

**U. PORTO**



**FACULDADE DE DESPORTO  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR DIFERENTES TIPOS DE  
PROVAS DE TRIATLO**

Estudo de diversos biomarcadores enzimáticos, hematológicos, de stresse oxidativo e da função imune.

Dissertação apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto,  
com vista à obtenção do grau de Doutor em Ciências do Desporto (Decreto-  
Lei nº 216/92 de 13 de Outubro).

**Orientador: Professor Doutor José Augusto Rodrigues dos Santos**

**Co-orientador: Professor Doutor Agostinho Franklin Pinto Marques**

Faber Sérgio Bastos Martins

Porto, 2010

## **FICHA DE CATALOGAÇÃO**

Martins, Faber Sergio Bastos (2010). Alterações bioquímicas induzidas por diferentes tipos de provas de triatlo - estudo de diversos biomarcadores enzimáticos, hematológicos, de stresse oxidativo e da função imune. Dissertação de Doutoramento em Ciências do Desporto apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

**Palavras chave:** TRIATLO, ACTIVIDADE ENZIMÁTICA, INDICADORES HEMATOLÓGICOS, SISTEMA IMUNOLÓGICO, STRESSE OXIDATIVO.

## **DEDICATÓRIA**

**“ O conhecimento é a única ferramenta de produção  
que não está sujeita a depreciação”**

**John Maurice Clarke**

**Aos meus avós e padrinhos, Lacy e Gerson,  
por me permitirem adquirir o conhecimento.**

**Muito obrigado.**



## **AGRADECIMENTOS**

A realização desta dissertação só foi possível graças à colaboração, empenho e dedicação de muitas pessoas. Gostaria desta forma, de poder expressar a minha gratidão e os sinceros agradecimentos a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho, agradecendo especialmente:

Ao Prof. Dr. José Augusto Rodrigues dos Santos, por ter aceite a tarefa de orientar este estudo, pela disponibilidade, atenção, confiança demonstrados constantemente, e pelo contributo dado a minha formação. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Agostinho Franklin Pinto Marques, co-orientador deste estudo, pela disponibilidade, incentivo e sugestões conducentes na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Jorge Manuel Rolo Pedrosa, pelos ensinamentos científicos e metodológicos fundamentais para realização deste estudo, pela disponibilidade e amizade constantemente demonstradas.

A secção de citometria do serviço de hematologia do HGSA, especialmente a Prof. Dra. Margarida Lima, pela colaboração, incentivo, apoio e facilidades concedidas para a realização deste estudo, e também, a Dra. Marta Gonçalves pela colaboração na realização das análises relativas ao protocolo experimental.

A Dra. Laura Pereira, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela ajuda na determinação dos diversos biomarcadores inseridos na presente dissertação.

A Dra. Deolinda Ramos e aos funcionários Mafalda Pereira, Virgínia Pinheiros, Nuno Reis e Pedro Novaes da biblioteca da FADE-UP, pela disponibilidade e auxílio demonstrados durante o curso de doutoramento

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Teixeira, pelo apoio, incentivo e colaboração ao longo de toda a realização deste estudo.

A Prof. Dra. Ruth Marina, pelo auxílio, paciência e disponibilidade dispensados para a realização do presente estudo.



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
RESUMÉ.....	xxi
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da Literatura.....</b>	<b>5</b>
2.1 O exercício físico como modelo indutor de lesão muscular esquelética.....	5
2.2 Estudo dos biomarcadores enzimáticos.....	7
2.2.1 Aumento da actividade e concentração das enzimas séricas.....	7
2.2.1.1 Creatinaquinase (CK) .....	9
2.2.1.2 Asparato-aminotransferase (AST).....	12
2.2.1.3 Alanina-aminotransferase (ALT).....	14
2.2.1.4 Gama-glutamilttransferase (GGT).....	15
2.3 Estudo dos biomarcadores hematológicos.....	17
2.3.1 Efeito do exercício aeróbio nos diversos indicadores eritrocitários....	17
2.3.1.1 Eritrócitos (Glóbulos Rubros).....	20
2.3.1.2 Hematócrito (Hct).....	23
2.3.1.3 Hemoglobina (Hb).....	24
2.3.1.4 Volume Globular Médio (VGM).....	26
2.3.1.5 Hemoglobina Globular Média (HGM).....	27
2.3.1.6 Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM).....	28
2.3.1.7 Índice de Anisocitose eritrocitária (RDW).....	28
2.4 Estudo dos biomarcadores da função imune.....	29
2.4.1 Sistema Imune: considerações gerais.....	29
2.4.1.1 Neutrófilos.....	31
2.4.1.2 Eosinófilos.....	32
2.4.1.3 Basófilos e Mastócitos.....	32
2.4.1.4 Monócitos e Macrófagos.....	33

2.4.1.5 Linfócitos.....	34
2.4.1.5.1 Linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> .....	35
2.4.1.5.2 Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> reguladores.....	36
2.4.1.5.3 Linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> .....	37
2.4.1.5.4 Linfócitos NK.....	38
2.4.1.5.6 Linfócitos B.....	38
2.4.2 Sistema Imune e exercício físico: regulação, integração e activação..	39
2.4.2.1 Resposta do sistema imune ao exercício físico agudo.....	43
2.4.2.1.1 Activação dos linfócitos T.....	50
2.4.2.3 Efeitos crónicos do exercício físico na resposta imune.....	51
2.4.3 Exercício físico e a susceptibilidade às infecções.....	54
2.5 Estudo dos biomarcadores de stresse oxidativo.....	58
2.5.1 Radicais livres e espécies reactivas: considerações gerais.....	58
2.5.2 Formação das espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio.....	61
2.5.2.1 Formação mitocondrial.....	62
2.5.2.2 Activação da enzima xantina-oxidase (XO).....	63
2.5.2.3 Oxidação dos metais de transição.....	64
2.5.2.4 Oxidação da hemoglobina, mioglobina e catecolaminas.....	65
2.5.2.5 Activação das células fagocíticas imunocompetentes.....	66
2.5.3 Stresse oxidativo.....	68
2.5.3.1 Detecção do stresse oxidativo.....	69
2.5.3.2 Lipoperoxidação.....	70
2.5.4 Sistemas de defesa antioxidante.....	72
2.5.4.1 Sistema de defesa antioxidante enzimático.....	73
2.5.4.2 Sistema de defesa antioxidante não-enzimático.....	76
2.5.5 Exercício físico aeróbio agudo e stresse oxidativo.....	79
2.5.6 Treino, stresse oxidativo e adaptações antioxidantes.....	83
<b>3. Objectivos.....</b>	<b>89</b>
3.1 Objectivo geral.....	89
3.2 Objectivos específicos.....	89
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>91</b>
4.1 Caracterização da amostra.....	91
4.2 Protocolo experimental.....	93



4.2.1 Determinação das variáveis antropométricas.....	94
4.3 Colheita de sangue e preparação.....	94
4.4 Determinações bioquímicas.....	95
4.5 Determinações hematológicas.....	97
4.6 Determinações imunológicas.....	97
4.6.1 Imunomarcção.....	97
4.6.2 Aquisição das amostras no citómetro de fluxo.....	98
4.6.2.1 Preparação das células mononucleares.....	98
4.6.2.3 Determinação das subpopulações linfocitárias.....	98
4.6.3 Análise dos resultados.....	98
4.7 Procedimentos estatísticos.....	99
<b>5. Apresentação dos Resultados.....</b>	<b>101</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>139</b>
6.1 Considerações gerais do estudo.....	139
6.2 Discussão dos resultados.....	141
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>175</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>179</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a actividade das enzimas musculares e hepáticas nos momentos pré e pós-prova de triatlo longo.....	105
<b>Figura 2</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a actividade das enzimas musculares e hepáticas nos momentos pré e pós-prova de triatlo olímpico.....	107
<b>Figura 3</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a actividade das enzimas musculares e hepáticas nos momentos pré e pós-prova de triatlo <i>sprint</i> .....	108
<b>Figura 4</b> - Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima CK apresentado pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.....	108
<b>Figura 5</b> - Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima AST apresentado pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.....	109
<b>Figura 6</b> - Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima ALT apresentado pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.....	110
<b>Figura 7</b> - Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima GGT apresentado pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.....	110
<b>Figura 8</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento das subpopulações leucocitárias nos momentos pré e pós-prova de triatlo longo.....	115
<b>Figura 9</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a concentração dos leucócitos totais nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.....	116

<b>Figura 10</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos fenótipos linfocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.....	117
<b>Figura 11</b> - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao efeito da prova de triatlo longo na relação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup> .....	118
<b>Figura 12</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4 <sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.....	119
<b>Figura 13</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8 <sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.....	121
<b>Figura 14</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento das subpopulações leucocitárias nos momentos pré e pós-prova de triatlo olímpico....	122
<b>Figura 15</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a concentração dos leucócitos totais nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.....	123
<b>Figura 16</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos fenótipos linfocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.....	124
<b>Figura 17</b> - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao efeito da prova de triatlo olímpico na relação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup> .....	125

<b>Figura 18</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4 <sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.....	126
<b>Figura 19</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD8 <sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.....	127
<b>Figura 20</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento das subpopulações leucocitárias nos momentos pré e pós-prova de triatlo <i>sprint</i> .....	129
<b>Figura 21</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a concentração dos leucócitos totais nos momentos pré e pós prova de triatlo <i>sprint</i> .....	129
<b>Figura 22</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos fenótipos linfocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo <i>sprint</i> .....	131
<b>Figura 23</b> - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> na relação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> / T CD8 <sup>+</sup> .....	131
<b>Figura 24</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4 <sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo <i>sprint</i> .....	133
<b>Figura 25</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD8 <sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo <i>sprint</i> .....	134



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Características antropométricas, prática desportiva e volumes das cargas de treino relativos aos grupos experimentais participantes da prova de triatlo longo .....	91
<b>Tabela 2</b> – Características antropométricas, prática desportiva e volumes das cargas de treino relativos aos grupos experimentais participantes da prova de triatlo olímpico .....	92
<b>Tabela 3</b> – Características antropométricas, prática desportiva e volumes das cargas de treino relativos aos grupos experimentais participantes da prova de triatlo <i>sprint</i> .....	92
<b>Tabela 4</b> – Identificação dos anticorpos monoclonais utilizados na determinação da imunomarcação .....	97
<b>Tabela 5</b> – Performances dos grupos experimentais de triatletas nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida durante a prova de triatlo longo .....	101
<b>Tabela 6</b> – Correlações entre os segmentos da prova de triatlo longo e o tempo final de prova .....	101
<b>Tabela 7</b> – Performances dos grupos experimentais de triatletas nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida durante a prova de triatlo olímpico .....	102
<b>Tabela 8</b> – Correlações entre os segmentos da prova de triatlo olímpico e o tempo final de prova .....	102
<b>Tabela 9</b> – Performances dos grupos experimentais de triatletas nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida durante a prova de triatlo <i>sprint</i> .....	103
<b>Tabela 10</b> – Correlações entre os segmentos da prova de triatlo <i>sprint</i> e o tempo final de prova .....	104
<b>Tabela 11</b> – Efeito da prova de triatlo longo nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas.....	105
<b>Tabela 12</b> – Efeito da prova de triatlo olímpico nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas.....	106

<b>Tabela 13</b> – Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas.....	107
<b>Tabela 14</b> – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes indicadores eritrocitários dos triatletas.....	111
<b>Tabela 15</b> – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.....	112
<b>Tabela 16</b> – Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes indicadores eritrocitários.....	112
<b>Tabela 17</b> - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.....	113
<b>Tabela 18</b> – Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nos diferentes indicadores eritrocitários.....	113
<b>Tabela 19</b> – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo <i>sprint</i> .....	114
<b>Tabela 20</b> – Efeito da prova de triatlo longo nas diferentes subpopulações leucocitárias.....	115
<b>Tabela 21</b> – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes fenótipos linfocitários.....	116
<b>Tabela 22</b> – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD4 <sup>+</sup> .....	118
<b>Tabela 23</b> – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD8 <sup>+</sup> .....	120
<b>Tabela 24</b> – Efeito da prova de triatlo olímpico nas diferentes subpopulações leucocitárias.....	121
<b>Tabela 25</b> - Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes fenótipos linfocitários.....	123
<b>Tabela 26</b> - