

CRISTIANE CRISUK PARREIRA DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AGARICUS  
BLAZEI EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

BELO HORIZONTE

2020

CRISTIANE CRISUK PARREIRA DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AGARICUS  
BLAZEI EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Linha de pesquisa: Bioquímica e Imunologia Nutricional

Orientador: Prof. Dr. Wiliam César Bento Régis

Coorientador: Prof. Dr. Hugo Martins Costa

BELO HORIZONTE

2020

Azevedo, Cristiane Crisuk Parreira de.  
A994a Avaliação do efeito agudo da suplementação de agaricus blazei em marcadores inflamatórios após exercício excêntrico [manuscrito]. / Cristiane Crisuk Parreira de Azevedo. - - Belo Horizonte: 2020.  
79 f.: il.  
Orientador (a): Wiliam César Bento Régis.  
Coorientador (a): Hugo Martins Costa.  
Área de concentração: Nutrição e Saúde.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Agaricales. 2. Exercício Físico. 3. Inflamação. 4. Músculos/lesões. 5. Suplementos Nutricionais. 6. Dissertação Acadêmica. I. Régis, Wiliam César Bento. II. Costa, Hugo Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: QU 145.5

**ATA DE NÚMERO 52 (CINQUENTA E DOIS) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA CRISTIANE CRISUK PARREIRA DE AZEVEDO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.**

Aos 13 (treze) dias do mês de abril de dois mil e vinte, às 13:30 horas, realizou-se por meio de videoconferência, a sessão para apresentação e defesa da dissertação "**AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AGARICUS BLAZEI EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**", da aluna **Cristiane Crisuk Parreira de Azevedo**, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Wiliam César Bento Régis, Adaliene Versiani Matos Ferreira, Jacqueline Isaura Alvarez Leite e Débora Romualdo Lacerda, sob a presidência do primeiro. Abrindo a sessão, o Senhor Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

**APROVADO;**

**APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;**

**REPROVADO.**

O resultado final foi comunicado à candidata pelo Senhor Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Wiliam César Bento Régis, Presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de abril de 2020.

Prof. Dr. Wiliam César Bento Régis



Presidente (PUC-Minas)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adaliene Versiani Matos Ferreira  
(UFMG)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez Leite  
(UFMG)

---

Dr<sup>a</sup>. Débora Romualdo Lacerda  
(UFMG)



---



**ATA DE NÚMERO 52 (CINQUENTA E DOIS) DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA CRISTIANE CRISUK PARREIRA DE AZEVEDO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.**

Aos 13 (treze) dias do mês de abril de dois mil e vinte, às 13:30 horas, realizou-se por meio de videoconferência, a sessão para apresentação e defesa da dissertação "**AValiação DO EFEITO AGUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DE AGARICUS BLAZEI EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS APÓS EXERCÍCIO EXCÊNTRICO**", da aluna *Cristiane Crisuk Parreira de Azevedo*, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Nutrição Clínica e Experimental". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Wiliam César Bento Régis, Adaliene Versiani Matos Ferreira, Jacqueline Isaura Alvarez Leite e Débora Romualdo Lacerda, sob a presidência do primeiro. Abrindo a sessão, o Senhor Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

**APROVADO;**

**APROVADO COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;**

**REPROVADO.**

O resultado final foi comunicado à candidata pelo Senhor Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Wiliam César Bento Régis, Presidente da Comissão Examinadora, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de abril de 2020.

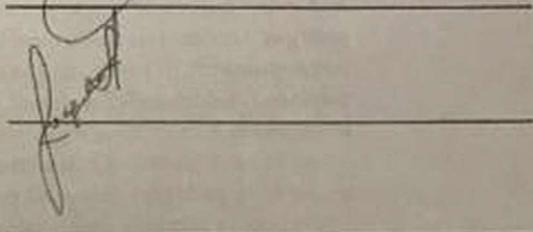
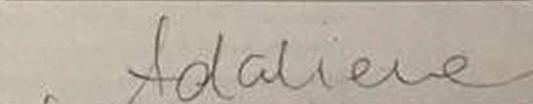
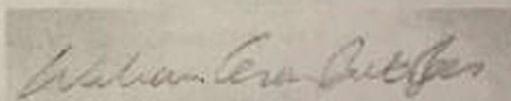
Prof. Dr. Wiliam César Bento Régis

Presidente (PUC-Minas)

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Adaliene Versiani Matos Ferreira  
(UFMG)

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez Leite  
(UFMG)

Dr.<sup>a</sup>. Débora Romualdo Lacerda  
(UFMG)



## **Agradecimentos**

A conclusão deste mestrado possui um significado especial em minha vida, e agradeço a Deus por esta oportunidade de crescimento, onde pude superar os desafios e dificuldades que cruzei neste caminho.

Sou grata em ter ao meu lado pessoas que me auxiliaram nesta caminhada.

Em especial meu companheiro de vida e esposo, Fernando, por me auxiliar a atravessar todos os momentos, por me incentivar a seguir em frente e compreender minhas ausências quando necessário. E também aos meus filhos Isa e Francisco, que mesmo ainda crianças compreenderam minha ausência em alguns momentos e em outros estiveram ao meu lado nas horas de estudo.

Aos meus pais, Yara e Carlos, a oportunidade de estudar e concluir uma graduação, pois sem ela nada disso seria possível.

Ao meu orientador prof. Wiliam a oportunidade em realizar este projeto, a confiança, o apoio e principalmente, a paciência em orientar, escutar e ensinar.

Ao meu coorientador prof. Hugo, por todo auxílio e disposição. Gratidão pela oportunidade de aprendizado.

Ao professor Albená, à Larissa e Amanda e todos os voluntários, por tornar possível a execução deste projeto, e em especial à colega de mestrado Lorena, com quem aprendi muita coisa, e juntas pudemos superar alguns desafios.

Aos professores, colaboradores e alunos da Pós-Graduação, em especial as professoras Aline e Adaliene.

E a todos os amigos que caminharam comigo, me auxiliaram, me aconselharam e me incentivaram, gratidão.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Atividade do  $\beta$ -glucano sob o sistema imunológico.

**Figura 2.** Desenho ilustrativo do processo inflamatório após a contração excêntrica.

**Figura 3.** Fluxograma da amostra.

**Figura 4.** Delineamento do estudo (A) e detalhamento dos procedimentos em cada ciclo (B).

**Figura 5.** Representação do fluorocromo em estado de repouso e emitindo fluorescência após ser excitado pela luz laser.

**Figura 6.** Exemplo do esquema representativo da marcação de linfócitos T com AcMo anti CD3 acoplado com o fluorocromo FITC.

**Figura 7.** Exemplo de esquema representativo da suspensão de células submetidas a marcação com AcMo.

**Figura 8.** Esquema representativo do funcionamento do citômetro de fluxo.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Caracterização da amostra.

**Tabela 2.** Consumo médio de macro e micronutrientes entre placebo e *A.blazei*.

**Tabela 3.** Média do consumo alimentar por grupos alimentares através da análise do QFA.

## LISTA DE QUADROS

**Quando 1.** Composição nutricional em 100 gramas de *A.blazei* desidratado

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Concentrações médias de leucócitos entre placebo e *A.blazei* no período basal e 2 horas.

**Gráfico 2.** Concentrações médias de neutrófilos entre placebo e *A.blazei* no período basal e 2 horas.

**Gráfico 3.** Concentrações médias de linfócitos entre placebo e *A.blazei* no período basal e 2 horas.

**Gráfico 4.** Concentrações médias de monócitos entre placebo e *A.blazei* no período basal e 2 horas.

**Gráfico 5.** Concentrações médias de IFN- $\gamma$  entre placebo e *A.blazei* no período basal, 2 horas e 24 horas.

**Gráfico 6.** Concentrações médias de TNF- $\alpha$  entre placebo e *A.blazei* no período basal, 2 horas e 24 horas.

**Gráfico 7.** Concentrações médias de IL-10 entre placebo e *A.blazei* no período basal, 2 horas e 24 horas.

**Gráfico 8.** Concentrações médias de IL-6 entre placebo e *A.blazei* no período basal, 2 horas e 24 horas.

**Gráfico 9.** Concentrações médias de IL-4 entre placebo e *A.blazei* no período basal, 2 horas e 24 horas.

**Gráfico 10.** Concentrações médias de IL-2 entre placebo e *A.blazei* no período basal, 2 horas e 24 horas.

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Termo de consentimento livre e esclarecido.

**Anexo 2.** Questionário de frequência alimentar.

## LISTA DE ABREVIações

**A.blazei** – *Agaricus blazei*

**AcMo** – Anticorpos monoclonais conjugados

**ADM** – Amplitude de movimento

**AINES** – anti-inflamatórios não esteroides

**CK** – Creatinina quinase

**DOMS** – Dor muscular de início tardio

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**IMC** – Índice de massa corporal

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-8** – Interleucina 8

**IL-10** – Interleucina 10

**IL-1ra** – antagonista interleucina 1

**IL-15** – Interleucina 15

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina 1 beta

**IL-2** – Interleucina 2

**Kg** – quilogramas

**LDH** – Lactato desidrogenase

**LP** – Legpress

**M** – metros

**Mg** – Mioglobina

**mRNA** – RNA mensageiro

**NF-Kb** – Fator nuclear kappa B

**NK** – Natural Killer

**NO** – Óxido nítrico

**PCR** – Proteína C reativa

**PUC MINAS** – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

**QFA** – Questionário de frequência alimentar

**RNs** – Espécies reativas de nitrogênio

**TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

O consumo de suplementos alimentares por praticantes de musculação cresce consideravelmente, assim como estudos para verificar os efeitos de alguns suplementos na recuperação após o dano muscular. Sabe-se que o exercício excêntrico ocasiona dano à estrutura muscular, após ocorre o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão com o objetivo de reparo muscular, entretanto podem ocorrer danos secundários a estrutura muscular através dos produtos metabólicos da inflamação, o que pode prejudicar a recuperação e a prática de treinamentos devido a diminuição na capacidade de geração de força e dor de início tardio. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação aguda do *A.blazei* sobre marcadores inflamatórios após uma sessão de exercício excêntrico, já que este tem demonstrado possuir uma atividade imunomoduladora em animais e humanos. Metodologia: Os indivíduos receberam uma suplementação de *A.blazei* ou placebo durante 8 dias, sendo que no 7º dia realizaram 7 séries de 10 repetições a 100% de 1RM de contração excêntrica unilateral no aparelho LegPres. Foram realizadas coletas sanguíneas para análise de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos antes e 2 horas após o exercício e, para análise de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foram realizadas coletas antes, imediatamente após e 24 horas após o exercício. A ingestão alimentar foi avaliada através de QFA e recordatório de 3 dias. Como tratamento estatístico, utilizou-se a Análise de Variância (variáveis inflamatórias) e teste T (ingestão alimentar). Resultados: Os resultados da ANOVA não demonstraram efeito principal ou interação para as variáveis inflamatórias analisadas. Com relação a ingestão alimentar não foi demonstrada diferença entre placebo e *A.blazei*. Conclusão: Não foi evidenciado o efeito do *A.blazei* nos marcadores inflamatórios após série de exercícios excêntricos.

Palavras chaves: *Agaricus blazei*, exercício excêntrico, inflamação, dano muscular.

## ABSTRACT

The consumption of food supplements by bodybuilders grows considerably, as well as the studies to verify the effects of certain supplements in the recovery after muscle damage. Eccentric exercise is known to damage muscle structure, followed by the recruitment of inflammatory cells in the damaged region with the goal of muscle repair. However, there may be secondary damages to muscle structure caused by metabolic products of the inflammation, which may, in turn, harm the training recovery and execution due to a decrease in strength-generating capacity and delayed-onset soreness. The aim of this study was to evaluate the effects of acute supplementation of the *A.blazei* over inflammatory markers after a session of eccentric training, given that the former demonstrates an immunomodulatory response in animals and humans. Methods: The subjects received a supplement of either *A.Blazei* or a placebo for ten days, and on the seventh day, they performed 7 series of 10 repetitions at 100% 1RM unilateral eccentric muscle contraction on a LegPress machine. Blood samples were then collected for the analysis of leucocytes, neutrophils, lymphocytes and monocytes, before the training and 2 hours after. For the analysis of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , the samples were collected before, immediately after, and 24 hours after the session of eccentric training. The food intake was FFQ-evaluated with the 3-day recall. As a statistical treatment, use an Analysis of Variance (inflammatory variables) and T test (food intake). Results: The ANOVA results did not demonstrate a main effect or interaction for the inflammatory variables analyzed. The relationship of food intake was not demonstrated as a difference between placebo and *A.blazei*. Conclusion: The effect of *A. blazei* on inflammatory markers after the eccentric exercises was not evidenced.

Key words: *Agaricus blazei*, eccentric exercise, inflammation, muscle damage

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	14
1.1	<i>Agaricus blazei</i> .....	16
1.2	Exercício de força excêntrica e a resposta inflamatória .....	20
1.3	Funções e variações das citocinas após o exercício excêntrico .....	26
2.	Justificativa .....	33
2.1	Hipótese.....	33
3.	Objetivo Geral.....	34
4.	Metodologia .....	35
4.1	Tipo e campo do estudo .....	35
4.2	Amostra e aspectos éticos.....	35
4.3	Desenho experimental.....	36
4.4	Teste de 1 RM .....	38
4.5	Protocolo de exercício excêntrico intenso. ....	39
4.6	Avaliação Antropométrica .....	39
4.7	Avaliação nutricional.....	40
4.8	Análises marcadores sanguíneos de inflamação .....	40
4.9	Análises estatísticas .....	44
5.	Resultados.....	46
5.1	Análises marcadores sanguíneos de inflamação .....	48
6.	Discussão .....	57
7.	Conclusão.....	68
8.	Referencias .....	69
9.	Anexos.....	75

## 1. Introdução

Atualmente suplementos nutricionais têm sido utilizados por indivíduos recreativamente ativos com o objetivo de evitar a fraqueza, aumentar a força muscular e melhorar o desempenho, entre outras razões, sendo que seu uso tem crescido nos últimos anos (1). Entre estudantes universitários dos Estados Unidos, cerca de 66% dos indivíduos relataram utilizar semanalmente um ou mais tipos de suplementos nutricionais (2). No Brasil, cidade de Belo Horizonte, foi relatado o consumo de suplementos nutricionais por 36,8% dos praticantes de academia de diversas modalidades, sendo que seu consumo é maior entre indivíduos praticantes de musculação, do sexo masculino e indivíduos mais jovens ( $31 \pm 10,4$  anos) (1).

Durante a prática da musculação, um dos exercícios empregados é o exercício de força de contração excêntrica (3), que promove um aumento maior no ganho de força (4). Entretanto o mesmo pode promover maior dano muscular em razão do estresse mecânico causado na estrutura muscular, levando à um processo inflamatório local, que é necessário para a regeneração das fibras musculares danificadas. (5,6). A inflamação será proporcional à intensidade do exercício e à quantidade de músculo recrutado (5,7), e ela poderá ainda promover danos secundários (6). Após o dano muscular ocorre uma diminuição da força muscular e na amplitude do movimento (ADM), e o surgimento da dor muscular de início tardio (DOMS). Essa diminuição na capacidade funcional, pode comprometer a realização do treinamento diário (8) e prejudicar a capacidade de recuperação após o exercício (6). Assim medidas preventivas ou a minimização do dano muscular secundário é sugerida como um fator importante para a recuperação após o exercício (8).

Algumas estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas atualmente com o objetivo de reduzir os efeitos negativos do dano muscular secundário decorrente da inflamação aguda após o exercício excêntrico (9,10,11). Embora algumas abordagens já possuam um amplo debate científico, como é o caso da creatinina, que possui artigos detalhando a segurança e a eficácia da sua suplementação em humanos (9), suplementos com propriedades anti-inflamatórias, têm sido estudados e considerados uma estratégia para melhorar a recuperação e mitigar a resposta inflamatória após o dano muscular (10,11).

Suplementos são definidos como um produto de ingestão oral, ao qual destina-se suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, isolados ou combinados. Eles podem ser em forma de extrato, metabólitos ou concentrados dessas substâncias, disponíveis em diversas formas farmacêuticas, como comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, bebidas, em pó e barras comestíveis (12).

Um exemplo de estudo utilizou a suplementação de substâncias bioativas, provenientes da beterraba, com o objetivo de verificar seu efeito após danos musculares provocados por exercício excêntrico. Considerada um alimento rico em ácidos fenólicos, flavonoides e carotenoides, também possui um grupo de pigmentos nitrogenados, denominados de betalaínas, classificados como betacianinas ou betaxantinas. As betacianinas demonstram um efeito antioxidante e anti-inflamatório, razão pela qual tem despertado interesse. Seu efeito anti-inflamatório possivelmente seja atribuído a inibição de ativadores pró-inflamatórios, enquanto sua atividade antioxidante possa ser devida a uma eliminação direta de espécies de radicais e, a uma regulação na atividade enzimática endógena anti-oxidante (13).

Com o objetivo de verificar seu efeito, 30 indivíduos ingeriram diariamente uma dose alta de uma bebida à base de beterraba (250 ml) ou uma dose menor (125 ml), ou ingeriram placebo. Eles observaram que, uma alta dose de suco de beterraba foi efetiva para melhorar o desempenho no salto contra movimento em 48 e 72 horas após o exercício excêntrico. E independente da dosagem, atenuou a sensibilidade de dor após, 24 horas, 48 e 72 horas. Entretanto, a bebida não demonstrou efeito sobre marcadores bioquímicos como creatina quinase (CK), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (13).

Outro alimento que é descrito possuir efeitos anti-inflamatórios, é a cúrcuma. Assim alguns estudos foram realizados com o objetivo de verificar seu efeito nos marcadores de dano muscular após o exercício excêntrico, comparando os efeitos de sua ingestão antes ou depois do exercício (8,14,15).

Em um estudo com 24 homens que ingeriram 180mg/dia de cúrcuma 7 dias antes ou 4 dias após o exercício de contração excêntrica ou a mesma quantidade de placebo. Nos indivíduos que ingeriram o suplemento após o exercício excêntrico, foi observada uma maior ADM e menor dor percebida no 3º dia após o exercício se

comparado aos indivíduos que receberam placebo. No entanto os indivíduos que ingeriram o suplemento antes do protocolo de exercício não demonstraram diferenças significativas. A CK avaliada neste estudo, não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos, e demais marcadores de inflamação não foram verificados (8).

Outro estudo que também avaliou o efeito da mesma quantidade da suplementação de cúrcuma em 20 homens após exercícios de contração excêntrica, resultou em uma diminuição da IL-8 após 12 horas do exercício, quando a mesma foi ingerida 7 dias antes do exercício. Enquanto a ingestão após o exercício apresentou um aumento na ADM e torque de contração voluntária máxima no 2° e 3° dia respectivamente, e menor dor muscular e CK no 3° e 5° respectivamente. Assim, de acordo com os autores, uma ingestão de cúrcuma após o exercício pode atenuar danos musculares e proporcionar uma melhor recuperação (14).

Outro estudo com 28 indivíduos que receberam suplementação com 400mg/dia de cúrcuma ou placebo, 2 dias antes e 4 dias após exercício excêntrico, apresentaram um aumento significativamente menor das concentrações de CK (1,2,3 e 4 dias), TNF- $\alpha$  (1,2 e 4 dias) e IL-8 (1 e 2 dias), após o exercício excêntrico comparado ao placebo. Entretanto não foram observadas diferenças nas concentrações de IL-6, interleucina-10 (IL-10) e sensação de dor nos indivíduos suplementados (15).

### **1.1 *Agaricus blazei***

É descrito que o *Agaricus blazei* possui atividade imunomoduladora, caracterizada por induzir, estimular ou suprimir a produção de citocinas, incluindo pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, capaz de ativar o sistema imunológico e, não somente um efeito direto sob componentes do processo inflamatório (16).

Um estudo piloto que avaliou a suplementação de 2.000mg/dia de *A.blazei* durante 9 dias em indivíduos que foram submetidos à um teste de força excêntrica, sugere que sua utilização pode ser promissora na recuperação após o exercício. O estudo resultou em uma diminuição na fadiga muscular, no entanto não foram analisados parâmetros bioquímicos para uma melhor elucidação dos mecanismos (17).

O cogumelo *A.blazei*, pertencente à família dos *basidiomycetes*, natural da cidade de Piedade, estado de São Paulo. Durante anos foi utilizado como ingrediente alimentar pela população local, a qual apresentava uma menor prevalência de doenças como aterosclerose, hiperlipidemia, diabetes e câncer comparada às populações vizinhas, relacionado presumivelmente devido ao consumo do cogumelo. A partir da década de 60 passou a ser utilizado no Japão, integrando o mercado de alimentos saudáveis e despertando o crescente interesse de pesquisa (18,19,20,21). Atualmente, é amplamente consumido em países orientais, considerado um alimento funcional e para fins terapêuticos, na forma de extrato concentrado ou chá (22).

Composto por 89 a 91% de água e, sua matéria seca composta por proteínas, carboidratos, gorduras, fibras e minerais, pode ser considerado de alto valor nutricional. Os corpos de frutificação possuem vitaminas B1, B2 e niacina, rico em  $\beta$ -glucanos, sendo os  $\beta$ -glucanos considerados um estimulador do sistema imune inato (16,23,21).

O quadro 1 apresenta a composição nutricional do *A.blazei* desidratado.

**Quadro 1.** Composição nutricional em 100 gramas de *A.blazei* desidratado.

<b>100 gramas <i>A. blazei</i> desidratado</b>	
Proteínas (g)	37,2
Gorduras (g)	2,2
Carboidratos (g)	23,9
Fibras (g)	0,07
Vitamina A ( $\mu$ g)	<16
Vitamina C (mg)	69,7

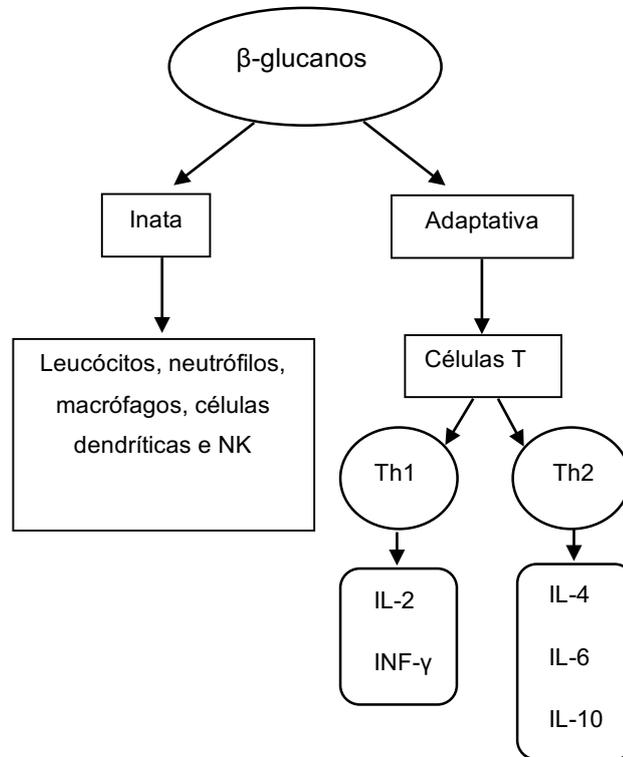
Fonte: Liu D, et al. (2019). *Nutrient Properties and Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabonomic Analysis of Microfungi*.

As proteínas e carboidratos são elementos abundantes em cogumelos, sendo que quando comparado a demais cogumelos comestíveis, o *A.blazei* possui uma quantidade maior de proteínas. Dentre as proteínas presentes, 30-40% dos aminoácidos são essenciais, possuindo o nível mais alto de aminoácidos essenciais, comparado aos demais cogumelos comestíveis. Além dos aminoácidos essenciais, o conteúdo de glutamina encontrado no *A.blazei* fresco, é maior que nos demais cogumelos (21,6g/Kg de cogumelo fresco) (15). De acordo com Kim et al. (2014), a

glutamina pode participar da modulação da atividade de células imunes, embora existam estudos controversos. Em um estudo que avaliou a ingestão de 0,3 g/kg de peso de glutamina, por um período de 4 dias após o exercício excêntrico, relatou uma diminuição na DOMS comparado ao placebo. A mesma foi associada à uma diminuição na inflamação, embora nenhum marcador inflamatório tenha sido avaliado. No entanto uma ingestão de 0,1 g/Kg de peso três vezes por semana em um período de 4 semanas, não apresentou diferença na DOMS (22).

Entre os carboidratos, o *A.blazei* é rico em polissacarídeos e  $\beta$ -glucanos, que são consideradas as moléculas mais importantes na atividade imunomoduladora. Os polissacarídeos são reconhecidos por receptores de membrana (Receptores de Reconhecimento Padrão) em leucócitos, macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK), levando a proliferação de células imunes (24,25,26,27). Podem ser reconhecidos, portanto por receptores Dectin-1 e CR3 (27). Os  $\beta$ -glucanos são capazes de ativar diretamente os leucócitos, estimulando atividades fagocíticas, citotóxicas e antimicrobianas, demonstrando que são importantes imunomoduladores com efeitos na imunidade inata e adaptativa (24,28) e também sobre a produção de citocinas (27). Esta atividade imunomoduladora é mediada através da resposta imune Th1, células NK, NF-kB, monócitos e granulócitos, produção de anticorpos e síntese de óxido nítrico (NO), embora este mecanismo ainda não seja totalmente elucidado (29,30).

**Figura 1.** Atividade do  $\beta$ -glucano sob o sistema imunológico. Fonte: Vetvicka V, et al. *Beta glucan: Supplement or Drug? From Laboratory to Clinical Trials. Molecules*, 2019.



A estimulação *in vitro* em monócitos humanos e células endoteliais humanas, com extrato de *A.blazei*, induziu um aumento dose dependente na produção de citocinas Interleucina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  em culturas de monócitos e células endoteliais, enquanto não houve alteração para IL-10 (30). Experimentos *ex vivos* demonstraram a capacidade dos extratos de *A. blazei* de aumentar os níveis de citocinas (pró-inflamatória e anti-inflamatória, interferon), assim como fatores de crescimento de leucócitos. Já *in vivo*, demonstrou uma capacidade de redução nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interleucina-2 (IL-2) e Interleucina-17 (IL-17) (16).

Entretanto, pode-se observar uma diferença no efeito do *A.blazei* sobre a produção de citocinas entre os estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Desta maneira um estudo, que teve como objetivo verificar o efeito do extrato de *A.blazei* na liberação de citocinas, quimionas e fator de crescimento de leucócitos no sangue humano, tanto *ex vivo* e *in vivo*, apresentou diferentes resultados na liberação de citocinas entre as análises. Na análise do sangue estimuladas com *A.blazei ex vivo*, de voluntários considerados saudáveis, houve um aumento nas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$

(0,1 e 0,5% concentração *A.blazei*) e IL-6 (concentração de 0,5%), e também da citocina anti-inflamatória IL-10 (concentração de 0,1%). Diferentemente, quando analisado o efeito da ingestão em humanos saudáveis por 12 dias de uma quantidade diária de 60 ml de suplemento à base de *A.blazei*, no qual houve uma redução nas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (84%), IL-1 $\beta$  (97%), IL-2 (46%) e IL-6 (não informado %) 12 dias após o consumo do suplemento (31).

Ainda no mesmo estudo, eles aumentaram a dose do suplemento *A.blazei* para 360 ml/dia por um período de apenas 2 dias. Somente a IL-8 apresentou um aumento significativo no dia 1, retornando aos valores basais no dia 2. Enquanto para a IL-6 e interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), houve somente uma tendência de diminuição sem significância, sendo sugerido pelos autores ser decorrente de uma grande variação entre os indivíduos. Quando examinaram após somente os indivíduos que apresentavam inicialmente valores mais elevados, houve uma redução significativa destas citocinas após o dia 2 (31). Isto sugere que valores iniciais mais elevados destas citocinas, como observado durante inflamação, são mais propensos ao declínio dos valores após o uso de *A.blazei*, assim como sugere uma resposta dose dependente do *A.blazei* (31).

Entretanto, alguns estudos em humanos não obtiveram resultados significativos na redução de citocinas, como por exemplo pacientes com Doença de Chron e Colite Ulcerativa, que consumiram extrato do cogumelo (18). Enquanto pacientes com câncer de ovário, que receberam suplementação de *A. blazei* além da quimioterapia, apresentaram maior atividade de células NK (32). E cultura de monócitos humanos, incubadas com um suplemento composto por *A. blazei*, aumentou a produção de citocinas e quimiocinas (32,33).

Até o momento ainda não existem estudos que verifiquem qual o papel da suplementação aguda de *A.blazei* e, a avaliação de marcadores inflamatórios decorrente da resposta inflamatória gerada após o dano muscular em exercícios de força excêntrica.

## **1.2 Exercício de força excêntrica e a resposta inflamatória**

O exercício físico pode ser conduzido por diferentes protocolos, sendo um deles exercícios de força (5). Exercício de força tem sido considerado adequado para

combater dislipidemias, obesidade, doenças cardiorrespiratórias e diabetes, induzido efeitos específicos na resistência à insulina e perfil lipídico sanguíneo, juntamente com efeitos positivos sobre a função muscular (3). O exercício de força também pode ter como objetivo a obtenção da hipertrofia muscular que é provocada principalmente pela tensão gerada na musculatura (7). A hipertrofia do músculo esquelético pode ser definida como um aumento de proteínas miofibrilares, provocando um aumento no número de sarcômeros em paralelo de miofibrilas existentes ou recém-sintetizadas (34).

O Protocolo de exercício de força pode ser realizado através de uma contração concêntrica, excêntrica e isométrica, e ele permite maior controle das ações musculares (5). As contrações excêntricas são realizadas durante diversas atividades cotidianas ou exercícios físicos, quando o músculo esquelético se contrai excentricamente para suportar o peso do corpo contra a gravidade e para absorver o choque (3). A contração muscular excêntrica ocorre quando uma força aplicada ao músculo excede uma força momentânea produzida pelo próprio músculo, resultando durante a contração um alongamento forçado do músculo esquelético, desta maneira o músculo absorve a energia aplicada por uma carga externa, ao contrário da contração concêntrica, quando ocorre um encurtamento das fibras musculares (3,6).

O exercício excêntrico pode ser realizado em diversos equipamentos de treinamento resistido, como por exemplo pelo levantamento com os dois membros de uma carga maior do que 1RM unilateral e após, durante a fase excêntrica, com apenas um dos membros, ou seja exercício unilateral, entre outros (4).

Alguns estudos relatam que a contração excêntrica realizada cronicamente, promove maior ganho de força (4), massa muscular, se comparada à contração concêntrica (35). A prática regular do exercício de contração excêntrica possui respostas adaptativas perante situações de estresse, favorecendo uma melhor defesa orgânica antioxidante, impactando no sistema imune adaptativo. Esse apresenta memória ao responder ao antígeno de maneira específica, sendo composto por linfócitos T e B, fatores humorais e imunoglobulinas (36).

Durante as ações excêntricas e concêntricas, distintas vias moleculares musculares são ativadas, fato observado em humanos e ratos. Sendo que o exercício excêntrico, desencadeia uma ativação progressiva de genes responsáveis pelo

crescimento e desenvolvimento celular, envolvidos no processo de hipertrofia das células musculares. Comparada às ações isométricas ou concêntricas, os níveis de expressão destes genes são maiores, possivelmente devido ao estresse mecânico diferenciado nas contrações excêntricas (35).

O estresse mecânico nas estruturas musculares devido a força elevada combinada ao recrutamento reduzido de fibras durante as contrações excêntricas, causa micro lesões temporárias nas fibras musculares e rompimento do sarcolema, o qual denomina-se dano muscular. Este dano muscular induzido pelo exercício excêntrico desencadeia uma cascata de eventos, como a resposta inflamatória local/sistêmica e uma mudança na homeostase redox. Esta resposta é essencial e necessária para o mecanismo de regeneração e reparo do tecido muscular esquelético, sendo considerada responsável pela remoção de detritos da área lesionada e após promotora da regeneração tecidual (5,6). A magnitude desta inflamação local ou sistêmica, será de acordo com a intensidade do exercício e quantidade de músculo recrutado (5,7), e ela precisa ocorrer de maneira coordenada e dinâmica, retornando à homeostase posteriormente (37).

O dano muscular pode ser dividido em duas fases distintas: dano inicial, relacionado ao estresse mecânico da contração muscular excêntrica; dano secundário, relacionado aos eventos posteriores de origem metabólica, como perda da homeostase do cálcio intracelular, estresse oxidativo e inflamação (6).

Durante a contração excêntrica, a tensão mecânica causa o alongamento excessivo dos sarcômeros (37), ocasionando a ruptura da matriz extracelular e da lâmina basal do sarcolema (5). Este dano ocasionado nas fibras musculares, são associados diretamente na diminuição da produção de força muscular (4,37). Este evento também é acompanhado da dilatação do retículo sarcoplasmico, ocasionando a liberação e reabsorção mais lentas do cálcio, sendo estas alterações transitórias e também relacionadas com a diminuição de força muscular (4). Este dano ao retículo sarcoplasmático, permite um influxo maior de cálcio para fibras musculares, o que levará a ativação de enzimas proteolíticas (protease lisossomal), que degradam estruturas dentro das fibras musculares (4), resultando em perda prolongada da força muscular (37) e aumentando o dano, conseqüentemente o edema, inflamação e dor muscular (4).

Alguns autores argumentam que estes danos adicionais e, também o retardo na recuperação da força muscular, podem ser decorrentes dos produtos metabólicos, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (RNs), produzidos por fagócitos ativados durante o processo de remoção de tecido fragmentado, atingindo ocasionalmente estruturas intactas (6).

O dano muscular decorrente do exercício excêntrico, também pode prejudicar a capacidade de geração de força através da posição do músculo em uma posição de menor comprimento, e através da distribuição não uniforme do comprimento do sarcômero. Alguns sarcômeros rapidamente se alongam e se estendem demais, resultando em sobreposição insuficiente de miofilamentos, e após o relaxamento não são reintegrados adequadamente. Isso resulta em uma adaptação dos sarcômeros que ainda funcionam em um comprimento menor, levando a mudanças na curva de comprimento-tensão do músculo na direção de comprimentos musculares maiores (4).

A diminuição na capacidade de força parece ser a consequência funcional mais imediata ao dano muscular. Reconhecida como marcador indireto confiável e válido para verificar o dano muscular, sendo restaurada gradativamente dentro de dois dias (35,37), podendo permanecer deprimida por dias ou até mesmo semanas, de acordo com o grau do dano muscular (6). Em situações em que ocorre uma diminuição de até 50% na capacidade de geração de força imediata após o exercício comparada aos valores pré exercícios, essa pode levar até sete dias para retornar aos valores iniciais. Assim sugere-se uma associação entre o tempo necessário para restaurar a força muscular, e a intensidade da perda de força muscular (37).

A secreção e/ou liberação passiva de proteínas em decorrência das modificações na permeabilidade da membrana devido o dano muscular, está envolvida no recrutamento de células inflamatórias circulantes, caracterizando o estágio inicial inflamatório através da fagocitose, liberando enzimas proteolíticas e EROs (6). A lesão muscular é acompanhada por uma invasão de macrófagos e outras células fagocíticas, ocasionando a liberação de EROs (38), através da respiração durante a fagocitose (39). Consequentemente, a geração de EROs é capaz de ativar o NF-kB, levando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (40).

Imediatamente após o exercício excêntrico intenso tem sido observado o acúmulo precoce de leucócitos, principalmente neutrófilos, em micro vasos

sanguíneos do músculo lesionado. Sendo os neutrófilos infiltrados no músculo e na área lesionada 1 a 24 horas após o exercício excêntrico (35,37), associado a ação das catecolaminas (36) e, contribuindo para degradação do tecido muscular lesionado através da produção de EROs (41,42). Exames histológicos demonstram um acúmulo no espaço extracelular dentro do músculo em até 24 horas após o exercício para os neutrófilos (37). De acordo com Hody et al (2019), o acúmulo de leucócitos pode estar relacionado às alterações na capacidade de geração de força (35). Após o exercício também ocorre uma rápida redução de 30 a 50% na contagem dos linfócitos sanguíneos comparado ao pré-exercício, e uma diminuição no número dos eosinófilos (36).

A infiltração de leucócitos no tecido muscular, os desequilíbrios eletrolíticos e ação de EROs, estão supostamente associados a DOMS (6,43). O acúmulo de células inflamatórias no local lesionado aumenta concomitante os níveis de bradicinina, leucotrienos e prostaglandinas. A bradicinina pode ativar a fosfolipase, aumentando a concentração de cálcio na membrana celular, abrindo canais iônicos, levando a secreção de neurotransmissores e estimulação de ácido araquidônico, que por sua vez causa o aumento nos níveis de prostaglandinas e leucotrienos, potenciais substratos para DOMS por interação direta com fibras aferentes através de receptores de dor. Os leucotrienos aumentam a permeabilidade muscular, resultando na adesão de neutrófilos à lesão, que proporcionam maior fagocitose e maior produção de EROs, induzindo possivelmente à maiores danos à membrana celular. Outra via de percepção da dor pode ser através do inchaço muscular durante a inflamação, que aumenta a produção dos exsudatos, resultando em um aumento na pressão intramuscular e sensibilidade das fibras aferentes. Quando estes estímulos atingem a medula e o córtex cerebral através da medula espinhal, percebe-se a dor muscular (22).

A resposta inflamatória que segue o dano muscular ocasiona o acúmulo de líquido no local lesionado, levando ao inchaço muscular, que é associado à rigidez devido ao aumento na concentração de cálcio plasmático, como resultado dos danos na membrana e/ou liberação de cálcio ativado após o dano muscular (6). O inchaço e a rigidez muscular são associados a DOMS, e essa é associada a diminuição na capacidade de força, e amplitude de movimento reduzida nas articulações subjacentes. A DOMS normalmente tem seu início entre 6 e 12 horas após o dano

muscular induzido pelo exercício, e aumenta progressivamente atingindo um nível máximo de dor entre 48 e 72 horas após o dano muscular. Posteriormente os sintomas são diminuídos até desaparecerem entre 7 e 10 dias após o dano muscular (43).

Embora estes déficits funcionais, associados ao dano muscular desapareçam espontaneamente após alguns dias, eles podem atrapalhar no programa de treinamento. Assim como durante ou logo após o episódio de DOMS, pode-se aumentar o risco de lesões adicionais, visto que a DOMS desaparece antes da recuperação total da função muscular (35). Portanto a promoção da recuperação do dano muscular pode proporcionar a melhora da DOMS, recuperação da capacidade de força muscular e níveis de desempenho (43).

Após o exercício excêntrico intenso também ocorre uma monocitose transitória, sendo após os macrófagos recrutados para o sítio inflamatório (36), podendo permanecer no espaço extracelular dentro do músculo entre 48 horas a 7 dias (37). Eles participam da miogênese e contribuem no remodelamento da matriz extracelular, além de suas funções imunológicas (35). Inicialmente macrófagos M1 são responsáveis pela remoção de detritos celulares através da produção de níveis citotóxicos de Óxido Nítrico (NO), e também pela secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) (35). Posteriormente a mudança para macrófagos M2 que produzem citocinas anti-inflamatórias e moléculas de sinalização (35), sendo assim responsável pela ativação das células satélites, juntamente com os neutrófilos, com a finalidade de regenerar as fibras musculares (44).

O influxo dos neutrófilos e macrófagos M1 dentro das fibras lesionadas dependem diretamente da magnitude do dano celular, podendo levar a uma exacerbação das alterações celulares, sendo necessário uma interação entre eles para regulação da resposta pró-inflamatória (35). Esta interação foi observada em camundongos, nos quais os neutrófilos contribuíram na lesão celular e prejudicaram o remodelamento muscular após lesão induzida. Entretanto, a capacidade de fagocitose e citotoxicidade dos neutrófilos foram reduzidas quando esses foram cultivados juntamente com macrófagos, o que sugere uma interação entre eles durante o estágio pró-inflamatório após a lesão muscular. A presença dos neutrófilos e macrófagos são importantes para a remoção dos detritos celulares por fagocitose e produção de EROs, no entanto uma produção excessiva de EROs pode agravar os danos musculares (37).

Os macrófagos M1 também estimulam a proliferação de células satélites e secretam citocinas pró-inflamatórias (por exemplo TNF- $\alpha$ , IL-6) (37), já os macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias e moléculas de sinalização envolvidas na recuperação e regeneração muscular. Desta maneira, a substituição dos macrófagos M1 para M2 é um processo fundamental e necessário, sendo a transição do processo pró-inflamatório para anti-inflamatório. Entretanto, o exercício excêntrico intenso é capaz de ocasionar uma alteração nesta resposta adaptativa mediada por sinalização celular, podendo causar danos secundários ao tecido muscular, uma vez que a inflamação e a resposta imune podem ser mediadas pelas ações de citocinas pró e anti-inflamatórias (35).

### **1.3 Funções e variações das citocinas após o exercício excêntrico**

As citocinas são mediadores inflamatórios produzidas por macrófagos, linfócitos, células endoteliais, musculares, fibroblastos, adipócitos e, estimuladas por agentes patológicos e/ou fisiológicos. São fundamentais na resposta inflamatória diante infecções, lesões e estímulos fisiológicos agressivos, no entanto uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode ocasionar instabilidades hemodinâmicas ou distúrbios metabólicos (7). São denominadas glicoproteínas de baixa massa molecular capazes de agir em pequenas concentrações de maneiras distintas: autócrina, agindo na própria célula que secretou; parácrina, com efeitos em células distintas no mesmo tecido ou tecidos adjacentes e; endócrina, ocasionando efeito sistêmico assim como hormônios em tecidos adjacentes. Concomitante, as citocinas podem estimular a ativação ou inibição de demais citocinas (34).

Embora ainda não seja relatada de maneira precisa, qual a fonte para síntese de citocinas plasmáticas durante e após o exercício (35), sabe-se que a contração muscular é capaz de liberar citocinas (miocinas), sendo que elas desempenham um papel de adaptação no metabolismo muscular, exercendo funções semelhantes à hormonais, com efeitos endócrinos ou parácrinos (45,46,47).

A contração muscular esquelética pode estimular a síntese de IL-6, e o aumento simultâneo nas concentrações musculares de seu RNA mensageiro (mRNA IL-6) após 30 minutos de exercício, decorrente do aumento de sua expressão na célula (34,45). Este aumento da IL-6 é seguido pelo aparecimento de inibidores de citocina, o antagonista IL-1 (IL-1ra), receptores do TNF-R e citocina anti-inflamatória IL-10,

embora o aumento nas concentrações sistêmicas destas seja mais moderado se comparado a IL-6 (48).

A IL-6 é a primeira miocina a ser produzida e secretada pelo músculo, atingindo concentrações plasmáticas até 100 vezes maiores que concentrações anteriores ao exercício imediatamente após o exercício, seguida por uma rápida diminuição para valores próximos aos níveis pré-exercício (45). Sua principal função neste momento compreende o metabolismo da glicose e aumento o da sensibilidade da insulina, afim de estimular a gliconeogênese e o processo da lipólise (34). Estas funções, somadas a inibição do TNF- $\alpha$ , estímulo da produção de outras proteínas de fase aguda com perfil anti-inflamatório, além de outras citocinas anti-inflamatórias tais como o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) e IL-10, confere um efeito anti-inflamatório do exercício moderado (49). Diferentemente da síntese de IL-6 sinalizada através dos macrófagos, provavelmente dependente da ativação do NFkB, a expressão da IL-6 intramuscular é regulada por uma rede de sinalização em cascata sem ativação das vias pró-inflamatórias clássicas, demonstrando que sua capacidade de ação anti-inflamatória pode ser relacionada ao local de síntese (45).

Alguns achados sugerem que após exercício excêntrico intenso ocorre uma diferença no pico da concentração de IL-6 circulante, devido diferentes fontes e funções da expressão de IL-6 (42), sendo que ainda não existe um consenso de qual seria o período de pico nas concentrações de IL-6 após o exercício excêntrico. Estudo com estimulação excêntrica em ratos demonstrou um aumento na expressão de IL-6 muscular nas primeiras 24 horas após a contração excêntrica, sendo que os níveis retornaram após 3 dias (10). Outro estudo com ratos também apresentou um aumento na expressão muscular do mRNA de IL-6 após 12 horas do exercício excêntrico, permanecendo elevado por até duas semanas, entretanto as concentrações séricas não apresentaram alterações (50). Já em 8 mulheres que realizaram ações excêntricas através da corrida em declive, a IL-6 plasmática apresentou um aumento imediatamente após o exercício (11). Outro estudo com homens e mulheres demonstrou aumento (642,5%) nas concentrações plasmáticas de IL-6 após 24 horas do exercício excêntrico, sendo que nas 48 horas após a mesma apresentou um declínio nas concentrações (51). A quantidade do músculo recrutado tem um efeito principal na concentração sistêmica da IL-6 de acordo com Pedersen et. al. (2002), sendo que exercícios que recrutam uma quantidade menor de grupos musculares,

ocasionam uma elevação da IL-6 plasmática tardia se comparados com exercícios que resultam no recrutamento de um número maior de unidades motoras (48).

Enquanto fibras musculares, tecido conjuntivo e tecido adiposo expressam e liberam IL-6 na circulação sem ativar vias pró-inflamatórias, o exercício excêntrico possui propriedades inflamatórias através da expressão local de IL-6 no músculo esquelético, devido ao rompimento mecânico do sarcolema e abertura de canais ativadas por estiramento após a lesão muscular (42). A ruptura da membrana celular do músculo durante a lesão muscular leva ao aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, induzindo a expressão da citocina IL-6 pró-inflamatória através da sua síntese por macrófagos no local da lesão muscular durante o mecanismo de reparo muscular (10,48). A IL-6 promove o recrutamento e ativação de células inflamatórias, responsáveis pela produção de substâncias citotóxicas, incluindo EROs, o que pode aumentar o dano muscular secundário (10).

No entanto a IL-6 participa do processo de regeneração muscular, sendo considerada uma molécula de sinalização, regulando a proliferação e diferenciação de mioblastos (42), e controlando a migração de macrófagos, por isso é interessante suprimir seus efeitos pró-inflamatórios sem inibir sua atividade regenerativa (10).

Assim como a IL-6, existem relatos que os níveis plasmáticos da Interleucina-8 (IL-8) também são aumentados após concentração muscular excêntrica, enquanto após ações concêntricas não foi observada alteração na sua concentração (3). A IL-8 é produzida principalmente por monócitos, linfócitos e macrófagos, sendo sua função atrair e migrar outras células, como neutrófilos e leucócitos para o local, favorecendo o influxo de substâncias para dentro da célula estimulando a angiogênese (34). Entretanto, sua função no músculo ainda não é bem definida, uma vez que uma pequena e transitória alteração de suas concentrações no músculo indica apenas uma possível função local, exercendo efeitos endócrinos ou parácrinos. Já seu aumento em concentrações sistêmicas durante exercícios excêntricos, são prováveis de uma resposta inflamatória (46).

A Interleucina-10 (IL-10) tem uma maior expressão algumas horas após o exercício excêntrico, afirmando sua atividade nas células lesadas decorrente da atividade muscular (49). Sendo demonstrado um aumento na IL-10 em estudos que verificaram a resposta das citocinas ao exercício excêntrico, enquanto no exercício

concêntrico não foi verificado (35). Produzida principalmente pelos macrófagos, possui atividade anti-inflamatória devido sua função em diminuir a inflamação local e restaurar o tecido lesionado. Sua expressão suprime a atividade dos macrófagos e a síntese de demais citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (49,52).

Após uma sessão de exercício de força, a Interleucina-15 (IL-15), também é expressa no músculo esquelético humano. Seus níveis de mRNA de IL-15 são regulados positivamente no músculo esquelético (5,45). Imediatamente após exercícios excêntricos a IL-15 aumentou de  $1,43 \pm 0,17$  para  $1,62 \pm 0,28$  pg/mL em indivíduos não atletas, enquanto em atletas aumentou de  $1,72 \pm 0,4$  para  $2,46 \pm 1,3$  pg/mL (53). Estudos sugerem sua ação anabólica no músculo, após culturas miogênicas esqueléticas humanas demonstrarem um aumento da proteína miosina em células musculares diferenciadas, estimulando a diferenciação miogênica independentes de fatores de crescimento (46). Além da função anabolizante, sugere-se que a IL-15 tenha uma associação negativa entre suas concentrações plasmáticas e a gordura visceral, desempenhando desta maneira função na diminuição do tecido adiposo (46).

A concentração de Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) habitualmente não sofre alteração ou somente é levemente aumentada após uma sessão de força (44,54). Já a expressão local de TNF- $\alpha$  e mRNA TNF- $\alpha$  no músculo esquelético é elevada após o exercício excêntrico (55). Isto corrobora com Zuo et. al. (2019), que verificaram em ratos o aumento da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  imediatamente após o exercício excêntrico, sendo que estas permaneceram aumentadas nas 2 semanas após o exercício excêntrico, enquanto as concentrações séricas não foram alteradas (50).

Este aumento na expressão mRNA TNF- $\alpha$  e proteica no músculo após 24 horas da lesão, inicialmente é através da sua síntese por macrófagos, responsáveis pela remoção e remodelamento do tecido lesionado (44,55). Após, sua síntese pode ser aumentada decorrente do aumento de citocinas pró-inflamatórias e do próprio TNF- $\alpha$ , estimulados pela sinalização do NF- $\kappa$ B, devido ao aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante a respiração de macrófagos, gerando um ciclo no aumento desta citocina (55), podendo sua expressão local permanecer aumentada por 14 dias (44). Liao et al. (2010), demonstraram em seu trabalho um aumento na expressão local mRNA TNF- $\alpha$  após 2 horas do exercício excêntrico, sendo

progressivo seu aumento nas 6 e 24 horas seguintes. No mesmo estudo, a concentração proteica local foi elevada após 6 e 24 horas do exercício excêntrico, enquanto sua concentração sérica aumentou após 2 horas, chegando a 3 e 4 vezes maior que os níveis de repouso após 6 e 24 horas respectivamente (55), contrariando demais estudos que relatam que a concentração sérica não é aumentada após exercícios excêntricos (44,54).

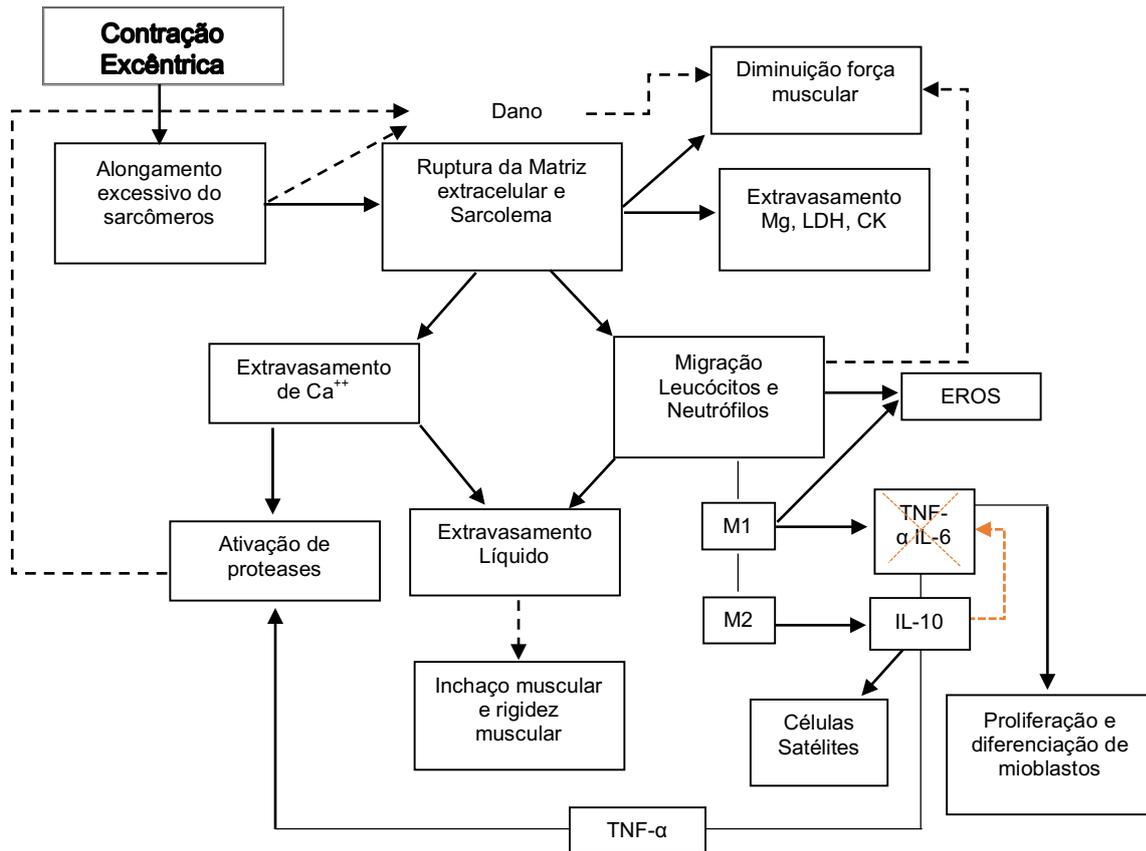
A síntese de TNF- $\alpha$  após o dano muscular através da sinalização de NF- $\kappa$ B ativada por EROs, é associada à regulação positiva das vias catabólicas e a supressão da síntese proteica no músculo esquelético pela estimulação da via ubiquitina-proteassoma, um dos principais mecanismos para degradação proteica celular em células eucarióticas. O TNF- $\alpha$  aumenta a expressão genica das ligases E1-E3, 3 diferentes tipos de enzimas, que ligam os polímeros de ubiquitina aos detritos celulares. Desta maneira as proteínas marcadas pela ubiquitina serão degradadas pelas proteassomas. Ele também pode atenuar a fusão e diferenciação dos mioblastos, prejudicando então a regeneração muscular. Assim, pode-se considerar o TNF- $\alpha$  um importante desencadeador do processo de remodelação muscular após o dano de exercício excêntrico intenso (44,55).

O TNF- $\alpha$  é considerado a principal citocina do grupo das citocinas pró-inflamatórias, induzindo a produção da IL-8 e proteína C reativa (PCR) (52,56) e ação catabólica no tecido muscular (49). Produzido por células NK, fagócitos mononucleares ativos, mastócitos, adipócitos, dentre outras, o TNF- $\alpha$  possui funções na alteração do metabolismo de carboidratos e lipídeos (52), favorecendo um aumento de 40% da lipólise em todo corpo com concomitante aumento na depuração de ácidos graxos de cadeia longa, porém sem alterações em sua captação, liberação ou oxidação no músculo esquelético, regulando negativamente a sinalização de insulina, associando-se a resistência à insulina. Desta maneira o TNF- $\alpha$  possui uma ação direta sobre a inflamação sistêmica de baixo grau (57).

A prática de exercícios moderados e a IL-6 são capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$  induzida por monócitos, além de inibir o aumento dos níveis circulantes da mesma induzido por endotoxina em seres humanos saudáveis (45,57). Entretanto após o exercício excêntrico ocorre a expressão de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, os quais podem sintetizar IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , gerando uma resposta

pró ou anti-inflamatória, que será determinada pelo tipo, intensidade e duração do exercício (44).

Na figura 2 estão descritos os principais mecanismos da inflamação decorrente do exercício excêntrico, sendo que outros componentes participam deste processo.



**Figura 2:** Desenho ilustrativo do processo inflamatório após a contração excêntrica. A contração excêntrica causa um alongamento excessivo dos sarcômeros, que leva ao dano muscular, através da ruptura do sarcolema e da matriz extracelular, e estão associados à diminuição de força muscular. A ruptura do sarcolema e matriz extracelular gera o extravasamento de Mg, LDH, CK e  $\text{Ca}^{2+}$ . O extravasamento de  $\text{Ca}^{2+}$ , estimula os macrófagos que por sua vez levam a síntese de IL-6. O dano muscular na fibra muscular gera uma migração de leucócitos e neutrófilos para o local, e posteriormente macrófagos. Estes são responsáveis pela produção de EROs, que pode estar associada a diminuição de força muscular, e pela síntese de pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), e anti-inflamatórias (IL-10) através dos macrófagos M1 e M2 respectivamente. A IL-10 diminui a síntese das citocinas pró-inflamatórias e leva a ativação das células satélites, enquanto TNF- $\alpha$  e IL-6, estimulam a proliferação e diferenciação de mioblastos. O TNF- $\alpha$  também ativa as proteases, e é associado à diminuição da força muscular. Fonte: Elaborado pela autora.

Em resumo, a resposta local e sistêmica ao processo inflamatório induzido pelo exercício é benéfica e necessária na regeneração e reparo do músculo esquelético, porém este processo precisa ser mantido sob controle para ser eficiente. Fatores como tipo e intensidade do exercício, quantidade de músculo recrutado e tipo de ação (concêntrica ou excêntrica), estão associados a magnitude da inflamação (36).

## **2. Justificativa**

O exercício de força de contração excêntrica promove um dano muscular, o qual ocasiona o rompimento das fibras musculares, a liberação de proteínas intracelulares para o meio extracelular, resultando em uma resposta inflamatória que é natural e necessária para o remodelamento muscular. No entanto, uma resposta inflamatória exacerbada pode induzir uma lesão muscular secundária através da degradação de proteínas intactas, prejudicando o remodelamento muscular e a recuperação do dano muscular. Fatores estes que podem prejudicar a prática do exercício físico regular, já que juntamente ao dano muscular ocorre uma diminuição na capacidade de geração de força, e a dor de início tardio. Atualmente vem crescendo o interesse dos praticantes de musculação por suplementos que melhorem a recuperação após sessão de exercício de força, sendo pesquisado os benefícios de suplementos naturais.

O *A.blazei* demonstra um efeito modulador de marcadores inflamatórios em humanos, sendo que em um estudo piloto com indivíduos submetidos à um teste de força excêntrica, ele demonstrou uma possível melhora na fadiga (17). Entretanto ainda não foi verificado seu efeito sobre marcadores inflamatórios após danos musculares decorrente do exercício excêntrico.

### **2.1 Hipótese**

A suplementação aguda com *A.blazei* pode favorecer a recuperação após o dano muscular ocasionado por exercícios excêntricos através da modulação da resposta inflamatória, devido sua ação imunomoduladora.

### **3. Objetivo Geral**

Avaliar o impacto da suplementação com *Agaricus blazei* nos marcadores inflamatórios após a realização de uma sessão de exercícios excêntricos.

#### **3.1 Objetivo específico**

Observar se possíveis variações dos marcadores inflamatórios ocorreriam ou seriam mantidas 2 horas ou 24 horas após a sessão de exercícios excêntricos.

## 4. Metodologia

### 4.1 Tipo e campo do estudo

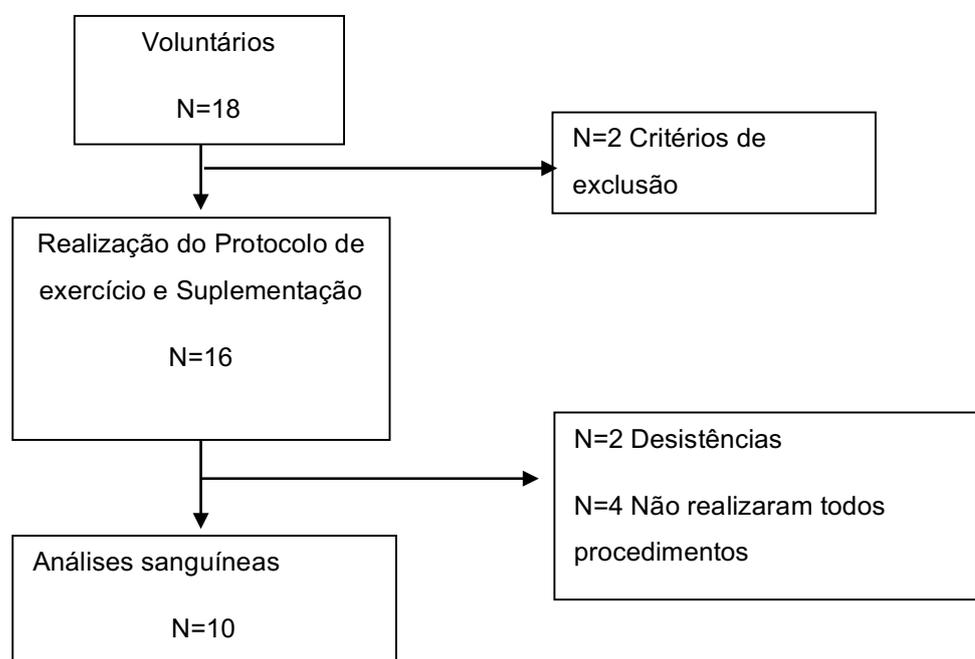
Este é um estudo duplo-cego, controlado por placebo, *crossover*. Os protocolos de exercícios e coletas de material biológico foram realizados no Laboratório de Análise do Movimento e Desempenho humano do complexo esportivo da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-Minas), e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Hermes Pardini e Laboratório de análises da Escola de Medicina na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 4.2 Amostra e aspectos éticos

O cálculo amostral foi realizado pelo cálculo do valor de poder de teste 0,80 (considerado este como o mínimo necessário para garantir uma análise adequada), através da variável Neutrófilos, utilizando o programa GPower 3.1.9.2 – Frans Faul, Universitat Kiel, Germany, o qual sugeriu uma amostra mínima de 34 indivíduos.

Entretanto, não foi possível compor a amostra sugerida, devido limitações do estudo. Portanto a amostra foi de conveniência, composta inicialmente por 18 indivíduos do sexo masculino, saudáveis, com idade entre 18 a 35 anos, praticantes de atividade física (musculação) por um tempo superior a seis meses ininterruptos. Após a realização do protocolo de exercício e análises sanguíneas, a amostra compreendeu 10 indivíduos.

**Figura 3.** Fluxograma da amostra.



Parâmetros de inclusão: Os voluntários deveriam apresentar hábitos alimentares saudáveis, realizar prática de treinamento de força na musculação por um tempo superior de 6 meses ininterruptos. Não utilizar ou descontinuar o uso de suplementos ou complementos alimentares com antecedência de uma semana ao início da realização dos protocolos e durante todo período do estudo.

Parâmetros de exclusão: fazer o uso de anabolizantes ou medicamentos (anti-inflamatórios ou controlados), consumo de bebida alcoólica superior a duas doses por semana, apresentar distúrbios neurológicos, cardiovasculares e respiratórios, assim como relatar dores musculares sem causa aparente.

O presente estudo faz parte de um projeto de pesquisa mais amplo, que objetivou investigar o impacto da suplementação com *A.blazei* na composição corporal, parâmetros de força, flexibilidade e inflamação, após um protocolo de exercício excêntrico intenso. Os resultados na composição corporal, parâmetros de força e flexibilidade já foram previamente apresentados em outra dissertação de uma integrante do grupo, intitulada: “Avaliação dos efeitos da suplementação com o cogumelo *Agaricus blazei* em uma sessão aguda de exercícios de força”. Almeida LM, (2019) (58).

Os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, onde haviam informações sobre o estudo, riscos e desconfortos envolvidos no estudo (Anexo 1), o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais sob o registro 22481113.5.0000.5137.

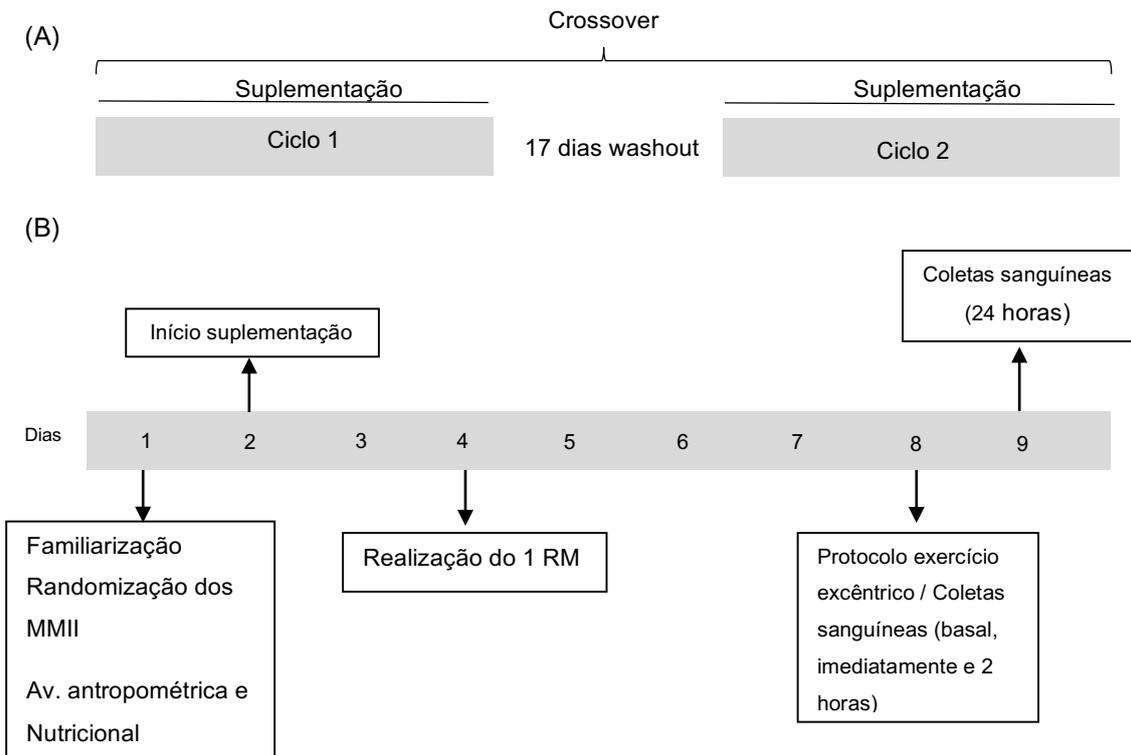
### **4.3 Desenho experimental**

A coleta de dados foi realizada em dois ciclos alternados, compreendendo o ciclo 1 e ciclo 2. Cada indivíduo recebeu a suplementação por 8 dias consecutivos do *Agaricus blazei* ou Placebo (1° ciclo), com um washout de 17 dias, e após novamente a suplementação por 8 dias consecutivos do *Agaricus blazei* ou Placebo (2° ciclo). A suplementação foi realizada por capsulas, contendo cada uma 500 mg de *Agaricus blazei*, ou Placebo (500 mg de amido), sendo orientada a ingestão de cinco capsulas diariamente, totalizando 2.500 mg/dia. Os indivíduos realizaram no 7° dia de suplementação em cada ciclo um protocolo de exercício excêntrico intenso.

No primeiro dia de coleta de dados, os voluntários assinavam o TCLE, recebiam a orientação que os mesmos deveriam se abster da prática de exercícios físicos durante a realização de cada ciclo. Neste dia era realizada a avaliação antropométrica e randomização dos membros inferiores para execução do protocolo de exercício, orientado o preenchimento do recordatório de 3 dias, enfatizando a manutenção da dieta habitual e orientada a suplementação. O membro inferior foi randomizado no 1º ciclo, sendo após utilizada a outra perna no 2º ciclo, para minimizar qualquer efeito de luta repetido.

Os indivíduos realizavam no segundo dia de estudo o início da suplementação, a familiarização de todos os procedimentos e testes que seriam realizados durante o protocolo de exercício, com objetivo de esclarecer todas as etapas e métodos de realização dos testes e protocolo, afim de evitar a elaboração inadequada dos movimentos durante a execução dos mesmos. Após dois dias realizava-se o teste de 1RM, com a finalidade de verificar qual o peso seria utilizado na execução do protocolo. Na semana seguinte, era realizado o protocolo do exercício e as análises sanguíneas. Todos os procedimentos, foram realizados pelo mesmo avaliador, previamente treinado, com o objetivo de prevenir diferentes medidas entre avaliadores distintos. O protocolo de exercício e coletas sanguíneas, foram realizados no mesmo horário para cada indivíduo, em todos os dias de estudo, em ambos os ciclos.

**Figura 4.** Delineamento do estudo (A) e detalhamento dos procedimentos em cada ciclo (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.4 Teste de 1 RM

O protocolo utilizado foi adaptado de Nicol et al (2015) e Bowtell et al (2011). O indivíduo era posicionado no aparelho de legpress a 90° de flexão de joelho, utilizando o esquadro e as referências anatômicas. Era realizada uma única força concêntrica com velocidade livre, para determinar o maior peso por ele levantado. Era aumentado progressivamente o peso, até o voluntário não conseguir realizar a ação. Para encontrar o valor de 1 RM realizava-se até 6 tentativas em média. O membro contralateral deveria ficar flexionado e posicionado para ao final da força concêntrica apoiar a placa para sua sustentação e após descida (59,60). O valor encontrado na familiarização de 1 RM foi utilizado para realização do protocolo de exercício excêntrico intenso, sendo após este protocolo, utilizado o protocolo acima para realização do teste de força máxima.

#### **4.5 Protocolo de exercício excêntrico intenso.**

Foi utilizado como referência o protocolo de Nicol et al (2015), no qual os indivíduos realizaram 5 séries de 10 repetições a 120% de 1RM, e após mais 2 séries de 10 repetições a 100% de 1RM (59).

No presente estudo os voluntários realizaram 7 séries de 10 repetições cada, a 100% de 1RM, com um intervalo de descanso entre cada sessão de 3 minutos. Diferente do realizado por Nicol et al. (2015), optou-se por realizar todas as séries com a intensidade de 100% de 1RM, pois em um estudo piloto os voluntários não foram capazes de realizar as séries adequadamente com a intensidade de 120% de 1RM. O indivíduo era posicionado no aparelho legpress a 90° de flexão de joelho, usando o esquadro e as referências anatômicas: trocanter maior do fêmur (quadril), epicôndilo lateral do fêmur (joelho) e maléolo lateral da fíbula (tornozelo). Inicialmente o indivíduo deveria apoiar os dois pés no aparelho para realizar a força concêntrica, enquanto durante a força excêntrica, o indivíduo deveria realizar a força somente com o membro randomizado durante 3 segundos.

#### **4.6 Avaliação Antropométrica**

Foi realizada a avaliação antropométrica dos voluntários afim de caracterizar a amostra. Os participantes foram avaliados no primeiro dia do estudo, por meio da aferição das seguintes medidas:

- Peso atual (Kg);
- Estatura (m);
- Percentual de gordura através da bioimpedância, realizada em jejum de no mínimo 4 horas, incluindo água;
- Índice de Massa Corporal (IMC) ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )

Para aferição de peso, percentual de gordura, IMC, foi utilizada a balança marca Omron, modelo HBF 514C, enquanto para aferição da estatura foi utilizado um estadiômetro de parede.

#### **4.7 Avaliação nutricional**

A avaliação dietética foi realizada nos dois ciclos por meio de um inquérito qualitativo e outro quantitativo. Como inquérito qualitativo foi utilizado o Questionário de Frequência Alimentar validado (61), considerando o período de 30 dias anteriores, adaptado (Anexo 2). O inquérito quantitativo utilizado foi o registro alimentar de 3 dias preenchido pelo próprio participante após receber as devidas instruções pelo pesquisador, compreendendo dois dias da semana e um dia de final de semana. Os voluntários foram orientados a manter a dieta habitual.

O consumo de macro e micronutrientes, foi calculado através do registro alimentar de 3 dias, utilizando a ferramenta online Dietbox, os dados são apresentados em média e desvio-padrão. Através da avaliação do questionário de frequência alimentar, foi calculado o consumo em gramas dos grupos alimentares.

#### **4.8 Análises marcadores sanguíneos de inflamação**

As coletas foram realizadas a partir de uma veia mediana do antebraço, utilizando técnicas padrão de punção venosa à vácuo em sistema fechado. As coletas seriadas de sangue foram realizadas nos dois ciclos.

##### Hemograma

Coletado 2 ml de amostra de sangue venoso em dois momentos, sendo um antes (basal) e outro 2 horas após protocolo de exercício excêntrico intenso (5, 38).

Foram utilizados tubos com anticoagulante EDTA para coleta sanguínea à vácuo, após as amostras foram armazenadas sob refrigeração (4° a 10°C) até o momento da análise por um período inferior a 24 horas. A análise foi realizada no Laboratório Hermes Pardini, e foram analisados leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos.

##### Citocinas

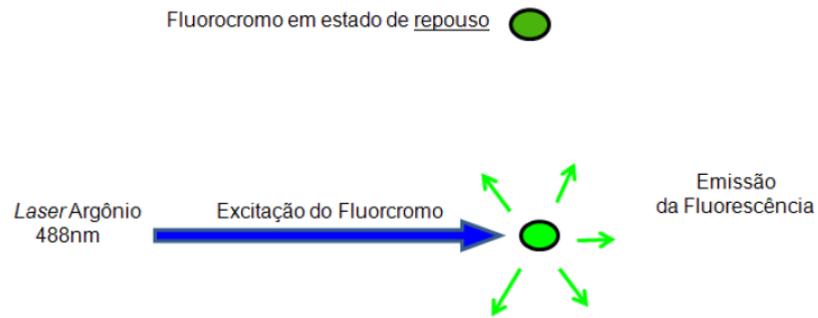
Amostras de sangue venoso foram coletadas para análises de: Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Inteferon (IFN- $\gamma$ ) as amostras sanguíneas foram coletadas antes da realização do protocolo da série de exercício excêntrico intenso (basal), imediatamente após e 24 horas após a realização do protocolo. Estes horários foram

definidos de acordo com algumas referências utilizadas, onde relatos que a IL-6 tem o pico em suas concentrações plasmáticas logo após o exercício excêntrico (45,54), e a expressão de TNF- $\alpha$  por macrófagos, ocorre na fase inicial da resposta inflamatória no período de até 24 horas (44).

Foram utilizados tubos com ativador de coágulos e separador em gel para coleta à vácuo. Após as amostras foram centrifugadas no equipamento Marca Coleman modelo 90-1, a 4000 rotações por minuto (rpm), pelo período de 5 minutos a temperatura ambiente (62). Após o sobrenadante (soro) foi separado, transferido para tubos Ependorf e armazenado sob a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises, o sedimento foi descartado. O kit utilizado para as análises foi BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) - Human Inflammatory Cytokines Kit.

O método de análise utilizado para ambas as análises foi a contagem automatizada através de citometria de fluxo, que permite a avaliação de características químicas e biológicas de vários tipos celulares (humanas, animais, bactérias, entre outros), previamente preparados e marcados, de acordo com a molécula de interesse, utilizando anticorpos monoclonais conjugados (AcMo) a fluorocromos específicos (63). A utilização de AcMo conjugados à fluorocromo ou substâncias fluorescentes, possibilita a emissão de cor, e a identificação de moléculas na superfície ou no interior da célula. Fluorocromo são moléculas fluorescentes, que estão inicialmente em repouso, quando uma determinada fonte luminosa (laser) é emitida, e está possui afinidade por determinado AcMo, que está acoplado ao fluorocromo, ele será excitado e emitirá uma luz de comprimento de onda (cor) característica (Figura 5).

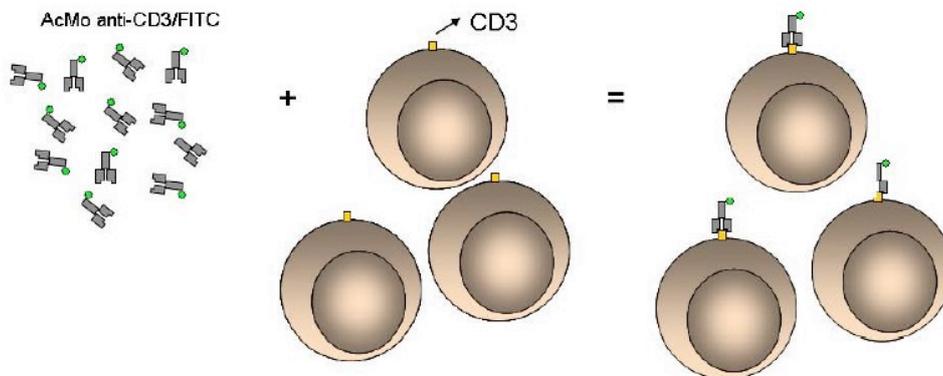
**Figura 5:** Representação do fluorocromo em estado de repouso e emitindo fluorescência após ser excitado pela luz do laser.



Fonte: Cunha CF et. al. Citometria de fluxo: Imunofenotipagem e avaliação da produção de citocinas. MS Fundação Osvado Cruz, 2012.

A estrutura química da célula e sua atividade biologicamente ativa, caracteriza o tipo celular, um evento bioquímico ou uma resposta imunológica, o que irá determinar o acoplamento do fluorocromos aos anticorpos (Figura 6) (63).

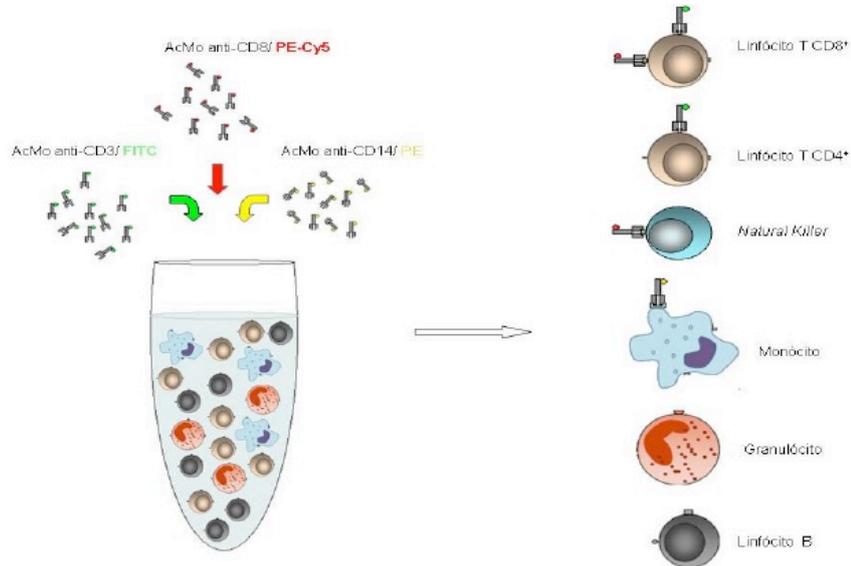
**Figura 6:** Exemplo de esquema representativo da marcação de linfócitos T com AcMo anti-CD3 acoplado com o fluorocromo FITC.



Fonte: Cunha CF et.al. Citometria de fluxo: Imunofenotipagem e avaliação da produção de citocinas. MS Fundação Osvado Cruz, 2012.

Inicialmente, as amostras devem estar em uma suspensão. As células devem ser dissociadas de forma a evitar a formação de grumos na suspensão. Após, é realizada a definição das moléculas celulares de interesse que receberão a marcação, sendo nesta etapa realiza a escolha dos fluorocromos (Figura 7) (63,64).

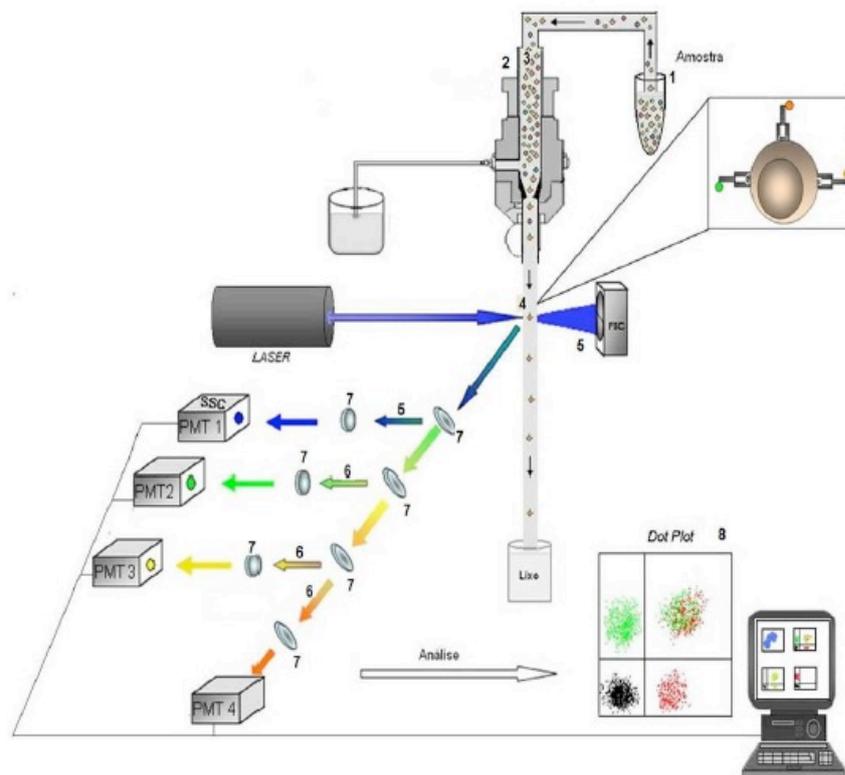
**Figura 7:** Exemplo de esquema representativo da suspensão de células submetidas a marcação com AcMo.



Fonte: Cunha CF et.al. Citometria de fluxo: Imunofenotipagem e avaliação da produção de citocinas. MS Fundação Osvaldo Cruz, 2012.

O tubo contendo a suspensão é acoplado ao citômetro de fluxo, as células são aos poucos aspiradas por um sistema de pressão, e levadas à uma câmara especial. Esta câmara também é banhada por uma solução salina responsável por um fluxo contínuo, que juntamente com o desenho cônico da câmara, proporciona a acomodação das células enfileiradas, deixando as células saírem através de um pequeno orifício individualmente. Assim elas serão marcadas pela radiação laser individualmente, emitindo um comprimento de onda (cor) que é detectado por um sensor capaz de converter a luz captada em sinais eletrônicos. Através de um software é possível a análise para obtenção dos resultados, a qual é realizada através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e das respectivas características morfológicas das células (Figura 8) (63,64).

**Figura 8:** Esquema representativo do funcionamento do citômetro de fluxo. 1) Solução salina; 2) Câmara de fluxo; 3) Solução salina dentro da câmara fluxo; 4) foco hidrodinâmico; 5) Dispersão frontal; 6) Sinal de luz emitido para os filtros de captação de luz e sendo recebido nos fotomultiplicadores; 7) Filtros para captação de luz emitida; 8) Sinais eletrônicos enviados ao computador através de gráfico *dot plot* (gráfico de pontos).



Fonte: Cunha CF et.al. Citometria de fluxo: Imunofenotipagem e avaliação da produção de citocinas. MS Fundação Osvaldo Cruz, 2012.

#### 4.9 Análises estatísticas

Os resultados são apresentados em médias e desvio padrão ( $\pm$ ). Inicialmente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados possuíam distribuição normal, foi utilizado o suplemento Action Star do programa Excel 2016. A avaliação da normalidade das distribuições dos dados amostrais é essencial para uma análise adequada e para utilização do teste estatístico ANOVA, um dos testes utilizado na análise de dados experimentais, o qual pressupõem a distribuição normal dos dados (65).

Após o teste de normalidade, foi realizado o teste ANOVA fator duplo com repetição (Fator 1: Tratamento; Fator 2: Tempo), utilizando o programa SPSS (IBM

SPSS Statistics, versão 22.0), para comparar médias nos diferentes intervalos de tempos entre o *A. blazei* e Placebo no mesmo indivíduo, bem como a análise do poder observado para os fatores principais e interação. Para análises da avaliação nutricional, foi utilizado o teste T pareado utilizando o programa Excel 2016, pois são comparadas apenas duas médias intra-indivíduo (placebo x *A. blazei*). Foi considerada diferença significativa quando valor de  $p < 0,05$ .

Foi realizado a análise de poder de teste para o conjunto de dados através do programa GPower 3.1.9.2 – Frans Faul, Universitat Kiel, Germany.

## 5. Resultados

Foram avaliados 10 voluntários com idade média de  $24 \pm 3,62$  anos com estatura média de  $1,76 \pm 0,06$  metros, peso inicial médio de  $77,36 \pm 10,28$  Kg, índice de massa corporal inicial médio  $24,7 \pm 3,04$  kg/m<sup>2</sup>, percentual de gordura inicial médio  $19,4 \pm 5,31$  %. Na tabela 1 estão descritos os valores individuais, assim como a média e desvio padrão.

**Tabela 1.** Caracterização da amostra. Idade (anos), altura (m), peso inicial (Kg), IMC (Kg), percentual de gordura inicial.

Voluntário	Idade (anos)	Altura (m)	Peso (Kg)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	% Gord.
1	20	1,79	74,9	23,37	18,5
2	30	1,67	60,9	21,83	17,4
3	26	1,65	79,7	29,27	27,1
4	22	1,81	97,9	29,88	27,8
5	24	1,81	82,3	25,12	14,9
6	20	1,75	66,6	21,74	14
7	22	1,82	79,5	24,00	19,3
8	21	1,84	70,9	20,94	11,7
9	29	1,81	85	25,94	21,8
10	26	1,72	75,9	25,65	21,7
Média	24	1,76	77,36	24,77	19,42
DP	3,62	0,06	10,28	3,04	5,31

Fonte: Dados do estudo

O consumo médio de macro e micronutrientes estão descritos na tabela 2, sendo que não houve diferença significativa no consumo médio dos indivíduos entre suplementação *A.blazei* e placebo ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Consumo médio de macro e micronutrientes entre placebo e *A.blazei*  $p>0,05$ . Recomendações de acordo com DRI e FAO/OMS; ND\* Não determinado. Estimativa de energia pela DRI Gasto Energético Total Homens:  $662-(9,53 \times \text{idade}) + \text{P.A} \times (15,91 \times \text{Kg}) + (539,6 \times \text{altura})$ . Utilizado valor 1,11 para P.A (atividade leve) e valores médios apresentados da amostra para variáveis, peso, altura e idade.

	Placebo	<i>A.blazei</i>	Valor de p	Recomendações
Ingestão	2360,35	2330,23	0,88	2544,32 Kcal
Energética (Kcal)	±475,67	±513,79		
Proteína (g)	484,08 ±199,24	653,44 ±227,32	0,49	10-35 %
Carboidrato (g)	1022,68	1027,68	0,96	45-65 %
	±216,02	±292,72		
Gordura total (g)	823,41 ±276,93	735,84 ±264,51	0,46	20-35%
Gordura sat. (g)	28,77 ±9,28	28,47 ±10,27	0,94	ND
Ác. Oleico (g)	26,46 ±10,15	25,67 ±11,73	0,87	ND
Ác. Linoleico (g)	10,05 ±3,76	9,56 ±5,14	0,69	17 g
Ác. Linolênico (g)	1,06 ±0,41	0,98 ±0,40	0,56	1,60 g
Colesterol (mg)	714,94 ±333,37	778,75 ±393,79	0,63	ND
Vitamina C (mg)	63,26 ±4498	76,72 ±30,23	0,36	45 mg
Vitamina E (UI)	5,44 ±4,67	3,79 ±3,38	0,43	10 mg
Vitamina D (mcg)	0,521 ±0,68	0,93 ±1,73	0,30	5 mcg
Vitamina A (mg)	2025,54	1424,01	0,75	600 mg
	±4772,9	±2945,12		
Total de fibras (g)	28,9 ±15,5	23,92 ±10,05	0,24	38 g

Fonte: Dados do estudo

Na tabela a seguir é apresentado o resultado do QFA, sendo analisada quantidade individual ingerida por grupos alimentares para suplementação *A.blazei* e placebo, a qual apresentou um maior consumo de manteiga ( $p=0,04$ ) e menor de hortaliça crua ( $p=0,009$ ) durante a suplementação com o *A.blazei*.

**Tabela 3.** Média do consumo alimentar por grupos alimentares através da análise do QFA. Somente manteiga e hortaliça crua apresentaram diferenças significativas ( $p=0,04$  e  $p=0,009$  respectivamente). Demais grupos alimentares valor de  $p>0,05$ .

Alimentos (gramas)	Placebo	A.blazei	Valor de p
Leites e derivados	329,98 $\pm$ 233,98	293,83 $\pm$ 199,24	0,56
Ovos	184,31 $\pm$ 131,33	221,11 $\pm$ 206,47	0,40
Carne vermelha	194,60 $\pm$ 141,85	149,40 $\pm$ 82,58	0,26
Carne branca	236,45 $\pm$ 134,89	207,08 $\pm$ 139,15	0,38
Embutidos	2,73 $\pm$ 6,70	5,35 $\pm$ 9,48	0,13
Azeite	17,63 $\pm$ 19,94	20,21 $\pm$ 35,43	0,73
Bacon ou toucinho	17,04 $\pm$ 18,17	18,19 $\pm$ 27,03	0,80
Manteiga	3,87 $\pm$ 6,37	8,10 $\pm$ 11,83	0,04*
Fast food	40,14 $\pm$ 29,56	37,14 $\pm$ 39,43	0,59
Enlatados	2,71 $\pm$ 3,65	8,50 $\pm$ 19,96	0,34
Folha crua	17,94 $\pm$ 29,43	21,69 $\pm$ 30,48	0,76
Folha cozida	2,85 $\pm$ 2,57	9,39 $\pm$ 24,96	0,37
Hortaliça crua	50 $\pm$ 16,54	38,86 $\pm$ 29,10	0,009*
Hortaliça cozida	17,9 $\pm$ 22,86	33,47 $\pm$ 50,34	0,56
Tubérculos	350 $\pm$ 147,01	150,60 $\pm$ 108,03	0,86
Frutas	281,61 $\pm$ 270,82	304,87 $\pm$ 159,72	0,43
Sobremesas e doces	31,72 $\pm$ 26,12	27,51 $\pm$ 37,28	0,80

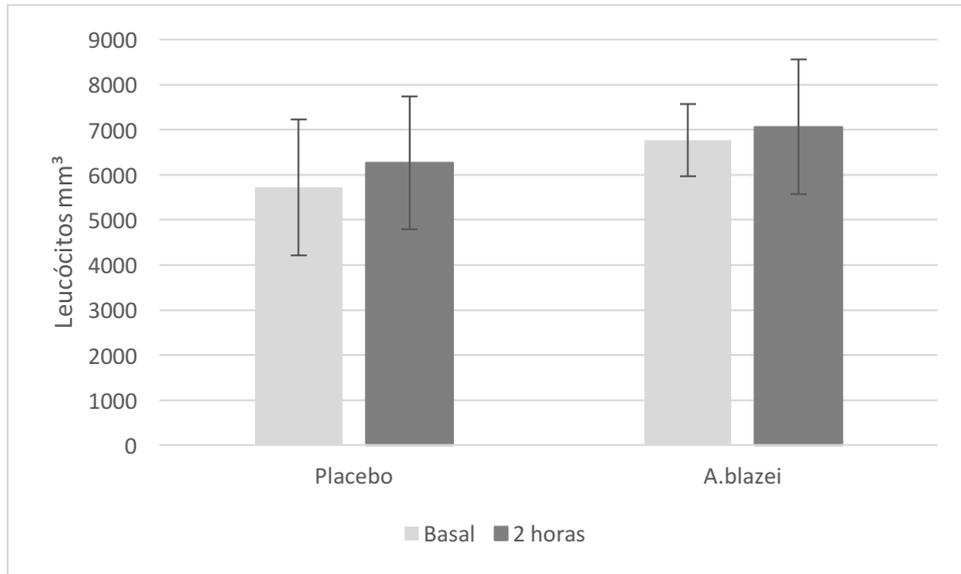
Fonte: Dados do estudo

### 5.1 Análises marcadores sanguíneos de inflamação

Foram realizadas as análises sanguíneas a seguir com objetivo de verificar a resposta inflamatória após o protocolo de exercício excêntrico intenso. Para os marcadores de hemogramas foram considerados apenas 6 voluntários devido à falta de amostras para todos os indivíduos em todos os tempos analisados.

Análise ANOVA para os leucócitos não foi verificado efeito de tempo ( $p=0,376$ ; poder=0,125), efeito de tratamento ( $p=0,247$ ; poder=0,182) ou interação tempo e tratamento ( $p=0,660$ ; poder=0,67). (Gráfico 1).

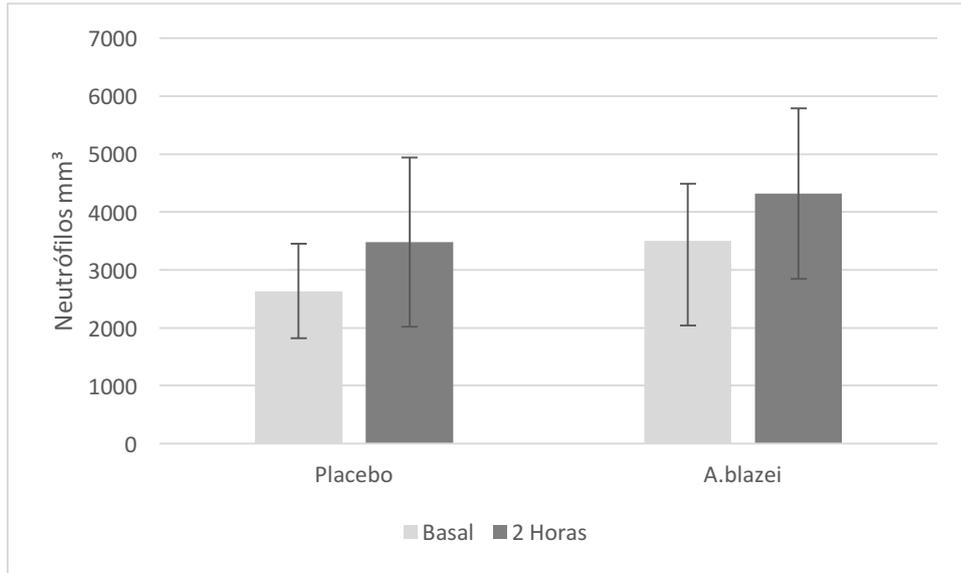
**Gráfico 1:** Concentrações médias de leucócitos entre placebo e *A.blazei*, nos períodos basal e 2 horas (n=6). Placebo basal 5.716,7 ±1.511,8; Placebo 2 horas 6.266,7 ±1.476,5; *A.blazei* basal 6.766,7 ±796,7; *A.blazei* 2 horas 7.066,7 ±1.493,5.



Fonte: Dados do estudo

Análise ANOVA para os neutrófilos não houve efeito de tempo ( $p=0,385$ ; poder=0,122), efeito de tratamento ( $p=0,086$ ; poder=0,408), ou interação tempo e tratamento ( $p=0,943$ ; poder=0,052) (Gráfico 2).

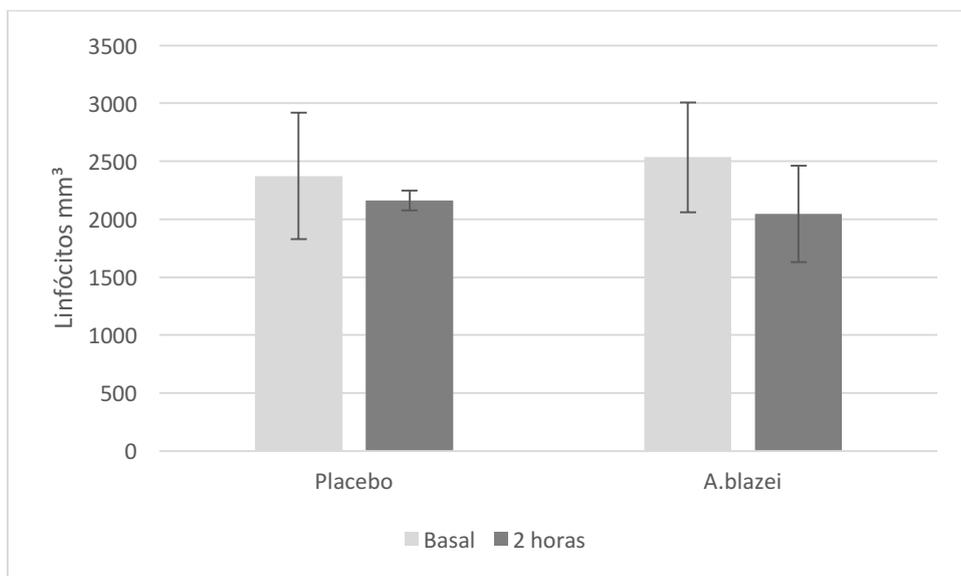
**Gráfico 2:** Concentrações médias de neutrófilos entre placebo e *A.blazei*, nos períodos basal e 2 horas (n=6). Placebo basal 2.633 ±815; Placebo 2 horas 3.481,2 ±1.459,5; *A.blazei* basal 3.501,7 ±981; *A.blazei* 2 horas 4.315 ±1.472,5.



Fonte: Dados do estudo

Em relação à concentração de linfócitos, a análise ANOVA não demonstrou efeito de tempo ( $p=0,909$ ; poder=0,051), efeito de tratamento ( $p=0,127$ ; poder=0,318) ou interação entre os fatores ( $p=0,382$ ; poder=0,123) (Gráfico 3).

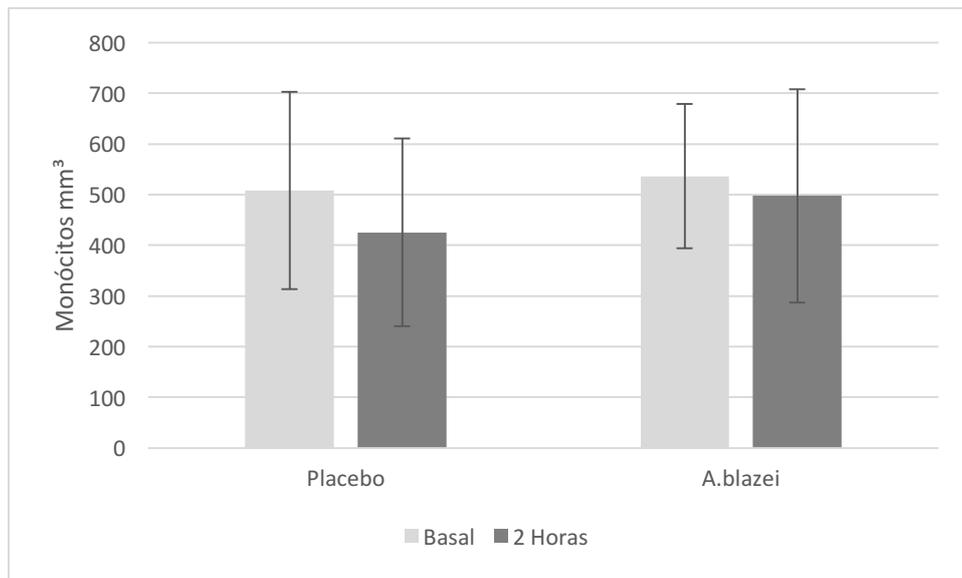
**Gráfico 3:** Concentrações médias de linfócitos entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal e 2 horas ( $n=6$ ). Placebo basal 2.373 ± 545,6; Placebo 2 horas 2.160,5 ± 86,9; *A.blazei* basal 2.535,2 ± 473,7; *A.blazei* 2 horas 2.047,5 ± 415,4.



Fonte: Dados do estudo

Em relação à concentração de monócitos, a análise ANOVA não demonstrou efeito de tempo ( $p=0,233$ ; poder= $0,199$ ), efeito de tratamento ( $p=0,228$ ; poder= $0,202$ ) ou interação entre os fatores ( $p=0,290$ ; poder= $0,162$ ) (Gráfico 4).

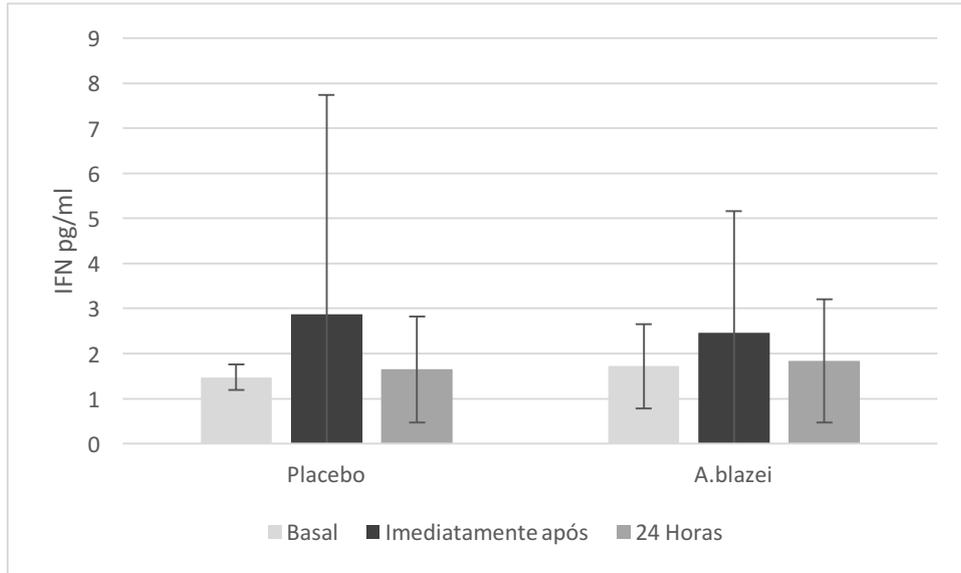
**Gráfico 4:** Concentrações médias de monócitos entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal e 2 horas ( $n=6$ ). Placebo basal  $508,2 \pm 194,9$ ; Placebo 2 horas  $425,2 \pm 185,4$ ; *A.blazei* basal  $536,3 \pm 142$ ; *A.blazei* 2 horas  $497,5 \pm 209,9$ .



Fonte: Dados do estudo

Para a concentração de IFN, a análise ANOVA não identificou efeito significativo de tempo ( $p=0,565$ ; poder= $0,050$ ), efeito de tratamento ( $p=0,977$ ; poder= $0,120$ ) ou interação entre tempo e tratamento ( $p=0,89$ ; poder= $0,056$ ) (Gráfico 5).

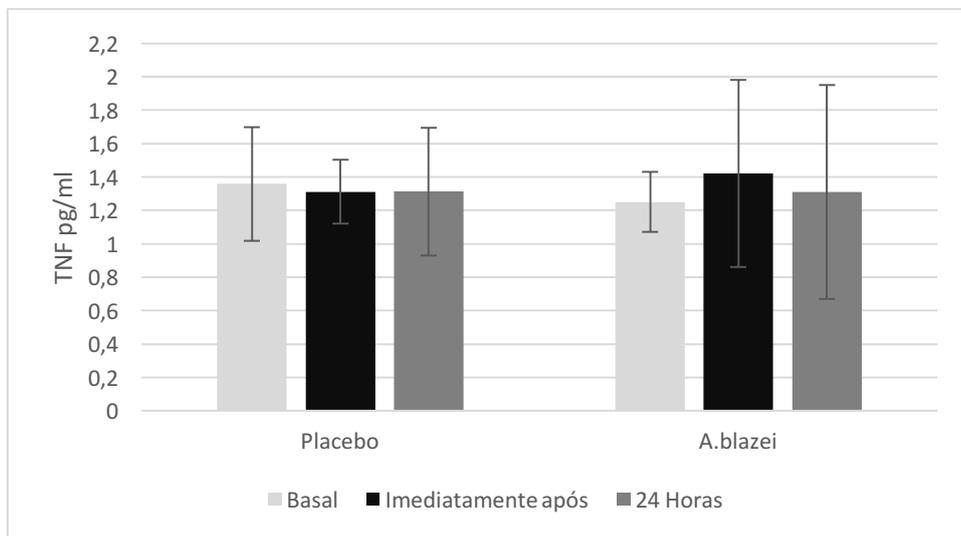
**Gráfico 5:** Concentrações médias de IFN entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal, imediatamente após e 24 horas ( $n=10$ ). Placebo basal  $1,47 \pm 0,28$ ; Placebo imediatamente após  $2,87 \pm 4,87$ ; Placebo 24 horas  $1,64 \pm 1,17$ ; *A.blazei* basal  $1,74 \pm 0,93$ ; *A.blazei* imediatamente após  $2,46 \pm 2,70$ ; *A.blazei* 24 horas  $1,84 \pm 1,37$ .



Fonte: Dados do estudo

Para a concentração de TNF- $\alpha$ , a análise ANOVA não identificou efeito significativo de tempo ( $p=0,785$ ; poder=0,077), efeito de tratamento ( $p=0,974$ ; poder=0,050) ou interação entre tempo e tratamento ( $p=0,490$ ; poder=0,141) (Gráfico 6).

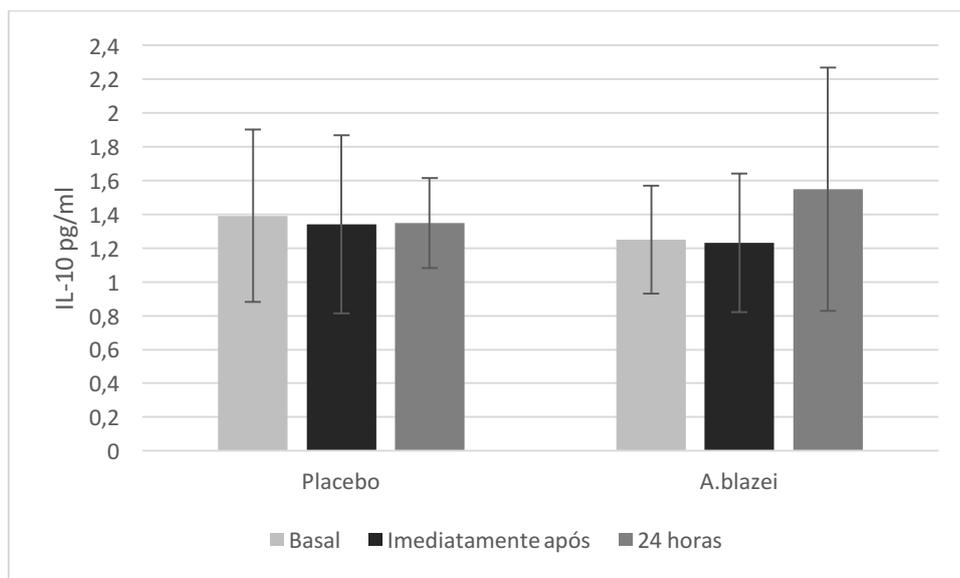
**Gráfico 6:** Concentrações médias de TNF- $\alpha$  entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal, imediatamente após e 24 horas ( $n=10$ ). Placebo basal  $1,35 \pm 0,34$ ; Placebo imediatamente após  $1,31 \pm 0,19$ ; Placebo 24 horas  $1,31 \pm 0,38$ ; *A.blazei* basal  $1,25 \pm 0,18$ ; *A.blazei* imediatamente após  $1,42 \pm 0,56$ ; *A.blazei* 24 horas  $1,31 \pm 0,64$ .



Fonte: Dados do estudo

Para a concentração de IL-10, a análise ANOVA não identificou efeito significativo de tempo ( $p=0,291$ ; poder= $0,226$ ), efeito de tratamento ( $p=0,943$ ; poder= $0,051$ ) ou interação entre tempo e tratamento ( $p=0,555$ ; poder= $0,123$ ) (Gráfico 7).

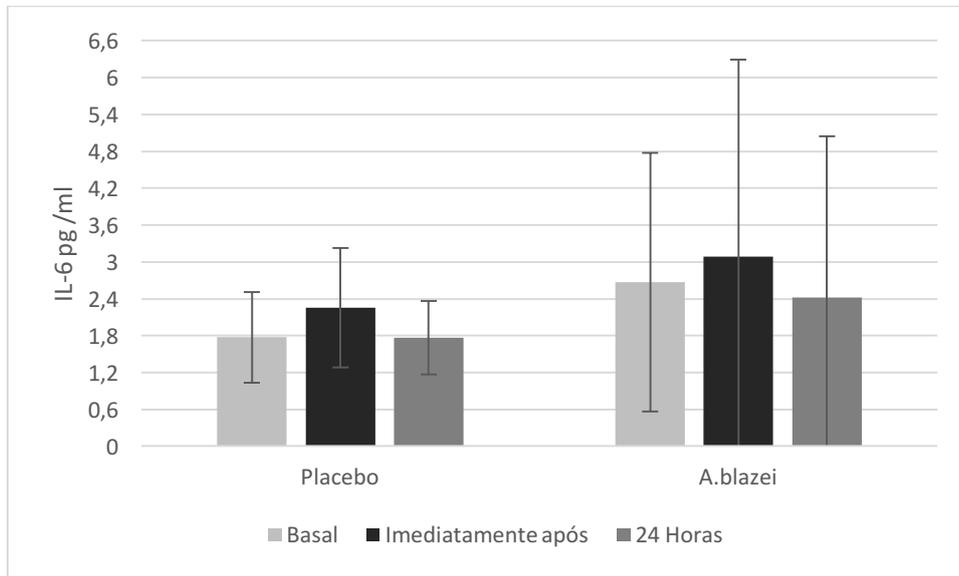
**Gráfico 7:** Concentrações médias de IL-10 entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal, imediatamente após e 24 horas ( $n=10$ ). Placebo basal  $1,39 \pm 0,51$ ; Placebo imediatamente após  $1,34 \pm 0,53$ ; Placebo 24 horas  $1,34 \pm 0,27$ ; *A.blazei* basal  $1,25 \pm 0,32$ ; *A.blazei* imediatamente após  $1,23 \pm 0,41$ ; *A.blazei* 24 horas  $1,55 \pm 0,72$ .



Fonte: Dados do estudo

Para a concentração de IL-6, a análise ANOVA não verificou efeito de tratamento ( $p=0,397$ ; poder= $0,125$ ), efeito de tempo ( $p=0,053$ ; poder= $0,573$ ) ou interação entre tempo e tratamento ( $p=0,857$ ; poder= $0,071$ ) (Gráfico 8).

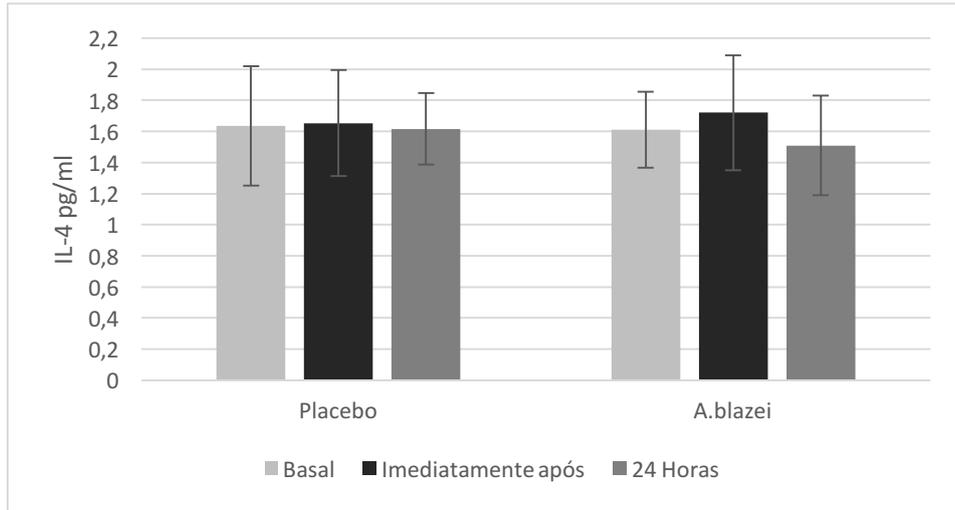
**Gráfico 8:** Concentrações médias de IL-6 entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal, imediatamente após e 24 horas (n=10). Placebo basal  $1,77 \pm 0,73$ ; Placebo imediatamente após  $2,25 \pm 0,97$ ; Placebo 24 horas  $1,76 \pm 0,59$ ; *A.blazei* basal  $2,67 \pm 2,10$ ; *A.blazei* imediatamente após  $3,09 \pm 3,20$ ; *A.blazei* 24 horas  $2,42 \pm 2,63$ .



Fonte: Dados do estudo

Para a concentração de IL-4, a análise ANOVA não identificou efeito significativo de tempo ( $p=0,321$ ; poder=0,231), efeito de tratamento ( $p=0,878$ ; poder=0,052) ou interação entre tempo e tratamento ( $p=0,668$ ; poder=0,107) (Gráfico 9).

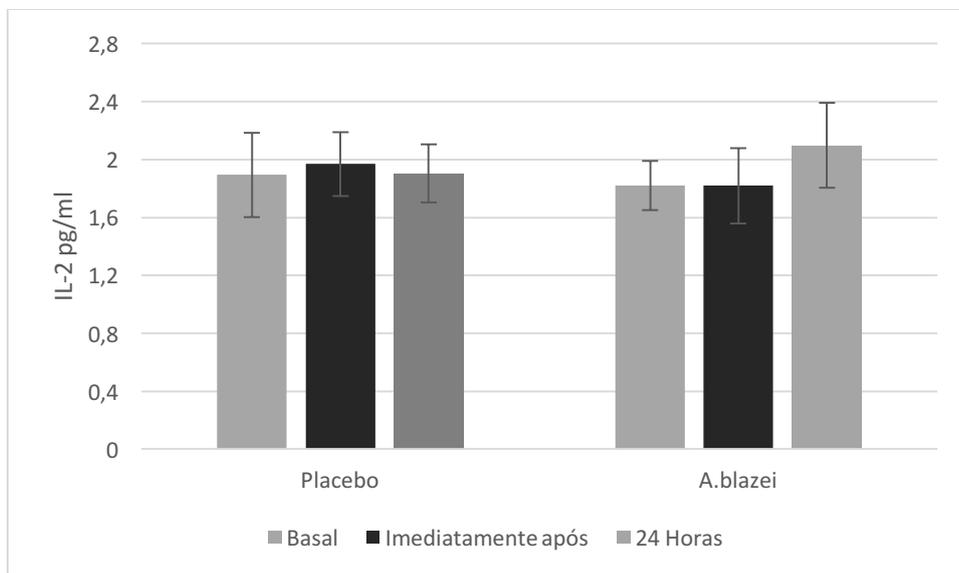
**Gráfico 9:** Concentrações médias de IL-4 entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal, imediatamente após e 24 horas (n=10). Placebo basal  $1,63 \pm 0,39$ ; Placebo imediatamente após  $1,65 \pm 0,34$ ; Placebo 24 horas  $1,61 \pm 0,23$ ; *A.blazei* basal  $1,61 \pm 0,24$ ; *A.blazei* imediatamente após  $1,72 \pm 0,37$ ; *A.blazei* 24 horas  $1,51 \pm 0,32$ .



Fonte: Dados do estudo

Por fim, para a concentração de IL-2, a análise ANOVA não identificou efeito significativo de tempo ( $p=0,158$ ; poder=0,343), efeito de tratamento ( $p=0,960$ ; poder=0,050), ou de interação entre tempo e tratamento ( $p=0,072$ ; poder=0,517) (Gráfico 10).

**Gráfico 10:** Concentrações médias de IL-2 entre Placebo e *A.blazei*, nos períodos basal, imediatamente após e 24 horas ( $n=10$ ). Placebo basal  $1,89 \pm 0,28$ ; Placebo imediatamente após  $1,97 \pm 0,22$ ; Placebo 24 horas  $1,90 \pm 0,20$ ; *A.blazei* basal  $1,82 \pm 0,17$ ; *A.blazei* imediatamente após  $1,82 \pm 0,26$ ; *A.blazei* 24 horas  $2,10 \pm 0,29$ .



Fonte: Dados do estudo

## 6. Discussão

No presente estudo não houve um aumento significativo de neutrófilos e leucócitos após o exercício excêntrico, embora seja relatado que ocorra o aumento destes marcadores imediatamente após e 2 horas após uma única série de exercício (5), sendo que os leucócitos seriam mobilizados na circulação sanguínea para o local da lesão com o objetivo de contribuir na degradação do tecido muscular lesionado, através da liberação de EROs durante a fagocitose, e enzimas proteolíticas (41,42,53). Esta manutenção na concentração sanguínea destes marcadores pode ter sido influenciada devido os indivíduos já serem praticantes de musculação por um período superior de 6 meses. Quando comparado indivíduos praticantes de exercícios físicos (superior a 6 meses) e, indivíduos não praticantes de exercícios físicos, o aumento nas concentrações sanguíneas são diferentes, mesmo diante do mesmo protocolo de exercício. Indivíduos praticantes, apresentaram menores aumentos que os indivíduos não praticantes (leucócitos indivíduos destreinados basal  $6,9 \pm 0,9 \mu\text{l}$ , imediatamente após  $8,7 \pm 2,1 \mu\text{l}$  e após 2 horas  $10,2 \pm 3,9 \mu\text{l}$ ; leucócitos indivíduos treinados basal  $5,2 \pm 1,5 \mu\text{l}$ , imediatamente após  $7,0 \pm 2,3 \mu\text{l}$  e após 2 horas  $6,8 \pm 1,9 \mu\text{l}$ ; neutrófilos indivíduos destreinados basal  $3,9 \pm 1,0 \mu\text{l}$ , imediatamente após  $5,0 \pm 1,8 \mu\text{l}$  e após 2 horas  $8,0 \pm 3,9 \mu\text{l}$ ; neutrófilos indivíduos treinados basal  $2,7 \pm 1,4 \mu\text{l}$ , imediatamente após  $3,5 \pm 2,0 \mu\text{l}$  e após 2 horas  $4,6 \pm 2,0 \mu\text{l}$ ) (5).

A magnitude do dano muscular também pode influenciar no aumento da concentração sanguínea dos marcadores inflamatórios. De acordo com Paulsen et al. (2012), quando o dano muscular é leve a migração dos leucócitos da corrente sanguínea para o local da lesão não costuma ser observada, sendo então os macrófagos locais responsáveis por desempenhar a recuperação muscular (54). Esta associação entre a diminuição na capacidade de geração de força e o aumento dos leucócitos, costumam ser relatadas quando ocorre uma redução maior que 50% na função muscular ou uma recuperação tardia, acima de 7 dias após o dano. Enquanto uma redução menor que 20% ou uma recuperação após 2 dias do dano muscular, apresenta pouca ou nenhuma alteração histológica, embora já tenha sido relatado um acúmulo de leucócitos no tecido nesta condição (43,54).

Quando verificada a redução na capacidade de força dos indivíduos deste estudo, através dos resultados apresentados por Almeida (2019), a redução observada na capacidade de força, não foi superior à 50% (58). Sendo esse um fator

importante à ser considerado nos valores apresentados da concentração sanguínea de leucócitos e neutrófilos após o exercício excêntrico.

Uma vez que a capacidade de redução de força é considerada um bom marcador indireto para o dano muscular, pode-se considerar o resultado apresentado por Almeida (2019) na redução da capacidade de força dos indivíduos que participaram do presente estudo, um marcador indireto do dano muscular. A CK frequentemente utilizada como marcador para avaliação do dano muscular, pode apresentar uma variabilidade acentuada entre indivíduos, mesmo quando o protocolo de exercício excêntrico utilizado tenha sido o mesmo (35). Desta maneira, alguns indivíduos apresentam grandes aumentos da CK, enquanto outros demonstram apenas aumentos moderados (66). Além disso, a comparação dos níveis de CK não parece ser adequada para inferir pequenas diferenças em relação ao grau de lesão muscular (51), assim como é sugerido no presente estudo pela redução na capacidade de força apresentada por Almeida (2019).

Outro marcador confiável de dano muscular são os estudos histológicos, que demonstram um acúmulo de leucócitos no espaço extracelular dentro do músculo entre 24 e 48 horas após o exercício (37). A biópsia é considerada um método de análise confiável, entretanto biópsias repetidas podem provocar um aumento na inflamação muscular, e quando realizadas em uma pequena área muscular, não são consideradas representativas suficientemente (10). Assim, a utilização de marcadores indiretos pode substituir o uso de biópsias, já que esta é considerada um método invasivo (35).

Evidências para o acúmulo de neutrófilos após 24 horas no local da lesão são limitadas, isso pode ser devido ao fato de que os neutrófilos desaparecem rapidamente do músculo em regeneração ou, por dificuldades metodológicas para sua detecção. Já os monócitos ou macrófagos são observados de maneira consistente no músculo em recuperação em um período entre 48 horas e 7 dias (37). Após contrações musculares excêntricas máximas unilaterais dos extensores de joelho, diante da recuperação da força muscular no período de até 2 dias, foi observado o acúmulo de macrófagos no tecido muscular (43).

Após uma única série de exercício excêntrico foi observado o aumento dos monócitos imediatamente após o exercício, retornando aos valores de base após 2

horas do exercício (5). No presente estudo a avaliação da concentração de monócitos foi realizada 2 horas após o exercício, o que pode ter influenciado na avaliação da concentração deste marcador.

A presença dos neutrófilos e macrófagos são fundamentais para remoção dos detritos celulares, porém a produção de EROs por estas células inflamatórias podem agravar a inflamação. O acúmulo de macrófagos no local da lesão inicia após a eliminação dos neutrófilos, sendo inicialmente os do tipo M1, contribuindo para fagocitose e secretando citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ), e mais tarde ocorre a substituição pelos macrófagos M2, que produzem citocinas anti-inflamatórias e moléculas de sinalização, que participam da regeneração muscular (35). Os macrófagos também interagem com os neutrófilos durante o estágio pró-inflamatório da lesão muscular, reduzindo a citotoxicidade e, a capacidade dos neutrófilos em fagocitar as células musculares, desta maneira o remodelamento muscular e a recuperação funcional não são prejudicados (37).

Além da biópsia, exames de imagem podem ser utilizados para fornecer informações referentes ao dano muscular. A ressonância magnética tem sido utilizada fornecendo imagem detalhada, caracterizando então a lesão muscular. Decorrente da resposta inflamatória, o edema intramuscular pode ser detectado pela ressonância magnética, o qual apresenta forte correlação com o grau do dano intramuscular. Desta maneira, uma análise entre 24 e 72 horas pode contribuir na avaliação da resposta inflamatória local, pois neste período a intensidade do edema seria aumentada. Enquanto que se realizada imediatamente após o exercício, esta pode revelar resultados negativos em relação ao dano muscular (43).

O ultrassom convencional já é utilizado a algumas décadas para diagnosticar danos musculares, embora sua aplicação para danos de baixo grau não apresente informações sobre a lesão. Já a utilização do ultrassom com contraste pode melhorar a sensibilidade do exame, pois as alterações de perfusão sanguínea podem ser visualizadas através de alterações de sinais do meio com contraste, uma vez que este contém microbolhas cheias de gás. Assim o ultrassom com contraste demonstra um resultado superior se comparado ao convencional para as investigações de lesões musculares, em especial a de baixo grau, e identificação do edema muscular (43).

Em comparação as informações sobre resposta dos leucócitos, menos estudos avaliaram a expressão de citocinas intramusculares após o exercício excêntrico, ou à comparou com a capacidade de geração de força muscular, marcador indireto do dano muscular (37).

O exercício excêntrico é descrito como capaz de elevar a IL-6 através do aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, que ocorre após o rompimento do sarcolema e abertura de canais ativados por estiramento devido a lesão muscular (42). Sua síntese é induzida por macrófagos no local da lesão, durante o mecanismo de reparo muscular (10,48). Os macrófagos também são responsáveis pela expressão mRNA TNF- $\alpha$  no músculo após 24 horas da lesão (45,55), sendo que após, sua síntese pode ser aumentada através do aumento das citocinas pró-inflamatórias e até mesmo o próprio TNF- $\alpha$ , estimulados pela sinalização NF-kB (55).

O dano muscular após exercícios excêntricos, evidenciado através do aumento das concentrações da CK após 24 horas do exercício, também apresentou um aumento da IL-6 imediatamente e 2 horas após o exercício excêntrico (13). Estas informações podem sugerir que o aumento da IL-6 plasmática não esteja relacionado diretamente ao dano muscular, assim como afirma Petersen et al. (2001) após não encontrar uma correlação entre a produção de IL-6 e CK. Pois o pico de aumento nas concentrações plasmáticas foram diferentes entre si, sendo imediatamente após para a IL-6 e 24 horas após o exercício excêntrico para a CK (67). Em nosso estudo, o protocolo do exercício excêntrico utilizado, não foi capaz de provocar aumento nas concentrações sanguíneas de IL-6, e demais citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ .

Já o estudo de Jo et al. (2019) demonstrou um aumento da IL-6 após 24 horas do exercício (+642,5% grupo controle) a qual foi acompanhada do aumento da CK e na diminuição na capacidade de força e, após 48 horas estas concentrações diminuíram comparadas ao período de 24 horas (51). Enquanto Nicol et al. (2015) observou um aumento da IL-6 após uma série de exercícios excêntricos, imediatamente e 48 horas após o exercício excêntrico (31%;  $\pm$ 29% e 32%;  $\pm$ 29% respectivamente) quando utilizado a suplementação com cúrcuma, e uma diminuição (-20%;  $\pm$ 18%) às 24 horas em relação a linha de base. A suplementação com cúrcuma foi associada ao aumento da IL-6 sanguínea e, também à moderada redução na DOMS e redução na CK, enquanto nenhum efeito placebo foi observado (59).

O que pode influenciar os diferentes resultados entre os estudos são as diferentes metodologias de análises. No presente estudo foi utilizada a citometria de fluxo, Nicol et al. (2015) utilizou o ensaio quimioluminescente, Jo et al. (2019) analisou através do imunoenensaio enzimático. Todas estas técnicas de análises são consideradas técnicas sensíveis, no entanto o imunoenensaio enzimático é descrito por detectar quantidades extremamente pequenas de antígenos e anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros forem bem padronizados (68).

Alguns estudos com ratos demonstraram um aumento nas concentrações musculares do mRNA IL-6 entre 12 e 24 horas após a concentração excêntrica (10,50), sendo que em um dos estudos este aumento permaneceu elevado por até duas semanas sem qualquer aumento nas concentrações sanguíneas (50). Isso pode demonstrar que determinados protocolos de exercício excêntrico provocam somente um aumento nas concentrações musculares da IL-6, não influenciando nas concentrações sanguíneas.

O aumento do mRNA mensageiro e na liberação de IL-6 também pode estar relacionado a um comprometimento do glicogênio intramuscular, sendo verificado que a ingestão de glicose durante o exercício pode atenuar esta resposta induzida pelo exercício (45). Tem sido proposto que uma das funções da IL-6 compreenda o aumento da sensibilidade da insulina, estimulando a gliconeogênese e a lipólise (34). Desta maneira, o fato do protocolo de exercícios não ser realizado em jejum pode ter mitigado o aumento da IL-6, assim como o fato de que o grupo amostral foi composto por indivíduos com percentuais de gorduras heterogêneos (14 a 27,8%), o que pode ter contribuído na variação entre os valores individuais apresentados para IL-6, já que o tecido adiposo é capaz de liberar IL-6 na corrente sanguínea (42).

No presente estudo não foi observado o aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , corroborando com Clifford et al. (2015), que mesmo diante de um aumento nas concentrações de CK não observaram um aumento nas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  após o exercício excêntrico. Embora Liao et al. (2010) verificaram um aumento deste marcador em mais que o dobro após 2 horas do exercício excêntrico em ratos, o qual permaneceu aumentado até 24 horas após. Sendo que este aumento foi acompanhado do aumento progressivo na concentração muscular do TNF- $\alpha$  e do aumento dos níveis de mRNA TNF- $\alpha$ , assim como da concentração plasmática de CK. O aumento nos níveis da CK demonstram que o

exercício excêntrico utilizado foi capaz de provocar danos musculares e os exames histológicos realizados, demonstraram a infiltração de células inflamatórias no músculo após a lesão (55). Já no presente estudo não houve um aumento na concentração destas células inflamatórias após o exercício, o que pode ter contribuído para a manutenção dos níveis de TNF-  $\alpha$ , assim como IL-6, uma vez que estas células inflamatórias podem levar a síntese destes marcadores (10,44,48,55).

A afirmação que após o exercício excêntrico ocorra uma maior expressão de IL-10 algumas horas após o exercício excêntrico (35,49) não foi confirmada no presente estudo, corroborando com Kanda et al. (2013) e McFarlin et al. (2016), que mesmo diante do dano muscular após contrações excêntricas não observaram um aumento plasmático ou urinário da citocina IL-10 (69,70). Em relação à concentração plasmática de INF- $\gamma$ , poucos estudos avaliaram esta citocina, sendo relatado por Paulsen et al. (2012) e Suzuki et al. (2002) que suas concentrações plasmáticas não são alteradas após exercício, o que corrobora com o presente estudo, onde as concentrações plasmáticas não apresentaram alterações nos diferentes grupos após o protocolo de exercício excêntrico (54,71).

As concentrações de IL-2 e IL-4 não sofreram alterações após o exercício excêntrico, corroborando com o que é relatado por Paulsen et al. (2012) que a IL-2 não sofre alterações após o exercício excêntrico (56). A IL-2 é uma citocina pró-inflamatória responsável pela ativação de células efetoras imunes e estimulação de leucócitos, considerada um importante indutor das funções de proliferação, diferenciação, desenvolvimento e sobrevivência, memória e regulação dos linfócitos T. A IL-4 é produzida principalmente pelas células T, mastócitos e neutrófilos, no entanto existe relato de que outras células como fibroblastos e células musculares são capazes de expressar IL-4 (72).

Poucos estudos avaliaram a concentração das citocinas IL-2 e IL-4 após exercícios de concentração excêntrica, sendo que um estudo com humanos que realizaram contrações excêntricas, não demonstrou aumento nas concentrações da IL-2 e IL-4, embora tenha ocorrido um aumento na Mb demonstrando a presença do dano muscular após o exercício (69).

Quanto ao efeito do *A. blazei* nos marcadores inflamatórios após uma série de exercício excêntrico, o mesmo não demonstrou efeito sobre células imunes. Embora

seja descrito que o *A.blazei* possua atividade imunomoduladora através do reconhecimento de seus polissacarídeos por receptores de membrana em leucócitos e macrófagos, resultando na proliferação de células imunes (16,25). Sugere-se que a estimulação da resposta imune inata ocorra pelo reconhecimento de  $\beta$ -glucanos através da dectina-1, que é um receptor de proteína transmembrana tipo II presente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, desencadeando respostas imunes efetivas, incluindo fagocitose (25).

Experimento *ex vivo* demonstrou o aumento em fatores de crescimento de leucócitos através da suplementação contendo *A.blazei*, entretanto quando verificado o efeito da suplementação *in vivo*, o mesmo demonstrou uma tendência na redução deste marcador (31). Assim, é descrito na literatura diferenças de ação da suplementação de *A.blazei* entre estudos *in vivo* e *ex vivo* ou *in vitro*.

Em experimentos *ex vivo*, um suplemento à base de *A.blazei* também induziu a liberação de diferentes citocinas, sendo que as citocinas pró-inflamatórias que apresentaram um maior aumento foram TNF- $\alpha$  (399 vezes), IL-6 (271 vezes) e IL-1 $\beta$  (86 vezes), derivadas principalmente de células monocíticas (31). Assim como é demonstrado em culturas de monócitos humanos incubados com *A.blazei*, que aumentaram a produção de citocinas e quimiocinas (32,33). *In vitro* demonstrou a capacidade de estimular fagócitos mononucleares e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) (21), entretanto não foi verificada a capacidade do *A.blazei* em promover a síntese de IL-10 (29).

Por outro lado, a ingestão de *A.blazei* em humanos saudáveis apresentou uma redução significativa após 12 dias nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como para IL-2, diferente do resultado em estudo *ex vivo* com o mesmo suplemento (31). Estes resultados corroboram com estudos que verificaram as citocinas após ingestão do mesmo suplemento, à base de *A.blazei*, em doença de Crohn e Colite Ulcerativa, os quais apresentaram uma redução na IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-2, demonstrando assim um declínio especialmente nas citocinas pró-inflamatórias (16).

Entretanto, no presente estudo a ingestão do *A.blazei* em adultos saudáveis após uma série de exercício excêntrico não apresentou alteração em qualquer um dos marcadores inflamatórios avaliados. Alguns autores sugerem que o efeito do *A.blazei*

na diminuição das citocinas pró-inflamatórias, possam ser decorrentes de um alto nível inicialmente destas citocinas, o que é observado durante a inflamação (29,31). Isto pode ser evidenciado no estudo com indivíduos saudáveis quando utilizado uma alta dosagem de suplemento (720 ml/dia) por um período de dois dias, o qual apresentou somente uma tendência na diminuição da IL-6 e TNF- $\alpha$ . Porém, após uma análise somente dos indivíduos que apresentavam inicialmente o nível mais elevado de algumas citocinas, observaram uma diminuição significativa da IL-6 e INF- $\gamma$  (31). E também em estudo com pacientes com Doença de Chron e Colite Ulcerativa (16). Desta maneira, o fato de não ter havido um aumento dos marcadores inflamatórios no presente estudo pode ter influenciado o efeito imunomodulador do *A.blazei* descrito na literatura (16,29,31).

Outra lacuna ainda existente é a discrepância entre os estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Uma possível causa é relacionada a absorção intestinal do *A.blazei* e seus componentes pela mucosa intestinal humana, pois esta ainda não é bem elucidada. Suspeitas de que  $\beta$ -glucanos e demais fragmentos maiores e bioativos possuam uma limitação na capacidade absorptiva. Essa pode impedir seu efeito estimulador de citocinas *in vivo*, como é demonstrado nos estudos *in vitro* e *ex vivo*, embora os  $\beta$ -glucanos possam ter um efeito indireto no intestino, estimulando células imunes ali presentes (16,31). Entretanto, alguns estudos verificaram após 3 dias de ingestão a presença de  $\beta$ -glucanos marcados dentro de macrófagos esplênicos, com o mesmo tamanho anterior a sua ingestão via oral. Quando verificado o caminho percorrido após sua absorção, experiências demonstraram que  $\beta$ -glucanos após sua fagocitose foram degradados lentamente dentro das células. Seus fragmentos solúveis biologicamente ativos foram liberados nas células circulantes, demonstrando um período de aproximadamente 13 dias como tempo necessário para sua degradação completa por macrófagos (27). Assim, o período de suplementação do *A.blazei* utilizado no presente estudo pode também ter influenciado esta resposta imunomoduladora (27). Embora já tenha sido observado o efeito de uma suplementação de *A.blazei* após 2 dias, entretanto considerada de alta dosagem (31).

O *A.blazei* também é rico em compostos fenólicos, flavonoides, ácido urônico e ascórbico, possuindo assim propriedades antioxidantes, sendo seu extrato capaz de inibir a oxidação de enzimas peroxidases, reduzir o estresse oxidativo através da redução da oxidação por neutrófilos polimorfonucleares, aumentando especialmente

nas mitocôndrias a concentração de enzimas antioxidantes como catalase e peróxido dismutase (16). Desta maneira o *A.blazei* poderia influenciar estes marcadores, porém no presente estudo não foi possível a avaliação dos marcadores oxidativos, que podem ser associados à atividade dos neutrófilos e macrófagos, assim como produção de citocinas (73).

Sabe-se que a infiltração celular após o dano muscular é seguida de uma fagocitose, onde neutrófilos e macrófagos produzem EROs que participam também na regulação de mecanismos celulares, contribuindo para biogênese mitocondrial, angiogênese, hipertrofia do músculo esquelético e contração muscular, sendo relacionado positivamente a sua produção controlada com a contração muscular (62,74). Porém, é necessário manter um equilíbrio na produção dos radicais livres a fim de evitar um desequilíbrio, o que pode influenciar no dano muscular secundário contribuindo para fadiga muscular e diminuição na capacidade de força (62).

A ingestão alimentar entre os indivíduos utilizando placebo ou *A.blazei* no presente estudo não apresentou diferença significativa através da avaliação dos registros alimentares e frequência alimentar. Sendo assim, o consumo alimentar não foi considerado no presente estudo um fator de influência sobre os marcadores inflamatórios. O *A.blazei* é descrito possuir um conteúdo de glutamina superior aos demais tipos de cogumelos, sendo relatado uma associação entre o consumo da glutamina e a diminuição da inflamação. No presente estudo o conteúdo diário de glutamina foi de aproximadamente 0,54 gramas, considerando os valores referenciados para cogumelo fresco (15). Desta maneira seu consumo não foi considerado relevante para um efeito anti-inflamatório, pois o consumo abaixo de 0,1 g/Kg de peso não apresentou efeitos em marcadores indiretos (22).

Desta maneira diferente do encontrado por Silva et al. (2017), que observou uma melhora na recuperação da fadiga muscular, o presente estudo não resultou em benefícios na avaliação dos marcadores inflamatórios com a utilização do *A.blazei*. Sua ação imunomoduladora não foi verificada no presente estudo, e isso pode ser decorrente de algumas limitações, assim como diferenças nos protocolos de exercício utilizados. Entretanto a avaliação do efeito da suplementação de *A.blazei* pode ser útil para outras diferentes modalidades de esportes, e diferentes públicos, visto que a resposta inflamatória pode diferir entre praticantes acostumados e desacostumados.

É importante enfatizar que o efeito esperado da suplementação com o *A.blazei* era uma efeito imunomodulador e não somente um efeito anti-inflamatório, uma vez que o processo inflamatório é essencial para a restauração do tecido muscular após o dano ocasionado através de exercício excêntrico. A utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) por exemplo dependendo da dose ingerida, sugere uma atenuação no aumento de células satélites após exercícios, células estas que participam no remodelamento muscular (75). Embora inicialmente possa demonstrar uma resposta terapêutica diante da inflamação, a utilização de AINES pode comprometer o estágio inicial da cicatrização, sem melhorar necessariamente a recuperação após o dano muscular (70), demonstrando desta maneira que o efeito anti-inflamatório pode ser prejudicial na recuperação após o exercício. Embora o presente estudo não tenha apresentado aumento nos marcadores inflamatórios após a sessão de exercício excêntrico, a recuperação e adaptação muscular pode ocorrer mesmo na ausência do recrutamento e acúmulo dos monócitos transmitidos pelo sangue, sendo os leucócitos residentes no tecido responsáveis por desempenhar este papel (54,37).

A amostra deste estudo não foi totalmente homogênea, como por exemplo o percentual de gordura corporal individual apresentou uma grande variação, isso pode ter influenciado na avaliação dos marcadores inflamatórios. Assim como a técnica utilizada para análise destes marcadores, pois é possível observar diferentes técnicas de análises de citocinas entre os estudos que avaliam este marcador inflamatório, o que pode gerar diferentes resultados.

Através da análise de poder de teste para o conjunto de dados que resultou no valor de 0,266, pode-se confirmar que o tamanho amostral utilizado no presente estudo foi limitado, sendo sugerido através do cálculo amostral uma amostra mínima de 34 indivíduos. Entretanto, a utilização de uma amostragem voluntária envolve limitações para atingir o valor amostral sugerido, em especial quando é necessário a realização de um protocolo de exercício excêntrico intenso, com visitas frequentes ao local de realização do estudo e a utilização de suplementos alimentares de maneira regular.

A dosagem sanguínea é outro fator limitante, pois no presente estudo houve perdas durante a realização de algumas análises o que gerou uma redução na amostra para análise dos marcadores inflamatórios. Tal medida foi necessária uma

vez que o método de análise estatística utilizado no presente estudo através da ANOVA fator duplo com repetição, determina a utilização de dados dos mesmos voluntários na comparação entre efeito placebo e protocolo. A utilização de outro método de análise, como por exemplo o método de análise de dados longitudinais pelo GEE, possibilitaria a análise e inclusão de todos os indivíduos, mesmo os indivíduos que apresentaram ausência de dados para um determinado período, evitando, portanto, qualquer viés de seleção (76).

Entretanto ainda é possível verificar outros estudos publicados com tamanho amostral próximo ao utilizado no presente estudo, e também a utilização do mesmo método de análise estatística.

## 7. Conclusão

O protocolo do exercício excêntrico realizado no presente estudo não promoveu o aumento nas concentrações plasmáticas de células imunes (neutrófilos e leucócitos) e também citocinas como IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  após a realização do exercício comparado com os valores basais.

Tal fato pode ter sido influenciado pela magnitude do dano muscular ou até mesmo pela técnica de análise destes marcadores, já que na literatura são descritas diferentes metodologias, assim como a utilização de diferentes protocolos.

Não foi verificado efeito da suplementação de *A.blazei* sob os marcadores inflamatórios após uma sessão de exercício excêntrico, possivelmente pelo fato que estes marcadores não sofreram um aumento significativo após a realização do protocolo de exercício. O tempo de suplementação do *A.blazei* utilizado no presente estudo pode ter sido insuficiente para sua atividade imunomoduladora.

## 8. Referencias

1. Goston JL, Correia MITD. Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors. *Nutrition*; 2010. (26):604-611. Doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.021
2. Dreher M, Ehlert T, Simon P, Neuburger EWI. Boost Me: Prevalence and Reasons for the Use of Stimulant Containing Pre Workout Supplements Among Fitness Studio Visitors in Mainz (Germany). *Front Psychol.* 2018; 9: 1134. Doi: 10.3389/fpsyg.2018.011343. Izquierdo M, Ibañez J, Calbet JAL, Navarro-Amezqueta I, Gonzalez-Izal M, Idoate F, et al. Cytokine and hormone responses to resistance training. *Eur J Appl Physiol.* 2009. 397-409.
3. Izquierdo M, Ibañez J, Calbet JAL, Navarro-Amezqueta I, Gonzalez-Izal M, Idoate F, et al. Cytokine and hormone responses to resistance training. *Eur J Appl Physiol.* 2009. 397-409.
4. Fleck SJ, Kraemer WJ. *Fundamentos do treinamento de força muscular.* 4ª Edição. Artmed, 2017.
5. Fortunato AK, Pontes WM, Souza DMS, Prazeres JSF, Marcucci-Barbosa LS, Santos JMM et al. Strength Training Session Induces Important Changes on Physiological, Immunological, and Inflammatory Biomarker. *Journal of Immunology Research.* 2018. 1-12
6. Panza VSP, Diefenthaler F, Silva EL. Benefits of dietary phytochemical supplementation on eccentric exercise-induced muscle damage: Is including antioxidants enough? *Nutrition* 31 (2015) 1072–1082.
7. American College of sports medicine. *Guidelines for exercise testing and prescription.* Riebe D, Senior editor. Philadelphia, PA. Tenth edition. 2018.
8. Tanabe Y, Chino K, Sagayama H, Lee HJ, Ozawa H, Maeda S, Takahashi H. Effective Timing of Curcumin Ingestion to Attenuate Eccentric Exercise-Induced Muscle Soreness in Men. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology.* 2019. 65:82-89. Doi.org/10.3177/jnsv.65.82
9. Kedia AW, Hofheins JE, Habowski SM, Ferrando AA, Gothard MD, Lopez HL. Effects of a Pre-workout Supplement on Lean Mass, Muscular Performance, Subjective Workout Experience and Biomarkers of Safety. *Int J Med Sci.* 2014; 11(2): 116–126. Doi: 10.7150/ijms.7073
10. Kato H, Miura K, Nakano S, Suzuki K, Bannai M, Inoue Y. Leucine-enriched essential amino acids attenuate inflammation in rat muscle and enhance muscle repair after eccentric contraction. *Amino Acids.* 2016; 48: 2145–2155. doi: 10.1007/s00726-016-2240-1
11. Köhne JL, Ormsbee MJ, McKune AJ. The effects of a multi-ingredient supplement on markers of muscle damage and inflammation following downhill running in females. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016; 13: 44. Doi: 10.1186 / s12970-016-0156-5
12. Kerksick CM, Wilborn CD, Roberts MD, Smith-Ryan A, Kleiner SM, Jäger R, et al. ISSN exercise & sports nutrition review update: research & recommendations. *J Int Soc Sports Nutr.* 2018. 15:38.
13. Clifford T, Bell O, West DJ, Howatson G, Stevenson EJ. The effects of beetroot juice supplementation on indices of muscle damage following eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2016 Feb;116(2):353-62. doi: 10.1007/s00421-015-3290-x

14. Tanabe Y, Chino K, Ohnishi T, Ozawa H, Sagayama H, Maeda S, Takahashi H. Effects of oral curcumin ingested before or after eccentric exercise on markers of muscle damage and inflammation. *Scand J Med Sci Sports*. 2019. 29(4):524-534. doi: 10.1111/sms.13373
15. McFarlin BK, Venable AS, Henning AL, Sampson JNB, Pennel K, Vingren JL, Hill DW. Reduced inflammatory and muscle damage biomarkers following oral supplementation with bioavailable curcumin. *BBA Clin*. 2016 Jun; 5: 72–78. Doi: 10.1016/j.bbacli.2016.02.003
16. Souza ACS, Correa VG, Goncalves GA, Soares AA, Bracht A, Peralta RM. *Agaricus blazei* Bioactive Compounds and their Effects on Human Health: Benefits and Controversies. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23, 2807-2834.
17. Silva FF, de Oliveira GAC, Costa HCM, Regis WCB. Royal Sun Culinary-Medicinal Mushroom, *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes), Supplement in Training Capacity Improvement Parameters. *Int J Med Mushrooms*. 2017;19(9):759-66.
18. Therkelsen SP, Hetland G, Lyberg T, Lygren I, Johnson E. Cytokine Levels After Consumption of a Medicinal *Agaricus blazei* Murill-Based Mushroom Extract, AndoSan™, in Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in a Randomized Single-Blinded Placebo-Controlled Study. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2016. Doi.org/10.1111/sji.12476.
19. Therkelsen SP, Hetland G, Lyberg T, Lygren I, Johnson E. Effect of the Medicinal *Agaricus blazei* Murill-Based Mushroom Extract, AndoSan™, on Symptoms, Fatigue and Quality of Life in Patients with Crohn's Disease in a Randomized Single-Blinded Placebo Controlled Study. *Plos One*. 2016; 11 (7). Doi: 10.1371 / journal.pone.0159288.
20. Therkelsen SP, Hetland G, Lyberg T, Lygren I, Johnson E. Effect of a Medicinal *Agaricus blazei* Murill-Based Mushroom Extract, AndoSan™, on Symptoms, Fatigue and Quality of Life in Patients with Ulcerative Colitis in a Randomized Single-Blinded Placebo Controlled Study. *Plos One*. 2016; 11 (3). Doi: 10.1371 / journal.pone.0150191.
21. Tangen JM, Tierens A, Caers J, Binsfeld M, Olstad OK, Trøseid AMS, Wang J, Tjønnfjord GE, Hetland G. Immunomodulatory Effects of the *Agaricus blazei* Murrill-Based Mushroom Extract AndoSan in Patients with Multiple Myeloma Undergoing High Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation: A Randomized, Double Blinded Clinical Study. *Biomed Res Int*. 2015. Doi: 10.1155 / 2015/718539.
22. Kim J, Lee J. A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I. *J Exerc Rehabil*. 2014 Dec; 10(6): 349–356. doi: 10.12965/jer.140179.
23. Živković L, Borozan S, Čabarkapa A, Topalović D, Ciptasari U, Bajić V, Spremo-Potparević B. Antigenotoxic Properties of *Agaricus blazei* against Hydrogen Peroxide in Human Peripheral Blood Cells. *Oxid Med Cell Logev*. 2017. Doi: 10.1155 / 2017/8759764.
24. Smiderle FR, Ruthes AC, van Arkel J, et al. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11:58. Doi: 10.1186/1472-6882-11-58

25. Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol* 2009; 2: 25. Doi: 10.1186/1756-8722-2-25
26. Lee DH, Kim HW. Innate immunity induced by fungal  $\beta$ -glucans via dectin-1 signaling pathway. *Int J Med Mushrooms* 2014; 16: 1-16.
27. Vetvicka V, Vannucci L, Sima P, Richter J. Beta glucan: Supplement or Drug? From Laboratory to Clinical Trials. *Molecules*. 2019; 24(7): 1251. Doi: 10.3390/molecules24071251
28. Hetland G, Johnson E, Lyberg T, Kvalheim G. The mushroom *Agaricus blazei* Murrill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy, and inflammation through its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation. *Adv Pharmacol Sci* 2011; 2011: 157015. Doi: 10.1155/2011/157015
29. Lima CUJO, Cordova COA, Nobrega OT, Funghetto SS, Karnikowski MGO. Does the *Agaricus blazei* Murrill mushroom have properties that affect the immune system? An integrative review. *J Med Food* 2011; 14: 2-8. Doi: 10.1089 / jmf.2010.0017
30. Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AM, Johnson E. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells in vitro. *Inflammation*. 2005;29(4-6):147-53. Doi:10.1007/s10753-006-9010-2
31. Johnson E, Forland DT, Saetre L, Bernardshaw SV, Lyberg T, Hetland G. Effect of an Extract Based on the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Release of Cytokines, Chemokines and Leukocyte Growth Factors in Human Blood *Ex Vivo* and *In Vivo*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2009 (69); 242-250. Doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02218.x
32. Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AMA, Johnson E. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells in vitro. *Inflammation*. 2005;29(4-6):147-153.
33. Førland DT, Johnson E, Tryggestad AMA, Lyberg T, Hetland G. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production *in vitro*. *Cytokine*. 2010;49(3):245-250.
34. Pinckard K, Baskin KK, Stanford KI. Effects of Exercise to Improve Cardiovascular Health. *Front Cardiovasc Med*. 2019; 6: 69. Doi: 10.3389/fcvm.2019.00069
35. Hody S, Croisier JL, Bury T, Rogister B, Leprince P. Eccentric muscle contractions: risks and benefits. *Front Physiol*. 2019; 10: 536. doi: 10.3389/fphys.2019.00536
36. Rosa LFPBC e Vaiberg MW. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte*. Vol. 8, N°4. 2002.
37. Peake JM, Neubauer O, Gatta PAD, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from. *Physiology*. 06 Mars 2017. Doi.org/10.1152/jappphysiol.00971.2016
38. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*. 2008 Oct; 88 (4): 1243-1276. Doi: 10.1152 / physrev.00031.2007

39. Kawamura T, Muraoka I. Exercise-induced oxidative stress and the effects of antioxidant intake from a physiological viewpoint. *Antioxidants*. 2018, 7 (9):119. Doi: 10.3390 / antioxidants7090119
40. Vassale C, Pingitore A, De Giuseppe R, Vigna L e Bamonti L. Biomarkers to Estimate Bioefficacy of Dietary/Supplemental Antioxidants in Sport In: Lamprecht M. *Antioxidants in Sport Nutrition*. Boca Raton: Ed. Taylor&Francis. 2015.
41. McGinley C, Shafat A, Donnelly AE. Does antioxidant vitamin supplementation protect against muscle damage? *Sports Med*. 2009;39(12):1011–1032. Doi: 10.2165/11317890-000000000-00000
42. Nguyen HX, Tidball JG. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol*. 2003;547(1):125–132. doi: 10.1113/jphysiol.2002.031450
43. Hotfiel T, Freiwald J, Hoppe MW, Lutter C, Forst R, Grim C, Bloch W, Hüttel M, Heiss R. Advances in Delayed-Onset Muscle Soreness (DOMS): Part I: Pathogenesis and Diagnostics. *Sportverl Sportschad* 2018; 32: 243–250.
44. Baumert P, Lake MJ, Stewart CE, Drust B, e Erskine RM. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. *Eur J Appl Physiol* . 2016; 116: 1595-1625. Doi: 10.1007 / s00421-016-3411-1
45. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *Journal of experimental biology*. 2011. 337-346
46. Pedersen PK, Akerstrom TCA, Nielsen AR e Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal Appl Physiol*. 2007. 1093-98.
47. Beavers KM, Brinklev TE e Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. *International Journal of clinical chemistry*. 2010. 785-93.
48. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *The FASEB Journal*. 2002; 16:1336.
49. Santos, CM. Marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 após atividade física de alta intensidade em adultos jovens: Revisão de literatura. Belo Horizonte. Monografia (Especialização em fisioterapia da escola de educação física, fisioterapia e terapia ocupacional) – Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
50. Zuo Q, Qu F, Li N, Wang S, Liu J, XU CJ, Yu X. Eccentric exercise results in a prolonged increase in interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2019 December; 40: 379-387. Doi: 10.1007/s10974-019-09554-6
51. Jo E , Bartosh R, Auslander AT, Directo D, Osmond A, Wong MWH. Post-Exercise Recovery Following 30-Day Supplementation of Trans-Resveratrol and Polyphenol-Enriched Extracts. *Sports (Basel)* . 2019 out; 7 (10): 226. Doi: 10.3390 / sports7100226
52. Nicioli C. Efeito treinamento de musculação em circuitos sobre a aptidão cardiorrespiratória e citocinas plasmáticas IL-6, IL-8, IL-10, TNF, IL-1 $\beta$  E IL-12p70 em mulheres saudáveis. São Carlos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fiológicas) – Universidade Federal São Camilo; 2008.
53. Bazgir B, Salesi M, Koushki M, Amirghofran Z. Effects of Eccentric and Concentric Emphasized Resistance Exercise on IL-15 Serum Levels and Its Relation to Inflammatory Markers in Athletes and Non-Athletes. *Asian J Sports Med*. 2015 Sep; 6(3): e27980. Doi: 10.5812/asjasm.27980

54. Paulsen G, Mikkelsen UR, Raastad T, Peake JM. *Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? EIR 18 2012.*
55. Liao P, Zhou J, Ji LL, Zhang Y. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *American Journal of Physiology*. 2010. Doi.org/10.1152/ajpregu.00480.2009
56. Ulbrich AZ. Influência da intensidade do exercício físico no perfil inflamatório de pacientes com insuficiência cardíaca. Florianópolis. Tese (Doutorado Ciência do movimento humano) – Universidade do Estado de Santa Catarina. 2013.
57. Mathure N e Pedersen BK. Exercise as a Mean to Control Low-Grade Systemic Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2008.
58. Almeida LM. Avaliação dos efeitos da suplementação com o cogumelo *Agaricus blazei* em uma sessão aguda de exercícios de força. Dissertação Mestrado – UFMG. 2019
59. Nicol LM, Rowlands DS, Fazakerly R, Kellett J. Curcumin supplementation likely attenuates delayed onset muscle soreness (DOMS). *Eur J Appl Physiol*. 2015;115(8):1769-77. Doi: 10.1007/s00421-015-3152-6.
60. Bowtell JL, Sumners DP, Dyer A, Fox P, Mileva KN. Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Aug; 43(8):1544-51.
61. Ribeiro AC, Sávio KEO, Rodrigues MLCF, Costa THM, Schmitz BAS. Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. *Rev. Nutri. Campinas*.2006;19(5): 553-562.
62. Picchi MG. Efeitos do ácido ascórbico nos biomarcadores de estresse oxidativo induzido por exercício físico exaustivo. Ribeirão Preto. Tese (Doutorado em ciências médicas) – Universidade de São Paulo. 2015.
63. Carvalho AT, Ribeiro GA, Nogueira RF, Santos ALB. Citometria de fluxo no estudo de doenças infecto-parasitárias. Cursos de Inverno. Instituto Oswaldo Cruz. 2010.
64. Cunha CF, Cortes FH, Flores GL, Sánches-Arsila JC, Ferraz R, Silva TP. Citometria de fluxo: Imunofenotipagem e avaliação da produção de citocinas. MS Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
65. Miot HA. Avaliação da normalidade dos dados em ensaios clínicos e experimentais. *J Vasc Bras*. 2017; 16 (2): 88-9. Doi: 10.1590/1677-5449.041117
66. Buchwald-Werner S, Naka I, Wilhelm M , Schütz E, Schoen C, Reule C. Effects of lemon verbena extract (Recoverben®) supplementation on muscle strength and recovery after exhaustive exercise: a randomized, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* . 2018; 15: 5. Doi: 10.1186 / s12970-018-0208-0
67. Petersen EW, Ostrowski K, Ibfelt T, Richelle M, Offord E. Effect of vitamin supplementation on cytokine response and on muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jun;280(6):C1570-5. Doi: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1570>
68. Bender AL, von Muhlen CA. Capítulo 5: Testes laboratoriais aplicados a Imunologia Clínica. In: Julio C Voltarelli; Eduardo A Donadi; Ivan F de Carvalho; Karla Arruda; Paulo Louzada JR; Willy Sarti. (Org.). *Imunologia Clínica na Prática Médica*. 1ªed. São Paulo: Atheneu, 2008, v. 1, p. 75-96.

69. Kanda K, Sugama K, Hayashida h, Sakuma J, Kawakami Y, Miura S, Yoshioka H, Mori Y, Suzuki K. *Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. Eccentric exercise and inflammation. 2013.*
70. McFarlin BK, Venable AS, Henning AL, Sampson JNB, Pennel K, Vingren JL, Hill DW. Reduced inflammatory and muscle damage biomarkers following oral supplementation with bioavailable curcumin. *BBA Clin.* 2016; 5: 72–78. Doi: 10.1016/j.bbacli.2016.02.003
71. Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka H, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics. Exerc Immunol Rev.* 2002;8:6-48.
72. Neto JCR, Lira FS, Zanchi NE, Oyama LM, Pimental GD, Santos RVT, Seelaender M, Nascimento CMO. Acute exhaustive exercise regulates IL-2, IL-4 and MyoD in skeletal muscle but not adipose tissue in rats. *Lipids Health Dis .* 2011; 10: 97. Doi: 10.1186 / 1476-511X-10-97
73. Lamb KL, Ranchordas MK, Johnson E, Denning J, Downing F, Lynn A. No Effect of Tart Cherry Juice or Pomegranate Juice on Recovery from Exercise- Induced Muscle Damage in Non-Resistance Trained Men. *Nutrients* 2019, 11 (7), 1593. Doi.org/10.3390/nu11071593
74. Kerksick CM e Zuhl M. Mechanisms of Oxidative Damage and Their Impact on Contracting Muscle. In: Lamprecht M. *Antioxidants in Sport Nutrition.* Boca Raton: Ed. Taylor&Francis. 2015
75. Lundberg TR, Howatson G. REVIEW ARTICLE Analgesic and anti-inflammatory drugs in sports: Implications for exercise performance and training adaptations. *Scand J Med Sci Sports.* 2018; 28 (11), 2252-2262. Doi: 10.1111/sms.13275
76. Guimarães LSP, Hirakata VN. Uso do modelo de equações de estimatórias generalizadas na análise de dados longitudinais. *Revista HCPA.* 2012; 32 (4): 503-511.

## 9. Anexos



**ANEXO 1.** Termo de consentimento livre e esclarecido.

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS**

Pró- Reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do Projeto: “Avaliação do efeito agudo da suplementação do cogumelo *Agaricus blazei* em exercícios de carga muscular.” N.º Registro **CEP: 22481113.5.0000.5137**

Prezado Sr,

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que estudará os efeitos agudos da suplementação com o cogumelo *Agaricus blazei* em treinamentos de força. Você foi selecionado por que apresenta idade entre 18 e 35 anos e é um indivíduo saudável. A sua participação nesse estudo consiste em se submeter a um período de dez dias de suplementação com o *Agaricus blazei*, que será ministrado via oral (2500mg/dia) ou suplementação com placebo. A coleta dos dados ocorrerá em um período de 7 dias e você será submetido a um teste de carga muscular e outros testes para avaliar a força. Serão feitas coletas de material biológico para avaliar o nível de cortisol (Saliva), e para análises de marcadores bioquímicos e imunológicos (sangue), gratuitamente no próprio local de treino. Após um período de 17 dias este protocolo será novamente executado. O objetivo do projeto é avaliar os impactos da suplementação com o cogumelo *Agaricus blazei* em treinamentos físicos, avaliar parâmetros bioquímicos de estresse em grupos de indivíduos que fizeram uso da suplementação com o cogumelo e foram submetidos a testes. O estudo não oferece

nenhum prejuízo a sua saúde, pois o cogumelo tem seu consumo liberado pela ANVISA como alimento, salvo pela possibilidade de haver alergia ou intoxicação devido a componentes que podem estar presentes no cogumelo, nesse caso, o uso do mesmo será suspenso e você será encaminhado para orientação médica pelo sistema único de saúde. Suas considerações serão utilizadas em nosso estudo, podendo ser publicada, porém não haverá qualquer divulgação pessoal. Sua participação é muito importante e voluntária. Você não terá nenhum gasto e também não receberá nenhum pagamento por participar desse estudo. Não haverá gastos com o seu deslocamento, nem gastos com outros serviços. As informações obtidas nesse estudo serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação, quando da apresentação dos resultados em publicação científica ou educativa, uma vez que os resultados serão sempre apresentados como retrato de um grupo e não de uma pessoa. Você poderá se recusar a participar ou a responder algumas das questões a qualquer momento, não havendo nenhum prejuízo pessoal se esta for a sua decisão. Os resultados dessa pesquisa servirão para que se tenha uma maior variedade de produtos produzidos a base do cogumelo para que a população tenha acesso aos seus benefícios funcionais. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador responsável, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Nome do pesquisador: Wiliam C. B. Régis

Endereço: Av. Afonso Vaz de Melo, 1.200 - Barreiro de Baixo - CEP: 30640-070 - Belo Horizonte - MG

Telefone: (31) 3328-9541 Email: [wregis@pucminas.br](mailto:wregis@pucminas.br)

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, coordenado pela Prof.<sup>a</sup> CRISTIANA LEITE CARVALHO, que poderá ser contatado em caso de questões éticas, pelo telefone 3319-4517 ou email [cep.propppg@pucminas.br](mailto:cep.propppg@pucminas.br).

Obrigado pela sua colaboração e por merecer sua confiança.

Belo Horizonte, \_\_/\_\_/2018.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar deste estudo.

Nome (em letra de forma): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: WILIAM CESAR BENTO REGIS

Assinatura:



