.¹⁸ The trained groups

performed 60-minute aerobic exercises (gymnastics and circular dance) two times a week at approximately 40% of their heart rate reserve. Prior to the study, the trained YW exercised for 4.3 ± 0.5 years, and the trained MAW exercised for 5.1 ± 0.5 years.

The blood samples of these groups were collected from the antecubital vein (20 mL) while the participants were at rest. The volunteers in the trained group did not exercise for at least 24 hours prior to the blood collection.

Isolation of neutrophils and lymphocytes

Human neutrophils and mononuclear cells from peripheral blood were isolated using a Histopaque gradient ($d = 1.077$), in accordance with the procedure mentioned in a previous study.¹⁹ Mononuclear cells were maintained in RPMI-1640 medium on plates for 30 minutes to allow for monocyte adherence and lymphocyte isolation. The supernatant, which contained the lymphocytes, was collected (purity = approximately 98%). A Neubauer chamber was examined under an optical microscope (Nikon, Melville, NY, USA) to count the neutrophils and lymphocytes.

Lymphocyte proliferation assay

Lymphocytes (2×10^6 cells/mL) were cultured and stimulated for 48 hours in the presence of $50 \mu\text{g/mL}$ concanavalin A (ConA). The cells were incubated in a humidified atmosphere at 5% CO_2 and 95% air at 37°C . Then $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{-thymidine}$ ($1 \mu\text{Ci/mL}$) was added to the medium, and the cells were incubated for an additional 18 hours. A liquid scintillation counter was used to analyze the radioactivity (Packard TRI-CARB 2100 TR counters; Packard Instruments Company, Downers Grove, IL, USA).²⁰

Cell viability assay

Approximately $50 \mu\text{L}$ of propidium iodide [PI; $20 \mu\text{g/mL}$ in phosphate-buffered saline (PBS)] was added to $500 \mu\text{L}$ of lymphocytes and neutrophils (1×10^6 cells/mL in PBS). The PI binds to DNA in cells that have lost membrane integrity by intercalating between the bases. The percentage of viable cells in each sample was determined using the FL2 fluorescence channel (orange-red fluorescence = $585/42 \text{ nm}$) of an FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson and Company, San Juan, PR, USA). A total of 10,000 events were analyzed in each experiment. The percentage of cells with high PI fluorescence was then evaluated using CellQuest software (Becton Dickinson and Co.).

DNA fragmentation

Neutrophils and lymphocytes were resuspended in a solution containing PI and Triton X-100 to allow for the prompt incorporation of the dye into the DNA. The cells were prepared according to the method reported by Nicoletti et al.²¹ for characterizing apoptotic cells. The DNA fragmentation was

determined using flow cytometry. Those samples in which PI was not incorporated into the fragmented DNA emitted low fluorescence in the FL2 channel. A total of 10,000 events were analyzed in each experiment. The percentage of cells with low PI fluorescence was then evaluated using CellQuest software (Becton Dickinson and Co.).

Measuring plasma cytokine levels

The plasma was separated by centrifuging the cell mixture for 10 minutes at 1200 rpm and 4 °C. The levels of IL-2 and IL-1ra in the plasma were measured using enzyme-linked immunosorbent assay with the R&D Systems Quantikine High Sensitivity kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The intra-assay coefficient of variance (CV) was 4.1–10%, the interassay CV was 6.6–8%, and the sensitivity was 0.0083 pg/mL.

Statistical analysis

The results are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean. Differences were assessed by two-way analysis of variance using InStat software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and the Bonferroni post-test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Untrained MAW (5089.6 ± 817 cpm) showed a 30% decrease in lymphocyte proliferation relative to that of untrained YW (7264 ± 355 cpm, $p < 0.05$). Trained MAW showed no difference in lymphocyte proliferation relative to that of the trained YW and untrained MAW (Fig. 1).

The YW, trained ($82.4 \pm 2\%$) and untrained ($87 \pm 3.5\%$), had a significant decrease in lymphocyte viability compared with that of trained and untrained MAW ($89.7 \pm 1.6\%$ and $95 \pm 0.9\%$, respectively, $p < 0.05$; Fig. 2A). The proportion of viable neutrophils in untrained YW ($85.4 \pm 2.8\%$) was significantly lower

Fig. 1. Proliferation capacity of lymphocytes from untrained and trained women of different ages (young and middle aged). Lymphocytes were plated and cultured for 24 hours in the presence of 50 μ g/mL concanavalin A. After 48 hours, [14 C]-thymidine (1 μ Ci/mL) was added to the medium, and the cells were incubated for another 18 hours. The radioactivity was analyzed using a liquid scintillation counter. The values are the mean $\pm$ standard error of the mean of 7–13 samples. * $p < 0.05$ for comparisons between young and middle-aged women.

Fig. 2. Percentage of (A) viable lymphocytes and (B) neutrophils from untrained and trained women of different ages (young and middle aged). Cells were isolated from the blood of trained and untrained women at rest. The histograms correspond to the distribution of the propidium iodide (PI) fluorescence intensity (log scale), which indicates the loss of membrane integrity. The values are the mean $\pm$ standard error of the mean of 7–13 samples. * $p < 0.05$ for comparisons between young and middle-aged women and ** $p < 0.05$ for comparisons between untrained and trained women.

than that of the untrained MAW ($93.4 \pm 1\%$, $p < 0.05$) and the trained YW ($92.5 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$; Fig. 2B).

Regular exercise caused significant increases of 2.5- and 3.5-fold ($p < 0.05$) in the proportion of lymphocytes with DNA fragmentation in both YW ($2.7 \pm 0.3\%$) and MAW ($2.2 \pm 0.2\%$), respectively, (Fig. 3A); however, it resulted in an increase in the neutrophil DNA fragmentation of the MAW ($9.4 \pm 2.8\%$, $p < 0.05$) volunteers only (Fig. 3B). Regular exercise increased the plasma concentration of IL-1ra in YW (from 78 ± 4 pg/mL to 251 ± 10 pg/mL, $p < 0.05$). This change was not observed in MAW (Fig. 4A). The IL-2 plasma levels were greater in YW (450 ± 161 pg/mL and 554 ± 82 pg/mL, $p < 0.05$, for untrained and trained, respectively) than in MAW (172 ± 73 pg/mL and 162 ± 39 pg/mL, $p < 0.05$, for untrained and trained, respectively; Fig. 4B).

Discussion

Aging increases the risk of malignancy and infection. Recently, many researchers have focused on the benefits of regular physical activity on the immune system in young and aged individuals.²² Although the alterations in the immune system that are triggered by acute exercise have been examined extensively,^{23,24} there are only a few studies about the effect of chronic exercise.

T-cell functions can be affected by aging, and these changes can be evaluated using the *in vitro* proliferative capacity in response to polyclonal mitogens, such as ConA or phytohemagglutinin (PHA).²⁵ Shinkai et al¹⁰ observed a reduction in

Fig. 3. Percentage of (A) lymphocytes and (B) neutrophils with fragmented DNA from untrained and trained women of different ages (young and middle aged). The percentage of lymphocytes (A) and neutrophils (B) with fragmented DNA is indicated. Cells were isolated from the blood of untrained and trained women at rest. Cells were stained with a buffer containing citrate, Triton X-100, and propidium iodide and analyzed using flow cytometry. The values are the mean $\pm$ standard error of the mean of 7–13 experiments. * $p < 0.05$ for comparisons between untrained and trained women.

Fig. 4. Plasma concentration of (A) IL-1ra and (B) IL-2 from untrained and trained women of different ages (young and middle aged). Plasma was isolated from the blood of untrained and trained women at rest. Plasma IL-2 and IL-1ra levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay with the R&D Systems Quantikine High Sensitivity kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for each cytokine. * $p < 0.05$ for comparisons between young and middle-aged women. ** $p < 0.05$ for comparisons between untrained and trained women. IL = interleukin.

the proliferative response of aged male participants, not only in response to PHA, but also in response to the pokeweed mitogen and alloantigens. A previous study suggested that the age-related reduction in T-cell responsiveness *in vitro* was accompanied by reduced IL-2 secretion and IL-2R α -chain expression.²⁶ The aging-influenced cell-mediated immunity may be directly attributed to the age-associated involution of the thymus.^{27,28}

Nieman et al.²⁹ demonstrated that moderate aerobic exercise for 12 weeks increased the NK-cell cytotoxicity or the T-lymphocyte mitogenesis in sedentary women. In addition, a 15-week period of intense exercise in aged rats prevented age-related declines in ConA-induced lymphocyte proliferation, as demonstrated by Nasrullah and Mazzeo.³⁰ Shinkai et al.¹⁰ reported an increase (40–50%) in the proliferative response of active elderly adults compared with that in sedentary ones. In our study, the lymphocyte proliferation in trained MAW was higher than that in untrained MAW. Therefore, the regular low-intensity exercise training improved the immune function. One possible limitation of the present study might be that we did not analyze neutrophil function by migration or phagocytosis capacity.

The number of lymphocytes and neutrophils increases during exercise; however, some studies have demonstrated that only the number of lymphocytes and not the number of neutrophils declined below the corresponding pre-exercise value 2 hours after physical activity.³¹ Recent studies suggest that the decline in leukocyte number after exercise occurs due to the induction of leukocyte death.³² Moreover, the increase in DNA fragmentation depends on the intensity and duration of the exercise.^{33,34}

Exhaustive exercise increases DNA fragmentation in the lymphocytes and neutrophils of athletes.^{35–38} The study of Lagranha et al.³⁹ showed an increase in the apoptosis of neutrophils obtained from immature and mature rats after a single session of exercise. Similar results were found by Levada-Pires et al.³⁶ in neutrophils from elite athletes after competing in a triathlon.

Only a few studies have examined the effect of low- to moderate-intensity exercise on the DNA fragmentation of neutrophils and lymphocytes. A previous study reported that moderate exercise has a protective effect against the DNA fragmentation of lymphocytes in rats.⁴⁰ In this study, we observed a slight increase in the lymphocyte death by necrosis in YW and in the neutrophil death in untrained YW. In addition, we demonstrated that the percentage of lymphocyte apoptosis increased among trained women relative to that in untrained women for both age groups. Furthermore, the percentage of neutrophil death also increased in the trained MAW relative to that in the untrained MAW group. These results suggested that the regular training was also able to induce cell death in the lymphocytes of YW and MAW and in the neutrophils of MAW.

Aging is associated with impairment (in number and function) of a wide diversity of cell types, including those from the immune system. Therefore, the excessive apoptotic cell death appears to be an important event in immunosenescence. Phelouzat et al.⁴¹ demonstrated that mature activated T lymphocytes from old

people are more susceptible to apoptosis than those from young controls. Studies of aging using animal models and humans have suggested that changes or defects in T-cell apoptosis may be an important mechanism for age-related immune depression.⁴²

A decrease in the inflammatory cytokine production by circulating mononuclear cells from older people has also been observed.⁴³ Therefore, the authors suggested that chronic elevated levels of proinflammatory cytokines might induce a negative feedback in the capacity of blood mononuclear cells to produce the same cytokines.⁴³ Muscle damage and impaired repair mechanisms after muscle injury may contribute to the impaired muscle function in older participants.⁴⁴

The IL-2 cytokine is necessary for T-cell development in both the thymus and the periphery. Moreover, appropriate concentrations of IL-2 are required to maintain lymphocyte homeostasis.¹⁶

A previous study demonstrated decreases in plasma IL-2 concentrations with aging.²⁶ The same result was observed in our study for the sedentary and active groups. Drela et al⁴⁵ showed an increase in the production of IL-2 after moderate exercise, which contributed to the restoration of T cells.

However, other studies did not find any modulation of IL-2 concentration after regular physical activity. After 12 weeks of progressive strength training, the plasma IL-2 concentration of healthy older participants did not change.⁴⁶ We also showed that the IL-2 plasma concentration did not significantly differ between the trained and untrained groups. Other studies found that progressive resistance strength training (3 months) did not induce cytokine production.⁴⁴ However, Shinkai et al¹⁰ demonstrated that the IL-2 production in middle-aged older runners was higher than that in the middle-aged sedentary group. These results demonstrate that older participants who exercise regularly might have improved type I cytokine responses.

IL-6 induces the production of C-reactive protein but suppresses IL-1 production and increases the synthesis of IL-1ra.⁴⁷ IL-1ra inhibits IL-6 release.⁴⁸

We found that the pattern of change in the level of IL-1ra differed significantly between the trained YW and the trained MAW groups. Therefore, regular exercise causes a greater increase in the levels of this anti-inflammatory cytokines in YW than in MAW. Toft⁴⁹ observed that eccentric exercise raised the plasma IL-1ra levels in younger and elderly individuals.

In conclusion, MAW have an impairment in lymphocyte function, and regular activity partially prevents these alterations, confirming the benefit of regular exercise to the immune system of MAW. Regular exercise also induced leukocyte apoptosis, thus maintaining immune system homeostasis.

References

- Ben-Yehuda A, Weksler ME. Immune senescence: mechanisms and clinical implications. *Cancer Invest.* 1992;10:525–531.
- Berghella AM, Contasta I, Del Beato T, et al. The discovery of how gender influences age immunological mechanisms in health and disease, and the identification of ageing gender-specific biomarkers, could lead to specifically tailored treatment and ultimately improve therapeutic success rates. *Immun Ageing.* 2012;9:24.
- Cannon JG, St Pierre BA. Gender differences in host defense mechanisms. *J Psychiatr Res.* 2008;3:99–113.
- Khosla S, Melton 3rd LJ, Atkinson EJ, et al. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2266–2274.
- Hordern MD, Cooney LM, Beller EM, et al. Determinants of changes in blood glucose response to short-term exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2008;115:273–281.
- Tanaka H, Seals DR. Endurance exercise performance in Masters athletes: age-associated changes and underlying physiological mechanisms. *J Physiol.* 2008;586:55–63.
- Jonsdottir IH, Hoffmann P. The significance of intensity and duration of exercise on natural immunity in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:1908–1912.
- Newsholme P, Homem De Bittencourt PI, O'Hagan C. Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide. *Clin Sci (Lond).* 2009;118:341–349.
- Shepherd RJ, Shek PN. Exercise, aging and immune function. *Int J Sports Med.* 1995;16:1–6.
- Shinkai S, Kohno H, Kimura K, et al. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27:1516–1526.
- Warburton DER, Nicol C, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *Can Med Assoc J.* 2006;174:801–809.
- Nieman DC. Exercise, infection, and immunity. *Int J Sports Med.* 1994;15(suppl 3):S131–S141.
- Mellanby RJ, Thomas DC, Lamb J. Role of regulatory T-cells in autoimmunity. *Clin Sci (Lond).* 2009;116:639–649.
- Unden AL, Andreasson A, Eloffsson S, et al. Inflammatory cytokines, behaviour and age as determinants of self-rated health in women. *Clin Sci (Lond).* 2007;112:363–373.
- Ostapiuk-Karolczuk J, Zembron-Lacny A, Nacz M, et al. Cytokines and cellular inflammatory sequence in non-athletes after prolonged exercise. *J Sports Med Phys Fitness.* 2012;52:563–568.
- Lin JX, Leonard WJ. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:313–332.
- Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.* 1994;8:1314–1325.
- Voorrips LE, Ravelli AC, Dongelmans PC, et al. A physical activity questionnaire for the elderly. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23:974–979.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77–89.
- Dwyer JM, Johnson C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clin Exp Immunol.* 1981;46:237–249.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991;139:271–279.
- Nieman DC. Exercise immunology: future directions for research related to athletes, nutrition, and the elderly. *Int J Sports Med.* 2000;21(suppl 1):S61–S68.
- Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol.* 2007;103:693–699.
- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80:1055–1081.
- Peterson ML, Rommo N, House D, et al. In vitro responsiveness of lymphocytes to phytohemagglutinin. *Arch Environ Health.* 1978;33:59–63.
- Xu X, Beckman I, Bradley J. Age-related changes in the expression of IL-2 and high-affinity IL-2 binding sites. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;102:224–231.
- George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today.* 1996;17:267–272.
- Thoman ML. The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mech Ageing Dev.* 1995;82:155–170.
- Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G, et al. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25:823–831.

Please cite this article in press as: Santos VC, et al., Effect of regular exercise on leukocyte function in young and middle-aged women, Journal of Exercise Science & Fitness (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jesf.2013.05.002>

30. Nasrullah I, Mazzeo RS. Age-related immunosenescence in Fischer 344 rats: influence of exercise training. *J Appl Physiol.* 1992;73: 1932–1938.
31. Krzywkowski K, Petersen EW, Ostrowski K, et al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281:C1259–C1265.
32. Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, et al. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34:438–442.
33. Lagranha CJ, de Lima TM, Senna SM, et al. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem Funct.* 2005;23:101–107.
34. Levada-Pires AC, Cury-Boaventura MF, Górgão R, et al. Induction of lymphocyte death by short- and long-duration triathlon competitions. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41:1896–1901.
35. Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, et al. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis.* 1994;9:269–272.
36. Levada-Pires AC, Cury-Boaventura MF, Górgão R, et al. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2008;40:1447–1454.
37. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:393–396.
38. Wang JS, Huang YH. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur J Appl Physiol.* 2005; 95:290–297.
39. Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36:210–217.
40. Prestes J, De Ferreira CK, Dias R, et al. Lymphocyte and cytokines after short periods of exercise. *Int J Sports Med.* 2008;29:1010–1014.
41. Phelouzat MA, Laforge T, Arbogast A, et al. Susceptibility to apoptosis of T lymphocytes from elderly humans is associated with increased in vivo expression of functional Fas receptors. *Mech Ageing Dev.* 1997;96:35–46.
42. Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, et al. Cell proliferation and apoptosis in the immune system in the elderly. *Immunol Res.* 2000;21:31–38.
43. Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, et al. Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin Exp Immunol.* 1999;118:235–241.
44. Rall LC, Roubenoff R, Cannon JG, et al. Effects of progressive resistance training on immune response in aging and chronic inflammation. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28:1356–1365.
45. Dreila N, Kozdron E, Szczypiorski P. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. *BMC Geriatr.* 2004;4:8.
46. Kapasi ZF, Ouslander JG, Schnelle JF, et al. Effects of an exercise intervention on immunologic parameters in frail elderly nursing home residents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58:636–643.
47. Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, et al. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006;61:575–584.
48. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, et al. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.* 1994;83:113–118.
49. Toft AD, Jensen LB, Bruunsgaard H, Ibfelt T, Halkjaer-Kristensen J, Febbraio M, Pedersen BK. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jul;283(1): C289–C295.

ANEXO H

Artigo 2 - SANTOS, V. C. et al. Effects of DHA-Rich Fish Oil Supplementation on Lymphocyte Function Before and After a Marathon Race. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 23, n. 2, p. 161-169, 2013.

Effects of DHA-Rich Fish Oil Supplementation on Lymphocyte Function Before and After a Marathon Race

Vinicius Coneglian Santos, Adriana Cristina Levada-Pires, Sâmia Rocha Alves, Tânia Cristina Pithon-Curi, Rui Curi, and Maria Fernanda Cury-Boaventura

Purpose: To investigate the effects of docosahexaenoic (DHA)-rich fish oil (FO) supplementation on lymphocyte function before and after a marathon race. **Methods:** Twenty-one athletes participated in this study. Eight marathon runners were supplemented with 3 g of FO daily for 60 d (FO group), and 13 athletes were not supplemented (C group). The following measures of lymphocytes were taken before and after the marathon: cell proliferation, cytokine production (IL-2, IL-10, TNF- α , and IL-4), and signs of cell death. **Results:** In the C group, the marathon had no effect on lymphocyte proliferation, DNA fragmentation, or mitochondrial membrane polarization; however, the marathon increased phosphatidylserine externalization (by 2.5-fold), induced a loss of plasma membrane integrity (by 20%), and decreased IL-2, TNF- α , and IL-10 production (by 55%, 95%, and 50%, respectively). FO supplementation did not prevent lymphocyte death induced by the marathon, as indicated by cell viability, DNA fragmentation, and phosphatidylserine externalization. However, FO supplementation increased lymphocyte proliferation before and after the marathon, and before the race, FO supplementation decreased IL-2, TNF- α , and IL-10 production in concanavalin-A-stimulated lymphocytes (by 55%, 95%, and 58%, respectively) compared with cells from the C group. The production of cytokines was not altered before or after the race in the FO group. **Conclusions:** DHA-rich FO supplementation increased lymphocyte proliferation and prevented a decrease in cytokine production, but it did not prevent lymphocyte death induced by participation in the marathon. Overall, DHA rich-FO supplementation has beneficial effects in preventing some of the changes in lymphocyte function induced by marathon participation.

Keywords: lipids, leukocyte, exercise, cytokine, apoptosis, immune function

To investigate lymphocyte function after intense exercise, several authors have evaluated lymphocyte proliferation (Gleeson & Bishop, 2005; Kwak, 2006; Levada-Pires et al., 2009) and lymphocyte death (Levada-Pires et al., 2009; Mars, Govender, Weston, Naicker, & Chuturgoon, 1998; Mooren, Lechtermann, & Volker, 2004). Previous studies have demonstrated an inhibition of lymphocyte proliferation capacity in the recovery period after intense exercise (Gleeson & Bishop, 2005; Henson et al., 2004; Kwak, 2006). Some authors have suggested that apoptosis contributes to the loss of lymphocytes in the blood after exercise, possibly via the cell surface's death-receptor-signaling CD95, resulting in postexercise lymphopenia (Hsu et al., 2002; Levada-Pires et al., 2009; Mars et al., 1998; Mooren et al., 2004).

An increase in the plasma levels of the inflammatory mediators IL-1- α , IL-6, IL-8, IL-10, and CRP has been observed after a marathon race (Henson et al., 2004;

Nieman et al., 2001; Suzuki et al., 2003). In spite of the fact that cytokine production by mononuclear cells has been evaluated after intense physical exercise, this issue is not yet completely understood. Most studies were conducted in animals and/or in vitro with controversial data (Haahr et al., 1991; Hoffman-Goetz, Pervaiz, & Guan, 2009; Hoffman-Goetz, Spagnuolo, & Guan, 2008; Lin, Jan, & Chen, 1993; Radom-Aizik, Leu, Cooper, & Zaldivar, 2007; Senchina, Hallam, Dias, & Perera, 2009; Starkie, Rolland, Angus, Anderson, & Febbraio, 2001). Moreover, information on cytokine production by lymphocytes after a marathon remains inconclusive.

Adequate levels of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially those found in fish or fish oils, such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6), optimize health and prevent diseases (Kang, 2011). The Western diet is deficient in omega-3 but abundant in omega-6 PUFAs, resulting in a very high omega-6-to-omega-3 fatty-acid ratio. This unbalanced ratio is thought to be associated with a high prevalence of cardiovascular disease, cancer, diabetes, and neurodegenerative diseases. Consequently, government and scientific organizations now recommend an increased dietary intake of omega-3 PUFAs, with doses of 1.5–5 g/day (Kang, 2011).

Santos, Alves, Pithon-Curi, and Cury-Boaventura are with the Inst. of Physical Activity and Sports Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, SP, Brazil. Levada-Pires and Curi are with the Dept. of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Fish oil supplementation has beneficial effects on autoimmune and inflammatory disorders, such as psoriasis, rheumatoid arthritis, and diabetes, and strenuous exercise (Simopoulos, 2008). In fact, the EPA and DHA present in fish oil incite anti-inflammatory action and control immune-response regulation through changes in plasma membrane fluidity, fatty-acid composition, production of secondary messengers, activity of transcription factors, and gene expression (Martins de Lima et al., 2007). A previous study in our laboratory demonstrated that DHA-rich fish oil supplementation prevented the increases in IL-6, PGE₂, and IL-1ra plasma concentrations that are induced by running in a marathon. In addition, neither the marathon nor the fish oil supplementation affected the plasma levels of TNF- α , IL-8, and IL-10 (Cury-Boaventura et al., unpublished data).

DHA produces less pronounced anti-inflammatory activity than does EPA. Unlike EPA, DHA enhances leukocyte function (Gorjão et al., 2006). Hill et al. (2007) observed no effects of DHA supplementation on cytokine production by T cells during regular physical exercise in patients with risk factors for cardiovascular disease. To our knowledge, there have been no studies in which the effect of DHA-rich fish oil on lymphocyte function was evaluated in athletes.

DHA supplementation may be beneficial to athletes because it has a moderate anti-inflammatory effect that minimizes the exacerbated inflammation induced by the effort of exercise and because it improves leukocyte function. We investigated the effects of chronic supplementation of DHA-rich fish oil on lymphocyte function (proliferation and cytokine production) and death (viability, DNA fragmentation, phosphatidylserine externalization, and mitochondrial membrane depolarization) before and after a marathon.

Materials and Methods

Subjects

Twenty-one male athletes with the following characteristics participated in this study: age 37 ± 2 years, body mass 59 ± 1 kg, height 163 ± 1 cm, body fat $9.0\% \pm 0.6\%$, body-mass index (BMI) 22 ± 0.3 kg/m², race duration 186 ± 28 min, training program 136 ± 15 km/week, and race speed 15 ± 0.3 km/hr. The study participants did not take any medications during the study. All human blood donors signed an informed-consent form. The study was approved by the ethical committee of the Cruzeiro do Sul University (protocol number 101/2007).

Experimental Design

Twenty-one male marathon athletes were randomly selected from national competitions. Fish oil supplementation was randomized, and researchers were blind to treatment during data collection and analysis. The fish oil group (8 marathon runners) were supplemented daily with 3 g of fish oil (Omega DHA, Naturalis, São

Paulo, Brazil) containing 1.5 g DHA, 0.3 g EPA (5:1 DHA:EPA), and 18 mg α -tocopherol for 60 days. The subjects received exactly 180 capsules with the dates of the beginning and the end of the supplementation period and with instructions from the researchers to take the required dose every day. When asked by researchers, all subjects confirmed that the required doses of PUFA were taken every day for the 60 consecutive days before the race. Thirteen marathon runners were not supplemented (control group). Age, body mass, height, body fat, BMI, race duration, race speed, and training program did not differ between the groups (Table 1). Blood samples (25 ml) were collected from the antecubital vein 3–7 days before the race, when the subjects were at rest (12 hr without exercise), and immediately after the race. The training program of the runners was the same 3–7 days before the marathon competition. The blood volume (25 ml) was too small to have any adverse effect on training 3–7 days before the marathon race. The spread of the collection days/times between the fish oil and control groups was the same.

Dietary intake was monitored using the Food Frequency Questionnaire to identify omega-3 PUFA consumption, and three 24-hr food records were taken on separate days to determine dietary intake per day (analyzed using Dietwin Professional Software, Version 2008, Rio Grande do Sul, Brazil). The average daily intake of the marathon runners, as expressed by $M \pm SEM$, was $2,441 \pm 217$ kcal, 360 ± 70 g of carbohydrate, and 89 ± 14 g of protein. The distribution of macronutrients in total energy intake was of $54\% \pm 3\%$ carbohydrates, $19\% \pm 2\%$ protein, and $25\% \pm 2\%$ lipids. The frequency of fish consumption was less than one fish meal per week.

Limitations of the Study

Vegetable oil capsules were used as a placebo because they are similar in appearance and color to fish oil capsules but do not have the same smell. We chose not to use vegetable oils such as soybean or olive oil that are

Table 1 Characteristics of the Marathon Runners

	C group	FO group	<i>p</i>
Age (years)	35 ± 7	38 ± 7	.60
Body mass (kg)	59 ± 4	58 ± 5	.74
Height (cm)	165 ± 5	161 ± 4	.11
BMI (kg/m ²)	22 ± 1.4	23 ± 1.5	.34
Body fat (%)	9 ± 2	8 ± 3	.60
Race duration (min)	181 ± 31	190 ± 24	.90
Training (km/week)	131 ± 42	126 ± 37	.64
Speed race (km/hr)	14.0 ± 2.3	15.0 ± 0.6	.64

Note. C = control; FO = fish oil; BMI = body mass index. Values are presented as $M \pm SD$ of 8–13 samples. The *p* value was obtained by nonparametric *t* tests comparing the C and FO groups.

rich in linoleic and oleic acids because these fatty acids have potent immunomodulatory effects (Martins de Lima et al., 2007) that could confound the study. The lack of a placebo group was a limitation to the study that has to be taken into consideration when interpreting the results.

Lymphocyte Isolation

Peripheral blood samples were collected in tubes containing ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA; 1 mg/ml). Blood was diluted in phosphate-buffer saline (PBS; 1:1), added into a BD Falcon conical tube (San Diego, CA) containing Histopaque-1077, and centrifuged (Harrier 18/80, Sanyo, London, UK) for 30 min at 800 *g* at 4 °C. Mononuclear cells were collected during interphase and washed once with PBS. Mononuclear cells were isolated from the erythrocytes with a lysis buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4). The mononuclear cells remained in an RPMI 1640 medium for 30 min to allow monocytes to adhere to the plates. Next, the supernatant medium containing lymphocytes was collected to obtain a pure lymphocyte preparation (approximately 98%). The lymphocytes were counted in a Neubauer chamber under an optical microscope (Nikon, Melville, NY).

Lymphocyte Proliferation Assay

The lymphocyte proliferation assay was carried out to evaluate lymphocyte function. Lymphocytes (2×10^6 cells/ml) were cultured for 48 hr in the presence of 50 µg/ml of concanavalin A (ConA). The plates were incubated in a humidified atmosphere at 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. Afterward, [2-¹⁴C]-thymidine (1 µCi/ml) was added to the medium, and the cells were incubated further for a period of 18 hr. The radioactivity was analyzed using a liquid scintillation counter (Packard TRI-CARB 2100 TR counters, Downers Grove, IL; Dwyer & Johnson, 1981).

Lymphocyte Cytokine Production

Lymphocyte cytokine determination was also carried out to evaluate lymphocyte function. Lymphocytes (2×10^6 cells/ml) were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37 °C in RPMI-1640 medium with fetal bovine serum (10%) and ConA (50 µg/ml), a T lymphocyte mitogen. After 18 hr, lymphocytes were centrifuged for 10 min at 1,200 rpm at 4 °C, and the supernatant was collected. Measurements of IL-2, IL-10, TNF-α, and IL-4 in the supernatant were taken by ELISA using the R&D Systems Quantikine High Sensitivity kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). The level of cytokine release from lymphocytes is expressed in pg/ml (2×10^6 cells/ml). The sensitivities were 7.81 pg/ml for IL-2 and TNF-α and 15.62 pg/ml for IL-4 and IL-10.

Cell Viability Assay

Lymphocytes (1×10^6 cells/ml) were resuspended in 500 µl of PBS, and 50 µl of propidium iodide (PI, 20 µg/ml

in PBS) were added. In cells that have lost membrane integrity, PI binds to DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. The percentage of viable cells in each sample was determined using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Juan, CA). Fluorescence was measured using the FL2 channel (orange-red fluorescence = 585/42 nm). Ten thousand events were analyzed per experiment. Cells with PI fluorescence were then evaluated using Cell Quest software (Becton Dickinson, San Juan, Puerto Rico).

DNA Fragmentation

DNA fragmentation was determined by flow cytometry after DNA staining with PI according to the method described by Nicoletti, Migliorati, Pagliacci, Grignani, and Riccardi (1991) to characterize apoptotic cells. Cells were resuspended in a solution containing detergents to allow the prompt incorporation of the dye into the DNA. Briefly, cells were centrifuged at 1,000 *g* for 15 min at 4 °C. The pellet was gently resuspended in 300 µl of a hypotonic solution containing 50 µg/ml PI, 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100. The cells were then incubated for 2 hr at room temperature. Fluorescence was determined by flow cytometry as described for cell viability.

Phosphatidylserine Externalization

Phosphatidylserine externalization was analyzed by flow cytometry after staining with Annexin V-FITC, according to the method described by Vermes, Haanen, Steffen-Nakken, and Reutelingsperger (1995), to characterize apoptotic cells. Cells (1×10^6) were washed twice with cold PBS and resuspended in 100 µl of binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂); then 5 µl of fluorescein-conjugated annexin V (annexin V-FITC) were added. The cells were gently agitated and incubated for 15 min in the dark at room temperature (20–25 °C). Next, 10 µl of PI solution and 400 µl of binding buffer were added and the cells were analyzed by flow cytometry. Annexin V-FITC fluorescence was measured in the FL1 channel (green fluorescence, 530/30 nm), and PI was measured in the FL2 channel (orange-red fluorescence, 585/42 nm) of a flow cytometer, as described previously.

Mitochondrial Membrane Potential

The mitochondrial membrane potential evaluates apoptosis induced by intrinsic pathway. Cells were centrifuged at 1,000 *g* for 15 min at 4 °C, and the pellet was resuspended in 1,000 µl of PBS. Rhodamine 123 is a cell-permeable, cationic, fluorescent dye that is readily sequestered by active mitochondria without inducing toxic effects. Rhodamine 123 (5 µM) was added and the cells were then incubated for 15 min at 37 °C in the dark. Cells were washed twice with cold PBS and incubated for 30 min at 30 °C in the dark. Fluorescence was determined using the FL1 channel (green fluorescence, 530/30 nm) of a flow cytometer as described previously (Darzynkiewicz, Staiano-Coico, & Melamed, 1981).

Statistical Analysis

Data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test. The statistical analyses of the marathon runners' characteristics, such as age, body mass, height, body fat, BMI, race duration, training program, and race speed, were performed using nonparametric *t* tests. The results were considered statistically significant when $p < .05$. GraphPad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA) was used for statistical analysis.

Results

Lymphocyte Function

Lymphocyte proliferation activity increased in the fish oil group compared with the control group before ($7,264 \pm 282$ and $3,805 \pm 124$ counts/min, respectively) and after the competition ($4,348 \pm 314$ and $2,919 \pm 317$ counts/min, respectively; Figure 1). Lymphocyte proliferation activity decreased after the race in the fish oil group but remained above the values of the control group (Figure 1).

The marathon led to a decrease of IL-2, TNF- α , and IL-10 production in ConA-stimulated lymphocytes by 80%, 75%, and 50%, respectively (56 ± 13 , 822 ± 179 , and 566 ± 96 pg/ml, respectively) compared with the values before the race (342 ± 71 , $3,230 \pm 1,022$, and $1,073 \pm 130$ pg/ml, respectively; Table 2). Fish oil supplementation induced a decrease in IL-2, TNF- α , and IL-10 production in stimulated lymphocytes by 55%, 95%, and 58%, respectively (151 ± 53 , 121 ± 59 , and 452 ± 192 pg/ml, respectively) compared with the values of the control group before the race (Table 2). IL-2, TNF- α , and IL-10 production were not altered after the race in

the fish oil group. IL-4 production was detected before but not after the marathon race in both groups (Table 2).

Lymphocyte Death

The marathon race had no effect on cell DNA fragmentation (Figure 2[A]), but it induced an increase in the percentage of lymphocytes with phosphatidylserine externalization (by 2.5-fold; Figure 2[C]) and a decrease in the percentage of lymphocytes with loss of plasma membrane integrity in both the control and fish oil groups ($95\% \pm 1\%$ to $86\% \pm 3\%$ and $95\% \pm 1\%$ to $77\% \pm 2\%$, respectively; Figure 2[B]). Fish oil supplementation did not prevent marathon-induced lymphocyte death (Figures 2[A], 2[B], and 2[C]). The marathon also led to a slight increase in the lymphocyte mitochondrial membrane potential in both groups, but this effect was significant only in cells from the fish oil group (Figure 2[D]).

Discussion

The marathon led to increased lymphocyte phosphatidylserine externalization, a loss of plasma membrane integrity, and decreased IL-2, TNF- α , and IL-10 production. DHA-rich fish oil supplementation increased lymphocyte proliferation and decreased IL-2, TNF- α , and IL-10 production in ConA-stimulated lymphocytes before the race compared with the control group, indicating an improvement in lymphocyte function in the fish oil group.

Leukocyte function is modulated by ω -3 PUFA through different pathways such as proliferation control, cytokine and anti-inflammatory mediator (eicosanoids, resolvins, protectins, and maresins) generation, adhesion molecule expression, and cell death (Akhtar Khan, 2010; Gorjão et al., 2009; Martins de Lima et al., 2007). Fish oils containing

Figure 1 — Effect of DHA-rich fish oil (FO) supplementation on lymphocyte proliferation activity in athletes before and after a marathon. Lymphocytes were plated and cultured for a period of 48 hr in the presence of 50 μ g/ml concanavalin A. The values are presented as $M \pm SEM$ of 8–13 samples. # $p < .05$ and ## $p < .001$ when comparing the control (C) group with the FO group. * $p < .05$ when comparing athletes before and after the race.

Table 2 Cytokine Production by Lymphocytes Stimulated With Concanavalin A (50 µg/ml)

Cytokine (pg/ml)	Before Race		After Race	
	Control group	Fish oil group	Control group	Fish oil group
IL-2	342 ± 71	151 ± 53#	56 ± 13***	25 ± 12
TNF-α	3,230 ± 1,022	121 ± 59##	822 ± 179*	144 ± 62
IL-10	1,073 ± 130	452 ± 192#	566 ± 96*	391 ± 64
IL-4	12 ± 10	14 ± 4	ND	ND

Note. ND = not detected. Values are presented as $M \pm SEM$ of 8–13 samples. The production of cytokines by lymphocytes was measured in pg/ml of supernatant obtained from 2×10^6 cells/ml cultured lymphocytes.

* $p < .05$, *** $p < .001$ when comparing athletes before and after the race. # $p < .05$, ## $p < .001$ when comparing the control and fish oil groups.

different compositions of EPA and DHA can exert divergent effects on immune responses. DHA promotes less pronounced anti-inflammatory activity than EPA. EPA-rich fish oil (2:1, EPA:DHA), which is the most widely available type commercially, suppresses leukocyte function, thus decreasing lymphocyte proliferation and immunity, whereas DHA-rich fish oil (5:1, DHA:EPA) stimulates several aspects of immune function, including lymphocyte proliferation, thus improving acquired immunity (Gorjão et al., 2009). DHA supplementation may be beneficial to athletes because it has a moderate anti-inflammatory effect that minimizes the exacerbated inflammation induced by exercise with no marked effect on leukocyte function. Thus, the selection of DHA- or EPA-rich fish oils must be carefully considered before being used to control inflammatory responses induced by exercise. DHA-rich fish oil supplementation has an anti-inflammatory effect and contributes to the improvement of lymphocyte function in marathon runners.

Immune function is maintained due to the balance between cell death and cell proliferation. Nieman et al. (1995) observed that the proliferative activity of lymphocytes did not differ between runners who had been training for marathon race events and sedentary controls. However, in this study we observed an impairment of lymphocyte proliferation during the periods before and after the competition in the control group compared with the fish oil supplementation group. In the fish oil group, we observed impairment in lymphocyte proliferation after the race compared with at rest, but this was an improvement compared with the control group.

Many studies have shown an inhibition of lymphocyte proliferation capacity in the recovery period after intense exercise, but not compared with nonathletes (Gleeson & Bishop, 2005; Henson et al., 2004; Kwak, 2006). Levada-Pires et al. (2009) demonstrated that lymphocyte proliferation is reduced in triathletes at rest, as well as after triathlon competitions, suggesting that it is altered by the exercise training itself, as indicated in our current study. Moreover, MacNeil, Hoffman-Goetz, Kendall, Houston, and Arumugam (1991) reported a reduction in lymphocyte proliferation capacity due to physical effort in the recovery period after an exercise session.

A previous study from our laboratory demonstrated an improvement in ConA-stimulated proliferation of lymphocytes from healthy volunteers after 2 months of DHA-rich fish oil supplementation. In the current study, DHA-rich fish oil supplementation promoted an augmentation of the ConA-induced lymphocyte proliferative capacity in marathon runners before and after the competition. These results suggest that athletes supplemented with fish oil have better acquired immunity and less susceptibility to pathogen infections than nonsupplemented athletes. In spite of the marathon race's decreasing lymphocyte proliferation in the fish oil group, this function remained better than the control group after the race. Andrade, Ribeiro, Bozza, Costa Rosa, and Tavares do Carmo (2007) also observed an increase of lymphocyte proliferation in elite swimmers after EPA-rich fish oil supplementation. In contrast, Kew et al. (2004) found that DHA supplementation decreases T-lymphocyte activation. It is noteworthy that Kew et al. employed higher doses of DHA (4.91 g/day) than the dose used in the current study (1.5 g/day), which may have affected the results of the experiments. In fact, a previous in vitro study demonstrated that treatment with DHA induces human lymphocyte proliferation at lower concentrations ($<50 \mu\text{M}$) and leads to its reduction at higher concentrations ($>100 \mu\text{M}$; Gorjão, Cury-Boaventura, de Lima, & Cury, 2007). The discrepancy between the studies may also be explained by the different approaches used by the authors: While Kew et al. evaluated CD69 expression, we assessed cell division in our study.

The release of IL-2 and TNF-α by lymphocytes is crucial to activating other immune cells of acquired immunity and preventing pathogen infections. The production of IL-10 plays a central role in limiting host immune responses to pathogens, thereby preventing damage to the host and the risk of developing many autoimmune diseases (Iyer & Cheng, 2012). Production of TNF-α, IL-2, and IL-10 was markedly decreased after the race, deregulating acquired immunity. In rats, the production of IL-2 in spleen lymphocytes stimulated by ConA was significantly lower in an exercise group than in a sedentary group (Lin et al., 1993). Haahr et al. (1991) found that concentric bicycle

exercise did not alter IL-2 production by lymphocytes *in vitro*. Moderate exercise (three times a week) also did not alter IL-2 production by monocytes in patients at risk for cardiovascular disease (Hill et al., 2007). The treatment of T cells (Jurkat) with a serum obtained from healthy volunteers after 30 min of exercise led to a reduction in IL-2 and TNF- α production, but it had no effect on TGF- β 1 and IL-1- α production compared with treatment with a serum obtained before exercise (Radom-Aizik et al., 2007). Hoffman-Goetz et al. (2009; 2008) also found a decrease in TNF- α expression in mouse intestinal lymphocytes immediately after treadmill exercise, and Senchina et al. (2009) observed a reduction in TNF- α and IL-1 β but not in IL-10 production by mononuclear cells after strenuous exercise. In contrast, another study showed no change in TNF- α production and a decrease in IL-1 α and IL-6 synthesis by monocytes after prolonged running (Starkie et al., 2001).

Low-dose fish oil supplementation (<750 mg of EPA and/or DHA) did not affect the production of IL-6, TNF- α , IL-1 β , and IL-10 by mononuclear cells in healthy human subjects (Trebbles et al., 2003; Wallace, Miles, & Calder, 2003). Nevertheless, an inhibitory effect on the production of these cytokines may occur due to daily intake of high doses of EPA and DHA, even after a prolonged period of treatment at low doses (Yaqoob & Calder, 1995). A high intake of DHA (>1,500 mg) has been shown to lead to decreased production of IFN- γ , IL-2, IL-10, and TNF- α by lymphocytes, monocytes, and macrophages in human volunteers (Endres, Meydani, & Dinarello, 1991; Verlengia et al., 2004a, 2004b; Yaqoob & Calder, 1995). The supplementation of DHA-rich fish oil reduced IL-2, IL-10, and TNF- α generation by lymphocytes before the race compared with the control group, indicating an anti-inflammatory effect.

The high occurrence of lymphocyte apoptosis has been associated with postexercise immunosuppression (Mars et al., 1998), and high-intensity exercise and/or prolonged exercise increases the percentage of apoptotic lymphocytes (Hsu et al., 2002; Mars et al., 1998; Mooren, Blomling, Lechtermann, Lerch, & Volker, 2002; Mooren et al., 2004; Steensberg, Morrow, Toft, Bruunsgaard, & Pedersen, 2002). An exercise intensity threshold between 40% and 60% of $\text{VO}_{2\text{max}}$ induced an increase in lymphocyte apoptosis (Navalta et al., 2009; Navalta, Mohamed, El-Baz, McFarlin, & Lyons, 2010; Navalta, Sedlock, & Park, 2007). Levada-Pires et al. (2009) have reported that the duration of high-intensity exercise is correlated with lymphocyte death in elite athletes based on different mechanisms. A long-duration triathlon competition did not induce lymphocyte apoptosis, but it led to an augmentation of the proportion of cells with membrane integrity loss, suggesting that these cells were dying by necrosis (Levada-Pires et al., 2009). Likewise, Peters, Van Eden, Tyler, Ramautar, and Chuturgoon (2006) and Mooren et al. (2004) did not find DNA damage or phosphatidylserine externalization in lymphocytes obtained from well-trained endurance athletes after either a 2.5-hr trial or a marathon competition, but those studies did not examine plasma membrane integrity. In our study, the marathon

had no effect on lymphocyte DNA fragmentation, but it led to an increase in the proportion of lymphocytes with phosphatidylserine externalization, which is indicative of an increase in lymphocyte apoptosis.

Marfe et al. (2010) have shown that endurance efforts by amateur runners attenuate the extent of apoptosis and that HSP 70, BCL-2, and HSP32 play an antiapoptotic role in modulating caspase and DNA fragmentation, providing physiological protection against apoptosis. Fish oil supplementation suppressed the expression of proapoptotic genes such as Caspases 3, 7, and 2 and led to an increase in HSP 70 mRNA expression, protecting against apoptosis (Gorjão et al., 2006). However, EPA and DHA can also decrease MAPK and Akt pathways involved in IL-2 production and lymphocyte survival, indicating a proapoptotic effect (Gorjão, Hirabara, de Lima, Cury-Boaventura, & Curi, 2007). In this study, fish oil supplementation did not alter marathon-induced lymphocyte death. Previous studies have shown that intense exercise diminishes lymphocyte glutathione content and subsequently enhances oxidative-stress-induced apoptosis (Levada-Pires et al., 2009; Wang & Huang, 2005). Accumulation of reactive oxygen species readily modifies the activity of a new class of proteins called sirtuins. In particular, sirtuin-1 can modulate cellular stress response and survival through the regulation of p53, NF- κ B-signaling, and FOXO transcription factors (Marfe et al., 2010) that may not be modulated by DHA and EPA. The mechanisms of lymphocyte death induced by exercise and the possible pro- or antiapoptotic effect of DHA and EPA have yet to be elucidated.

In conclusion, DHA-rich fish oil supplementation has immunomodulatory effects reducing pro- and anti-inflammatory cytokine production by lymphocytes, attenuating the exacerbation of immune stimulation and/or immune suppression. The balance in the production of pro- and anti-inflammatory cytokines may contribute to the repair of muscle injury induced by physical exercise. Although fish oil did not prevent lymphocyte apoptosis, it improved the responsiveness of the cells to ConA stimulation. These results suggest that athletes supplemented with fish oil have better acquired immunity and less susceptibility to pathogen infections than nonsupplemented athletes. Thus, DHA-rich fish oil supplementation is beneficial for lymphocyte function in marathon runners.

Acknowledgments

The authors are grateful to José Roberto Mendonça for his technical assistance.

This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), the National Council of Scientific Development and Technology (CNPq), and the Coordination of High-Level Personal Improvement (CAPES).

None of the authors have a conflict of interest with other people or organizations that could inappropriately influence our work, including employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

exercise did not alter IL-2 production by lymphocytes *in vitro*. Moderate exercise (three times a week) also did not alter IL-2 production by monocytes in patients at risk for cardiovascular disease (Hill et al., 2007). The treatment of T cells (Jurkat) with a serum obtained from healthy volunteers after 30 min of exercise led to a reduction in IL-2 and TNF- α production, but it had no effect on TGF- β 1 and IL-1- α production compared with treatment with a serum obtained before exercise (Radom-Aizik et al., 2007). Hoffman-Goetz et al. (2009; 2008) also found a decrease in TNF- α expression in mouse intestinal lymphocytes immediately after treadmill exercise, and Senchina et al. (2009) observed a reduction in TNF- α and IL-1 β but not in IL-10 production by mononuclear cells after strenuous exercise. In contrast, another study showed no change in TNF- α production and a decrease in IL-1 α and IL-6 synthesis by monocytes after prolonged running (Starkie et al., 2001).

Low-dose fish oil supplementation (<750 mg of EPA and/or DHA) did not affect the production of IL-6, TNF- α , IL-1 β , and IL-10 by mononuclear cells in healthy human subjects (Trebbles et al., 2003; Wallace, Miles, & Calder, 2003). Nevertheless, an inhibitory effect on the production of these cytokines may occur due to daily intake of high doses of EPA and DHA, even after a prolonged period of treatment at low doses (Yaqoob & Calder, 1995). A high intake of DHA (>1,500 mg) has been shown to lead to decreased production of IFN- γ , IL-2, IL-10, and TNF- α by lymphocytes, monocytes, and macrophages in human volunteers (Endres, Meydani, & Dinarello, 1991; Verlengia et al., 2004a, 2004b; Yaqoob & Calder, 1995). The supplementation of DHA-rich fish oil reduced IL-2, IL-0, and TNF- α generation by lymphocytes before the race compared with the control group, indicating an anti-inflammatory effect.

The high occurrence of lymphocyte apoptosis has been associated with postexercise immunosuppression (Mars et al., 1998), and high-intensity exercise and/or prolonged exercise increases the percentage of apoptotic lymphocytes (Hsu et al., 2002; Mars et al., 1998; Mooren, Blomling, Lechtermann, Lerch, & Volker, 2002; Mooren et al., 2004; Steensberg, Morrow, Toft, Bruunsgaard, & Pedersen, 2002). An exercise intensity threshold between 40% and 60% of $\text{VO}_{2\text{max}}$ induced an increase in lymphocyte apoptosis (Navalta et al., 2009; Navalta, Mohamed, El-Baz, McFarlin, & Lyons, 2010; Navalta, Sedlock, & Park, 2007). Levada-Pires et al. (2009) have reported that the duration of high-intensity exercise is correlated with lymphocyte death in elite athletes based on different mechanisms. A long-duration triathlon competition did not induce lymphocyte apoptosis, but it led to an augmentation of the proportion of cells with membrane integrity loss, suggesting that these cells were dying by necrosis (Levada-Pires et al., 2009). Likewise, Peters, Van Eden, Tyler, Ramautar, and Chuturgoon (2006) and Mooren et al. (2004) did not find DNA damage or phosphatidylserine externalization in lymphocytes obtained from well-trained endurance athletes after either a 2.5-hr trial or a marathon competition, but those studies did not examine plasma membrane integrity. In our study, the marathon

had no effect on lymphocyte DNA fragmentation, but it led to an increase in the proportion of lymphocytes with phosphatidylserine externalization, which is indicative of an increase in lymphocyte apoptosis.

Marfe et al. (2010) have shown that endurance efforts by amateur runners attenuate the extent of apoptosis and that HSP 70, BCL-2, and HSP32 play an antiapoptotic role in modulating caspase and DNA fragmentation, providing physiological protection against apoptosis. Fish oil supplementation suppressed the expression of proapoptotic genes such as Caspases 3, 7, and 2 and led to an increase in HSP 70 mRNA expression, protecting against apoptosis (Gorjão et al., 2006). However, EPA and DHA can also decrease MAPK and Akt pathways involved in IL-2 production and lymphocyte survival, indicating a proapoptotic effect (Gorjão, Hirabara, de Lima, Cury-Boaventura, & Curi, 2007). In this study, fish oil supplementation did not alter marathon-induced lymphocyte death. Previous studies have shown that intense exercise diminishes lymphocyte glutathione content and subsequently enhances oxidative-stress-induced apoptosis (Levada-Pires et al., 2009; Wang & Huang, 2005). Accumulation of reactive oxygen species readily modifies the activity of a new class of proteins called sirtuins. In particular, sirtuin-1 can modulate cellular stress response and survival through the regulation of p53, NF- κ B-signaling, and FOXO transcription factors (Marfe et al., 2010) that may not be modulated by DHA and EPA. The mechanisms of lymphocyte death induced by exercise and the possible pro- or antiapoptotic effect of DHA and EPA have yet to be elucidated.

In conclusion, DHA-rich fish oil supplementation has immunomodulatory effects reducing pro- and anti-inflammatory cytokine production by lymphocytes, attenuating the exacerbation of immune stimulation and/or immune suppression. The balance in the production of pro- and anti-inflammatory cytokines may contribute to the repair of muscle injury induced by physical exercise. Although fish oil did not prevent lymphocyte apoptosis, it improved the responsiveness of the cells to ConA stimulation. These results suggest that athletes supplemented with fish oil have better acquired immunity and less susceptibility to pathogen infections than nonsupplemented athletes. Thus, DHA-rich fish oil supplementation is beneficial for lymphocyte function in marathon runners.

Acknowledgments

The authors are grateful to José Roberto Mendonça for his technical assistance.

This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), the National Council of Scientific Development and Technology (CNPq), and the Coordination of High-Level Personal Improvement (CAPES).

None of the authors have a conflict of interest with other people or organizations that could inappropriately influence our work, including employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

References

- Akhtar Khan, N. (2010). Polyunsaturated fatty acids in the modulation of T-cell signalling. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 82(4-6), 179–187. PubMed doi:10.1016/j.plefa.2010.02.023
- Andrade, P.M., Ribeiro, B.G., Bozza, M.T., Costa Rosa, L.F., & Tavares do Carmo, M.G. (2007). Effects of the fish-oil supplementation on the immune and inflammatory responses in elite swimmers. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 77(3-4), 139–145. PubMed doi:10.1016/j.plefa.2007.08.010
- Darzynkiewicz, Z., Staiano-Coico, L., & Melamed, M.R. (1981). Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(4), 2383–2387. PubMed doi:10.1073/pnas.78.4.2383
- Dwyer, J.M., & Johnson, C. (1981). The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 46(2), 237–249. PubMed
- Endres, S., Meydani, S.N., & Dinarello, C.A. (1991). Effects of omega 3 fatty acid supplements on ex vivo synthesis of cytokines in human volunteers. Comparison with oral aspirin and ibuprofen. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 66, 401–406. PubMed
- Gleeson, M., & Bishop, N.C. (2005). The T cell and NK cell immune response to exercise. *Annals of Transplantation*, 10(4), 43–48. PubMed
- Gorjão, R., Azevedo-Martins, A.K., Rodrigues, H.G., Abdulkader, F., Arcisio-Miranda, M., & Procopio, J. (2009). Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(1), 56–64. PubMed doi:10.1016/j.pharmthera.2009.01.004
- Gorjão, R., Cury-Boaventura, M.F., de Lima, T.M., & Curi, R. (2007). Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. *Cell Biochemistry and Function*, 25(3), 305–315. PubMed doi:10.1002/cbf.1388
- Gorjão, R., Hirabara, S.M., de Lima, T.M., Cury-Boaventura, M.F., & Curi R. (2007). Regulation of Interleukin-2 signaling by fatty acids in human lymphocytes. *Journal of Lipid Research*, 48(9), 2009–2019.
- Gorjão, R., Verlengia, R., Lima, T.M., Soriano, F.G., Boaventura, M.F., & Kanunfre, C.C. (2006). Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. *Clinical Nutrition*, 25(6), 923–938. PubMed doi:10.1016/j.clnu.2006.03.004
- Haahr, P.M., Pedersen, B.K., Fomsgaard, A., Tvede, N., Diamant, M., & Klarlund, K. (1991). Effect of physical exercise on in vitro production of Interleukin 1, Interleukin 6, tumour necrosis factor- α , Interleukin 2 and interferon-gamma. *International Journal of Sports Medicine*, 12(2), 223–227. PubMed doi:10.1055/s-2007-1024672
- Henson, D.A., Nieman, D.C., Pistilli, E.E., Schilling, B., Colacino, A., & Utter, A.C. (2004). Influence of carbohydrate and age on lymphocyte function following a marathon. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 14(3), 308–322. PubMed
- Hill, A.M., Worthley, C., Murphy, K.J., Buckley, J.D., Ferrante, A., & Howe, P.R. (2007). n-3 fatty acid supplementation and regular moderate exercise: Differential effects of a combined intervention on neutrophil function. *The British Journal of Nutrition*, 98(2), 300–309. PubMed doi:10.1017/S0007114507707286
- Hoffman-Goetz, L., Pervaiz, N., & Guan, J. (2009). Voluntary exercise training in mice increases the expression of antioxidant enzymes and decreases the expression of TNF- α in intestinal lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(4), 498–506. PubMed doi:10.1016/j.bbi.2009.01.015
- Hoffman-Goetz, L., Spagnuolo, P.A., & Guan, J. (2008). Repeated exercise in mice alters expression of IL-10 and TNF- α in intestinal lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(2), 195–199. PubMed doi:10.1016/j.bbi.2007.07.002
- Hsu, T.G., Hsu, K.M., Kong, C.W., Lu, F.J., Cheng, H., & Tsai, K. (2002). Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 34(3), 438–442. PubMed doi:10.1097/00005768-200203000-00009
- Iyer, S.S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23–63.
- Kang, J.X. (2011). Effect of ω -3 fatty acids on life span. *Nutrition*, 27(3), 333. PubMed doi:10.1016/j.nut.2010.07.011
- Kew, S., Mesa, M.D., Tricon, S., Buckley, R., Minihane, A.M., & Yaqoob, P. (2004). Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 674–681. PubMed
- Kwak, Y.S. (2006). Effects of training on spleen and peritoneal exudate reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. *Journal of Sports Sciences*, 24(9), 973–978. PubMed doi:10.1080/02640410500386233
- Levada-Pires, A.C., Cury-Boaventura, M.F., Gorjão, R., Hirabara, S.M., Puggina, E.F., & Pellegrinotti, I.L. . . . Pithon-Curi, T.C. (2009). Induction of lymphocyte death by short- and long-duration triathlon competitions. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41(10), 1896–1901. PubMed doi:10.1249/MSS.0b013e3181a327a2
- Lin, Y.S., Jan, M.S., & Chen, H.I. (1993). The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. *International Journal of Sports Medicine*, 14(2), 86–92. PubMed doi:10.1055/s-2007-1021151
- MacNeil, B., Hoffman-Goetz, L., Kendall, A., Houston, M., & Arumugam, Y. (1991). Lymphocyte proliferation responses after exercise in men: Fitness, intensity, and duration effects. *Journal of Applied Physiology*, 70(1), 179–185. PubMed
- Marfè, G., Tafani, M., Pucci, B., Di Stefano, C., Indelicato, M., & Andreoli, A. (2010). The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners. *BMC Physiology*, 10, 7. PubMed doi:10.1186/1472-6793-10-7

