

TÂNIA CORRÊA MILLER

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS ÔMEGA-3 NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO E NO PERFIL LIPÍDICO EM
RATOS SUBMETIDOS À NATAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

SÃO PAULO

2015

TÂNIA CORRÊA MILLER

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS
GRAXOS ÔMEGA-3 NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO E NO PERFIL LIPÍDICO EM
RATOS SUBMETIDOS À NATAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flávio Faloppa

CO-ORIENTADORES: Dr^a. Sheila J. McNeill Ingham

Dr. Robson Campos Gutierre

SÃO PAULO

2015

Miller, Tânia Corrêa.

Efeito da suplementação de ácidos graxos ômega-3 no músculo esquelético e no perfil lipídico em ratos submetidos à natação./Tânia Corrêa Miller. -- São Paulo, 2015. xv, 122f.

(Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Effect of omega-3 fatty acid supplementation in skeletal muscle and in the lipid profile in rats submitted to swimming.

1. Ácidos graxos ômega-3. 2. Músculo esquelético. 3. Perfil Lipídico. 4. Ratos Wistar

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
TRANSLACIONAL

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Diva, sinônimo de Vida, pela sua presença amorosa, pelo grande apoio e incentivo.

Ao meu filho Gian, minha maior riqueza e realização.

À minha prima Odete Maria (in memoriam), com saudades.

AGRADECIMENTOS

PROF. DR. FLÁVIO FALOPPA, PROFESSOR TITULAR DO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA EPM-UNIFESP e PROFESSOR ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, meu orientador, pela confiança e estímulo para realização deste trabalho.

DR^a. SHEILA J. McNEILL INGHAM, PROFESSORA AFILIADA DO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DA EPM-UNIFESP, minha co-orientadora, pela atenção e colaboração no desenvolvimento do meu trabalho.

DR. ROBSON CAMPOS GUTIERRE, PESQUISADOR EM ESTÁGIO DE PÓS-DOCTORADO no Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da UNIFESP pelo incentivo, paciência e colaboração.

PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO, PROFESSOR ASSOCIADO LIVRE DOCENTE DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA EPM-UNIFESP e COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pelo acolhimento na pós-graduação e gentil atenção.

AOS PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela atenção, orientações e correções.

À **PROF^a GIANNI MARA SILVA DOS SANTOS**, PROFESSORA E ESTATÍSTICA DO SETOR DE ESTATÍSTICA APLICADA DA PRÓ REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA DA UNIFESP pela paciência na orientação das análises dos dados.

AOS COLEGAS DE PÓS-GRADUAÇÃO, pelas sugestões e comentários.

À **ROSELI PASCHOA**, SECRETÁRIA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP NO DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA DA EPM-UNIFESP, pela atenção, incentivo e colaboração durante o tempo nesta instituição.

À **SANDRA DA SILVA**, SECRETÁRIA DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA EPM-UNIFESP E DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela atenção e orientações.

À **UNIVERSIDADE DE MARÍLIA**, pelo consentimento para a realização de procedimentos experimentais no Centro de Experimentação em Modelos Animais (CEMA) e preparo do material biológico no Laboratório de Histologia.

À **DR^a PATRÍCIA CICOTTO DOS SANTOS BUENO**, DOCENTE DO CURSO DE MEDICINA E CHEFE DO CENTRO DE ESTUDOS EM MODELOS ANIMAIS (CEMA) DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA/UNIMAR, pelo grande apoio na realização do experimento.

À PROF^a Ma. MARA SILVIA FORATO MARCONATO,
COORDENADORA E DOCENTE DO CURSO DE NUTRIÇÃO DA
UNIVERSIDADE DE MARÍLIA/UNIMAR, pelo apoio e colaboração em
todos os momentos necessários.

À PROF^a Ma. REGINA CÉLIA DAVID GALVANI,
COORDENADORA DO CURSO DE EDUCAÇÃO FÍSICA DA
UNIVERSIDADE DE MARÍLIA/UNIMAR, pela colaboração.

À DR^a CLÁUDIA RUCCO PENTEADO DETREGIACHI e à Ma.
CAMILA MARIA DE ARRUDA, DOCENTES DO CURSO DE
NUTRIÇÃO DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA/UNIMAR, pela
colaboração nos momentos em que precisei me ausentar.

À PROF^a DR^a MARIA ANGÉLICA SPADELLA, DOCENTE DA
FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA/FAMEMA, pela
colaboração nos procedimentos de captação de imagens do material
biológico.

AO Me. PROF. DANIEL PEREIRA COQUEIRO, DOCENTE DO
CURSO DE EDUCAÇÃO FÍSICA DA FACULDADE DE ENSINO
SUPERIOR DO INTERIOR PAULISTA/FAIP DE MARÍLIA E
DISCENTE DE DOUTORADO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO/UNIFESP, pelo auxílio nos procedimentos experimentais.

À Ma BRUNA CORRAL GARCIA VALSONI, FISIOTERAPEUTA,
DISCENTE DE DOUTORADO DA FACULDADE DE MEDICINA DE

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO (FAMERP), pela atenção e colaboração no início das análises morfométricas.

AO **ROBERTO CARLOS TELES**, TÉCNICO DO CENTRO DE ESTUDOS EM MODELOS ANIMAIS (CEMA) DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA/UNIMAR, pela colaboração nos procedimentos com os animais.

AO **CIRILO F. DOS SANTOS NETO**, TÉCNICO DO LABORATÓRIO DE HISTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MARÍLIA/UNIMAR, pela colaboração na confecção das lâminas histológicas.

AO **OTÁVIO TOBIAS SOARES MANDRA E À RAÍZA PENTEADO MANDRA**, pelo acolhimento nos dias da minha permanência em São Paulo para as atividades da pós-graduação.

AOS MEUS IRMÃOS: **SANDRA MARIA, DENISE, JOÃO PAULO E JUSSARA**, pelo carinho e por terem me incentivado em todos os momentos.

AOS **AMIGOS E AMIGAS**, que sempre acreditaram em mim.

À **FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)**, pela bolsa de estudos.

“O conhecimento é como o amor: para crescer, deve ser compartilhado!”
Semíramis Martins Álvares Domene (2011)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTAS.....	ix
RESUMO.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVO.....	20
3. LITERATURA.....	22
4. MÉTODOS.....	51
5. RESULTADOS.....	65
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO.....	88
8. REFERÊNCIAS.....	90
NORMAS ADOTADAS.....	110
ABSTRACT.....	112
APÊNDICES.....	113
ANEXOS.....	118
FONTES CONSULTADAS.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral da síntese de mediadores lipídicos do ácido araquidônico, EPA e DHA e dos seus efeitos na inflamação. Fonte: Calder (2010, p. 8).....	31
Figura 2 - Equação da reação mediada pela enzima Creatina Quinase.....	42
Figura 3 - Equação da reação mediada pela enzima desidrogenase láctica.....	44
Figura 4 - Alojamento dos animais.....	53
Figura 5 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental e o tempo de estudo.....	54
Figura 6 - Animal sendo pesado.....	55
Figura 7 - Tanque de natação utilizado no experimento.....	56
Figura 8 - Animal sendo suplementado pelo método de gavagem.....	58
Figura 9 - Diagrama ilustrativo dos procedimentos realizados após a coleta do material biológico.....	59
Figura 10 - Fotomicrografia representativa da aplicação do método estereológico nucleator 2D.....	61
Figura 11 - Gráfico do peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início do experimento (semana 1), semanas: 2, 3, 4, 5, 6 e último dia do experimento de acordo com os grupos experimentais.....	67

Figura 12 - Gráfico do ganho de peso corporal (g) dos animais durante as seis semanas de experimento.....	68
Figura 13 - Gráfico dos valores das áreas seccionais do músculo gastrocnêmio (μm^2) dos ratos suplementados com AG ω -3 ou placebo e submetidos às sessões de natação durante 6 semanas.....	69
Figura 14 - Gráfico dos níveis de creatina quinase (CK) dos ratos suplementados com AG ω -3 ou placebo e submetidos às sessões de natação. durante 6 semanas.....	70
Figura 15 - Gráfico dos níveis de desidrogenase láctica (DHL) dos ratos suplementados com AG ω 3 ou placebo e submetidos às sessões de natação.. durante 6 semanas.....	71
Figura 16 - Gráfico dos níveis séricos de colesterol dos animais suplementados com AG ω -3 ou placebo e submetidos às sessões de natação durante 6 semanas.....	72
Figura 17 - Gráficos dos níveis séricos de LDL dos animais suplementados com AG ω -3 ou placebo e submetidos às sessões de natação durante 6 semanas.....	73
Figura 18 - Gráfico dos níveis séricos de HDL dos animais suplementados com AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação.....	74
Figura 19 - Gráfico dos níveis séricos de triglicérides dos animais suplementados com AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo do período de adaptação (duas semanas).....	56
Tabela 2 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo sedentário com placebo (SP)	114
Tabela 3 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo sedentário com suplementação (S ω -3)	115
Tabela 4 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo exercício com placebo (EP).....	116
Tabela 5 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo exercício com suplementação (S ω -3)	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
AACR	Aminoácidos de cadeia ramificada
AGPI	Ácidos graxos polinsaturados
AG ω -3	Ácidos graxos ômega 3
AG ω -6	Ácidos graxos ômega 6
Akt	Serina - treonina quinase
ALA	Ácido α - linolênico
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (análise de variância)
AST	Aspartato aminotransaminase
ASM/PC	Área seccional das fibras musculares/peso corporal
ATP	Trifosfato de adenosina
CEMA	Centro de Experimentação em Modelo Animal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Creatina quinase
cm	Centímetros
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHL	Desidrogenase Láctica
DMIT	Dor muscular de início tardio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
DPM	Degradação da Proteína Muscular
DXA	<i>Dual - energy X-ray absorptiometry</i>
EP	Grupo exercício placebo
EPA	Ácido eicosapentaenoico

EPESE	<i>Epidemiologic Research in the Elderly</i>
<i>et al.</i>	e colaboradores
E ω -3	Grupo exercício com suplementação de AG ω -3
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXO	<i>Forkhead box</i>
FOXO3a	<i>Forkhead box O3</i>
g	Gramas (s)
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
HMB	β -hidroxi β -metilbutirato
IGF-1	<i>Insulin Growth Factor 1</i> (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)
IL-6	Interleucina 6
Kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase
Mb	Mioglobina
mg	Miligrama
Mrfs	Fatores regulatórios miogênicos
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
mTor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MurF1	<i>Muscle RING-finger protein-1</i>
MyoD	<i>Myogenic Determination</i>
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

O3I	Omega-3 <i>Index</i>
p	Margem de erro
p70SK	Quinase da proteína
p70S6K	Quinase da proteína S6
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGF ₂	Prostaglandina F2
PI3K	Fosfatidil inositol 3' - quinase
Rpm	Rotações por minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SP	Grupo Sedentário Placebo
SPM	Síntese de Proteína Muscular
S ω -3	Grupo Sedentário com suplementação de AG ω -3
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UNIMAR	Universidade de Marília
USP	Universidade de São Paulo
VO	Via oral
ω -3	Ômega 3
ω -6	Ômega 6
ω -7	Ômega 7
ω -9	Ômega 9
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μm^2	Micrômetro ao quadrado

RESUMO

Introdução: Existe alguma evidência que sugere que os ácidos graxos ômega-3 (AG ω -3) podem alterar a atividade das vias anti-catabólicas e/ou anabólicas do músculo esquelético para promover a manutenção da massa muscular. **Objetivo:** Analisar o efeito da suplementação de AG ω -3 no músculo esquelético e no perfil lipídico em ratos submetidos à natação. **Método:** Sessenta ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: sedentário placebo (SP), sedentário AG ω -3 (S ω -3), exercício placebo (EP) e exercício AG ω -3 (E ω -3). Os animais dos grupos EP e E ω -3 foram submetidos à 30 sessões de natação com duração de 45 minutos, intermitente, com sobrecarga de 15% do peso corporal, cinco dias por semana. Os animais receberam 500mg/dia de AG ω -3 ou óleo de oliva (placebo) por gavagem. Após a eutanásia, amostras sanguíneas foram coletadas para dosagens de CK, DHL e lipídeos sanguíneos. Foi retirado o músculo *gastrocnêmio*, preparadas lâminas em HE e estimadas as áreas seccionais pelo método estereológico. **Resultados:** O grupo placebo submetido ao exercício (EP) apresentou menor ganho de peso comparado ao grupo sedentário placebo (SP) ($p < 0,0001$). O grupo S ω -3 apresentou menor área das fibras musculares ($p = 0,018$), menor valor de CK ($p = 0,001$) e de colesterol ($p < 0,0001$) comparado ao grupo SP. O grupo E ω -3 apresentou menor valor de DHL ($p = 0,029$), menor valor de LDL ($p = 0,0002$) e maior valor de HDL ($p = 0,035$) comparado ao grupo EP. **Conclusão:** A suplementação com AG ω -3 em ratos diminuiu a área seccional do músculo esquelético, diminuiu os níveis séricos das enzimas CK e DHL e melhorou o perfil lipídico.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O músculo esquelético é um tecido contrátil especializado, que movimenta todo o esqueleto, é essencial para a respiração, é uma importante fonte geradora de calor e regula o metabolismo. A manutenção da massa muscular é de grande importância para uma vida independente, saudável e normal (SHAVLAKADZE & GROUNDS, 2006).

O aumento do desempenho, da força e da massa muscular é de interesse fundamental da medicina esportiva (SHAVLAKADZE & GROUNDS, 2006) e é o objetivo principal da grande maioria dos atletas que deseja desenvolver sua capacidade física ao máximo (SCHOENFELD, 2010).

Existe alguma evidência em um número limitado de estudos em animais, que sugere que os ácidos graxos ômega-3 (AG ω -3) podem alterar a atividade das vias anti-catabólicas e/ou anabólicas do músculo esquelético, para promover a manutenção da massa muscular (GINGRAS *et al.*, 2007). Estes potenciais efeitos anti-catabólicos e anabólicos dos AG ω -3 podem atenuar a perda de massa muscular e promover a manutenção da massa muscular (e da taxa metabólica), durante os períodos de restrição energética na dieta, ou, potencialmente, aumentar a massa muscular durante o balanço energético (WHITEHOUSE & TISDALE, 2001; GINGRAS *et al.*, 2007).

O suplemento composto pelos AG ω -3 está entre os suplementos mais populares do mundo, é amplamente comercializado e consumido. Ele é vendido na forma de cápsula, contendo de 500 a 2000mg de extrato de óleo de peixe (FAPPI *et al.*, 2014; ALBERT *et al.*, 2015). A *Food and*

Drug Administration (FDA) recomenda um máximo de ingestão de 3g por dia de AG ω -3, sendo que não se deve exceder 2g na forma de suplemento dietético (*Food and Drug Administration*, 2004).

Devido à limitação que os seres humanos possuem para dessaturar os AG ω -3, eles são considerados essenciais e é necessário obtê-los em quantidades suficientes na dieta (MARTIN *et al.*, 2006; SURETTE, 2008; BUCKLEY & HOWE, 2010; MOLFINO *et al.*, 2014).

Pesquisas clínicas com a suplementação de AG ω -3 indicaram seu impacto positivo em muitas doenças, particularmente naquelas em que a inflamação é sugerida como componente chave na patogênese (BUCKLEY & HOWE, 2010; SILVERBERG & SCHWARTZ, 2012).

Além disso, tem sido demonstrado que os AG ω -3 podem melhorar o metabolismo dos lipídeos por diminuir os triglicérides no sangue (EBRAHIMI *et al.*, 2014, LESLIE *et al.*, 2015) e aumentar a beta oxidação, contribuindo para o efeito hipolipemiante (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2013).

Atualmente, também tem sido investigado o seu uso no meio atlético, avaliando o seu potencial anti-inflamatório e mais recentemente o seu efeito na função, manutenção e ganho de massa muscular.

Alguns estudos observaram que a composição de ácidos graxos dos lipídeos da membrana do músculo esquelético, são reflexo da composição de ácidos graxos da dieta em homens e mulheres saudáveis (ANDERSSON *et al.*, 2002), em idosos (SMITH *et al.*, 2011) e também em ratos (LE FOLL *et al.*, 2007; ABBOTT, ELSE, HULBERT, 2010; FAPPI *et al.*, 2014).

KIM & LEE (2014) fizeram uma revisão sobre as intervenções nutricionais com efeitos na dor muscular de início tardio (DMIT), que ocorre após o exercício. Os autores afirmaram que a intervenção nutricional

é uma das maneiras preventivas e terapêuticas de reduzir a DMIT e descreveram que os AG ω -3 possuem este papel, sugerindo que eles estão associados com a resposta inflamatória na redução da DMIT.

Diversos estudos têm mensurado vários parâmetros sanguíneos indicadores de lesões musculares, tais como: a atividade de enzimas como a creatina quinase (CK), desidrogenase láctica (DHL) e conteúdo de mioglobina (AOI, NAITO, YOSHIKAWA, 2006; UCHIYAMA *et al.*, 2006; NIU *et al.*, 2008; DEMINICE *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2010; SUSSAI *et al.*, 2010; SOUZA, *et al.*, 2010; RA *et al.*, 2013; MILIONI *et al.*, 2014; XIAO, 2015).

Lesões musculares estão associadas com alterações na função muscular e tem sido sugerido que pequenas lesões em um músculo em particular, podem torná-lo com predisposição para lesão maior no futuro (WISLØFF, HELGERUD, HOFF, 1998).

MOLFINO *et al.* (2014) analisaram o papel da suplementação com AG ω -3 em idosos e um dos aspectos estudados foi o efeito destes ácidos na função muscular e óssea. Os autores concluíram que a suplementação está fortemente correlacionada com a função e manutenção da massa muscular.

A suplementação com AG ω -3 também tem sido estudada como auxílio na perda de peso e ganho de massa muscular, quando associada ao exercício (DEFINA *et al.*, 2011).

Como já apontado anteriormente, os AG ω -3 são amplamente consumidos, assim como pesquisados na área clínica. Recentemente, o seu efeito no músculo esquelético tem despertado interesse, como uma estratégia nutricional para a manutenção da integridade da fibra muscular e prevenção da sarcopenia, como também para o aumento da massa muscular, associada ao exercício. Esta nova perspectiva do seu uso, por ser ainda pouco elucidada, motivaram a realização deste estudo.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Objetivo primário: Analisar os efeitos da suplementação de AG ω -3 (ácidos graxos ômega-3) no músculo esquelético em ratos submetidos ao exercício físico.

Objetivo Secundário: Verificar o efeito da suplementação de AG ω -3 nos valores séricos de CK (creatina quinase), DHL (desidrogenase láctica) e no perfil lipídico dos animais estudados.

3. LITERATURA

3. Literatura

3.1. O músculo esquelético

A musculatura esquelética constitui aproximadamente 40% do peso corporal humano (SHAVLAKADZE & GROUNDS, 2006). A água representa em torno de 75% da massa do músculo esquelético e a proteína corresponde a 20%. Os 5% restantes são representados por sais e outras substâncias, incluindo os fosfatos de alta energia, a ureia, o ácido lático, minerais (cálcio, magnésio e fósforo), várias enzimas, os íons de sódio, potássio e cloro, aminoácidos, gorduras e carboidratos (McCARDLE, KATCH, KATCH, 2008).

O músculo esquelético é a principal reserva de proteínas, cerca de 60% da proteína total do corpo dos seres humanos. O tecido muscular esquelético contém milhares de proteínas específicas que podem ser classificadas como miofibrilares, sarcoplasmáticas e frações mitocondriais (POOTTMANS *et al.*, 2012). A miosina (aproximadamente 60% da proteína muscular), actina e tropomiosina são as proteínas mais abundantes. Cada 100g de tecido muscular contém cerca de 700mg de proteína conjugada fixadora de oxigênio, a mioglobina (McCARDLE, KATCH, KATCH, 2008).

A massa muscular é regulada pelo equilíbrio (ou a falta dele) entre as taxas de síntese e degradação das proteínas (STEINER, GORDON, LANG, 2015). O *turnover* da proteína muscular é a soma do processo de síntese de proteína muscular (SPM) e a degradação da proteína muscular (DPM) (POOTTMANS *et al.*, 2012).

Depois da infância, o desequilíbrio crônico entre o processo de síntese e degradação da proteína, leva a um ganho líquido (hipertrofia: SPM>DPM) ou perda líquida de proteínas (atrofia: DPM>SPM) (PHILLIPS, 2014).

Com o desenvolvimento de técnicas da biologia molecular, ocorreram grandes avanços na compreensão das múltiplas vias de sinalização intracelulares, do *turnover* de proteína muscular com consequente reprogramação genética, que resulta em alterações na massa contráctil e nas propriedades metabólicas. Tais interações sugerem que a dinâmica na regulação da massa esquelética não é simplesmente um balanço entre síntese e degradação proteica, mas um processo finamente regulado (MIYAZAKI *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012).

O processo de desenvolvimento do músculo esquelético é chamado de miogênese. Todas as células começam como células-tronco embrionárias, que recebem inúmeros sinais e são programadas para assumir característica especializada tais como nervos, músculos, pele, ossos e órgãos. Este processo de especialização é chamado de diferenciação. Antes da diferenciação, ocorrem eventos importantes difíceis de observar. Um dos eventos é o momento em que a célula-tronco é direcionada para uma linhagem de tecido, o que é chamado de determinação (LIEBER, 2012, p.07).

Na biologia do músculo esquelético, o processo de determinação e diferenciação é finamente controlado por uma família de proteínas, que são chamadas de fatores reguladores da miogênese. O termo técnico para a proteína que controla a expressão do DNA é fator de transcrição. Um dos primeiros fatores de transcrição descoberto foi chamado de *myoD* (LIEBER, 2012, p.07).

Pesquisadores observaram que quando o *myoD* era expresso, uma célula-tronco era determinada para começar uma célula muscular.

Posteriormente, os pesquisadores descobriram que os fatores regulatórios miogênicos (*mrfs*) são uma família de quatro proteínas: a *myoD*, *mifs*, *mrf4* e *miogenina*. As duas primeiras proteínas (*myoD* e *mifs*) são expressas no momento da determinação, atuam na célula-tronco para ser determinado um mioblasto e as duas últimas proteínas (*mrf4* e *miogenina*) são expressas no momento da diferenciação, onde atuam no desenvolvimento das fibras musculares (LIEBER, 2012, p. 07; FERNANDES *et al.*, 2012).

A síntese proteica no músculo esquelético é estimulada pelo Fator de crescimento IGF-1 e insulina. Estímulos mecânicos, como o exercício físico aumenta a expressão de IGF-1 que ativa as vias de sinalização proteicas PI3K, Akt, mTOR e p70S6K, levando a hipertrofia muscular. (MIYAZAKI *et al.*, 2011; LIEBER, 2012).

Um fator de transcrição conhecido como FOXO, tem papel muito importante no controle da síntese e degradação proteica. Este fator, em condições de atrofia, entra no núcleo da fibra muscular e ativa a atrogênese (i.e: resposta atrófica), através da produção de atrogina (LIEBER, 2012, p.07).

Por outro lado, em condições hipertróficas o IGF-1 e a insulina ativam as proteínas de sinalização PI3K e AKT, que em cascata inibem a entrada do FOXO no núcleo, resultando na inibição da atrogênese e levando a hipertrofia muscular. (OCHI, ISHII, NAKAZATO, 2010; LIEBER, 2012, p. 207).

3.2. Hipertrofia muscular

O músculo esquelético é uma estrutura muito plástica, o que significa que ele é capaz de adaptar a sua estrutura e função em diferentes cargas de trabalho impostas (ERZEN, 2004).

A massa muscular mantém um elevado grau de plasticidade fenotípica durante o tempo de vida de um indivíduo, permitindo adaptações a diferentes tipos de treinamento físico e cargas de trabalho impostas (ERZEN, 2004; FLANN *et al.*, 2011).

Nos esportes, na reabilitação física, na cirurgia e no trauma, a ideia de que o músculo esquelético é um dos tecidos mais adaptáveis do corpo, é facilmente comprovada (FLANN *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012).

A hipertrofia muscular é conhecida pelo aumento da área de secção transversa do músculo esquelético a partir da biossíntese de novas estruturas envolvidas na contração muscular, sendo uma das principais adaptações geradas no músculo em decorrência do treinamento físico (GLASS, 2005).

Um dos mecanismos mais amplamente reconhecidos para provocar a hipertrofia muscular, é a tensão mecânica. Mecanotransdução é o termo utilizado para descrever a conversão da tensão mecânica num sinal bioquímico que desencadeia a sinalização intracelular anabólica e a síntese de proteína muscular. Geralmente, a hipertrofia induzida pelo treinamento é considerada um processo lento. Frequentemente dura em torno de 6 a 7 semanas para ocorrer uma hipertrofia significativa, na qual o aumento muscular pode ser demonstrado (PHILLIPS, 2000).

Entretanto, estudos observaram hipertrofia mais precoce após programas de treinamento (SEYNNES, BOER, NARICI, 2007; OCHI, ISHII, NAKAZATO, 2010; DEFREITAS *et al.*, 2011).

DEFREITAS *et al.* (2011), examinaram o tempo da hipertrofia do músculo esquelético, induzida por um programa de treino de força. Eles submeteram 28 homens com média de idade de $21,5 \pm 3,6$ anos, saudáveis e sedentários, durante oito semanas, a vinte e quatro sessões de treinamento, com intervalos de 48 horas de cada sessão. Foi medida a área

seccional do músculo do braço dominante em cada semana, através do uso da tomografia computadorizada. A hipertrofia muscular foi significativa depois de três a quatro semanas de treinamento.

RADER *et al.*(2014) estudaram a adaptação promovida pelo levantamento de peso volitivo em ratos na performance e morfologia do músculo esquelético. Os animais foram divididos em três grupos: controle, com cargas de 70 e 700g durante um mês, para observar a hipertrofia muscular através do método estereológico. Exclusivamente, o grupo submetido à carga de 700g aumentou o número de fibras por unidade de área em 20% e decresceu a área da fibra muscular em 20%, com isso a massa muscular permaneceu inalterada, isso inclusive ocorreu principalmente no músculo *gastrocnêmio*. Os autores concluíram que neste modelo, alterações morfológicas distintas acompanham o precoce ganho de força antes de ocorrer a hipertrofia propriamente dita. Os autores relataram que em estudo anterior com duração de dois meses, ocorreu a hipertrofia do músculo *gastrocnêmio*.

3.3. Suplementos nutricionais para aumento da massa muscular

A síntese proteica é dependente da disponibilidade de substratos construtores, energéticos e reguladores; portanto, a magnitude da resposta hipertrófica muscular tem estreita dependência em relação à ingestão nutricional (PASCHOAL & NAVES, 2014).

Os nutrientes podem ser obtidos através da alimentação. No meio esportivo os suplementos nutricionais têm sido muito utilizados. A indústria destes suplementos tem desenvolvido produtos com nutrientes

isolados ou com uma combinação deles com o objetivo de aumentar a massa muscular, a força e o desempenho físico.

KREIDER *et al.* (2010) realizaram uma revisão sobre as pesquisas e recomendações de suplementos nutricionais na área esportiva, onde foi efetuada uma análise sobre supostos suplementos para aumento de massa muscular. Foram considerados eficazes e seguros os seguintes suplementos:

- Creatina monohidratada - considerada nesta revisão o mais eficaz suplemento nutricional disponível para os atletas, para aumentar a massa muscular, associado a exercícios de alta intensidade.
- Proteína: atletas submetidos a treinamento intenso podem precisar de proteína adicional em sua dieta para atender às necessidades de proteína para síntese proteica muscular.
- Aminoácidos Essenciais: estudos recentes indicaram que a ingestão de 3 a 6 g destes aminoácidos antes e/ou após o exercício estimula a síntese proteica.

Além disso, outros suplementos que possuem fundamentação teórica para seu uso, mas que exigem mais pesquisas para determinar seu potencial anabólico são:

- β -hidroxi β -metilbutirato (HMB) - é um metabólito do aminoácido leucina. A leucina e os seus metabólitos inibem a degradação de proteínas.
- Aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) - relatou-se que reduzem a degradação de proteínas e de enzimas indicadoras de lesão muscular induzida pelo exercício, possivelmente através da promoção de um perfil hormonal anti-catabólico.

Recentemente, componentes alimentares com ações fisiológicas foram chamados de “alimentos funcionais” e os efeitos destes alimentos

têm sido cientificamente investigados (NICKLEBOROUGH *et al.*, 2003; AOI, NAITO, YOSHIKAWA, 2006).

Mais recentemente, outros nutrientes ou fitoquímicos presentes nos alimentos tem sido investigados quanto aos seus efeitos no ganho de massa muscular, como exemplos a vitamina C (MAKANAE *et al.*, 2013), o ácido ursólico, presente na maçã e outras frutas (OGASAWARA *et al.*, 2013), o ácido fosfatídico presente na soja (JOY *et al.*, 2014) e os ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (AG ω -3) presentes em peixes e óleo de peixes (WHITEHOUSE & TISDALE, 2001; BRAGA *et al.*, 2006; GINGRAS, WHITE, CHOUINARD, 2007).

3.4. Ácidos Graxos Ômega-3

Os ácidos graxos polinsaturados (AGPI) são considerados nutrientes benéficos para a saúde humana, com efeito particular no sistema cardiovascular e sistema nervoso (SIMOPOULOS, 2002; DUDA *et al.*, 2009; TENG *et al.*, 2010; BUCKLEY & HOWE, 2010; BAKKER, ERK, PELLIS, 2010; SILVERBERG & SCHWARTZ, 2012). Estes ácidos são classificados em quatro tipos de famílias: ômega-3 (ω -3), ômega-6 (ω -6), ômega-7 (ω -7) e ômega-9 (ω -9), sendo que esta classificação refere-se à posição da primeira insaturação (dupla ligação) na cadeia carbônica a partir do carbono terminal (MARTIN *et al.*, 2006; SURETTE, 2008).

Duas famílias de AGPI, os ácidos graxos ω -3 (ácido linolênico) e ω -6 (ácido linoleico) são os mais consumidos no mundo e estão associados a efeitos amplamente discutidos na comunidade científica (FAPPI *et al.*, 2014). Eles são seletivamente incorporados aos lipídeos da membrana plasmática em vários tipos de células, especialmente naquelas com funções especializadas, por exemplo: cardíacas, musculares, nervosas e células do

sistema imunológico (GALLI & CALDER, 2009; ABBOTT, ELSE, HUBERT, 2010; FAPPI *et al.*, 2014).

Os ácidos graxos ω -3 (AG ω -3) e ω -6 (AG ω -6) têm sido alvo de inúmeros estudos nas últimas décadas (ABBATECOLA *et al.*, 2009; ROUSSEAU, KLEPPINGER, KENNY, 2009; MOLFINO *et al.*, 2014). Estes ácidos podem ser produzidos pelas plantas mediante a introdução de duplas ligações adicionais no ácido oleico, formando o AG ω -6 com duas insaturações ou o AG ω -3 com três insaturações (MARTIN *et al.*, 2006).

Devido à limitação que os seres humanos possuem para sintetizar estes ácidos graxos, eles são considerados essenciais e é necessário obtê-los em quantidades suficientes por meio da dieta (MARTIN *et al.*, 2006; SURETTE, 2008; BUCKLEY & HOWE, 2010; MOLFINO *et al.* 2014).

Os AG ω -6 são convertidos por uma série de dessaturações e alongações em ácido araquidônico (AA), enquanto os AG ω -3, da mesma forma, dão origem aos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaenoico (DHA). Estes ácidos que são de cadeia longa vão formar eicosanoides, que incluem prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Os AG ω -3 geram prostaglandinas e tromboxanos da série-3 e leucotrienos da série-5 (séries ímpares), que têm efeito antitrombótico, antivasoconstritor e anti-inflamatório. No entanto, os AG ω -6 produzem prostaglandinas e tromboxanos da série-2 e leucotrienos da série-4 (séries pares), cujos efeitos são opostos (SANT'ANA, 2004; GALLI & CALDER, 2009; CALDER, 2010).

EPA e DHA são AG ω -3, inibem o metabolismo do AA, que é um AG ω -6 e reduzem a produção de mediadores inflamatórios, que são os leucotrienos e prostaglandinas e a produção de citocinas por células inflamatórias (ENDOH *et al.*, 2005). O consumo de óleo de peixe resulta numa parcial inibição do AA em membranas de células inflamatórias,

provocada pelo EPA. Esta resposta representa um potencial efeito anti-inflamatório dos AG ω -3 (ARITA *et al.*, 2005) (figura 1).

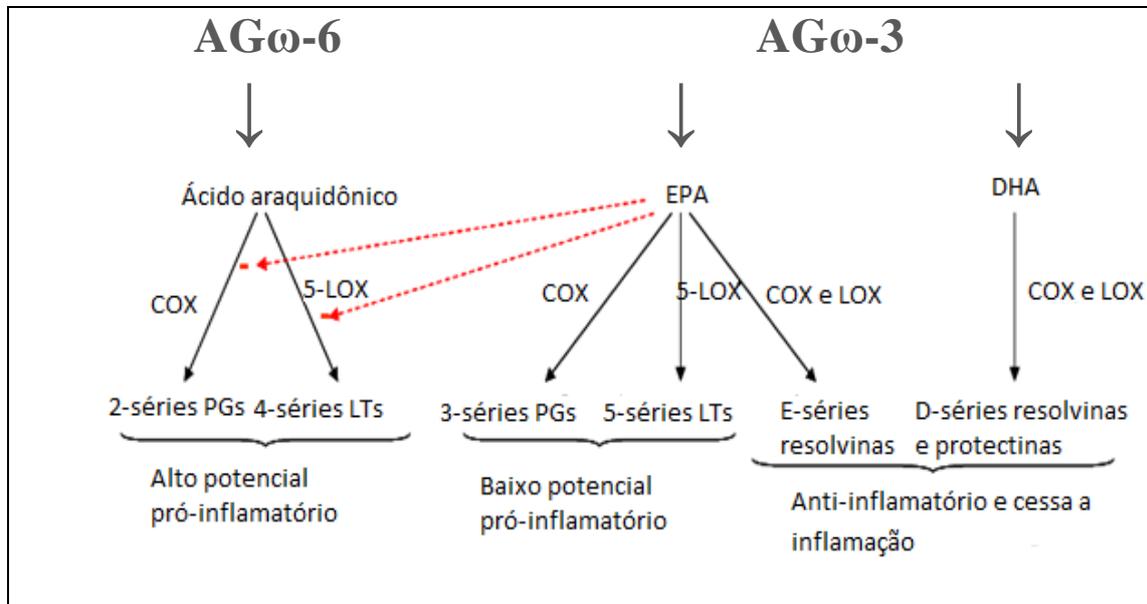


Figura 1 - Visão geral da síntese de mediadores lipídicos do ácido araquidônico, EPA e DHA e dos seus efeitos na inflamação. Fonte: Calder (2010, p. 8).

Os AGPI das séries ω -3 e ω -6 competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia. Embora essas enzimas tenham maior afinidade pelos ácidos da família ω -3, a conversão dos AG ω -3 é fortemente influenciada pelos níveis de AG ω -6 na dieta. Assim, a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de AG ω -3 e AG ω -6 assume grande importância na nutrição humana, resultando em várias recomendações que têm sido estabelecidas por autores e órgãos de saúde em diferentes países (MORITZ *et al.*, 2008).

Os AG ω -6, denominados linoleicos, são encontrados em óleos vegetais como o de algodão, gergelim, girassol, soja, milho, cereais integrais, leite, ovos, carnes, aves e alimentos processados (WEISS, BARRETT-CONNOR, MÜHLEN, 2005; MARTIN *et al.*, 2006; LANCHETA Jr, 2009).

Os AG ω -3, denominados α -linolênicos, são encontrados principalmente nos óleos de moluscos e de peixes de água fria, tipo

anchova, atum, arenque, cavalinha, salmão, sardinha, truta e tainha; assim como, em mamíferos marinhos (MARTIN *et al.*, 2006; SURETTE, 2008; SILVERBERG & SCHWARTZ, 2012). Peixes oriundos da piscicultura contêm menor teor de AG ω -3 e maior teor de AG ω -6 (PASCHOAL & NAVES, 2014). Fontes vegetarianas de AG ω -3 são encontradas nas sementes e no óleo de linhaça, de canola, na chia e nas nozes. Pequenas quantidades são encontradas em vegetais, frutas, ovos, aves, e carnes. (WEISS, BARRETT-CONNOR, MÜHLEN, 2005).

Suplemento de óleo de peixe também é uma fonte rica e normalmente contêm de 30% a 50% de AG ω -3 por peso (SURETTE, 2008).

Estima-se que a razão de AG ω -6/AG ω -3 na dieta das pessoas que viveram no período que antecedeu a industrialização, girava em torno de 1:1 a 2:1, devido ao consumo abundante de vegetais e de alimentos de origem marinha, contendo AG ω -3. A dieta ocidental moderna contém elevadas quantidades de AG ω -6, resultando numa elevada razão de AG ω -6/AG ω -3 (~15:1), o que pode promover o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SIMOPAULOS, 2002).

Alguns países, como a Suécia e a Alemanha têm estabelecido recomendações para uma ingestão por meio da dieta, na razão de AG ω -6/AG ω -3 de 5:1, enquanto o Japão é mais rigoroso e estabelece uma ingestão na razão de 2:1. A *Food and Agricultural Organization of the United Nations* (FAO) é menos exigente e estabelece uma ingestão destes ácidos com a razão AG ω -6/AG ω -3 de 5-10:1 (SANT'ANA, 2004).

ABBATECOLA *et al.* (2009) estudaram a relação do consumo de AGPI e o declínio da *performance* física em idosos durante três anos. Eles constataram que o nível plasmático de AG ω -3, os quais refletem a ingestão dietética, parecem proteger contra o acelerado declínio do desempenho

físico e que uma maior razão de AG ω -6/AG ω -3 está associada ao menor desempenho físico e à menor velocidade de caminhada.

BLASBALG *et al.* (2011) analisou a mudança no consumo de AG ω -6 e AG ω -3 na dieta da população americana no século 20 e verificou que a razão AG ω -6/AG ω -3 aumentou de 6,4 em 1909 para 10 em 1999. A maior modificação na dieta desta população neste século foi o aumento na estimativa do consumo per capita de óleo de soja de 0,006% para 7,38% da energia consumida. Este aumento se deu principalmente na última metade do século, de 1946 a 1999.

Com a industrialização, ocorreu um aumento progressivo desta razão, devido principalmente à produção de óleos refinados oriundos de espécies oleaginosas com alto teor de linoleico e a diminuição da ingestão de frutas e verduras, resultando em dietas com quantidades inadequadas de AG ω -3. Além disso, com o desenvolvimento difundido de certas práticas da criação de gado, incluindo a alimentação com grãos em vez de grama, tem levado a um decréscimo no consumo dos AG ω -3 (YOUNG & MARTIN, 2003; BLASBALG *et al.*, 2011).

Pesquisas clínicas com a suplementação com os AG ω -3 indicaram seu impacto positivo em certas doenças, particularmente aquelas em que a inflamação é sugerida como componente chave na patogênese (BUCKLEY & HOWE, 2010; SILVERBERG & SCHWARTZ, 2012).

A base molecular de ação nas doenças e local de inflamação tem sido investigada, incluindo doenças cardiovasculares (BUCKLEY & HOWE, 2010; SILVERBERG & SCHWARTZ, 2012), osteoartrite (JEROSCH, 2011), fibromialgia (KO *et al.*, 2010), asma e periodontites (ARITA *et al.*, 2005), doenças neuro degenerativas (SIMOPOULOS, 2002; RAMIREZ-RAMIREZ *et al.* 2013), depressão (HUANG *et al.*, 2008), transtornos de humor e pancreatite (WEYLANDT *et al.*, 2008), diabetes tipo 1 e 2 e

obesidade (GALLI & CALDER, 2009; BUCKLEY & HOWE, 2010; BAKKER *et al.*, 2010; DEFINA *et al.*, 2011). Além disso, são utilizados em alguns produtos para gestantes e lactentes para promover um melhor desenvolvimento cerebral e visual em crianças (LINKO & HAYAKAWA, 1996; SURETTE, 2008).

Atualmente, também tem sido estudado o seu efeito na prevenção de lesões neoplásicas (WHITEHOUSE & TISDALE, 2001) e foram observadas propriedades imunossupressoras e anticaquéticas (BAKKER *et al.*, 2010; ROGERS *et al.*, 2011).

A suplementação com AG ω -3 tem demonstrado efeito benéfico na perda de peso e ganho de massa muscular, quando associada ao exercício (DEFINA *et al.*, 2011).

Com isso, abriram-se novos horizontes de pesquisa, e uma delas aqui apresentada, é a possibilidade dos AG ω -3 contribuir na integridade e ganho de massa muscular decorrentes de exercícios intensos. Torna-se importante e necessária a compreensão do papel dos AG ω -3 nas fibras musculares, para somar a tantos outros benefícios já conhecidos.

3.5. Ácidos Graxos Ômega-3 e Hipertrofia Muscular

MOLFINO *et al.* (2014), em uma recente revisão, analisaram o papel da suplementação com AG ω -3 em idosos e um dos aspectos estudados foi o efeito destes ácidos na função muscular e óssea. Os estudos relacionados à função muscular foram de CORNISH & CHILIBECK (2009), ROUSSEAU *et al.* (2009) e SMITH, GREENBERG, TISDALE (2011).

CORNISH & CHILIBECK (2009) estudaram o efeito da suplementação com AG ω -3 associada ao treino de força em idosos. O

objetivo da pesquisa foi avaliar a efetividade dos AG ω -3 nos marcadores de inflamação, na massa muscular e força de idosos submetidos a um programa de treino de força progressiva. A hipótese dos autores é que a redução crônica da inflamação devido aos AG ω -3 poderia aumentar o conteúdo e a densidade mineral óssea mais que o placebo, durante o programa de exercício de força. Participaram da pesquisa 51 idosos e as variáveis dependentes foram: concentração plasmática de IL-6 e TNF- α , avaliação física e DXA. Os indivíduos foram divididos por sexo, randomizados e suplementados com AG ω -3 ou placebo. Cada indivíduo completou um programa progressivo de treinamento três vezes por semana, durante doze semanas. A suplementação com AG ω -3 diminuiu a concentração IL-6 em homens idosos, mas não nas mulheres, mas não teve efeito significativo na massa muscular e na força dos sujeitos avaliados.

ROUSSEAU *et al.* (2009) analisaram a relação entre o relato de ingestão de AG ω -3 e a densidade óssea através da DXA e a função muscular dos membros inferiores de idosos. O estudo foi transversal e participaram 247 idosos, sendo 118 homens e 129 mulheres. Os idosos reportaram uma média de ingestão de 1,27g/dia de AG ω -3, quantidade considerada baixa. Os autores concluíram que houve uma associação entre alta ingestão de AG ω -3 e maior densidade mineral óssea, mas não houve associação com a função muscular. Os autores acreditam que esta última é influenciada por outros fatores nutricionais, tais como, a ingestão de proteínas, de vitamina D e associação entre a razão de ingestão de AG ω -6/ ω -3, que foi pesquisada no estudo de Rancho Bernardo (WEISS, BARNETT-CONNOR, MÜHLEN, 2005), no qual os autores encontraram correlação inversa entre esta razão e a densidade mineral óssea.

SMITH, GREENBERG, TISDALE (2011) realizaram um estudo clínico randomizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação

com os AG ω -3 na síntese proteica muscular em idosos. Sessenta e seis idosos foram randomizados em dois grupos recebendo AG ω -3 ou óleo de milho durante oito semanas. Eles avaliaram a taxa da síntese proteica e as vias de sinalização anabólicas musculares antes e após a suplementação, em condições basais, pós absorptivas e durante hiperaminoacidemia - hiperinsulinemia. A suplementação com os AG ω -3 não teve efeito na taxa basal de síntese proteica, mas na condição de hiperaminoacidemia – hiperinsulinemia, aumentou a taxa de síntese proteica muscular que foi acompanhada com o grande aumento de mTor e p70S6K no músculo. Os autores concluíram que os AG ω -3 estimulam a síntese proteica muscular em idosos (por um mecanismo ainda não conhecido) e que podem ser usados na prevenção e tratamento da sarcopenia.

A suplementação com AG ω -3 está fortemente correlacionada com a função e manutenção da massa muscular. A maior ingestão de AG ω -3 na dieta ou na forma de suplementos deve ser encorajada, apesar de serem necessários mais estudos para elucidar os resultados conflitantes na literatura sobre o efeito dos AG ω -3 na manutenção da saúde óssea, na prevenção da perda de massa muscular e função associada com o envelhecimento (MOLFINO *et al.* 2014).

3.6. Ácidos Graxos Ômega-3 e Atrofia Muscular

Atrofia muscular é a perda de massa muscular resultante de uma redução da área da fibra muscular ou da densidade devido a uma diminuição da síntese proteica e um aumento da degradação de proteínas musculares. Alguns estudos recentes têm demonstrado um potencial atrogênico dos AG ω -3. (FAPPI *et al.*, 2014).

SOHAL *et al.* (1992) estudaram o efeito da dieta com altas doses de AG ω -3 (19%) versus controle (1%) em ratos saudáveis. Depois de três semanas, metade dos ratos foi induzida ao diabetes por meio da estreptozotocina, os quais formaram quatro grupos. Depois de passadas as três últimas semanas do experimento, os músculos epitrocleares e extensor longo dos dedos de cada rato foram avaliados *in vitro*. A dieta com altas doses de AG ω -3 diminuiu a síntese das prostaglandinas PGE₂ e PGF₂ nos dois músculos. Os músculos de todos os ratos alimentados com dieta com alto teor de AG ω -3 mostraram diminuição de 20% nas taxas de síntese proteica, comparado com os músculos dos ratos que ingeriram dieta com baixo teor de AG ω -3. As taxas de degradação proteica foram inibidas em torno de 10% nos músculos dos animais que ingeriram dieta com alto teor de AG ω -3. Os autores mostraram que a administração de EPA causou mudanças na composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos da membrana muscular, através da observação da mudança da produção das prostaglandinas. A dieta contendo altos níveis de AG ω -3 afetou significativamente todos os parâmetros do *turnover* proteico estudado. Os autores concluíram que a ingestão de óleo de peixe pode ter implicações com a composição da membrana muscular e resulta na alteração do metabolismo da glicose e da proteína muscular. Os autores sugeriram que a aparente habilidade dos AG ω -3 de suprimir as taxas de síntese e degradação proteica pode ter efeito no crescimento muscular e na atrofia e estes aspectos precisam ainda ser mais pesquisados.

VIGOUROUX *et al.* (2003) estudaram a influência de dietas suplementadas com óleo de peixe (9%) ou óleo de girassol (3%) na atividade do sistema proteosoma (que provoca a degradação proteica) nos músculos esqueléticos de ratos Wistar durante oito semanas. As duas dietas aumentaram a atividade do proteosoma, mas o aumento foi mais

pronunciado na dieta com óleo de peixe, sendo que no músculo *gastrocnêmio* o aumento foi de 90%. Os autores sugeriram que este aumento se dá devido à peroxidação lipídica que pode danificar proteínas.

LE FOLL *et al.* (2007) estudaram os mecanismos de sinalização celulares com uma dieta com baixo teor de AG ω -3 e avaliaram se esta dieta pode modular a atividade da PI3K e diminuir a fosforilação de Akt em ratos normais e com resistência a insulina. Durante 28 dias os ratos foram alimentados com dieta controle, contendo 14,6% do valor calórico composto de óleo de amendoim ou dieta com AG ω -3, na qual 4,9% do valor calórico do óleo de amendoim foram substituídos por óleo de peixe. O estímulo da insulina na PI3K e Akt foi estudado no fígado, músculo e tecido adiposo. Os autores verificaram que os ratos alimentados à base da dieta com AG ω -3 diminuíram a habilidade da insulina de estimular a atividade da PI3K e reduziram significativamente os níveis de Akt no tecido muscular. O decréscimo da atividade da Akt pela PI3K resulta em alta ativação dos fatores de transcrição como o FOXO, envolvidos no processo de atrofia muscular.

CASTILLERO *et al.* (2009) pesquisaram o efeito da suplementação com EPA na prevenção da perda de peso e da massa muscular induzida pela artrite. Os ratos receberam 1g/Kg/dia de EPA ou óleo de coco durante quinze dias. O EPA não alterou o decréscimo na ingestão alimentar e não teve efeito no ganho de peso corporal, mas preveniu o aumento de proteínas de sinalização de atrofia muscular (TNF- α e atrogina-1) e aumentou *MurF1 mRNA* e o peso do músculo *gastrocnêmio*. Nos ratos com artrite, o EPA não modificou o efeito estimulatório da artrite nos fatores regulatórios da miogênese. Os autores sugeriram que a suplementação com EPA atenuou a perda de músculo por decréscimo do

TNF- α e atrogina-1 e aumentou os fatores de transcrição que regulam a miogênese.

FAPPI *et al.* (2014) avaliaram o efeito da suplementação com AG ω -3 no desenvolvimento da atrofia muscular induzida pela dexametasona, através de análises histológicas, expressão de genes envolvidos na síntese e degradação proteica e análise da expressão de proteínas envolvidas, como a IGF-1, PI3K, AKt e mTOR. A hipótese destes pesquisadores era que a suplementação com os AG ω -3 poderia impedir a atrofia induzida pela dexametasona. Eles utilizaram dois grupos de ratos Wistar, com e sem a suplementação com AG ω -3, durante 40 dias. Nos últimos dez dias, os grupos foram subdivididos em quatro grupos: controle, dexametasona, AG ω -3 e AG ω -3 + dexametasona. Foram analisadas secções da área das fibras musculares, expressão de genes *myo D*, miogenina, *murf-1* e atrogina-1, a expressão das proteínas Akt, GSK3 β , FOXO3a e mTOR. A dexametasona induziu a perda de peso corporal e muscular, a atrofia nas fibras tipo II b e decréscimo na expressão das proteínas Akt, GSK3 β e FOXO3a. A suplementação com AG ω -3 não atenuou o efeito da dexametasona no músculo esquelético e, ao contrário, causou atrofia nas fibras musculares dos tipos I e IIa, reduziu a expressão de miogenina e aumentou a expressão de atrogina-1. Os pesquisadores concluíram que suplementos contendo AG ω -3 são usualmente benéficos para a saúde, mas eles podem potencializar alguns dos efeitos colaterais dos glicocorticóides.

3.7. O método estereológico

A estereologia é um conjunto de métodos que permite a aplicação de regras morfométricas para apresentar informações de secções em duas

dimensões (2D) ou em três dimensões (3D). As estimativas de qualquer parâmetro em especial, para ser significativa, tem que representar a estrutura como um todo. Isto significa que a estrutura tem que ser seccionada de tal modo que todas as partes tenham igual probabilidade de estar presente nas secções que estão sendo utilizadas na análise. Ou seja, é necessária uma amostra representativa das secções a partir da estrutura inteira ou área a ser analisada, seja em 2D ou 3D (WEST, 2012).

Uma das maneiras pela qual isto pode ser conseguido em material histológico é fazer a amostragem das secções a serem analisadas de maneira aleatória, sistemática e uniforme. A uniformidade significa que o conjunto de secções a serem coletadas para análise seja espaçado a intervalos iguais ao longo de toda região de interesse. Um dado importante é que a primeira secção no conjunto é posicionada aleatoriamente dentro do primeiro intervalo (WEST, 2012).

No caso da análise em 2D, isto é possível através da aplicação do “Fractionator” 2D, o qual realiza o procedimento de amostragem sistemática, uniforme e aleatória das regiões de cada secção histológica a ser analisada. Posteriormente, aplica-se o “Nucleator” 2D, que a partir do ponto central de cada unidade selecionada (dentro da região amostrada pelo Fractionator 2D) são projetadas linhas com direções isotrópicas que serão delimitadas até a borda da unidade a ser medida com o auxílio de um programa computacional (WEST, 2012).

ERZEN (2004) descreveu as possibilidades de aplicação dos métodos estereológicos para estudar os músculos esqueléticos e o autor concluiu que estes métodos não são ainda suficientemente reconhecidos, mas que representam uma ferramenta útil para quem deseja estudar a plasticidade do músculo esquelético.

A estereologia vem tomando o lugar da morfometria. A maioria dos estudos utilizava a morfometria para realizar as medidas dos componentes do músculo esquelético. Portanto, por ser uma técnica mais precisa, utilizamos nessa pesquisa o método estereológico, com o intuito de diminuir a margem de erro.

3.8. Creatina Quinase, Lactato Desidrogenase e Lesão Muscular

O micro trauma, a inflamação e a dor são frequentemente causados pelo aumento de atividade física, tais como treino intenso ou competição em atletas de elite. A resposta ao micro trauma é usualmente seguida por uma resposta aguda inflamatória (SCHENFELD, 2010).

Depois de um exercício intenso, a dor muscular que ocorre em torno de 24-48 horas após a execução da atividade física, é chamada de dor muscular de início tardio (DMIT). A quantificação da intensidade da dor é difícil, por ser um parâmetro subjetivo, portanto, investigadores têm reconhecido outros parâmetros mais objetivos para estudar o exercício excêntrico (LIEBER, 2012), tais como a mensuração de parâmetros sanguíneos de enzimas, como a creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (DHL) e conteúdo de mioglobina (Mb) (THOMPSON, NICHOLAS, WILLIAMS, 1997; XIAO, 2015).

A CK está localizada dentro da fibra muscular e em condições normais, permanece lá. Entretanto, quando o exercício é extremamente intenso e a célula é lesada, a CK é liberada no sangue, onde pode ser detectada (LIEBER, 2012). A elevação sérica da CK é atribuída a lesões teciduais, podendo resultar em aumento na permeabilidade da membrana celular, entre outros fatores, devido à peroxidação lipídica (ARAUJO *et al.*, 2010).

A CK serve como um marcador indireto da integridade e lesão da miofibrila (LIEBER, 2012). As concentrações circulantes de CK são alteradas conforme volume e intensidade de treinamento (ARAUJO *et al.*, 2010). Esta enzima catalisa a fosforilação da adenosina difosfato (ADP) do fosfato de creatina, tornando o ATP disponível para a contração muscular (LIEBER, 2012), como ilustra a figura abaixo:

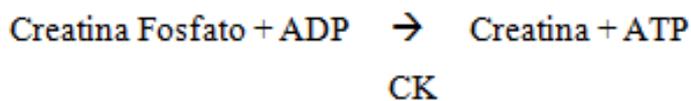


Figura 2 - Esquema da reação mediada pela enzima creatina quinase (CK)

O nível sérico circulante de CK é amplamente utilizado como biomarcador de estresse e alteração na atividade muscular em animais e humanos (ARAUJO *et al.*, 2010). Inúmeros estudos mostram aumento destes parâmetros em resposta ao treinamento físico, principalmente em atividades que exigem contrações excêntricas (NOSOKA & CLARKRSON, 1995; LENN *et al.*, 2002; ENDOH *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2010).

ZOPPI *et al.* (2003) realizaram uma pesquisa sobre a atividade da enzima CK no plasma de jogadores de futebol, para quantificar os níveis de alteração muscular. Os pesquisadores não encontraram variação significativa durante a temporada estudada, embora tenha apresentado grande variabilidade entre os sujeitos e sempre estivera bem acima da média dos valores de referência para sujeitos não atletas, evidenciando um maior nível de alteração muscular, ou pelo menos uma maior permeabilidade da membrana sarcolemal neste grupo de atletas, pelo próprio estresse induzido pelo treinamento a que são submetidos diariamente. Os autores consideram que deve haver outra faixa de

referência para os valores da CK nesta população, uma vez que os atletas participantes do grupo experimental não apresentaram nenhum tipo de lesão muscular que os impedisse de participar dos jogos por motivo de tratamento.

PRADA *et al.* (2004), analisaram biomarcadores de condicionamento aeróbico, de estresse oxidativo e lesão muscular em ratos treinados com natação na intensidade correspondente ao limiar anaeróbico (LAN). Além disso, os autores analisaram as concentrações plasmáticas de CK em ratos (n=10) submetidos a um teste para determinação do limiar anaeróbico e após uma semana a um protocolo de natação com duração de 4 semanas e controle (n=10). Os ratos nadaram uma hora por dia suportando carga correspondente ao limiar anaeróbico que foi determinada previamente. Ao final deste período, todos os ratos (controles e treinados) foram novamente submetidos ao teste de esforço com carga fixa. Constatou-se redução significativa da atividade da enzima CK no sangue dos ratos treinados em comparação com os controles, sugerindo redução das lesões musculares. Os autores concluíram que o protocolo de natação na intensidade correspondente ao limiar anaeróbico durante 4 semanas foi eficaz em melhorar o condicionamento aeróbico dos animais e reduzir as lesões musculares.

NIU *et al.*(2008) investigaram o efeito protetor da suplementação com *lycium barbarum polysaccharides* (uma planta da família das *Solanaceae*, muito usada na China) no dano oxidativo no músculo esquelético de ratos submetidos ao exercício exaustivo durante 30 dias. Foram utilizados 32 ratos machos Wistar, divididos em 4 grupos: controle e com dosagens diferentes da planta estudada. A CK foi mensurada e os autores observaram que a atividade desta enzima diminuiu

proporcionalmente com o aumento das dosagens de *lycium barbarum polysaccharides* utilizadas. Os autores concluíram que esta planta tem um efeito protetor no estresse oxidativo causado pelo exercício intenso de longa duração.

ARAÚJO *et al.* (2010), testaram um protocolo experimental periodizado em natação utilizando ratos Wistar. Eles verificaram os efeitos de 12 semanas de treinamento sobre os valores de glicogênio muscular e hepático, a capacidade aeróbia, anaeróbia e a creatina quinase (CK). A concentração de CK, não se modificou ao longo da periodização em comparação ao grupo controle. Este resultado, segundo os autores, sugere que as 12 semanas de periodização não resultou em lesão tecidual significativa.

A desidrogenase láctica (DHL) é uma enzima de transferência de hidrogênio, que catalisa a inter-conversão de piruvato e lactato com concomitante inter-conversão de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) + H⁺ e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) em todos os tecidos (PASCHOAL, NAVES, 2014). A figura 3 mostra a equação da reação mediada pela DHL.

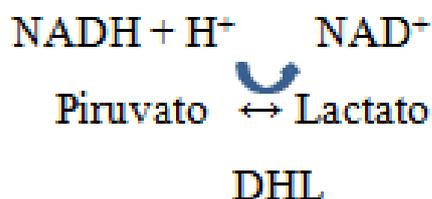


Figura 3 - Equação da reação mediada pela enzima desidrogenase láctica (DHL)

SOUZA *et al.* (2010) examinaram o efeito da suplementação aguda (5g/kg durante uma semana) e crônica (1g/kg durante quatro e oito semanas) de creatina sobre as concentrações plasmáticas de CK, DHL e

aspartato aminotransferase (AST) de ratos sedentários e exercitados com natação (80% da carga máxima tolerada). Setenta e dois ratos foram divididos em quatro grupos (n=18): controle, creatina, natação e natação + creatina. Ao final da primeira, quarta e oitava semanas, seis animais de cada grupo foram sacrificados. Os resultados demonstraram elevação plasmática da CK, DHL e AST na primeira semana nos grupos que nadaram. Ao final da quarta semana observaram valores superiores para CK e DHL para o grupo natação e ao final da oitava semana somente os valores AST do grupo creatina estavam maiores que dos demais grupos. Os autores sugeriram que a suplementação com creatina pode ser capaz de reduzir o dano muscular após quatro semanas de treinamento e que o dano muscular parece ser atenuado pelo próprio exercício.

XIAO (2015) investigou o efeito protetor da suplementação com resveratrol (fitoquímico da uva) no dano oxidativo e peroxidação lipídica no músculo esquelético de ratos Wistar submetidos ao exercício exaustivo em esteira. Ele dividiu os ratos em quatro grupos com diferentes doses de resveratrol (25, 50, e 100mg/kg) e o grupo controle. As enzimas CK e DHL e indicadores de estresse oxidativo foram analisados. Quanto maior a dose utilizada do suplemento a atividade destas enzimas diminuiu significativamente em relação ao grupo controle. O autor concluiu que o resveratrol apresentou efeito protetor contra o dano oxidativo e a peroxidação lipídica.

3.9. Ácidos Graxos Ômega-3 e Perfil Lipídico

A relação entre exercício físico, metabolismo de lipídios e suplementação com AG ω -3 na forma de óleo de peixe tem sido estudada

em relação ao efeito desta intervenção nutricional no perfil de lipoproteínas e na lipidemia pós-prandial (PASCHOAL, NAVES, 2014).

Dietas com alto teor de peixes tem sido associadas com baixa incidência de doenças cardiovasculares (LLUÍS *et al.*,2013; FERGUSON *et al.*,2015), o que é de relevância para a Saúde Pública (MOZAFFARIAN & WU, 2011), em especial as que são ricas em EPA e DHA (LLUÍS *et al.*,2013).

EBRAHIMI *et al.* (2004), alimentaram ratos com carne de cabra enriquecida com os AG ω -3 durante 12 semanas e avaliaram os seus efeitos sobre os níveis de colesterol no plasma, lipídeos nos tecidos e expressão genética. Houve aumento significativo de AG ω -3 nos tecidos musculares e no fígado dos ratos alimentados com carne de cabra enriquecida em comparação com o grupo controle. O colesterol plasmático diminuiu nos ratos alimentados com carne de cabra enriquecida em comparação ao grupo controle e regulou de forma positiva a expressão de genes.

LLUÍS *et al.* (2013), suplementaram ratas Wistar durante 13 semanas com 5 suplementos com óleos, 3 grupos com derivados de peixe (com proporções de EPA/DHA - 1:1, 2:1, 1:2), 1 grupo com óleo de soja e 1 grupo com óleo de linhaça. Eles avaliaram o perfil lipídico dos animais (triglicerídes, colesterol, HDL e sua ApoA1, LDL e sua ApoB100), como também antioxidantes endógenos, peso corporal e gordura abdominal. Em relação ao perfil lipídico, eles observaram que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum destes parâmetros, a relação ApoB100/ApoA1 diminuiu nos grupos suplementados com EPA/DHA - 1:1, 2:1 e no grupo suplementado com óleo de soja, o que representa um fator cardioprotetor destes óleos.

FERGUSON *et al.* (2015), estudou a associação entre o Index de ômega-3 (O3I) e o perfil lipídico de 276 idosos australianos de ambos os sexos com faixa etária entre 65 e 95 anos. O O3I foi inversamente associado aos triglicérides plasmáticos em ambos os sexos e com a relação triglicérides/ HDL e positivamente relacionado ao HDL em todos os idosos. Os autores afirmaram que há uma associação à longo prazo entre o O3I e o perfil lipídico dos idosos australianos. Os autores concluíram que os resultados deste estudo apoiam para o desenvolvimento e implantação de estratégias dietéticas específicas por faixa etária para reduzir o risco de doenças cardiovasculares através da melhoria do O3I.

LESLIE *et al.* (2015), em trabalho de revisão descreveram os efeitos benéficos dos AG ω -3, especialmente os EPA e DHA, em indivíduos hiperlipidêmicos que também se estende para indivíduos com níveis normais ou perto dos níveis aumentados de lipídeos séricos. Os autores concluíram que existe alguma evidência que mostra que o consumo \geq 4g/dia de AG ω -3 de fontes marinhas e alimentos enriquecidos com EPA e/ou DHA, ou 1,5g/dia de EPA e/ou DHA na forma de suplementos, tiveram efeitos na redução de triglicérides séricos de 9-26% e 4-51% respectivamente, em indivíduos normolipidêmicos para quase hiperlipidêmicos. Os autores descreveram que o consumo de AG ω -3 marinhos não é somente extremamente útil para o tratamento da dislipidemia, mas também para a população saudável, na prevenção de hiperlipidemia e pode subsequentemente reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Apesar dos benefícios dos AG ω -3 observados em muitos estudos, recentemente alguns pesquisadores tem alertado que estes óleos marinhos são altamente propensos a sofrer peroxidação lipídica e podem alterar a atividade biológica, tornando-os ineficazes ou prejudiciais (SACKS *et al.*,

1995; ALBERT, CAMERON-SMITH, HOFMAN, 2013; PESKIN, 2014), embora haja também evidências que alguns efeitos benéficos destes óleos podem ser mediados através da peroxidação lipídica (ALBERT *et al*, 2013; PESKIN, 2014).

Estudos em animais mostraram que lipídeos oxidados podem causar danos em órgãos, inflamação, carcinogênese e aterosclerose. Estes efeitos não podem ser ignorados, particularmente quando estes lipídeos são ingeridos durante as fases vulneráveis da vida, como a gravidez, infância e velhice ou por longos períodos de tempo (ALBERT *et al*, 2013; PESKIN, 2014).

ALBERT *et al* (2015), avaliaram a qualidade e o conteúdo dos suplementos de óleo de peixe na Nova Zelândia. Foram avaliados os conteúdos de ácidos graxos, como também calculados os valores de peróxidos, anisidina e oxidação total. Apenas 3 dos 32 suplementos de óleo de peixe continham quantidades de EPA e DHA iguais ou acima da indicada nos rótulos. A maioria testada (69%) continha menos de 67% do conteúdo que indicava, 83% excediam os valores de peróxidos, 25% excediam os valores de anisidina e 50% estavam acima dos valores de oxidação total. Apenas 8% não excediam estes valores. Os autores descreveram que estes suplementos podem sofrer oxidação durante o transporte, encapsulamento, embalagem e estocagem. Com o óleo oxidado, a concentração de EPA e DHA decresce, sugerindo redução da eficácia. Os autores concluíram que estudos devem investigar o efeito das condições ambientais na oxidação de óleos de peixe encapsulados, particularmente em relação ao processo de oxidação, quando eles são armazenados em ambientes de varejo ou em casa.

3.10. O modelo experimental: natação

Dentre os mais usados “ergômetros” animais para estudos da fisiologia do exercício, estão a esteira rolante e a natação. Os animais mais usados são, sem dúvida, os ratos, que são pequenos, de fácil manipulação e de boa resposta ao exercício (GOBATTO *et al.*, 2001).

A natação tem sido utilizada como modelo de exercício físico por vários grupos de pesquisa tanto em exercícios agudos (ROGATTO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2008; MILIONI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014) como em exercícios crônicos (CIABATTARI, DAL PAI, DAL PAI, 2005; CAMARGO FILHO *et al.*, 2006; YILDIZ *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; RIBEIRO, 2011; BECK & GOBATTO, 2013).

No entanto, uma limitação do modelo da natação é a dificuldade de precisão da sobrecarga de esforço. Para tornar o exercício de natação mais intenso, tem sido usada a inserção de pesos, geralmente de chumbo, junto ao corpo dos animais, enquanto nadam (GOBATTO *et al.*, 2001).

YILDIZ *et al.* (2009) estudaram o efeito da suplementação de creatina na morfologia do músculo e no rendimento da natação submetendo os animais a um teste de exaustão. Os ratos foram suplementados nas 12 semanas anteriores ao teste e divididos em quatro grupos: suplementados com creatina (com 1g/kg/dia e 2g/kg/dia), não suplementados e com restrição de aminoácidos na dieta. Todos os ratos ganharam peso e não houve diferença entre eles. Os animais suplementados resistiram a um tempo maior ao teste de exaustão e ocorreu maior ganho do número e tamanho das fibras musculares do músculo *gastrocnêmio*.

GARCIA *et al.* (2010) estudaram os efeitos da dieta suplementada com AG ω -3 no músculo sóleo de ratos submetidos à natação, com

sobrecarga corporal de 5%, durante 28 dias. Foram realizadas análises histológicas e morfométricas e os grupos submetidos à natação apresentaram padrões histológicos de lesão muscular (aumento de tecido endomisial e número de núcleos, presença de fibras fagocitadas e de contornos poligonais) com maior grau nos grupos que receberam o óleo de oliva. As fibras musculares foram medidas em seu menor diâmetro e houve aumento nos dois grupos submetidos à natação. Os autores concluíram que a suplementação com AG ω -3 apresentou efeito protetor contra lesões musculares, mas não teve efeito no aumento do diâmetro das fibras musculares.

Algumas propostas de protocolos de exercício físico com características anaeróbicas e de alta intensidade tem despertado maior interesse nos últimos anos, tendo em vista os benefícios que este tipo de atividade pode resultar (ROGATTO *et al.*, 2004).

Poucas intervenções com os AG ω -3 têm sido testadas em animais para verificar o efeito no músculo esquelético e não foi encontrado nenhum estudo que testou a suplementação com os AG ω -3 associada ao exercício intermitente. GARCIA *et al.* (2010) realizou estudo semelhante mas com um protocolo de exercício contínuo. Devido à facilidade de utilização da modalidade natação e o interesse de estudar em exercício intermitente e o uso de sobrecarga corporal, optamos por este desenho de estudo.

4. MÉTODOS

4. Métodos

4.1. O Estudo

4.1.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo primário e intervencional. Foi realizada uma pesquisa experimental e prospectiva, na qual foi testada uma hipótese, portanto é um estudo analítico, com controle comparativo.

4.1.2. Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (UNIFESP), com número do protocolo CEP nº **1294/08** (Anexo I) e durante o experimento foram seguidos os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/SBCAL.

4.1.3. Amostra

Este estudo foi realizado com sessenta ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos, com média de idade de 120 dias, pesando entre 250g e 300g, provenientes do setor de criação do Centro de Experimentação em Modelo Animal (CEMA) da Universidade de Marília/UNIMAR e ambientados no setor de Experimentação.

Estes animais foram mantidos em sala climatizada com controle de temperatura (entre 22°C a 24°C), com luz em ciclo de 12 horas (claro -

escuro), com ciclo claro das 7 às 19h. Os animais permaneceram sob condições higiênicas, dentro de caixas de Polietileno (5 ratos por caixa), durante sete dias (período de adaptação). Eles receberam ração peletizada comercial para ratos Nuvilab (fabricante Nuvital), contendo por peso 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais, totalizando 4,15Kcal/g=17,03kJ/g e água *ad libitum*.

Após sete dias, os animais foram divididos em grupos e alojados em gaiolas individuais (figura 4).



Figura 4 - Alojamento dos animais

4.1.4. Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos ao acaso em quatro grupos compostos por 15 animais cada:

Grupo sedentário com placebo (SP) - animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água à vontade e receberam placebo por gavagem.

Grupo sedentário com suplementação (S ω -3) - animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água à vontade, suplementados com AG ω -3 por gavagem.

Grupo exercício com placebo (EP) - animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água à vontade, submetidos às sessões diárias de natação e receberam placebo por gavagem.

Grupo exercício com suplementação (E ω -3) - animais mantidos em gaiolas individuais com ração e água à vontade, submetidos às sessões diárias de natação e suplementados com AG ω -3 por gavagem.

4.2. Etapas Experimentais

O esquema a seguir ilustra as etapas experimentais da pesquisa.

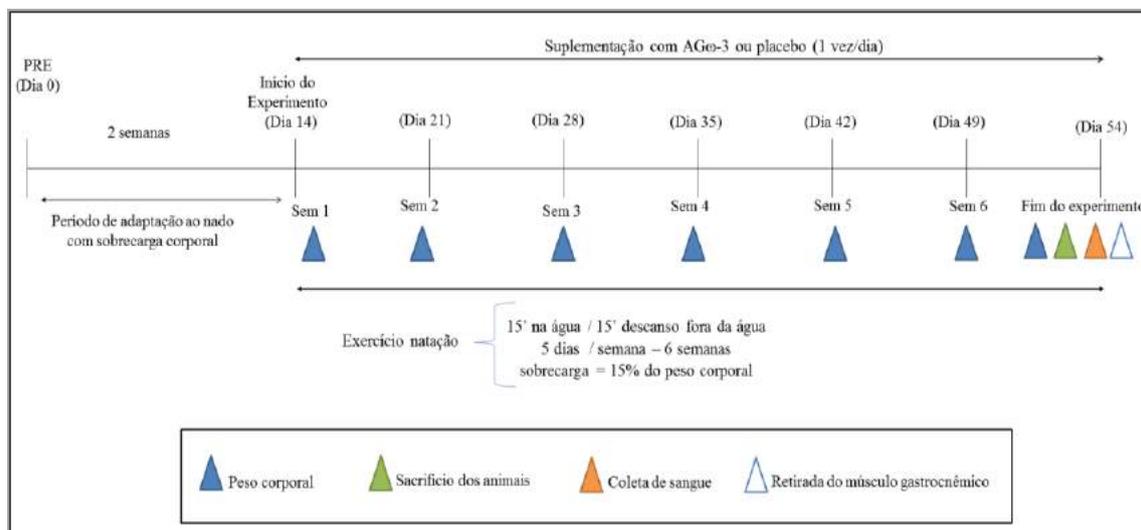


Figura 5 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental e o tempo de estudo. Os animais foram adaptados ao nado com sobrecarga corporal durante 2 semanas. Os animais nadaram com sobrecarga de 15% por meio de chumbo preso à cauda e receberam suplementação de AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas. Os animais foram pesados semanalmente e ao final do experimento. Abreviações: PRE: período de adaptação anterior ao início do experimento; AG ω -3: ácidos graxos ômega 3.

Para controle do peso corporal e a fim de reajustar as sobrecargas ao longo do estudo, os animais foram pesados semanalmente (figura 6) em balança digital (marca Filizola/mod.MF6kg).



Figura 6 - Animal sendo pesado

4.2.1. Protocolo do exercício físico

Todas as sessões de exercícios foram realizadas entre 9 e 11 da manhã. Os animais sedentários (SP e S ω -3) não foram submetidos ao exercício, mas manipulados ao mesmo horário e local dos animais exercitados (EP e E ω -3).

4.2.2. Período de adaptação:

Os animais dos grupos exercício passaram por um período de adaptação de duas semanas, em que realizaram a natação cinco vezes por semana, num total de dez sessões diárias de natação.

Os animais inicialmente nadaram 15 minutos no primeiro dia, o volume sendo aumentado gradativamente chegando até 35 minutos no terceiro dia. A partir do 4º dia, os animais começaram a nadar com cargas

presas à cauda por meio de um chumbo preso com elástico, que foram incrementadas gradativamente (tabela 1). O exercício realizado foi intermitente, alternando 15 segundos de exercício, com 15 segundos de repouso em que o animal era retirado da água pelo pesquisador. O tempo foi controlado com o auxílio de um cronômetro.

Tabela 1 - Protocolo do período de adaptação (duas semanas).

Dias do período de adaptação	Duração das sessões (minutos)	Carga
1 a 3 (semana 1)	15, 25, 35	Sem carga
4 e 5 (semana 1)	25, 35	5%
1 e 2 (semana 2)	45, 45	5%
3 a 5 (semana 2)	30, 35, 45	10%

Este procedimento foi realizado em seis tanques de inox (figura 7) contendo água na temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, medindo 30 cm de comprimento por 20 cm de largura e profundidade de 50 cm, suficientes para evitar que os animais encostem a cauda no fundo do tanque (SURETTE, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010).



Figura 7 - Tanque de natação utilizado no experimento

4.2.3. Período de experimento

Após o período de adaptação, os animais foram submetidos a sessões de natação, cinco dias da semana, durante seis semanas, num total de 30 sessões com uma carga utilizada que correspondia a 15% do peso corporal. A característica do exercício realizado foi intermitente, alternando 15 segundos de exercício, com 15 segundos de repouso, com duração de 45 minutos (BRAGA *et al.*, 2006). O peso das cargas utilizadas foi corrigido a cada semana, de acordo com o peso corporal dos animais.

4.2.4. Protocolo da suplementação

Os animais dos grupos S ω -3 e E ω -3 foram suplementados com 500mg/dia de óleo de peixe (0,55ml), contendo AG ω -3, composto de 50mg de EPA e 50mg de DHA (Ativus Farmacêutica Ltda, Valinhos, São Paulo-Brasil). De acordo com o fabricante, cada cápsula (1000mg) de óleo de peixe era composta de: valor energético (10kcal = 41kJ); gorduras totais (1,0g); gorduras monoinsaturadas (0,2g); gorduras polinsaturadas (0,4g); EPA- ácido eicosapentaenoico (0,1g); DHA -ácido docosahexaenóico (0,1g) e colesterol (2,6mg) (Anexo II). A suplementação foi realizada por meio de uma sonda oro-esofágica adaptada a uma seringa de 3ml (método de gavagem). O óleo foi introduzido na cavidade oral (VO), com uma agulha curvada de 8cm, com a ponta arredondada que foi introduzida na boca do animal e cuidadosamente empurrada pelo esôfago até o estômago (figura 8).



Figura 8 - Animal sendo suplementado pelo método de gavagem

Este protocolo de suplementação foi realizado sem anestesia, diariamente, de segunda à sexta-feira, logo após as sessões de natação, durante o período de seis semanas.

Os animais do Grupo SP e EP receberam óleo de oliva como placebo, no mesmo período e na quantidade dos demais grupos, pelo método de gavagem. Utilizamos o azeite de oliva como placebo para garantir a ingestão isocalórica, por apresentar em sua composição menos de 1% de AG ω -3 (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS, 2011) e por ser utilizado em outros estudos que também testaram os AG ω -3 (WHITEHOUSE & TISDALE, 2001; WHITEHOUSE *et al.*, 2001; SMITH, MUKERJI, TISDALE, 2005; KHAL & TISDALE, 2008; GARCIA *et al.*, 2010; BANDO *et al.*, 2012).

4.3. Obtenção das Amostras, Análises Estereológica e Bioquímicas

O diagrama a seguir ilustra as etapas de obtenção das amostras e das análises bioquímicas e estereológica.

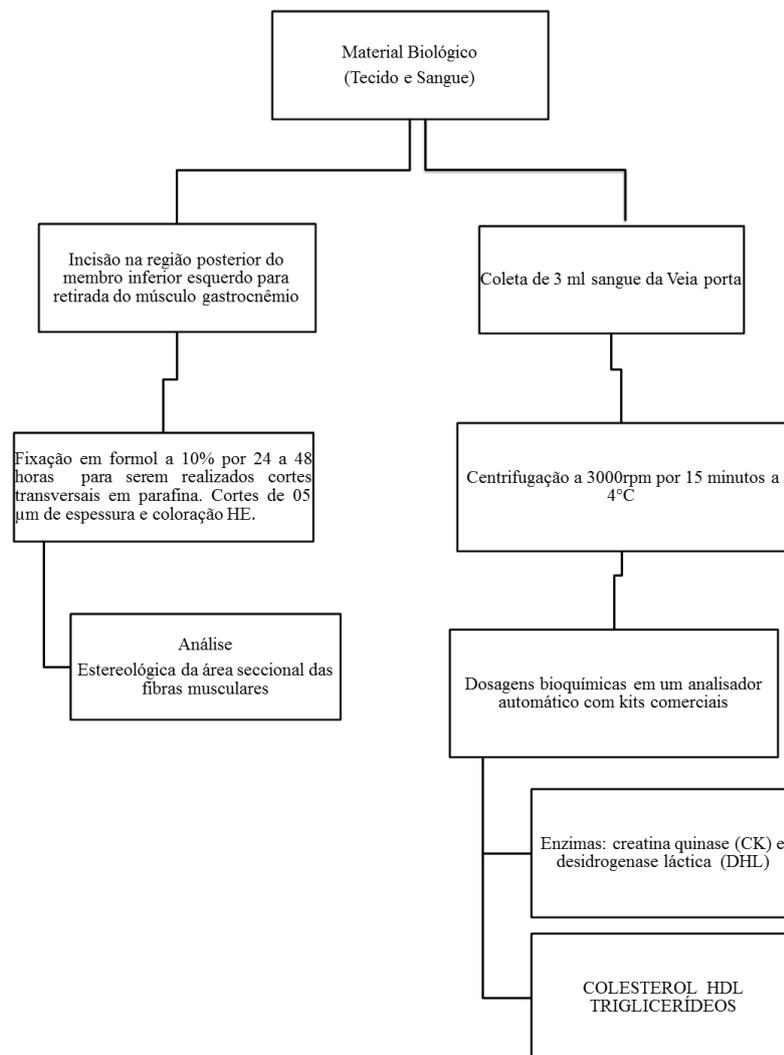


Figura 9 - Diagrama ilustrativo dos procedimentos realizados após a coleta do material biológico.

4.3.1. Músculo *Gastrocnêmio*

Foi realizada uma incisão na região posterior do membro inferior esquerdo, para remoção do músculo *gastrocnêmio* inteiro. As amostras musculares foram fixadas em formol a 10% por 24 a 48h e posteriormente lavadas por 2 minutos em água corrente, para a retirada das precipitações de formol. Em seguida, foram desidratadas em soluções alcoólicas com concentrações crescentes (70, 80 e 90 e 3 vezes em álcool absoluto durante 1 hora) e submetidas ao processo de diafanização (limpeza das impurezas

da amostra tecidual) com xilol durante 1 hora. Logo após, foram banhadas em parafina por mais 1 hora. Logo após, foi realizada a inclusão em molde e refrigeradas para solidificação. Posteriormente, foram realizados cortes transversais das amostras do músculo *gastrocnêmio* com 5µm de espessura, em micrótomo, e fixação em lâminas. Para desparafinização, foram realizados 3 banhos de xilol com duração de 5 minutos cada. Após este procedimento, foram realizados mais 3 banhos de 5 minutos com álcool absoluto e lavagem em água por 10 minutos para reidratação. Em seguida, foram corados com hematoxilina durante 5 minutos, lavados durante 20 minutos em água corrente e corados em seguida com o corante eosina por 3 minutos. Passaram por novo banho em água destilada e foram desidratadas com álcool 95% e absoluto por 2 minutos cada. Após isso, foram diafanizados em xilol (3 passagens de 2 minutos cada) (BEHMER, 1976; CAMARGO FILHO *et al.*, 2006). As secções foram montadas entre lâmina e lamínula, num total de 56 lâminas para posterior análise estereológica. Ocorreu perda de quatro lâminas durante este procedimento.

A preparação das lâminas foi realizada no Laboratório de Histologia da Universidade de Marília/UNIMAR.

4.3.2. Análise estereológica do músculo *gastrocnêmio*

4.3.2.1. Área do perfil seccional das fibras musculares

A estimativa local da área das fibras musculares do músculo *gastrocnêmio* foi realizada em duas etapas; primeiro aplicou-se um procedimento de amostragem sistemática, uniforme e aleatória das regiões de cada secção histológica, com a aplicação do "fractionator" 2D e, posteriormente aplicou-se o "nucleator" 2D (GUNDERSEN, 1988; JENSEN, 1998).

A partir de um ponto central de cada fibra transversal, amostrada com o fractionator 2D (figura 10), a área seccional foi estimada mensurando-se a distância, l , até a borda de cada fibra (membrana sarcoplasmática) em um número predeterminado de linhas a partir deste ponto central, em direções isotrópicas (Figura 8) (GUNDERSEN, 1988; JENSEN, 1998), criadas com o auxílio do software newCast[®] (versão 4.5.1.324). A seguinte fórmula foi utilizada:

$$a_{\text{seccional}/\text{fibra}} = \pi \cdot \bar{l}^2$$

Onde, a é a área seccional individual de cada fibra muscular, \bar{l}^2 é a distância até a borda de cada fibra transversal.

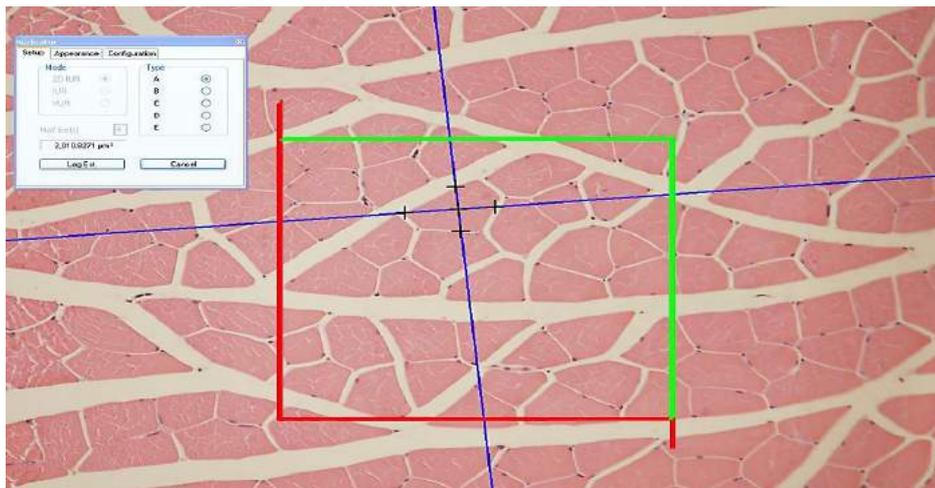


Figura 10 - Fotomicrografia representativa da aplicação do método estereológico nucleator 2D para a mensuração de área seccional de fibras musculares em corte transversal, onde foram geradas linhas isotrópicas a partir de um ponto central, marcando-se a intersecção destas linhas com a borda da fibra. Coloração: Hematoxilina-eosina. Escala de barra: 50 μm .

musculares fo

e epifluorescência (Leica DM 6000) na objetiva de 20x. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo/USP.

4.3.3. Coleta de sangue

No último dia do experimento, os animais foram pesados e após 3 horas da última sessão de treinamento, todos os animais foram submetidos ao processo de eutanásia por *overdose* do anestésico tiopental sódico (200 mg/kg), por via intramuscular, em uma sala de procedimento do Biotério. Após a constatação do óbito, o abdômen foi aberto e o sangue foi coletado diretamente da veia porta, com seringa de 5ml e agulhas de 25x7 mm após afastamento das vísceras anteriores ao vaso. Foram coletados 3 ml de sangue e armazenados diretamente em tubo de ensaio seco e foram encaminhados para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Marília/UNIMAR, onde imediatamente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga (CELM, modelo-Combate: 16 caçapas) e armazenadas para posterior análises bioquímicas.

4.3.4. Dosagem das enzimas plasmáticas, triglicérides e do colesterol total e HDL

As enzimas creatina quinase (CK) e desidrogenase láctica (DHL) foram dosadas pelo método cinético automatizado, sendo utilizado o reagente ABBOTT para a enzima CK e o reagente Labtest para a enzima DHL. Os triglicerídeos e o colesterol total foram dosados pelo método enzimático automatizado (reagente Labtest). O HDL foi dosado pelo método direto sem precipitação (reagente Labtest). Foram seguidas as instruções contidas nos manuais dos kits. As dosagens bioquímicas foram realizadas em um Analisador automático - Architect C4000 - marca ABBOTT, no Laboratório São Francisco situado no Hospital da Universidade de Marília.

As concentrações de LDL foram calculadas seguindo as fórmulas de FRIEDEWALD *et al* (1972) descritas abaixo:

$$\text{VLDL} = \frac{\text{triacilgliceróis}}{5}$$

$$\text{LDL} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

4.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram armazenados em um banco de dados no programa Microsoft Excel[®], versão 2010 (Microsoft[®]). A análise estatística foi realizada no programa estatístico Statistica para Windows (versão 12, Dell Inc.).

Para verificar se os dados apresentavam distribuição normal foram estimados os coeficientes de assimetria e curtose.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores fixos (exercício e suplementação) na comparação das seguintes variáveis:
 - a) Peso inicial e final dos animais (1^a semana e último dia) e ganho de peso.
 - b) Área muscular.
 - c) Enzimas CK e DHL
 - d) Colesterol total, LDL, triglicérides e relação HDL/LDL.
 - e) Relação da área seccional das fibras musculares com o peso corporal (ASM/PC).

Foi necessária a utilização da transformação matemática logarítmica nas variáveis: área muscular, relação ASM/PC, enzima CK, relação HDL/LDL e triglicérides, para o uso adequado da técnica estatística.

Foram realizadas comparações múltiplas pelo método de *Tukey*, quando necessário.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais, foi utilizado o nível de significância α igual a 5%.

5. RESULTADOS

5- Resultados

5.1. Peso corporal

No início do experimento, os animais não apresentaram diferença significativa no peso corporal entre os grupos experimentais ($p=0,7013$). Todos os animais apresentaram ganho de peso durante o experimento, com exceção de um animal do grupo exercício placebo (EP), que apresentou o mesmo peso no início e no final do experimento.

Os animais do grupo sedentário placebo (SP) tiveram aumento de 18,4% no peso corporal médio, durante o experimento (peso inicial $281\pm 35,7$ g e peso final $332,9\pm 42,2$ g) e os animais do grupo sedentário com suplementação ($S\omega-3$), o ganho médio foi de 18,2% (peso inicial $285,3\pm 29$ g e peso final $337,1\pm 32,1$ g). Os animais do grupo exercício placebo (EP) aumentaram 9,9% do peso corporal médio durante o experimento (peso inicial $295,2\pm 37,2$ g e peso final $324,7\pm 32,59$ g) e os do grupo exercício com suplementação ($E\omega-3$), aumentaram 9,3% (peso inicial $293\pm 27,3$ g e peso final $320,4\pm 33,78$ g). Pode-se observar na figura 11, a evolução do ganho de peso médio dos grupos experimentais durante o experimento.

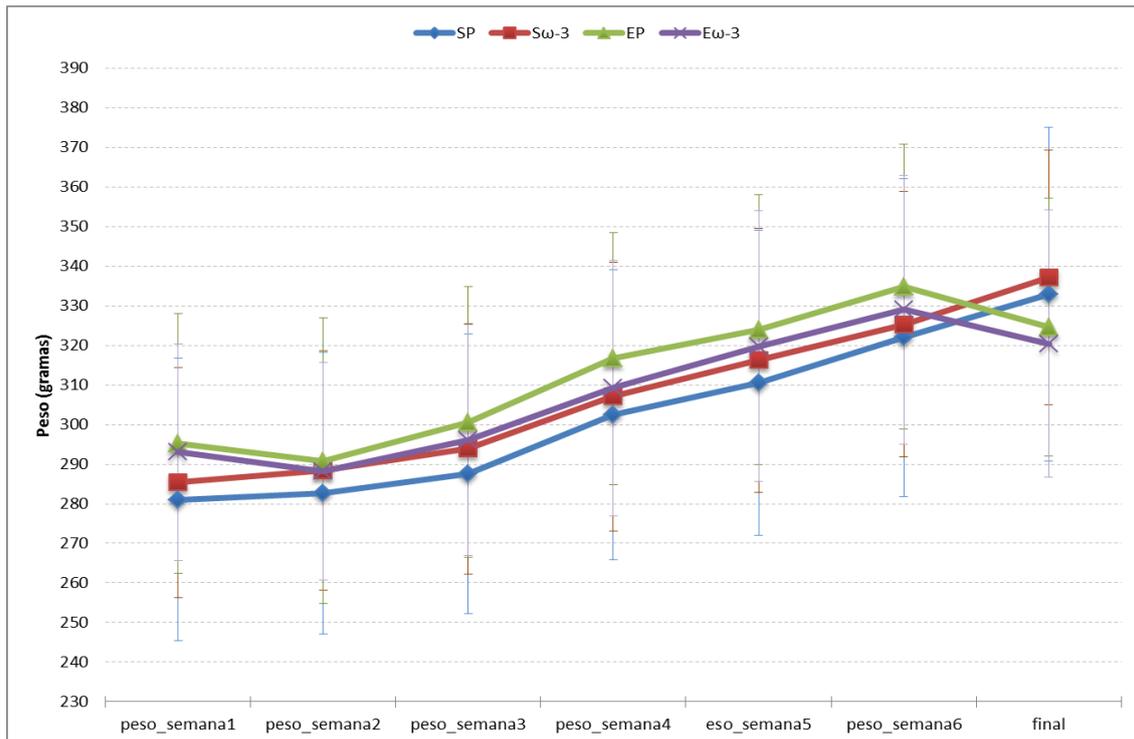


Figura 11 - Peso médio (g) dos ratos Wistar nos tempos: início do experimento (semana 1), semanas: 2, 3, 4, 5, 6 e último dia do experimento dos grupos experimentais. SP: sedentário placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

A figura 12 apresenta os valores medianos mínimos e máximos do ganho de peso dos animais, durante as seis semanas do experimento. Na análise estatística do ganho de peso, não evidenciamos efeito de interação ($p=0,811$) entre exercício físico e suplemento. Houve diferença significativa ($p<0,0001$) entre o ganho de peso do grupo sedentário (SP) comparado com o grupo submetido ao exercício físico (EP). O grupo suplementado (S ω -3) não apresentou diferença significativa ($p=0,811$) quando comparado ao grupo placebo (SP).

Em resumo, o exercício físico teve como consequência menor ganho de peso e a suplementação com AG ω -3, não alterou o ganho de peso dos animais durante o experimento.

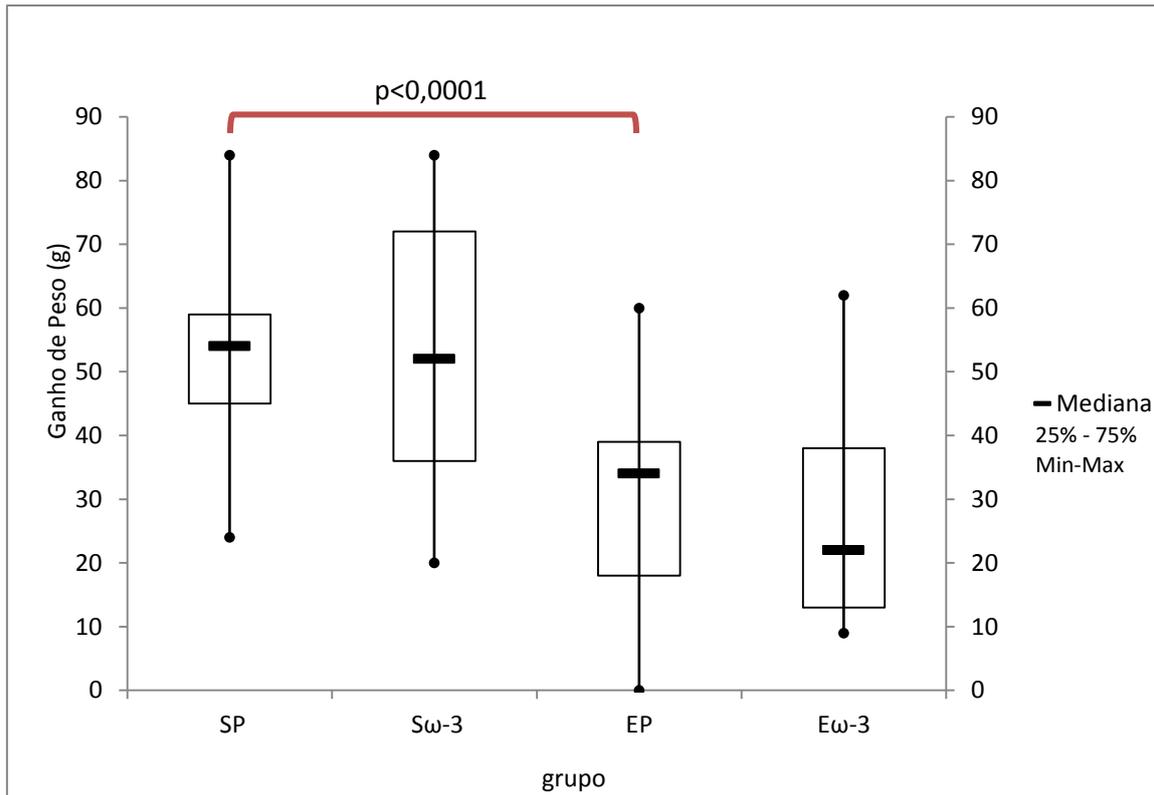


Figura 12 - Ganho de peso corporal (g) dos animais durante seis semanas de experimento. SP: sedentário placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

5.2 Área seccional das fibras musculares do músculo *gastrocnêmio*

A figura 13 mostra os valores medianos, mínimos e máximos da área seccional das fibras musculares do músculo *gastrocnêmio* dos animais estudados. Na comparação da mediana da área seccional do músculo *gastrocnêmio* entre os grupos sedentários, o grupo suplementado (S ω -3) apresentou a mediana da área 18,33% menor que o grupo placebo (SP) e na comparação da área seccional do músculo *gastrocnêmio* entre os grupos exercitados, o grupo exercício com suplementação (E ω -3) apresentou a média da área 8,8% menor que o grupo exercício placebo (EP). Na análise estatística não evidenciamos efeito de interação ($p=0,350$) entre exercício e suplemento. Houve diferença significativa ($p=0,018$) na área seccional do

músculo *gastrocnêmio* entre o grupo suplementado (S ω -3) comparado com o grupo placebo (SP). O grupo exercitado (EP) não apresentou diferença significativa ($p=0,646$) quando comparado ao grupo sedentário (SP).

Portanto, a suplementação com AG ω -3 teve como consequência uma menor área seccional do músculo *gastrocnêmio* e a natação não alterou a área seccional deste músculo durante o experimento.

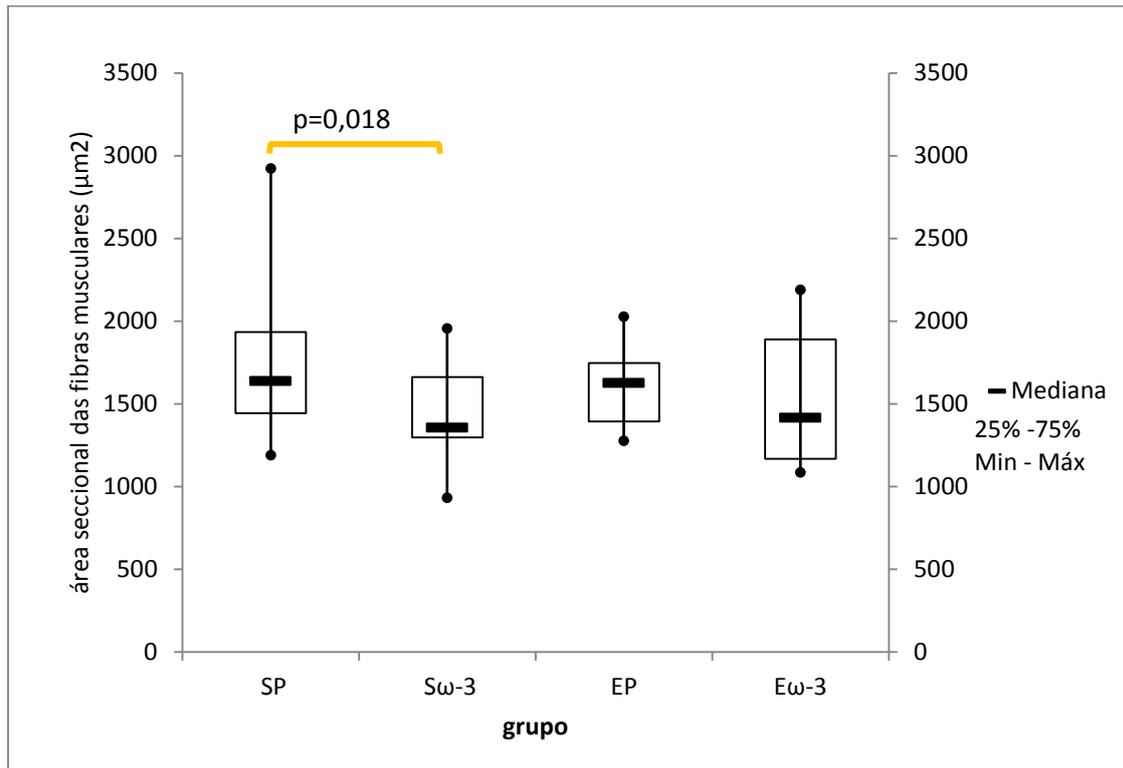


Figura 13 - Áreas seccionais do músculo *gastrocnêmio* (μm^2) dos ratos suplementados com AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP: sedentário placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

Foi calculada a relação da área seccional das fibras musculares com o peso corporal (ASM/PC) dos animais estudados. Na análise estatística da ASM/PC, não evidenciamos efeito de interação ($p=0,223$) entre exercício e suplemento. Houve diferença significativa ($p=0,016$) na relação ASM/PC entre o grupo suplementado (S ω -3) comparado com o grupo placebo (SP). O grupo suplementado apresentou menor valor de ASM/PC comparado com o grupo placebo. O grupo submetido ao exercício físico (EP) não

apresentou diferença significativa ($p=0,548$) quando comparado ao grupo sedentário (SP). Portanto, a suplementação com AG ω -3 teve como consequência uma menor relação ASM/PC e a natação não teve influencia nos valores desta relação.

5.3. Enzimas CK e DHL

A figura 14 apresenta os dados da enzima Creatina quinase (CK). Na análise desta enzima, não evidenciamos efeito de interação ($p=0,881$) entre exercício e suplemento. Houve diferença significativa ($p=0,048$) entre os níveis séricos de CK do grupo sedentário (SP) comparado com o grupo submetido ao exercício físico (EP). O grupo suplementado (S ω -3) também apresentou diferença significativa ($p=0,001$) quando comparado ao grupo placebo (SP).

Em resumo, o grupo suplementado apresentou níveis menores de CK em relação ao grupo placebo e o grupo submetido à natação também apresentou níveis menores de CK comparado ao grupo sedentário.

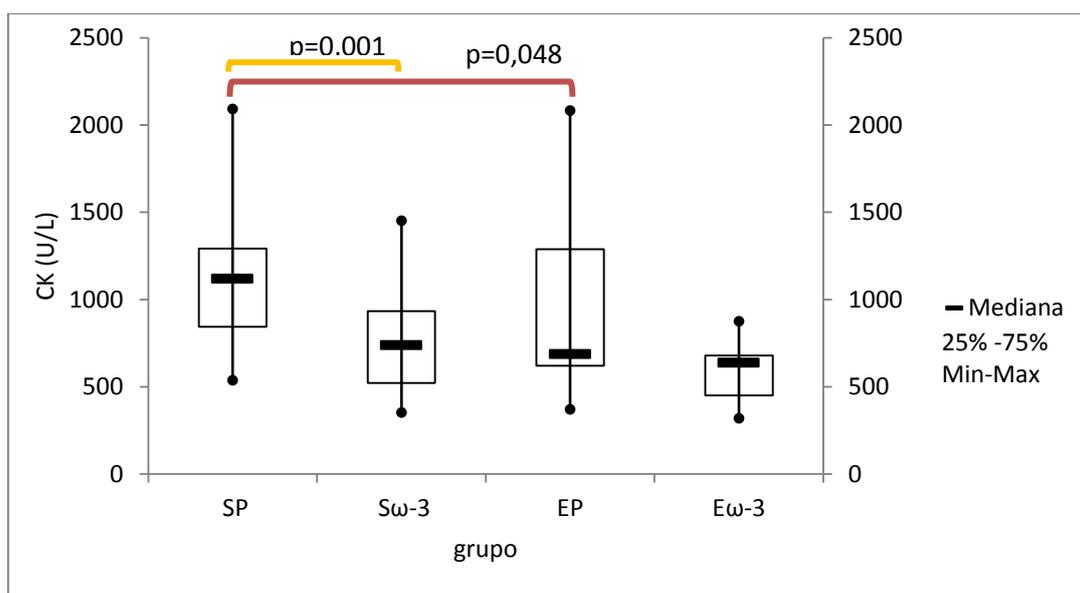


Figura 14 - Creatina quinase (CK) dos ratos suplementados com AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP: sedentário

placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

Na figura 15 estão apresentados os valores da enzima DHL. Na análise desta enzima, evidenciamos efeito de interação ($p=0,001$) entre exercício e suplemento. O grupo exercício suplemento (E ω -3) apresentou menor valor sérico da enzima DHL comparado ao grupo exercício placebo (EP) ($p=0,030$). Houve também diferença significativa ($p=0,016$) entre o grupo sedentário placebo (SP), o qual apresentou menores valores de DHL comparado ao grupo exercício placebo (EP). Os grupos sedentários (SP e S ω -3) não apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,149$), assim como os grupos suplementados (S ω -3 e E ω -3) também não apresentaram diferença significativa ($p=0,230$).

Em resumo, nos grupos submetidos ao exercício, a suplementação com AG ω -3, diminuiu os níveis séricos de DHL.

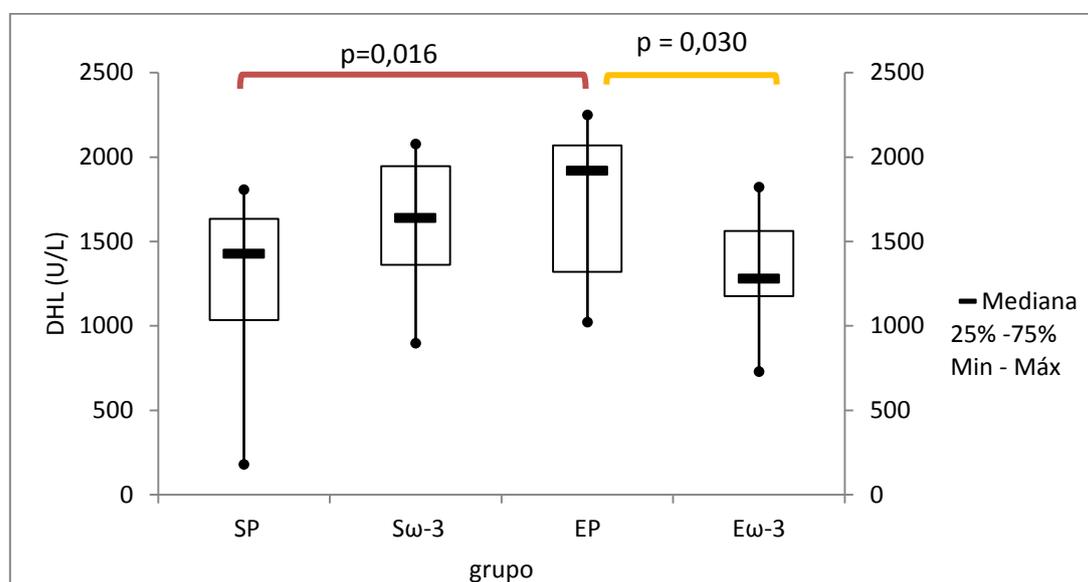


Figura 15 - Desidrogenase Láctica (DHL) dos ratos suplementados com AG ω 3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP: sedentário placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

5.4. Perfil lipídico

A figura 16 mostra a mediana, os valores mínimos e máximos dos níveis séricos de colesterol total dos quatro grupos experimentais. Na análise estatística, não evidenciamos efeito de interação ($p=0,964$) entre exercício e suplemento. Houve diferença significativa ($p<0,0001$) entre os níveis séricos de colesterol dos grupos sedentários (SP e S ω -3) comparados com os grupos submetidos ao exercício (EP e E ω -3). Os grupos suplementados (S ω -3 e E ω -3) apresentaram menores níveis de colesterol comparados aos grupos placebo (SP e EP) e esta diferença foi significativa ($p<0,0001$). A suplementação com os AG ω -3 diminuiu os níveis de colesterol quando comparado ao grupo placebo.

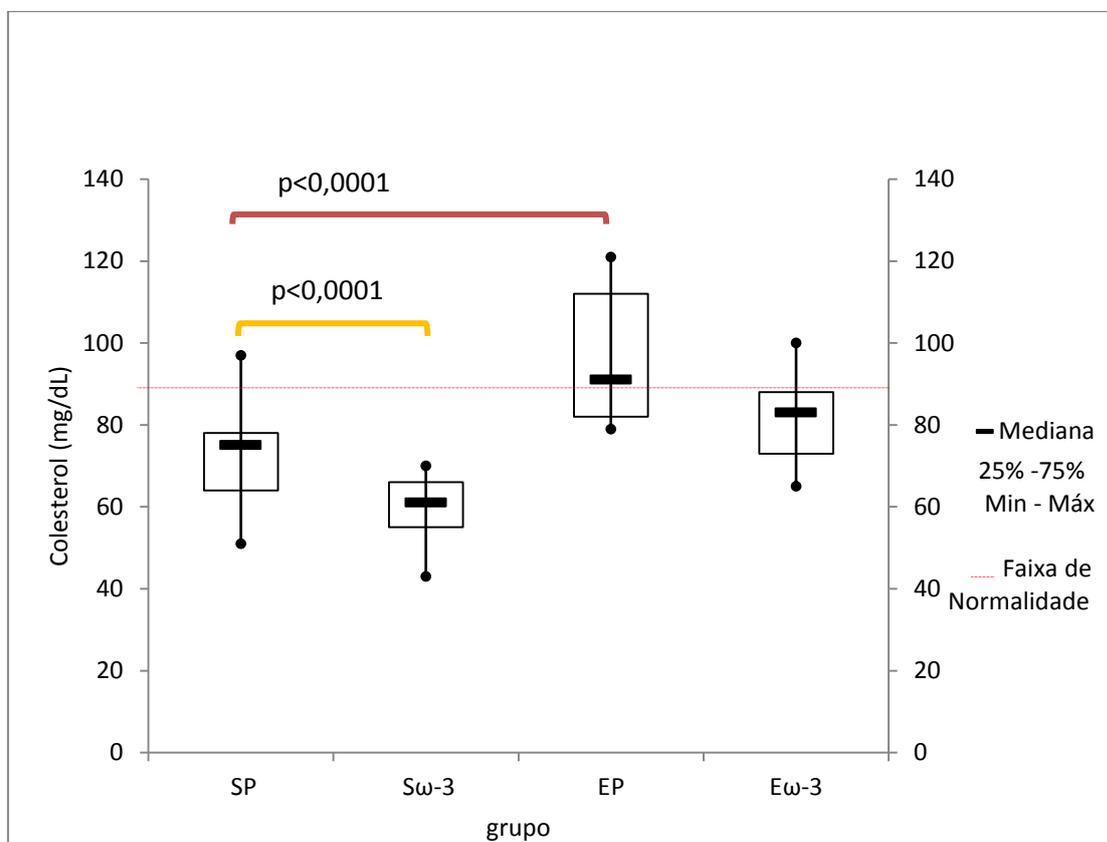


Figura 16 - Níveis séricos de colesterol dos animais suplementados com AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP:

sedentário placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

A figura 17 mostra a mediana, os valores mínimos e máximos dos níveis séricos e o desvio-padrão dos níveis de LDL dos grupos experimentais. Na análise desta enzima, evidenciamos efeito de interação ($p=0,017$) entre exercício e suplemento. Houve diferença entre os grupos sedentários: SP e S ω -3 ($p=0,042$), o grupo SP apresentou maiores valores de LDL. Houve diferença entre os grupos submetidos ao exercício: EP e E ω -3 ($p=0,0002$), o grupo EP apresentou maiores valores de LDL. Os dois grupos com placebo (SP e EP) também apresentaram diferença significativa ($p=0,0002$), o grupo EP apresentou maiores valores de LDL. Os grupos suplementados (S ω -3 e E ω -3) também apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,025$), o grupo S ω -3 apresentou maiores valores de LDL.

A suplementação com AG ω -3 diminuiu as concentrações plasmáticas de LDL.

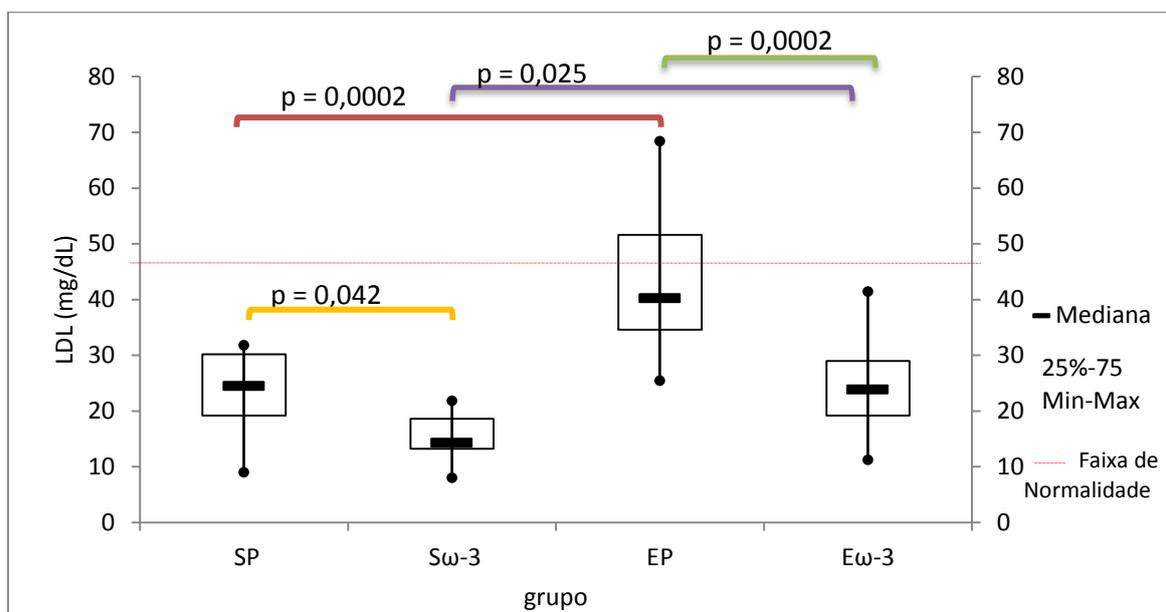


Figura 17 - Níveis séricos de LDL dos animais suplementados com AG ω -3 ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP: sedentário placebo; S ω -3: sedentário suplementado com AG ω -3; EP: exercício placebo; E ω -3: exercício suplementado com AG ω -3.

Quanto aos níveis de HDL, como mostra a figura 18, na análise estatística evidenciamos efeito de interação ($p=0,024$) entre exercício e suplemento. O grupo exercício suplemento ($E\omega-3$) apresentou maiores valores séricos de HDL comparado ao grupo exercício placebo (EP) ($p=0,035$). Houve também diferença significativa ($p=0,002$) entre o grupo sedentário suplemento ($S\omega-3$), comparado ao grupo exercício suplemento ($E\omega-3$). Os grupos sedentários (SP e $S\omega-3$) não apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,964$), assim como também os grupos placebo (SP e EP) não apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,964$).

A suplementação com $AG\omega-3$, associada ao exercício físico, aumentou os níveis séricos de HDL.

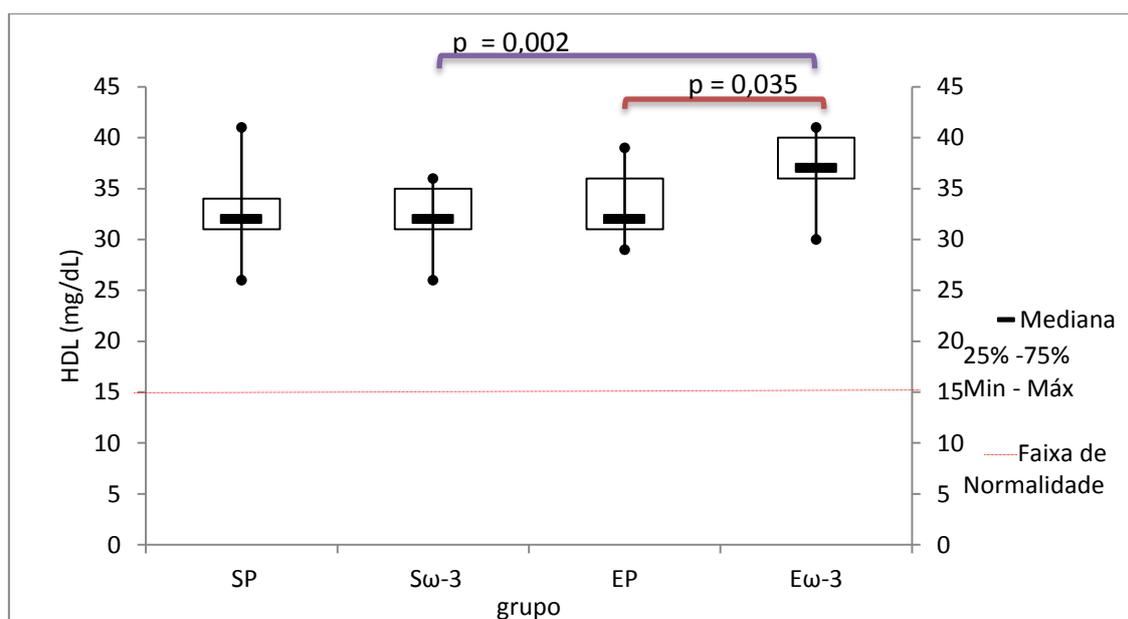


Figura 18 - Níveis séricos de HDL dos animais suplementados com $AG\omega-3$ ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP: sedentário placebo; $S\omega-3$: sedentário suplementado com $AG\omega-3$; EP: exercício placebo; $E\omega-3$: exercício suplementado com $AG\omega-3$.

Foi calculada a relação HDL/LDL dos animais estudados. Na análise estatística não evidenciamos efeito de interação ($p=0,127$) entre exercício e suplemento. Houve diferença significativa ($p<0,0001$) na relação HDL/LDL entre o grupo suplementado ($S\omega-3$) comparado ao grupo placebo (SP). O

grupo suplementado apresentou maior valor na relação HDL/LDL comparado com o grupo placebo.

A figura 19 apresenta os valores medianos, mínimos e máximos da concentração plasmática de triglicérides. Na análise estatística dos níveis de triglicérides, não evidenciamos efeito de interação ($p=0,114$) entre exercício e suplemento. Não houve diferença significativa ($p=0,422$) dos níveis de triglicérides entre o grupo suplementado ($S\omega-3$) comparado ao grupo placebo (SP). O grupo exercitado (EP) apresentou diferença significativa ($p=0,035$) quando comparado ao grupo sedentário placebo (SP). O grupo sedentário placebo apresentou menor valor de triglicérides em relação ao grupo submetido à natação. A suplementação com $AG\omega-3$ não alterou as concentrações plasmáticas de triglicérides.

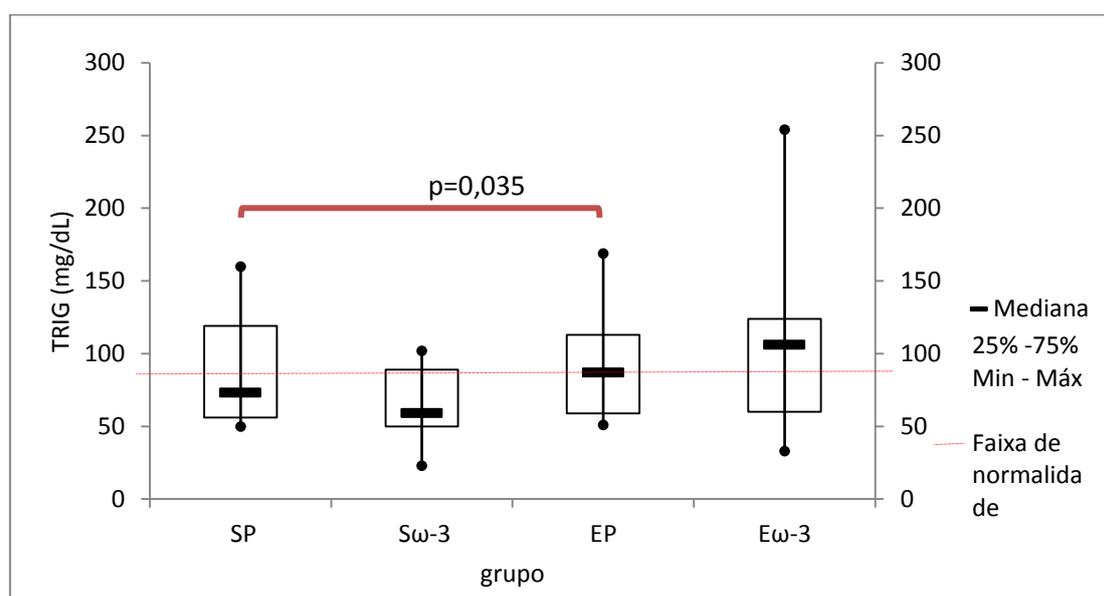


Figura 19 - Níveis séricos de triglicérides dos animais suplementados com $AG\omega-3$ ou placebo durante 6 semanas e submetidos às sessões de natação ou sedentários. SP: sedentário placebo; $S\omega-3$: sedentário suplementado com $AG\omega-3$; EP: exercício placebo; $E\omega-3$: exercício suplementado com $AG\omega-3$.

Em resumo, este estudo mostrou que:

- A suplementação com $AG\omega-3$ não alterou o peso corporal dos ratos e diminuiu a área seccional das fibras do músculo *gastrocnêmio*;

- As concentrações das enzimas CK e DHL apresentaram-se mais baixas nos grupos suplementados com AG ω -3.
- A suplementação com AG ω 3 diminuiu a concentração plasmática de colesterol total, LDL e quando associada ao exercício físico aumentou a concentração plasmática de HDL.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

O principal objetivo desta pesquisa foi analisar o efeito da suplementação de ácidos graxos ômega-3 (AG ω -3) no músculo esquelético em um modelo animal. Para isso, foi realizada análise estereológica da área seccional do músculo *gastrocnêmio* em ratos submetidos às sessões de natação, com protocolo de exercício intermitente. Além disso, foram dosadas as enzimas creatina quinase (CK) e a desidrogenase láctica (DHL). Investigamos também a ação dos AG ω -3 nos mediadores bioquímicos associados ao metabolismo lipídico, uma vez que a manutenção dos níveis lipídicos sanguíneos dentro dos valores normais é de extrema importância para saúde cardiovascular de um indivíduo, seja ele ativo ou não.

Os AG ω -3 são nutrientes naturais encontrados em alimentos de origem animal e vegetal e têm sido pesquisados pela possibilidade de efeito ergogênico nutricional para o músculo esquelético (SMITH *et al.*, 2011), ossos (ROUSSEAU, 2009; WEISS, BARRET-CONNOR, VON MÜHLEN, 2005), para proteção contra o declínio do desempenho físico em idosos (ABBATECOLA *et al.*, 2009, CORNISH & CHILIBECK, 2009), para perda de peso em indivíduos obesos (DEFINA *et al.*, 2011) e prevenção da atrofia em ratos (BRYNER *et al.*, 2012).

Peso corporal

Em nosso estudo, a suplementação com AG ω -3 não interferiu no ganho de peso corporal dos animais, já que não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Estes resultados corroboraram outras pesquisas que descreveram que os AG ω -3 não provocaram nenhuma mudança de peso corporal em humanos (DEFINA *et al.*, 2011); como

também em ratos (SOHAL *et al.*, 1992; LE FOLL *et al.*, 2007; CASTILLERO *et al.* 2009; GARCIA *et al.*, 2010). Nos estudos de SOHAL *et al.*(1992) e LE FOLL *et al.*(2007) os ratos não alteraram o consumo de ração com a suplementação com AG ω -3. Uma limitação deste estudo foi não termos monitorado a ingestão de ração dos animais.

Muitas controvérsias são encontradas na literatura na relação entre a composição lipídica da dieta e o ganho de peso (FRANCO, CAMPOS, DEMONTE, 2009). VIGOUROUX *et al.* (2003), LE FOLL *et al.* (2007) e GARCIA *et al.* (2010) também estudaram o efeito da suplementação com os AG ω -3 e utilizaram como placebo os ácidos graxos monoinsaturados e não encontraram diferença significativa no peso corporal entre os grupos. CASTILLERO *et al.* 2009, utilizou ácidos graxos saturados (óleo de coco) como placebo e também não encontrou diferença no ganho corporal entre os grupos experimentais. No nosso estudo, os animais suplementados com AG ω -3 e os do grupo placebo que receberam o óleo de oliva, também não apresentaram diferença no ganho de peso, portanto o tipo de gordura não teve influência no ganho de peso corporal em nossa pesquisa assim como nas citadas acima.

Por outro lado, os grupos submetidos às sessões de natação apresentaram menor ganho de peso em relação aos grupos sedentários, confirmando o que KREIDER *et al.* (2010) descreveu: que o exercício é uma das melhores estratégias para perda de peso. RIBEIRO *et al.*(2011) utilizaram o mesmo protocolo de exercício intermitente, mas com sessões de natação com duração de 20 minutos, durante 12 semanas e também encontraram menor ganho de peso nos grupos exercitados em comparação com os sedentários.

AG ω -3 e o músculo esquelético

Poucas intervenções com os AG ω -3 têm sido avaliadas em animais para verificar o efeito no músculo esquelético (PHILLIPS, 2014). O potencial destes ácidos para aumentar a força e a massa muscular é um assunto controverso e ainda precisa de mais estudos. Foram utilizadas diferentes metodologias para elucidar este fenômeno.

Diversos estudos em ratos (WHITEHOUSE *et al.*, 2001; WHITEHOUSE & TISDALE, 2001; KHAL & TISDALE, 2008; BRYNER *et al.*, 2012) e em humanos (ROBINSON *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2011) comprovaram que estes ácidos exercem influência na massa muscular e mostraram algum efeito nas vias de sinalização da síntese de proteínas musculares e na prevenção da degradação proteica ou um mínimo efeito no ganho de massa muscular (CORNISH & CHILIBECK, 2009). Entretanto, GARCIA *et al.* (2010) suplementaram ratos com 3g/dia de AG ω -3 submetidos à natação, realizada de forma contínua, e não encontraram diferença significativa no ganho de massa muscular entre os grupos.

Em contrapartida, estudos identificaram que a suplementação com os AG ω -3 alteraram os parâmetros de *turnover* proteico, diminuíram as taxas de síntese e degradação (SOHAL *et al.*, 1992), mas não atenuaram o processo de atrofia muscular, que foi evidenciado por meio de dosagens das proteínas das vias de sinalização da síntese proteica em ratos (BANDO *et al.*, 2012; FAPPI *et al.*, 2014). Apesar das metodologias para análise do efeito da suplementação com os AG ω -3 nos músculos serem bem diferentes do nosso estudo, na análise estereológica do músculo *gastrocnêmio*, foi observado efeito de menor área seccional deste músculo nos grupos suplementados com os AG ω -3 quando comparados com os animais dos grupos placebo.

No estudo de FAPPI *et al.*, 2014, os autores observaram que a suplementação com AG ω -3 causou atrofia nas fibras musculares dos tipos I e IIa, as quais apresentaram menor área seccional do músculo tibial anterior, expressão reduzida de miogenina e expressão aumentada de atrogina-1 em ratos Wistar. Quando os AG ω -3 foram administrados juntamente com a dexametasona, este efeito se potencializou ainda mais.

São necessários mais estudos para elucidar este efeito dos AG ω -3 no músculo esquelético, o qual sugere que eles apresentam o mesmo efeito colateral semelhante ao dos anti-inflamatórios medicamentosos.

Neste estudo, foi observado menor área da fibra muscular, mas não foram dosadas as proteínas das vias de sinalização de síntese proteica, sendo uma limitação para que pudéssemos possuir um maior número de variáveis para serem analisadas.

Os Marcadores de Lesão Muscular

Alguns autores descreveram que a concentração plasmática de CK não é o padrão ouro para a avaliação de lesão muscular porque não apresenta uma correlação linear significativa com as funções musculares e com as alterações estruturais nos músculos após o exercício (VAN DER MEULEN, KUIPERS, DRUKKER, 1991; NEME IDE *et al.*, 2013). Além disso, possui um alto grau de variabilidade biológica individual e é difícil demonstrar uma diferença estatística entre um pequeno número de indivíduos (ZOPPI *et al.*, 2003). Apesar disso, ela tem sido utilizada como marcador indireto de lesão muscular em muitos estudos em ratos (VAN DER MEULEN, KUIPERS, DRUKKER, 1991; AOI, NAITO, YOSHIKAWA, 2006; UCHIYAMA *et al.*, 2006; NIU *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2010; SOUZA, *et al.*, 2010; SUSSAI *et al.*, 2010; MILIONI *et al.*, 2014; XIAO, 2015;) e em humanos (THOMPSON *et al.*, 1997; KNITTER *et al.*, 2000; ZOPPI *et al.*, 2003; RAHNAMA,

RAHMANI-NIA, EBRAHIM, 2005; DEMINICE *et al.*, 2009; RA *et al.*, 2013).

A suplementação com AG ω -3 diminuiu a enzima CK nos grupos suplementados em comparação com os grupos placebo e quando associada ao exercício também diminuiu a enzima DHL em comparação ao grupo exercício placebo. Nossos resultados sugerem que a suplementação com AG ω -3 foi eficaz para proteger os músculos contra a lesão muscular.

A natação

CIABATTARI, DAL PAI e DAL PAI (2005) fizeram um estudo morfológico e histoquímico para pesquisar o efeito da natação associada a diferentes dietas no músculo tibial anterior de ratos durante dez semanas, 60 minutos por dia 2x/semana ou 5x/semana. Os pesquisadores realizaram a análise do menor diâmetro da fibra muscular e houve uma leve hipertrofia em relação ao grupo sedentário e os autores consideraram o tempo de dez semanas intenso, mas muito curto. Recentemente, tem sido observado em modelos de exercícios de força em animais, que anteriormente ao aumento de massa muscular, ocorre aumento do número de fibras.

No estudo de RADER *et al.*(2014) em um modelo animal de treino de resistência durante um mês, foi estudada a morfologia das fibras musculares e observaram que o número de fibras por unidade de área aumentou em 20% e decresceu a área da fibra muscular em 20%, com isso a massa muscular permaneceu inalterada, isso inclusive ocorreu principalmente no músculo *gastrocnêmio*. Os autores relataram que em estudo anterior com duração de dois meses, ocorreu a hipertrofia do músculo *gastrocnêmio*. O nosso estudo, com duração de seis semanas, pode ter sido curto e não ter contribuído para que houvesse aumento da área da fibra muscular. Além disso, não analisamos o número de fibras musculares para confirmar se houve, ou não, diferença entre os grupos.

De acordo com SCHOENFELD (2010), os benefícios da hipertrofia associados com maior estresse metabólico são aparentemente contrabalanceados por uma diminuição da capacidade de força, tornando o intervalo de descanso curto (≤ 30 segundos) abaixo do ideal para maximizar a hipertrofia. O intervalo de descanso no protocolo utilizado foi de 15 segundos e isto pode ter influenciado o ganho de massa muscular.

Perfil lipídico

Os suplementos com AG ω -3 são consumidos na forma de cápsulas, contendo de 500 a 2000mg de extrato de óleo de peixe. Utilizamos a dose de 500mg/dia, por ser a quantidade mínima geralmente comercializada e utilizada como suplemento e é também a quantidade recomendada pela Sociedade Internacional de Estudos dos Ácidos Graxos e Lipídeos para adultos saudáveis (SURETTE, 2008). Devemos considerar que esta dosagem é supra fisiológica para ratos. A proporção de EPA/DHA da suplementação foi de 1:1, como no estudo de LLUÍS *et al.* (2013) que associou esta proporção como benéfica para os parâmetros cardiovasculares avaliados.

Como placebo foi utilizado o óleo de oliva que também tem propriedades cardioprotetoras e influencia os parâmetros lipídicos no sangue. O óleo de oliva é uma fonte rica em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes e biológicas, tanto em animais quanto em humanos. A fração saponificável, que representa 98,5%-99,5% do peso do óleo, é formada pela esterificação de triglicerídeos composto principalmente pelo ácido graxo monoinsaturado denominado oleico (ω -9) e por outros ácidos (LOU-BONAFONTE *et al.*, 2012). A fração insaponificável (cerca de 2%) contém mais de 230 compostos fenólicos (SACODITTI, 2014). Justamente pela sua composição química, que é caracterizada pelos ácidos graxos monoinsaturados, e por ser utilizado em

muitos estudos que testaram os efeitos dos AG ω -3, utilizamos este óleo como placebo. Quando comparamos os dois tipos de óleos no perfil lipídico, observamos que o óleo de peixe teve maior efeito na diminuição do colesterol total, LDL e no aumento dos valores de HDL.

Não foi observada diferença significativa na concentração de triglicérides no plasma em resposta a suplementação com AG ω -3 e quando associada ao exercício contribuiu para o aumento do HDL.

Estes resultados foram semelhantes aos de ANDRADE, RIBEIRO, CARMO (2006), que avaliaram o efeito da suplementação com 2,5g/dia de AG ω -3 no perfil lipídico de 14 nadadores de elite do sexo masculino, em estudo randomizado, controlado por placebo, pelo período de seis semanas. O grupo placebo (GP) recebeu óleo mineral (n=6) e o grupo suplementado (n=8), óleo de peixe. Os autores observaram efeito hipocolesterolêmico, com a redução dos níveis séricos de VLDL, LDL e colesterol total. Os valores de HDL não se alteraram com a suplementação, o que foi diferente do resultado deste estudo. Os autores concluíram que a suplementação com os AG ω -3 é importante para a prevenção de doenças cardiovasculares.

Ferguson *et al.* (2015) tiveram a mesma conclusão quando relacionaram o O3I e o perfil lipídico de idosos australianos e encontraram correlação positiva com a concentração de HDL em todos os indivíduos e correlação inversa entre O3I e níveis triglicérides plasmáticos e também na razão TC/HDL.

É importante ressaltar que os valores obtidos nas análises do perfil lipídico dos animais estavam muito semelhantes aos valores normais encontrados em animais de laboratório da mesma linhagem (SPINELLI *et al.*, 2012). Além disso, nos grupos exercitados os valores das lipoproteínas apresentaram-se maiores em relação aos grupos sedentários; isto pode ter ocorrido devido à eutanásia dos animais ter sido realizada 3 horas após a sessão de natação e pode ter ocorrido maior mobilização de lipídeos para a

corrente sanguínea. Uma limitação do estudo foi não termos os valores iniciais destes parâmetros para podermos fazer a comparação.

Considerações finais

Nos recentes milênios, a razão AG ω 6/AG ω 3 da dieta aumentou dramaticamente devido às profundas mudanças nos hábitos alimentares da população, ocasionadas pela revolução agrícola em consequência ao aumento do consumo de milho (WEYLANDT *et al.*, 2015) e posteriormente com a revolução industrial ao aumento no consumo de óleo de soja (BLASBALG *et al.*, 2011), acarretando elevação da relação ω 6/ ω 3 de 1:1 para proporções em torno de 15:1 (SIMOPAULOS, 2002). Esta mudança é um dos principais fatores cruciais para o aumento das chamadas doenças da civilização (WEYLANDT *et al.*, 2015). A *Food and Agricultural Organization* (FAO) recomenda uma dieta com a relação ω -6/ ω -3 na razão de 5-10:1 (SANT'ANA, 2004). Atualmente, para equilibrar a relação ω 6/ ω 3 tem-se usado os AG- ω 3 na forma de suplementos alimentares e estes são consumidos no mundo inteiro.

Devemos ter em mente que a suplementação com os AG- ω 3 em doses supra fisiológicas pode ter efeitos adversos ao organismo, pelo fato destes ácidos serem quimicamente instáveis e se oxidarem rapidamente durante o armazenamento, resultando em uma mistura complexa de peróxidos lipídicos, produtos de oxidação e ácidos graxos não oxidados (ALBERT *et al.*, 2013).

À medida que os AG- ω 3 se oxidam com o tempo, há um aumento exponencial da concentração de peróxidos lipídicos, que vão se degradando e ocorre um aumento dos produtos de oxidação potencialmente prejudiciais à saúde (ALBERT *et al.*, 2013), com efeito citotóxico e potencial carcinogênico (SERINI, *et al.*, 2011), como foi constatado por ALBERT *et al.*(2015) que avaliaram a qualidade e o conteúdo de 32 tipos de

suplementos de óleo de peixe comercializados na Nova Zelândia, onde constataram que a grande maioria dos suplementos excediam os níveis recomendados de marcadores de oxidação. A maioria dos produtos de óleo de peixe vendida globalmente (inclusive da Nova Zelândia) é proveniente dos peixes das profundezas do mar da costa oeste da América do Sul, então os autores consideram que esta pesquisa tem relevância internacional.

A nutrição tem se tornado uma ciência muito complexa com a manipulação de nutrientes isolados para o consumo diário e apesar dos AG- ω 3 poderem ser considerados como um suplemento prescrito em muitas partes do mundo em altas doses, eles são parte essencial de nossa dieta (SERINI, *et al.*, 2011).

É importante analisarmos a alimentação como um todo e para melhorar a razão ω 6/ ω 3 na dieta, seria talvez mais recomendável o aumento do consumo de alimentos *in natura* e a diminuição do consumo de alimentos industrializados e se necessário, a suplementação com os AG- ω 3 numa dosagem fisiológica recomendada de 0,5 a 1g/dia ou doses ligeiramente superior em indivíduos saudáveis (SERINI *et al.*, 2011). Quando a sua utilização terapêutica for necessária deve-se ter precauções com dosagens acima do recomendado (ALBERT, 2013; FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2013; PESKIN, 2014; WEYLANDT, 2015).

Mais estudos com os AG- ω 3 são necessários, com a utilização de diferentes dosagens e em protocolos de exercício de força com maior tempo de duração para elucidar os mecanismos bioquímicos pelos quais os AG- ω 3 interferem no ganho de massa muscular.

Neste estudo, não foi possível mensurar as vias de sinalização da síntese proteica e o aumento da proteína muscular juntamente com a análise estereológica. Portanto, consideramos que mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação dos AG- ω 3. No futuro, a observação de proteínas relacionadas à mecanotransdução e a avaliação de vias de

sinalização proteica em associação com o exercício de força em modelos animais, poderão possibilitar uma nova resposta para esta questão.

7. CONCLUSÃO

7. Conclusão

A suplementação com ácidos graxos ômega -3 em ratos diminuiu a área seccional do músculo esquelético, diminuiu os níveis séricos de CK e DHL e melhorou o perfil lipídico.

8. REFERÊNCIAS

8. Referências

Abbatecola AM, Cherunini A, Guralinik JM, Lacueva CA, Ruggiero C, Maggio M. Plasma polyunsaturated fatty acids and age-related physical performance decline. *Rejuvenation Research*. 2009; 12(1): 25-31.

Abbott SK, Else PL, Hulbert AJ. Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA. *Br J Nutr*. 2010; 103: 522-9.

Albert BB, Cameron-Smith D, Hofman PL *et al*. Oxidation of marine omega-3 supplements and human health. *BioMed Res Int*. 2013; 2013: 1-8.

Albert BB, Derraik JGB, Cameron-Smith D, Hofman PL, Tumanov S, Villas-Boas SG, *et al*. Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. *Sci Rep*. 2015; 5.

Andersson A, Nälsén C, Tengblad S, Vessby B. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76: 1222-9.

Andrade PMM, Ribeiro BG, Carmo MGT. Suplementação de ácidos graxos ômega-3 em atletas de competição: impacto nos mediadores bioquímicos relacionados com o metabolismo lipídico. *Rev Bras Med Esporte*. 2006, 12 (6): 339-44.

Aoi W, Naito Y, Yoshikawa T. Exercise and functional foods. *Nutrition*. 2006; 5(15).

Araujo GG, Papoti M, Manchado-Gobatto FB, Mello MAR, Gobatto CA. Padronização de um Protocolo Experimental de Treinamento Periodizado em Natação Utilizando Ratos Wistar. *Rev Bras Med Esporte*. 2010; 16(1): 51-6.

Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, *et al*. Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *JEM*. 2005; 201(5): 713-22.

Bakker GCM, Erk MJ., Pellis L, Wopereis S, Rubingh CM, Cnubben NHP, *et al*. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation antioxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91: 1044-59.

Bando M, Fournier M, Da X, Lewis LI. Effects of malnutrition with or without eicosapentaenoic acid on proteolytic pathways in diaphragm. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2012; 180(1): 14-24.

Beck W, Gobatto C. Effects of maximum intensity aerobic swimming exercise until exhaustion at different times of day on the hematological parameters in rats. *Acta Physiologica Hungarica*. 2013; 100(4): 427-34.

Behmer OA. Manual de técnicas para histologia normal e patológica, São Paulo: Edart; 1976; 170-80 p.

Blasbalg TL., Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF, Rawlings RR.. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93: 950-62.

Braga L, Mello M, Manchado F, Gobatto C. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e do destreinamento sobre o peso corporal e o metabolismo muscular de ratos. *Rev Port Cien Desp.* 2006; 6(2): 160-9.

Bryner RW, Woodworth-Hobbs ME, Williamson DL, Always SE. Docosahexaenoic Acid Protects Muscle Cells from Palmitate-Induced Atrophy. *ISRN.* 2012; 2012(1): 1-14.

Buckley JD, Howe PRC. Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids May Be Beneficial for Reducing Obesity: A Review. *Nutrients.* 2010; 2: 1212-30.

Calder PC. The 2008 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: Fatty acids and inflammation - From the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. *Clinical Nutrition.* 2010; 29(1): 5-12.

Calder PC. The 2008 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: Fatty acids and inflammation - From the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. *Clinical Nutrition.* 2010; 29(1): 5-12. Figure 4, General overview of the synthesis of lipid mediators from arachidonic acid, EPA and DHA and of their effects on inflammation, p. 8.

Camargo Filho JCS, Vanderlei LCM, Camargo RCT, Francischeti FA, Belangero WD, Dal Pai V. Efeitos do esteróide anabólico nandrolona sobre o músculo sóleo de ratos submetidos a treinamento físico através de natação: estudo histológico, histoquímico e morfométrico. *Rev Bras Med Esporte.* 2006; 12 (5): 243-7.

Castillero E, Martín AI, Menduiña-López, Villanúa MA, López-Calderón A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogen-1 and on myogenic regulatory factors. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol*. 2009; 297(5): R1322-31.

Ciabattari O, Dal Pai A, Dal Pai V. Efeito da natação associado a diferentes dietas sobre o músculo tibial anterior do rato: estudo morfológico e histoquímico. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11(2): 121-5.

Cornish SM, Chilibeck PD. Alpha-linolenic acid supplementation and resistance training in older adults. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. 2009; 34: 49-59.

DeFina LF, Marcoux LG, Devers SM, Cleaver JP, Willis BL. Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93: 455-62.

DeFreitas JM, Beck TW, Stock MS, Dillon MA, Kasishke II PR. An examination of the time course of training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Eur J Appl Physiol*. 2011; 111: 2785-90.

Deminice R, Degiovann GC, Garlipp-Picchi MR, Nóbrega MT, Teixeira M, Jordão AA. Evolução de biomarcadores de estresse oxidativo e relação com a *performance* competitiva em dois momentos da temporada de treinamento de natação. *Rev Bras Med Esporte*. 2009; 15 (4): 277-81.

Duda MK, O'shea KM, Tintinu A, Xu W, Khairallah RG, Barrows BR, *et al*. Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents

pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2009; 81(2): 319-27.

Ebrahimi M, Rajion MA, Meng GY, Farjam AS. Omega-3 Fatty Acid Enriched Chevron (Goat Meat) Lowers Plasma Cholesterol Levels and Alters Gene Expressions in Rats. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 1-8.

Endoh T, Nakajima T, Sakamoto M, Komiyama T. Effects of Muscle Damage induced by eccentric Exercise on Muscle Fatigue. *Med Sci Sports Exerc.* 2005; 37(7): 1151-56.

Erzen I. Plasticity of skeletal muscle studied by stereology. *Image Anal Stereol.* 2004; 23: 143-52.

Fappi A, Godoy T, Maximino J, Rizzato VR, Neves JC, Chadi G. The Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 1-13.

Feillet-Coudray C, Aoun M, Fouret G, Bonafos B, Ramos J, Casas F, *et al.* Effects of long-term administration of saturated and n-3 fatty acid-rich diets on lipid utilisation and oxidative stress in rat liver and muscle tissues. *Br J Nutr.* 2013; 110: 1789-802.

Ferguson JJA, Veysey M, Lucock M, Niblett S, King K, MacDonald-Wicks L *et al.* Association between omega-3 index and blood lipids in older Australians. *J Nutr Biochem.* Forthcoming 2015.

Fernandes T, Soci UPR, Melo SFS, Alves CR, Oliveira EM. Signaling Pathways that Mediate Skeletal Muscle Hypertrophy: Effects of Exercise

Training, Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations, ISBN. 2012. 30 p.

Flann K L, LaStayo PC, McClain DA, Hazel M, Lindstedt SL. Muscle damage and muscle remodeling: no pain, no gain?. J Exp Biol. 2011; 214: 674-79.

Food and Drug Administration. US-Department of Health and Human Services. Substances affirmed as generally recognized as safe: menhaden oil. Washington. 2004. Disponível: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2004-01-15/pdf/04-811.pdf> (acesso 12/06/2014).

Franco LDP, Campos JADB, Demonte A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. Rev Nutr. 2009; 22(3): 359-66.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972; 18(6): 499-502.

Galli C, Calder PC. Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. Ann Nutr Metab. 2009; 5: 123-39.

Garcia BC, Camargo Filho JCS, Vanderlei LC M, Pastre CM, Camargo RCT, Souza TA, *et al.* Efeitos da dieta suplementada com ômega-3 no músculo sóleo de ratos submetidos à natação: análise histológica e morfométrica. Rev Bras Med Esporte. 2010; 16(5): 363-7.

Gilson H, Schakman O, Combraret L *et al.*, Myostatin Gene Deletion Prevents Glucocorticoid Induced Muscle Atrophy. *Endocrinology*. 2007; 148(1): 452-60.

Gingras AA, White PJ, Chouinard PY, Julien P, Davis TA, Dombrowski L. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity. *J Physiol*. 2007; 579(1): 269-84.

Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37: 1974-84.

Gobatto C, Sibuya C, Azevedo JRM, Luciano E, Kokubun E. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos wistar. *Motriz*. 2001; 7(1S): S57-62.

Gundersen HJG. The nucleator. *Journal of Microscopy*. 1988; 151(1): 3-21.

Huang S, Yang H, Chiu C, Pariante CM, Su K. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. *J Psychiat Res*. 2008; 42: 58-63.

Jensen EBV. *Local Stereology*. World Scientific, Singapore, 1998.

Jerosch J. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on cartilage metabolism in AO: Outlook on other nutrient partners especially omega-3 fatty acids. *Int J Rheumatol*. 2011; 2011: 1-17.

Joy JM, Gundermann DM, Lowery RP *et al.* Phosphatidic acid enhances mTOR signaling and resistance exercise induced hypertrophy. *Nutr Metab.* 2014; 11(29).

Khal J, Tisdale MJ. Downregulation of muscle protein degradation is sepsis by eicosapentaenoic acid (EPA). *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 375: 238-40.

Kim J & Lee J. A Review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness: Part I. *JER.* 2014; 10(6): 349-56.

Knitter AE, Panton L, Rathmacher JA, Petersen A, Sharp R. Effects of β -hydroxy- β -methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. *J Appl Physiol.* 2000; 89(4): 1340-4.

Ko GD, Nowacki NB, Arseneau L *et al.* Omega-3 fatty acids for neuropathic pain: case series. *Clin J Pain.* 2010; 26: 168-72.

Kreider RB, Wilborn CD, Taylor L, Campbell B, Almada AL, Collins R, *et al.* ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations. *J Int Soc Sports Nutr.* 2010; 7(7).

Lancha Jr. AH. Suplementação nutricional no esporte, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. 109p.

Le Foll C, Corporeau C, Le Guen V, Gouygou JP, Berge JP, Delarue J. Long-chain n-3 polyunsaturated acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3'-kinase activity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292: E1223-30.

Lenn J, Uhl T, Mattacola C *et al.* The effects of fish oil and isoflavones on delayed onset muscle soreness. *Med Sci Sports and Exerc.* 2002; 34(10): 1605-13.

Leslie MA, Cohen DJ, Liddle DM *et al.* A review of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood triacylglycerol levels in normolipidemic and borderline hyperlipidemic individuals. *Lipids Health Dis.* 2015; 6: 14-53.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, and plasticity: The physiological basis of rehabilitation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. 304 p.

Linko Y-Y, Hayakawa K. Docohexanoic acid : a valuable nutraceutical? *Trends in Food Sci Technol.* 1996; 7: 59-63.

Lluís L, Taltavull N, Cortés-Muñoz M, Sánchez-Martos V, Romeu M, Giralt M, *et al.* Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids in Health and Disease.* 2013; 12(140).

Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro M *et al.* Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56: 1043-57.

Makanae Y, Kawada S, Sasaki K *et al.* Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats. *Acta Physiol.* 2013; 208: 57-65.

Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, *et al.* Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr.* 2006; 19(6): 761-70.

McCardle WD, Katch FI, Katch VL. Músculo esquelético: estrutura e função. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.* 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 367-88p.

Milioni F, Antunes BMM, Teixeira-Arroyo C *et al.* Efeitos do exercício agudo sobre biomarcadores séricos de ratos diabéticos. *Rev Bras Med Esporte.* 2014; 20(1): 32-5.

Miyazaki M, Mccarthy JJ, Fedele MJ *et al.* Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol.* 2011; 589: 1831-46.

Molfino A, Gioia G, Fanelli FR, Muscaritoli M. The Role for Dietary Omega-3 Fatty Acids Supplementation in Older Adults. *Nutrients.* 2014; 6: 4058-72.

Moritz B., Wazlawiki E, Minatti J, Dimbarre de Miranda RC. Interferência dos ácidos graxos ômega-3 nos lipídeos sanguíneos de ratos submetidos ao exercício de natação. *Rev Nutr.* 2008; 21(6): 659-69.

Mozaffarian D, Wu JHY. (n-3) Fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *Nutrition*. 2012; S614-25.

Neme Ide B, Nunes LAS, Brenzikofer R. Time course of muscle damage and inflammatory responses to resistance training with eccentric overload in trained individuals. *Mediat Inflamm*. 2013; 2013.

Nickleborough TD, Murray RL, Ionescu AA *et al*. Fish Oil Supplementation reduces Severity of exercise-Induced Bronchoconstriction in Elite Athletes. *Am J Resp Crit Care Med*. 2003; 168: 1181-89.

Niu A, Wu J, Yu D, Wang R. Protective effector of *Lyciumbarnarum polysaccharides* on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats. *Int J Biol Macromol*. 2008; 42: 447-9.

Nosoka K, Clarkerson PM. Muscle damage following reapeatead bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 1995; 27: 1263-69.

Ochi E, Ishii N, Nakazato K. Time course change of IGF1/Akt/mTOR/p70s6k pathway activation in rat gastrocnemius muscle during repeated bouts of eccentric exercise. *J Sports Sci Med*. 2010; 9: 170-75.

Ogasawara R, Sato K, Higashida K, Nakazato K, Fujita S. Ursolic acid stimulates mTORC1 signaling after resistance exercise in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 305: E760-5.

Paschoal V, Naves A. Tratado de Nutrição Esportiva Funcional, São Paulo: Editora Roca; 2014. 508p.

Peskin BS. Why fish oil fails : A comprehensive 21st century lipids-based physiologic analysis. *J Lipids*. 2014; 2014: 1-15.

Phillips SM. A Brief Review of Critical Processes in Exercise-Induced Muscular Hypertrophy. *Sports Med*. 2014; 44 (S1): S71-7.

Phillips SM. Short-term training: when do repeated bouts of resistance exercise become training?. *Can J Appl Physiol*. 2000; 25: 185-93.

Poottmans JR, Carpentier A, Pereira-Lancha LO, Lancha Jr. A. Protein turnover, amino acid requirements and recommendations for athletes and active populations. *Braz J Med Biol Res*. 2012; 45(10): 875-90.

Prada FJA, Voltarelli FA, Oliveira CAM, Gobatto CA, Macedo DV, Mello MAR. Condicionamento aeróbico e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbico. *R Bras Ci e Mov*. 2004; 12(2): 29-34.

Ra S-G, Miyazaki T, Ishikura K, Nagayama H, Komine S, Nakata Y. Combined effect of branched-chain amino acids and taurine supplementation on delayed onset muscle soreness and muscle damage in high-intensity eccentric exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. 2013; 10(51).

Rader EP, Miller GR, Chetlin RD, Wirth O, Baker BA. Volitional weightlifting in rats promotes adaptation via performance and muscle morphology

prior to gains in muscle mass. *Environmental health insights*. 2014; 8(S1): 1-9.

Rahnama N, Rahmani-Nia F, Ebrahim K. The isolated and combined effects of selected physical activity and ibuprofen on delayed-onset muscle soreness. *J Sports Sci*. 2005; 23(8): 843-50.

Ribeiro C, Cambri LT, Dalia RA *et al*. Continuous and intermittent exercise training and glucose metabolism in neonatal alloxan administered rats. *J Endocrinol Metab*. 2011; 1(3): 101-12.

Rogatto GP, Oliveira CAM, Faria MC, Luciano E. Respostas metabólicas agudas de ratos Wistar ao exercício intermitente de saltos. *Motriz*. 2004; 10(2): 61-6.

Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, Ortiz GG, Pacheco-Moises F, Torres-Sanches ED, Sorto-Gomez TE. Efficacy of Fish Oil on Serum of TNF α , IL-1 β , and IL-6 Oxidative Stress Markers in Multiple Sclerosis Treated with Interferon Beta-1b. *Oxidative Med Cell Longevity*. 2013; 2013.

Rogers ES, Macleod RD, Stewart J *et al*, A randomised feasibility study of EPA and Cox-2 inhibitor (Celebrex) versus EPA, Cox-2 inhibitor (Celebrex), Resistance Training followed by ingestion of essential amino acids high in leucine in NSCLC cachectic patients. ACCeRT Study. 2011.

Robinson SM, Jameson KA, Batelaan SF, Martin HJ, Sydall HE, Dennison EM, *et al.* Diet and its relationship with grip strength in community-dwelling older men and women: the Hertfordshire Cohort Study. *JAGS*. 2008; 56(1): 84-90.

Rousseau JH, Kleppinger A, Kenny AM. Self- Reported Dietary Intake of Omega-3 Fatty Acids and Association with Bone and Lower Extremity Function. *JAGS*. 2009; 57: 1781-8.

Sacks FM, Stone PH, Gibson CM. Controlled Trial of Fish Oil for Regression of Human Coronary Atherosclerosis. *Am Coll Cardio Found*. 1995; 25(7): 1492-8.

Sant'ana LS. Mecanismos bioquímicos envolvidos na digestão, absorção e metabolismo dos ácidos graxos ômega. *RBPS*. 2004; 17(4): 211-6.

Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res*. 2010; 24(10): 2857-72.

Scoditti E, Capurso A, Capurso C. Vascular effects of the Mediterranean diet-Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vasc Pharmacol*. 2014.

Seynnes OR, Boer M, Narici MV. Early skeletal hypertrophy and architectural changes in response to high-intensity resistance training. *J Appl Physiol*. 2007; 102: 368-73.

Shavlakadze T; Grounds M. Of bears, frogs, meat, mice and men: complexity of factors affecting skeletal muscle mass and fat. *BioEssays*. 2006; 28: 994-1009.

Serini S, Fasano E, Piccioni E, Cittadini ARM, Calviello G. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Paradox of Their Health Benefits and Potential Harmful Effects. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24: 2093-105.

Silverberg DS, Schwartz D. The Role of Iron, Omega-3 Fatty Acids, and Vitamins in Heart Failure. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. 2012; 14(4): 328-41.

Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002; 21(6): 495-505.

Smith GI, Atherton P, Reeds DN, Mohammed BS, Rankin D, Rennie MJ et al. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93: 402-12.

Smith HJ, Greenberg NA, Tisdale MJ. Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice. *British Journal of Cancer*. 2004; 91: 408-12.

Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by β -hydroxy- β -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res*. 2005; 65(1): 277-83.

Sohal OS, Baracos VE, Thomas M. Dietary ω 3 fatty acid alters prostaglandin synthesis, glucose transport and protein turnover in skeletal muscle of healthy and diabetic rats. *Biochem J.* 1992; 286: 405-11.

Souza RA, Miranda H, Xavier M, Salles BF, Simão R, Osório RAL, *et al.* Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre marcadores enzimáticos de dano muscular de ratos sedentários e exercitados com natação. *Rev Bras Educ Fís Esporte.* 2010; 24(3): 343-52.

Spinelli MO, Godoy CMSC, Motta MC *et al.* Perfil bioquímico dos animais de laboratório do biotério de medicina da USP. *RESBCAL.* 2012; 1(1); 76-81.

Steiner JL, Gordon BS, Lang CH. Moderate alcohol consumption does not impair overload-induced muscle hypertrophy and protein synthesis. *Physiol Rep.* 2015; 3(3): 1-10.

Surette ME. The science behind dietary ω -3 fatty acids: review. *CMAJ.* 2008; 178 (2): 177-80.

Sussai DA, Carvalho PTC, Dourado DM, Belchior ACG, Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(1): 115-20.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ALIMENTOS / NEPA - UNICAMP.- 4. ed. Campinas: NEPAUNICAMP, 2011.

Teng LL, Shao L, Zhao YT *et al.* The beneficial effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats. *J Int Med Res.* 2010; 38: 940-8.

Thompson D, Nicholas CW, Williams C. Muscular soreness following prolonged intermittent high-intensity shuttle running. *J Sport Sci.* 1997; 17: 387-95.

Uchiyama S, Tsukamoto H, Yoshimura S *et al.* Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *Eur J Appl Physiol.* 2006; 452: 109-16.

Van der Meulen JH, Kuipers H, Drukker J. Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *J Appl Physiol.* 1991. 71(3) 999-1004.

Vigouroux S, Farout L, Clavel S, Briand Yves, Briand M. Increased muscle proteasome activities in rats fed a polyunsaturated fatty acid supplemented diet. *Int J Biochemistry & Cell Biol.* 2003; 35: 749-55.

Wang X, Niu C, Lu J, Li N, Li J. Hydrolzed protein supplementation improves protein content and peroxidation of skeletal muscle by adjusting the plasma amino acid spectrums in rats after exhustive swimming exercise : a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014; 11(5):1-6.

Weiss LA, Connor-Barrett E, Von Mühlen D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo study. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 934-8.

West MJ. Introduction to Stereology. Cold Spring Harb Protoc. 2012, doi:10.1101/pdb.top070623.

Weylandt KH, Nadolny A, Kahlke L, Köhnkre T, Schmöcker, Wang J, C *et al* Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. Biochim Biophys Acta. 2008; 1782(11): 634-41.

Weylandt KH, Serini S, Chen YK, Su HM, Lim K, Cittadini A, *et al*. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: The Way Forward in Times of Mixed Evidence. BioMed Res Int. 2015; 2015: 1-24.

Whitehouse AS, Smith JH, Drake JL, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. Cancer Res. 2001; 61: 3604-9.

Whitehouse AS, Tisdale MJ. Downregulation of Ubiquitin-Dependent Proteolysis by Eicosapentaenoic Acid in Acute Starvation. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 285: 598-602.

Wisløff U, Helgerud J, Hoff J. Strength and endurance of elite soccer players. Med Sci Sports Exerc. 1998; 30: 462-67.

Xiao N. Effects of resveratrol supplementation on oxidative damage and lipid peroxidation induced by strenuous exercise in rats. Biomol Ther. 2015; 23(4): 374-8.

Yildiz A, Ozdemir E, Gulturk S, Erdal S. The effects of creatine long-term supplementation on muscle morphology and swimming performances in rats. *Journal of Sports Science and Medicine*. 2009; 8: 516-22.

Young C & Martin A. Ômega-3 fatty acids in mood disorders: an overview. *Rev Bras Psiquiatria*. 2003; 25(3).

Zoppi CC, Antunes-Neto J, Catanho FO, Goulart LF, Motta e Moura N. Macedo DV. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev Paul Educ Fís*. 2003; 17(2): 119-30.

NORMAS ADOTADAS

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Ely PB. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. São Paulo: Editora CEDC, 2008. p.1 - 84.

Nomina Anatomica Veterinaria. Editorial Committee Hannover (Germany), Columbia, MO (U.S.A.), Ghent (Belgium), Sapporo (Japan), 2012. p. 1-1160.

U.S. National Library of Medicine - National Institutes of Health. Medical Subject Headings. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

ABSTRACT

Introduction: There is some evidence suggesting that omega-3 fatty acids (AG ω -3) can alter the activity of anti-catabolic and/or anabolic pathways of the skeletal muscle to promote the maintenance of muscle mass. **Objective:** To analyze the effect of AG ω -3 supplementation in skeletal muscle and in the lipid profile in rats submitted to swimming. **Method:** Sixty male Wistar rats were divided into four groups: sedentary placebo (SP), sedentary AG ω -3 (S ω -3), exercise placebo (EP) and AG ω -3 exercise (E ω -3). The animals in the EP and E ω -3 groups were subjected to 30 swimming sessions with a duration of 45 minutes, with intermittent exercise and an overload of 15% of body weight, five days a week. The animals received 500mg/day of AG ω -3 or olive oil (placebo) by gavage. After euthanasia, blood samples were collected for CK, LDH and blood lipids dosages. The gastrocnemius muscles were removed and slides were prepared with HE and an estimated cross-sectional area was calculated by the stereological method. **Results:** The placebo group submitted to exercise (EP) had less weight gain compared to the sedentary groups (SP) ($p < 0.0001$). The group S ω -3 presented with a lower area of muscle fibers ($p = 0,018$), lower CK ($p=0,001$) and cholesterol ($p < 0,0001$) compared to the groups SP. The E ω -3 group presented lower LDH ($p=0,029$), lower LDL ($p=0,0002$) and higher value of HDL ($p=0,035$) compared to the EP group. **Conclusion:** The supplementation with omega-3 in rats submitted to swimming decreased the sectional area of the skeletal muscle, decreased CK and DHL enzyme and improved lipid profile.

APÊNDICES

Dados das análises bioquímicas

Tabela 2 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo sedentário placebo (SP).

Grupo Sedentário Placebo						
ANIMAL	CK	LDH	COL	LDL	HDL	TRIG
1	1580	179	97	29,6	41	132
2	1292	1418	88	29	41	90
3	1603	1035	65	19,2	31	74
4	540	1560	78	31,8	35	56
5	2092	281	82	20,6	34	137
6	953	1596	74	30,8	32	56
7	1175	1764	75	19,2	32	119
8	1052	977	78	25,6	33	97
9	903	1635	75	9	34	160
10	1168	1555	73	30,2	31	59
11	643	1425	61	17,2	33	54
12	1117	1806	64	24,4	28	58
13	536	1208	77	30,4	32	73
14	1170	1189	63	24	29	50
15	844	1732	51	13,4	26	58
Média	1111,2	1290,66	73,4	23,62	32,8	84,86
Desvio Padrão	407,16	483,66	11,03	6,75	3,95	34,76
Máximo	536	179	51	9	26	50
Mínimo	2092	1806	97	31,8	41	160

Tabela 3 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo sedentário com suplementação de AG ω -3 (S ω -3).

GRUPO S ω -3						
ANIMAL	CK	LDH	COL	LDL	HDL	TRIG
16	459	1014	59	21,8	30	36
17	522	1501	43	9,4	29	23
18	644	1361	61	8	35	90
19	513	1234	66	18,6	36	57
20	813	1707	44	8	26	50
21	1451	1638	59	17,4	31	53
22	614	1455	54	14,2	31	44
23	622	1811	65	19,6	32	67
24	352	896	66	9,6	36	102
25	1231	1949	63	13,2	32	89
26	737	2034	70	21,2	35	69
27	934	2076	55	11,2	32	59
28	890	2057	61	17,6	31	62
29	962	1830	66	11,4	36	93
30	748	1545	67	21,6	31	72
Média	766,13	1607,2	59,93	14,85	32,2	64,4
Desvio Padrão	285,04	357,68	7,74	4,92	2,80	21,51
Máximo	352	896	43	8	26	23
Mínimo	1451	2076	70	21,8	36	102

Tabela 4 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do grupo exercício placebo (EP).

GRUPO EP						
ANIMAL	CK	LDH	COL	LDL	HDL	TRIG
31	1720	2249	82	27,6	34	102
32	1109	2019	91	34,6	33	117
33	2083	1021	121	59,4	39	113
34	1288	2175	79	34	31	70
35	676	1764	98	51,6	36	52
36	686	1728	88	37,6	32	92
37	445	1320	118	68,4	38	58
38	621	1571	87	47,8	29	51
39	370	1025	105	51,2	36	89
40	1372	2152	79	25,4	31	113
41	650	1967	85	36,4	32	83
42	696	2070	114	64,6	32	87
43	750	1917	79	37,2	30	59
44	622	1952	91	46,8	30	71
45	476	1234	112	40,2	38	169
Média	904,26	1744,27	95,26	44,18	33,4	88,4
Desvio Padrão	485,38	401,84	14,47	12,51	3,13	30,44
Máximo	370	1021	79	25,4	29	51
Mínimo	2083	2249	121	68,4	39	169

Tabela 5 - Dados dos valores séricos das análises bioquímicas dos ratos do Grupo exercício com suplementação de AG ω -3 (S ω -3).

GRUPO E ω -3						
ANIMAL	CK	LDH	COL	LDL	HDL	TRIG
46	465	1197	83	32,4	40	53
47	641	1278	87	23,4	41	113
48	662	1562	89	23,2	41	124
49	561	1469	88	37,4	37	68
50	709	1822	84	29	40	75
51	564	1345	87	41,4	39	33
52	450	1220	65	23,8	33	41
53	393	1034	73	24	37	60
54	636	1177	80	24,4	36	98
55	319	728	80	21,8	37	106
56	671	1400	100	11,2	38	254
57	384	914	66	14,2	30	109
58	875	1645	69	14,2	30	124
59	806	1685	83	19,2	37	134
60	680	1389	97	24,2	38	174
Média	587,733	1324,33	82,06	24,25	36,93	104,4
Desvio Padrão	154,47	286,07	9,97	8,00	3,37	54,72
Máximo	319	728	65	11,2	30	33
Mínimo	875	1822	100	41,4	41	254

ANEXOS

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisas
Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de novembro de 2008
CEP Nº: 1294/08

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): TANIA CORREA MILLER

Disciplina/Departamento Ortopedia e Traumatologia

Pesquisadores associados: Patrícia C dos Santos Bueno, Rene Jorge Abdalla (orientador)

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Efeito da suplementação de ácidos graxos ômega-3 em biomarcadores de lesão muscular em ratos:

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Verificar o efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-3, que são considerados componentes alimentares com ação fisiológica, nos biomarcadores (CK e LDH) de lesão muscular em ratos após exercícios intermitentes.

RESUMO: Estudo com 60 ratos Wistar. Anestésico: tiopental. Eutanásia: sobredose de tiopental. Os animais serão divididos em 4 grupos: grupo controle, grupo controle suplementado com Ômega 3; grupo treinado e grupo treinado suplementado com ômega 3. A dose diária do suplemento será composta de 0,6mg de ômega-3 em 0,5ml de óleo de oliva administrados por gavagem. Os animais serão submetidos ao treinamento de natação. Ao final do último dia de treinamento, após 3 horas, os animais serão sacrificados, coletado sangue para dosagem de CK e LDH.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Tem sido estudado o aparecimento de proteínas musculares no sangue como indicadores indiretos de danos musculares provocados pelo exercício. Muitas pesquisas tem mensurado vários parâmetros sanguíneos indicadores de danos musculares e os que são considerados mais confiáveis são: a atividade de enzimas como a creatinina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) e o conteúdo de mioglobina (Mb). Este estudo visa avaliar a hipótese de que a suplementação com PUFA ômega-3 pode alterar biomarcadores de lesão muscular associados ao exercício intermitente, em ratos.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 12 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 02/11/2009 e 28/10/2010

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO II – BULA DO SUPLEMENTO DO ÓLEO DE PEIXE EM CÁPSULA

Votag®
Óleo de peixe em cápsulas

PRODUTO ALIMENTÍCIO

FORMA E APRESENTAÇÃO

Caixa contendo 30 cápsulas gelatinosas moles.

USO ADULTO

INGREDIENTES

Óleo de Peixe (Ácidos graxos polinsaturados marinhos - ácidos eicosapentaenóico (ingrediente) e docosahexaenóico (ingrediente)), gelatina (excipiente da casca da cápsula), glicerina (excipiente da casca da cápsula), água de bismuto (excipiente da casca da cápsula), metilparabeno (excipiente da casca da cápsula) e propilparabeno (excipiente da casca da cápsula).

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção de 1g = 1 cápsula		
Quantidade por porção		% VD*
Valor energético	10kcal = 41kJ	0,5 %
Carboidratos	0 g	0
Proteínas	0 g	0
Gorduras totais	1 g	2,0 %
Gorduras saturadas	0 g	0
Gorduras trans	0 g	—
Gorduras monoinsaturadas	0,2 g	—
Gorduras polinsaturadas	0,6 g	—
Ácidos graxos Omega 3		
EPA - eicosapentaenóico	0,1 g	—
DHA - docosahexaenóico	0,1 g	—
Sódio	0,8 mg	—
Fibra alimentar	0 g	0
Álcool	0 mg	0

*% Valores Diários com base em uma dieta de 2000 Kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.

** Não há referência sobre VD.

CUIDADOS NA CONSERVAÇÃO

Conservar o produto ao abrigo do calor excessivo, da umidade, da luz e em temperatura ambiente (entre 15e30°C).

CUIDADOS NA ADMINISTRAÇÃO

Gestantes, nutrízes e crianças de até 3(três) anos, somente devem consumir este produto sob orientação de nutricionista ou médico. Siga as orientações sugeridas, respeitando os horários e as doses recomendadas.

Pessoas que apresentam doenças ou alterações fisiológicas, particularmente com alteração na coagulação sanguínea, gestantes, nutrízes e crianças devem consultar o médico antes de usar o produto.

Não contém Glúten.

Prazo de validade: 24 meses após a data de fabricação.

Verifique a data de fabricação no cartucho

Não utilizar com o prazo de validade vencido

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

Os Ácidos graxos insaturados, presentes em fontes animais e vegetais, são divididos em famílias denominadas Ômega 3 e Ômega 6. Os Ácidos graxos polinsaturados de origem marinha são utilizados como alimento por não serem sintetizados pelo nosso organismo. São derivados de peixes e frutos do mar e nelas estão presentes dois dos principais Ácidos graxos essenciais ao nosso corpo, que são o Ácido eicosapentaenóico (EPA) e o Ácido docosahexaenóico (DHA).

O Ministério da Saúde adverte: não existem evidências científicas comprovadas de que este alimento previna, trate ou cure doenças.

USO

VOTAG é um alimento a base de Óleo de Peixe recomendado para pessoas que têm uma dieta pobre em Ácidos graxos polinsaturados de origem marinha (Ômega 3).

MODO DE USO

1 a 3 cápsulas ao dia.

Nº DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE: VIDE CARTUCHO

M.S. Nº 6.1370.0017.001-1 - Farm. Resp.: Dra. Lucimara Andreotti - CRF-SP nº 32.564

Ativa Farmacêutica Ltda
Rua Formosa, 2050 Cx. Postal 489 - Valinhos - SP - CEP 13278-000
CNPJ nº 04.088.172/0001-41 - Insc. Estadual
SAC: 0800 55 1767 - r. 04.8

FONTES CONSULTADAS

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em:
<http://decs.bvs.br/> - terminologia em saúde.

U.S. National Library of Medicine - National Institutes of Health. Medical Subject Headings. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>.