- Mars, M., Govender, S., Weston, A., Naicker, V., & Chuturgoon, A. (1998). High intensity exercise: A cause of lymphocyte apoptosis? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(2), 366–370. [PubMed doi:10.1006/bbrc.1998.9156](#)
- Martins de Lima, T., Górgão, R., Hatanaka, E., Cury-Boaventura, M.F., Portioli Silva, E.P., & Procopio, J. (2007). Mechanisms by which fatty acids regulate leucocyte function. *Clinical Science (London, England)*, 113(2), 65–77. [PubMed](#)
- Mooren, F.C., Blomling, D., Lechtermann, A., Lerch, M.M., & Volker, K. (2002). Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.)*, 93(1), 147–153. [PubMed](#)
- Mooren, F.C., Lechtermann, A., & Volker, K. (2004). Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(9), 1476–1483. [PubMed doi:10.1249/01.MSS.0000139897.34521.E9](#)
- Navalta, J.W., McFarlin, B.K., Lyons, T.S., Faircloth, J.C., Bacon, N.T., & Callahan, Z.J. (2009). Exercise-induced lymphocyte apoptosis attributable to cycle ergometer exercise in endurance-trained individuals. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34(4), 603–608. [PubMed doi:10.1139/H09-018](#)
- Navalta, J.W., Mohamed, R., El-Baz, A., McFarlin, B.K., & Lyons, T.S. (2010). Exercise-induced immune cell apoptosis: Image-based model for morphological assessment. *European Journal of Applied Physiology*, 110(2), 325–331. [PubMed doi:10.1007/s00421-010-1504-9](#)
- Navalta, J.W., Sedlock, D.A., & Park, K.S. (2007). Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *International Journal of Sports Medicine*, 28(6), 539–542. [PubMed doi:10.1055/s-2006-955898](#)
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 139(2), 271–279. [PubMed doi:10.1016/0022-1759\(91\)90198-O](#)
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Smith, L.L., Utter, A.C., Vinci, D.M., & Davis, J.M. (2001). Cytokine changes after a marathon race. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.)*, 91(1), 109–114. [PubMed](#)
- Nieman, D.C., Simandle, S., Henson, D.A., Warren, B.J., Suttles, J., & Davis, J.M. (1995). Lymphocyte proliferative response to 2.5 hours of running. *International Journal of Sports Medicine*, 16(6), 404–409. [PubMed doi:10.1055/s-2007-973028](#)
- Peters, E.M., Van Eden, M., Tyler, N., Ramautar, A., & Chuturgoon, A.A. (2006). Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. *European Journal of Applied Physiology*, 98(2), 124–131. [PubMed doi:10.1007/s00421-006-0227-4](#)
- Radom-Aizik, S., Leu, S.Y., Cooper, D.M., & Zaldivar, F., Jr. (2007). Serum from exercising humans suppresses T-cell cytokine production. *Cytokine*, 40(2), 75–81. [PubMed doi:10.1016/j.cyto.2007.08.008](#)
- Senchina, D.S., Hallam, J.E., Dias, A.S., & Perera, M.A. (2009). Human blood mononuclear cell in vitro cytokine response before and after two different strenuous exercise bouts in the presence of bloodroot and Echinacea extracts. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 43(3), 298–303. [PubMed doi:10.1016/j.bcmd.2009.08.003](#)
- Simopoulos, A.P. (2008). Omega-3 fatty acids, exercise, physical activity and athletics. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 98, 23–50. [PubMed doi:10.1159/000152920](#)
- Starkie, R.L., Rolland, J., Angus, D.J., Anderson, M.J., & Febbraio, M.A. (2001). Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF- α levels after prolonged running. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280(4), C769–C774. [PubMed](#)
- Steensberg, A., Morrow, J., Toft, A.D., Bruunsgaard, H., & Pedersen, B.K. (2002). Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. *European Journal of Applied Physiology*, 87(1), 38–42. [PubMed doi:10.1007/s00421-002-0584-6](#)
- Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Liu, Q., Kurakake, S., & Okamura, N. (2003). Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 35(2), 348–355. [PubMed doi:10.1249/01.MSS.0000048861.57899.04](#)
- Trebbie, T., Arden, N.K., Stroud, M.A., Wootton, S.A., Burdge, G.C., & Miles, E.A. (2003). Inhibition of tumour necrosis factor- α and Interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *The British Journal of Nutrition*, 90(2), 405–412. [PubMed doi:10.1079/BJN2003892](#)
- Verlengia, R., Górgão, R., Kanunfre, C.C., Bordin, S., de Lima, T.M., & Martins, E.F. (2004a). Comparative effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on proliferation, cytokine production, and pleiotropic gene expression in Jurkat cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(11), 657–665. [PubMed doi:10.1016/j.jnutbio.2004.04.008](#)
- Verlengia, R., Górgão, R., Kanunfre, C.C., Bordin, S., de Lima, T.M., & Martins, E.F. (2004b). Effects of EPA and DHA on proliferation, cytokine production, and gene expression in Raji cells. *Lipids*, 39(9), 857–864. [PubMed doi:10.1007/s11745-004-1307-2](#)
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51. [PubMed doi:10.1016/0022-1759\(95\)00072-1](#)
- Wallace, F.A., Miles, E.A., & Calder, P.C. (2003). Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *The British Journal of Nutrition*, 89(5), 679–689. [PubMed doi:10.1079/BJN2002821](#)
- Wang, J.S., & Huang, Y.H. (2005). Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *European Journal of Applied Physiology*, 95(4), 290–297.
- Yaqoob, P., & Calder, P.C. (1995). The effect of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell derived cytokines. *Biochemical Society Transactions*, 23(2), 279S. [PubMed](#)

ANEXO I

Artigo 3 - SANTOS, V. C. et al. Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 3, p. 237-243, 2013.

CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION

Cell Biochem Funct 2013; **31**: 237–243.Published online 13 September 2012 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/cbf.2877

Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race

Vinicius Coneglian Santos¹, Adriana Cristina Levada-Pires², Sâmia Rocha Alves¹, Tânia Cristina Pithon-Curi¹, Rui Curi² and Maria Fernanda Cury-Boaventura^{1*}

¹*Institute of Physical Activity and Sports Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, SP, Brazil*²*Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil*

The aim of this study was to investigate the changes in lymphocyte and neutrophil selected functions before and after a marathon race. Fifteen professional athletes were recruited, and the following parameters were measured: plasma concentrations of IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α and C-reactive protein (CRP); neutrophil phagocytic capacity; cytokine production by neutrophils and lymphocytes and signs of neutrophil and lymphocyte death. The marathon race had no effect on CRP levels, but plasma concentrations of IL-6 and IL-1ra were increased. Although no effect was observed on the production of IL-6, IL-1ra, TNF- α , IL-1 β and IL-8 by unstimulated or stimulated neutrophils, a decrease in neutrophil phagocytic activity was observed immediately following the marathon. A high percentage of neutrophils undergoing apoptosis was observed due to the intense training regimen, whereas the percentages of apoptotic neutrophils were reduced after the race. The production of IL-2, TNF- α , IL-1 β and IL-10 by lymphocytes was decreased by 50%–80%, and the percentage of apoptotic and necrotic lymphocytes was increased by 42% and fourfold, respectively, as a result of the race. In conclusion, the increase in plasma levels of IL-6, IL-8, IL-1ra and IL-10 after the race was not due to the production of the cytokines by neutrophils or lymphocytes. In fact, the marathon led to a decrease in lymphocyte and neutrophil function, and the diminished function was more pronounced in lymphocytes, indicating an impairment in acquired immunity. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS—prolonged exercise; leukocytes; cytokines; apoptosis

INTRODUCTION

Athletes are at a higher risk of contracting upper respiratory tract infections in the weeks following a competitive ultra-endurance event.^{1,2} The factors that affect susceptibility to infections in athletes include increased exposure to pathogens, transient suppression of immune function and alteration in leukocyte numbers, distribution and function.^{3–5} The suppression of immune function observed after an intense exercise may result from the impairment in neutrophil and lymphocyte function as determined by reactive oxygen species production, phagocytic activity, migration, bactericidal activity in neutrophils, lymphocyte proliferation^{4,6–9} and acceleration of neutrophil and lymphocyte death.^{10–12} Reactive oxygen species production by neutrophils has an important role to digest invading microorganisms, but depending on insult intensity, the reactive oxygen species production can also induce apoptosis and damage the surrounding tissues.¹³

Several studies have shown that high-intensity exercise induces a decrease in circulating lymphocyte numbers

(below baseline values) and lymphocyte apoptosis in rats and athletes in postexercise period.^{14–18} Recently, our group showed that elite athletes competing in a long-duration triathlon exhibit apoptosis of neutrophils¹¹ and necrosis of lymphocytes.¹⁹ In contrast, a short-duration triathlon competition caused apoptosis of lymphocytes only.¹⁹ The leukocyte death induced by exercise varies according to the sport and the cell type. Thus, the effect of marathon racing on lymphocyte and neutrophil death was investigated in the current study.

Lymphocyte and neutrophil function and death may be modulated by inflammatory mediators. An increase in the plasma levels of the inflammatory mediators IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10 and C-reactive protein (CRP) after a marathon race has been observed.^{20–22} These inflammatory mediators can alter cytokine production by mononuclear cells.^{23,24} However, there are few studies evaluating the production of cytokines by neutrophils and lymphocytes after a marathon race.

In the current study, we hypothesized that a marathon race differentially modulates acquired and innate immunity. To investigate this hypothesis, the effects of a marathon race on the plasma levels of inflammatory mediators as well as lymphocyte and neutrophil function were assessed. Specifically, we measured the plasma concentrations of IL-1ra, IL-6,

*Correspondence to: Maria Fernanda Cury-Boaventura, Institute of Physical Activity and Sports Sciences, Cruzeiro do Sul University, Rua Galvão Bueno, 868, Liberdade, CEP 01506-000, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail: maria.boaventura@cruzeirodosul.edu.br

IL-8, IL-10 and CRP; neutrophil phagocytic activity; cytokine production by neutrophils and lymphocytes and signs of death in these cell types before and after a marathon race.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Fifteen male marathon runners [age: 35.2 ± 3.6 years; body mass: 60.4 ± 1.7 kg; height: 166 ± 0.2 cm; body fat: $9.5 \pm 0.9\%$; body mass index (BMI): 21.9 ± 0.6 kg m⁻²; race duration: $2\text{ h } 52 \pm 7$ min; training programme: 130 ± 12 km week⁻¹; race speed: 14.65 ± 0.6 km h⁻¹] and 12 male nonathlete volunteers (age: 31.6 ± 2.3 years; body mass: 74.4 ± 2.8 kg; height: 174 ± 2 cm; body fat: $20.5 \pm 2.1\%$; BMI: 24.6 ± 2 kg m⁻²) participated in the study. The training status of each subject is described in Table 1. Measurements of total body mass (kg), height (cm), BMI (kg m⁻²) and body fat (%) were performed according to the International Society for the Advancement of Kinanthropometry.²⁵

The study participants were not taking medication at the time of blood collection. Informed consent was obtained from each volunteer, and the experimental procedures were performed in accordance with the Ethical Committee of the Cruzeiro do Sul University.

Experimental design

Marathon runners and nonathletes were recruited via a letter of invitation before the 2008 Curitiba Marathon and the 2009 Sao Paulo Marathon. The same research design and procedures were used for both marathons, and the results were combined. All athletes completed the 42.195-km race. Blood samples (25 ml) were collected from the antecubital vein in marathon runners 3 to 7 days before the race (at rest; 12 hours without exercise) and immediately after the competition in both marathon runners and nonathletes at rest.

Table 1. Training and race details for each subject

Subject	Weekly training distance (km)	Race duration (min)	Race speed (km h ⁻¹)
1	140	148	17.2
2	180	140	18.2
3	190	164	15.5
4	140	154	16.5
5	180	140	18.2
6	220	170	15
7	70	211	12
8	70	206	12.3
9	100	250	17
10	100	215	11.2
11	150	189	13.4
12	90	210	11.1
13	90	213	11.9
14	105	186	13.7
15	125	177	14.4
Mean	130	172	14.6
SEM	12	7	0.6

Determination of plasma cytokine levels

Blood samples were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min, and plasma was separated and kept at -80°C until the determination of plasma cytokine levels.

Plasma levels of IL-6, IL-1ra, TNF- α , IL-8 and IL-10 were determined using Duoset enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer's instructions. The intra-assay coefficient of variance (CV) was 4.1%–10%, the inter-assay CV was 6.6%–8%, and the sensitivity was 19.53 pg ml⁻¹ for IL-1ra and TNF- α , 15.62 pg ml⁻¹ for IL-10 and IL-8, and 4.68 pg ml⁻¹ for IL-6.

Determination of plasma CRP levels

The CRP assay is a latex-enhanced immunoturbidimetric assay that measures the protein both within and outside the normal range (Bioclin Diagnostics, Sao Paulo, Brazil). The concentration of CRP was determined in duplicate by measuring the optical density at 505 nm (Spectra MAX plus, Molecular Devices, USA). The intra-assay CV was 1.6%–4%, the inter-assay CV was 0.6%–1.5%, and the sensitivity for CRP was 0.0312 mg ml⁻¹.

Isolation of neutrophils and lymphocytes

Human neutrophils and mononuclear cells were isolated from peripheral blood by density gradient using Histopaque ($d = 1.077$) according to Boyum.²⁶ Mononuclear cells were maintained in RPMI 1640 medium on plates for 30 min to allow for monocyte adherence. The supernatants containing lymphocytes were then collected (purity: approximately 98%). Neutrophils and lymphocytes were counted in a Neubauer chamber under an optical microscope (Nikon, Melville, NY, USA).

Production of cytokines by neutrophils and lymphocytes

Neutrophils (2×10^6 cells ml⁻¹) and lymphocytes (2×10^6 cells ml⁻¹) were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. The cells were plated in RPMI 1640 medium containing fetal bovine serum (10%) without or with lipopolysaccharide (LPS; 5 µg ml⁻¹) for neutrophils or Concanavalin A (Con A; 50 µg ml⁻¹) for lymphocytes. After 18 h, the neutrophils and lymphocytes were centrifuged for 10 min at $800 \times g$ and 4°C, and the supernatant was collected. Neutrophil IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-1ra and TNF- α production and lymphocyte IL-2, IL-10, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1ra and IL-1 β production were assessed by ELISA as described above. The intra-assay CV was 4.1%–10%, the inter-assay CV was 6.6%–8%, and the sensitivity was 19.53 pg ml⁻¹ for IL-1ra, 7.81 pg ml⁻¹ for IL-2 and TNF- α , 15.62 pg ml⁻¹ for IL-4, IL-10 and IL-8, 1.95 pg ml⁻¹ for IL-1 β and 4.68 pg ml⁻¹ for IL-6.

Measurement of neutrophil phagocytosis

Opsonized zymosan particles were centrifuged at $180 \times g$ for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in

RPMI 1640 medium for the phagocytosis assay. The number of particles per cover slip was 2×10^6 . The coverslips containing neutrophils (2×10^6) were incubated in 1 ml of RPMI 1640 medium containing opsonized zymosan for 40 min at 37 °C. Neutrophils were diluted (1:10) in a crystal violet solution (in acetic acid) and counted in a Neubauer chamber. Phagocytosis was expressed as the percentage of cells that had phagocytosed more than three particles (as determined by light microscopy at a magnification of 1000 $\times$).

Assessment of neutrophil and lymphocyte death

Neutrophils and lymphocytes (1×10^6 cells ml⁻¹) were incubated with propidium iodide (PI) solution (20 μ g ml⁻¹ in PBS) and fluorescein isothiocyanate-conjugated annexin V (FITC-annexin V) (Invitrogen, Carlsbad, USA).²⁷ The percentage of viable (annexin V-FITC -/PI -), apoptotic (annexin V-FITC +/PI -) and necrotic (annexin V-FITC +/PI +) cells in each sample was determined using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA). The fluorescence of annexin V-FITC was measured in the FL1 channel (green fluorescence), and PI was measured in the FL2 channel (orange-red fluorescence). Ten thousand events were collected per experiment, and cell death was evaluated using CellQuest software (Becton Dickinson, San Juan, USA).

Mitochondrial transmembrane potential

Neutrophils and lymphocytes (1×10^6 cells ml⁻¹) were incubated for 15 min at 37 °C with rhodamine 123 (5 μ mol l⁻¹) in the dark. The cells were then washed twice with cold PBS and incubated for 30 min at 37 °C in the dark. The fluorescence of rhodamine 123 was determined using the FL1 channel (green fluorescence, 530/30 nm), and the samples were evaluated as described above.

Statistical analysis

The phagocytic capacity and the percentage of viable, apoptotic and necrotic cells between nonathletes and athletes before and after the marathon were analysed using one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test. The analysis of cytokine production by neutrophils was performed by two-way analysis of variance with a Bonferroni post hoc test. The inflammatory mediators in plasma and the cytokine production by lymphocytes were analysed using *t* test. The results were considered statistically significant at $P \leq 0.05$. All analyses were performed using GraphPad Prism 4 software (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Immediately after the race, plasma IL-6 and IL-1ra concentrations were elevated fourfold (from 106 ± 38.5 to 435 ± 145.5 pg ml⁻¹) and 150-fold (from 18 ± 12 to 2718 ± 355 pg ml⁻¹), respectively. IL-8 and IL-10 were undetectable in plasma before the race, but they were clearly elevated after the competition (40.4 ± 20.2 and

32 ± 11.2 pg ml⁻¹, respectively). TNF- α and CRP concentrations remained unchanged after the competition (Table 2).

After the marathon, a decrease in the phagocytic capacity of neutrophils ($42 \pm 2\%$) was observed when compared with marathon runners at rest ($57 \pm 5\%$) (Figure 1) and with non-athletes ($60 \pm 3\%$).

The marathon race did not affect the production of IL-6, IL-1ra, TNF- α , IL-1 β and IL-8 by unstimulated or stimulated neutrophils (Table 3). LPS stimulation promoted an increase in neutrophil IL-8 and TNF- α production (by 10- and 20-fold, respectively) both before and after the race, whereas

Table 2. Effect of running a marathon on the plasma concentrations of inflammatory mediators

Cytokines	Before race	After race
IL-6 (pg ml ⁻¹)	106 ± 38.5	$435 \pm 145.5^*$
IL-1ra (pg ml ⁻¹)	18 ± 12	$2718 \pm 355^*$
TNF- α (pg ml ⁻¹)	32.3 ± 13.3	32.4 ± 7.7
IL-8 (pg ml ⁻¹)	ND	40.4 ± 20.2
IL-10 (pg ml ⁻¹)	ND	32 ± 11.2
CRP (U l ⁻¹)	5.2 ± 0.5	5.3 ± 0.7

The results are presented as the mean $\pm$ SEM of 8–15 samples. ND, not detected.

* $P < 0.05$ compared with the values obtained before the race.

Figure 1. Effect of running a marathon on the phagocytic capacity of neutrophils. Cells were freshly obtained from the blood of athletes before and after the race. The percentage of neutrophils that phagocytosed more than three opsonized zymosan particles was determined by light microscopy. The values are presented as the mean $\pm$ SEM of 8–15 samples. * $P < 0.05$ when compared with the values obtained before the race. # $P < 0.05$ when compared to nonathletes.

Table 3. Effect of running a marathon on the production of IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-1ra and TNF- α by LPS-stimulated (5 μ g ml⁻¹) and unstimulated neutrophils

Cytokines (pg ml ⁻¹)	Before race	After race	Before race	After race
	Unstimulated neutrophils	Unstimulated neutrophils	Stimulated neutrophils (with LPS)	Stimulated neutrophils (with LPS)
IL-6	70 ± 65	510 ± 122	692 ± 249	589 ± 328
IL-8	1033 ± 160	1148 ± 295	$6692 \pm 990^*$	$7728 \pm 2278^*$
IL-1 β	2 ± 1	5 ± 3	$63 \pm 32^*$	28 ± 6
IL-1ra	1087 ± 299	803 ± 142	4202 ± 1440	4379 ± 1623
TNF- α	126 ± 17	84 ± 24	$2000 \pm 332^*$	$1818 \pm 179^*$

The results are presented as the mean $\pm$ SEM of 8–15 samples.

* $P < 0.01$ compared with the values obtained from the unstimulated neutrophils.

Table 4. Cytokine production by lymphocytes stimulated with Concanavalin A ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)

Cytokines (pg ml^{-1})	Before race	After race
IL-2	342 ± 71	$56 \pm 13^{***}$
TNF- α	3230 ± 1022	$822 \pm 179^*$
IL-10	1073 ± 130	$566 \pm 96^*$
IL-4	12 ± 10	ND
IL-1 β	1117 ± 311	$350 \pm 177^*$
IL-6	8752 ± 1831	7444 ± 979
IL-1ra	11775 ± 3011	15023 ± 3628

Values are presented as the mean $\pm$ SEM of 8–16 samples. ND, not detected.

* $P < 0.05$ compared with the values obtained before the race.

*** $P < 0.001$ compared with the values obtained before the race.

Figure 2. Percentage of viable, apoptotic and necrotic neutrophils (A) and lymphocytes (B) before and after the race. Percentage of viable, apoptotic and necrotic cells were determined using a FACSCalibur flow cytometer. Fluorescence was measured in FL3 ($>670 \text{ nm}$) channels for propidium iodide or FL1 channel ($530/30 \text{ nm}$) for Annexin V-FITC. Ten thousand events were evaluated per experiment. The results are presented as the mean $\pm$ SEM of 8–15 samples. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ compared with the values obtained before the race

elevated neutrophil IL-1 β production (increased by 30-fold) was observed only before the race (Table 3). Neutrophil production of IL-6 and IL-1ra slightly but not significantly increased upon LPS stimulation.

The marathon race induced a decrease in lymphocyte production of IL-2, TNF- α , IL-10 and IL-1 β upon Con A stimulation by 80%, 75%, 50% and 70%, respectively, when compared with the production in athletes before the race (Table 4). The race did not affect the production of IL-6 and IL-1ra by lymphocytes (Table 4).

An increase in the percentage of viable neutrophils and a decrease in the percentage of necrotic neutrophils ($96 \pm 0.8\%$ and $3.3 \pm 0.6\%$, respectively) were found in athletes after the race when compared with the values obtained in athletes before the race ($71 \pm 8.8\%$ and $9 \pm 2\%$, respectively) (Figure 2) and in nonathletes ($78 \pm 3\%$ and $10 \pm 1\%$, respectively, $P < 0.001$). We also observed an increase in the percentage of apoptotic cells in participants before the race ($19 \pm 7.8\%$) compared with participants after the race ($2 \pm 0.8\%$) (Figure 2) and nonathletes ($6 \pm 1.3\%$, $P < 0.001$). However, we observed a mitochondrial membrane depolarization (by approximately 60%, from 144 ± 22 to 52 ± 10 , mean fluorescence intensity) in the neutrophils of participants after the race.

The marathon race increased the percentage of apoptotic and necrotic lymphocytes (from $21 \pm 2.2\%$ to $30 \pm 4.0\%$ and from $4 \pm 0.7\%$ to $17 \pm 3.3\%$, respectively) and decreased the percentage of viable lymphocytes (from $75 \pm 2.5\%$ to $57 \pm 5.4\%$) (Figure 2). The percentage of apoptotic and necrotic lymphocytes in the latter group was also increased when compared with the percentage in nonathletes (from $14.4 \pm 1\%$ to $30 \pm 4.0\%$ and from $3.2 \pm 0.2\%$ to $17 \pm 3.3\%$, respectively, $P < 0.001$). The competition did not change the percentage of lymphocytes with mitochondrial membrane depolarization (from $130.7 \pm 5.4\%$ to $109.3 \pm 6.8\%$, fluorescence mean).

DISCUSSION

The marathon race increased plasma IL-6 and IL-1ra concentrations, decreased the phagocytic capacity of neutrophils and the production of IL-2, TNF- α , IL-10 and IL-1 β by lymphocytes and increased the percentage of lymphocytes undergoing apoptosis. The competition did not affect IL-1ra, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 production by neutrophils. In fact, the changes in the plasma levels of IL-6 and IL-1ra after the race were not due to the production of these cytokines by neutrophils or lymphocytes, and the marathon race led to impairment in immune response.

Nieman *et al.*²¹ and Suzuki *et al.*²⁸ reported that postrace plasma levels of IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-12 and INF- γ remain undetectable or are near prerace concentrations. However, plasma levels of IL-8, IL-6, IL-10 and IL-1ra were increased after the marathon and remained elevated for up to 1.5 h afterwards. Nieman *et al.*²¹ showed that plasma cytokine levels do not differ significantly between men and women or between young and old adults after a marathon. We also observed an increase in plasma levels of IL-6 and IL-1ra and detectable levels of IL-8 and IL-10 after the race. Several studies have been unable to detect changes in TNF- α after a prolonged run.^{29,30} Some authors suggest that IL-10, IL-1ra and IL-6 may cause a reduction in plasma levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , to prevent systemic inflammation.²¹

The increase in plasma IL-6 and IL-8 levels after prolonged exercise has been shown to be due to the production

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they have no conflict of interest with other individuals or organizations that could inappropriately influence the work, including employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations and grants or other funding.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the FAPESP, CNPq, and CAPES. The authors are grateful to José Roberto Mendonça and Clara Vieira for their technical assistance.

REFERENCES

- Ekblom B, Ekblom O, Malm C. Infectious episodes before and after a marathon race. *Scand J Med Sci Sports* 2006; **16**: 287–293.
- Nieman DC. Risk of Upper Respiratory Tract Infection in Athletes: An Epidemiologic and Immunologic Perspective. *J Athl Train* 1997; **32**: 344–349.
- Chimenti L, Morici G, Patemo A, et al. Environmental conditions, air pollutants, and airway cells in runners: a longitudinal field study. *J Sports Sci* 2009; **27**: 925–935.
- Chinda D, Nakaji S, Umeda T, et al. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence* 2003; **18**: 324–329.
- Gleeson M. Immune system adaptation in elite athletes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; **9**: 659–665.
- Ferrer MD, Tauler P, Sureda A, Tur JA, Pons A. Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *J Sports Sci* 2009; **27**: 49–58.
- Hack V, Strobel G, Weiss M, Weicker H. PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J Appl Physiol* 1994; **77**: 1731–1735.
- Nieman D, Henson D, Gojanovich G, et al. Immune changes: 2 h of continuous vs. intermittent cycling. *Int J Sports Med* 2007; **28**: 625–630.
- Wolach B, Gavrieli R, Ben-Dror SG, Zigel L, Eliakim A, Falk B. Transient decrease of neutrophil chemotaxis following aerobic exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2005; **37**: 949–954.
- Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, Lu FJ, Cheng H, Tsai K. Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Med Sci Sports Exerc* 2002; **34**: 438–442.
- Lagranha CJ, de Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation on the function of neutrophils from exercised rats. *Cell Biochem Funct* 2005; **23**: 101–107.
- Levada-Pires AC, Cury-Boaventura MF, Gorjao R, et al. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes. *Med Sci Sports Exerc* 2008; **40**: 1447–1454.
- Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 2008; **83**: 288–295.
- Steensberg A, Morrow J, Toft AD, Bruunsgaard H, Pedersen BK. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. *Eur J Appl Physiol* 2002; **87**: 38–42.
- Hoffman-Goetz L, Spagnuolo PA. Freewheel exercise training modifies pro- and anti-apoptotic protein expression in mouse splenic lymphocytes. *Int J Sports Med* 2007; **28**: 787–791.
- Mooren FC, Blomling D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol* 2002; **93**: 147–153.
- Mooren FC, Lechtermann A, Volker K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Med Sci Sports Exerc* 2004; **36**: 1476–1483.
- Navalta JW, Sedlock DA, Park KS. Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *Int J Sports Med* 2007; **28**: 539–542.
- Levada-Pires AC, Cury-Boaventura MF, Gorjao R, Hirabara SM, Puggina EF, Pellegrinotti IL, Domingues Filho LA, Curi R, Pithon-Curi TC. Induction of Lymphocyte Death by Short- and Long-Duration Triathlon Competitions. *Med Sci Sports Exerc* 2009.
- Henson DA, Nieman DC, Pistilli EE, et al. Influence of carbohydrate and age on lymphocyte function following a marathon. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2004; **14**: 308–322.
- Nieman DC, Henson DA, Smith LL, et al. Cytokine changes after a marathon race. *J Appl Physiol* 2001; **91**: 109–114.
- Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, et al. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc* 2003; **35**: 348–355.
- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* 1998; **508** (Pt 3): 949–953.
- Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio MA. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C769–774.
- Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. *Nutrition* 1993; **9**: 480–492.
- Boyum A. Isolation of leucocytes from human blood A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; **97**: 9–29.
- Vermes I, Haanen C, Steffens, Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; **184**: 39–51.
- Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q, Sugawara K, Yamaya K, Sato K. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol* 1999; **87**: 1360–1367.
- Castell LM, Poortmans JR, Leclercq R, Brasseur M, Duchateau J, Newsholme EA. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1997; **75**: 47–53.
- Sprengher H, Jacobs C, Nain M, et al. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; **63**: 188–195.
- Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J Physiol* 2005; **563**: 507–516.
- Senchina DS, Hallam JE, Dias AS, Perera MA. Human blood mononuclear cell in vitro cytokine response before and after two different strenuous exercise bouts in the presence of bloodroot and Echinacea extracts. *Blood Cells Mol Dis* 2009; **43**: 298–303.
- Lin YS, Jan MS, Chen HI. The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. *Int J Sports Med* 1993; **14**: 86–92.
- Haahr PM, Pedersen BK, Fomsgaard A, et al. Effect of physical exercise on in vitro production of interleukin 1, interleukin 6, tumour necrosis factor-alpha, interleukin 2 and interferon-gamma. *Int J Sports Med* 1991; **12**: 223–227.
- Hoffman-Goetz L, Spagnuolo PA, Guan J. Repeated exercise in mice alters expression of IL-10 and TNF-alpha in intestinal lymphocytes. *Brain Behav Immun* 2008; **22**: 195–199.
- Nagatomi R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. *Exerc Immunol Ver* 2006; **12**: 54–71.
- Yaegaki MT, Umeda T, Takahashi I, et al. Measuring neutrophil functions might be a good predictive marker of overtraining in athletes. *Luminescence* 2008; **23**: 281–286.
- Muns G. Effect of long-distance running on polymorphonuclear neutrophil phagocytic function of the upper airways. *Int J Sports Med* 1994; **15**: 96–99.
- Gabriel H, Muller HJ, Kettler K, Brechtel L, Urhausen A, Kindermann W. Increased phagocytic capacity of the blood, but decreased phagocytic activity per individual circulating neutrophil after an ultradistance run. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1995; **71**: 281–284.
- Walker GJ, Dziubak A, Houghton L, Prendergast C, Lim L, Bishop NC. The effect of caffeine ingestion on human neutrophil oxidative burst responses following time-trial cycling. *J Sports Sci* 2008; **26**: 611–619.

41. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000; **28**: 170–177.
42. Lippi G, Banfi G, Montagnana M, Salvagno GL, Schena F, Guidi GC. Acute variation of leucocytes counts following a half-marathon run. *Int J Lab Hematol* 2010; **32**: 117–121.
43. Wu HJ, Chen KT, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 2711–2714.
44. Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q, Kudoh S, Kowatari K, Nakaji S, Sugawara K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2000; **81**: 281–287.
45. Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 2007; **37**: 837–856.
46. Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chuturgoon A. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 366–370.
47. Peters EM, Van Eden M, Tyler N, Ramautar A, Chuturgoon AA. Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. *Eur J Appl Physiol* 2006; **98**: 124–131.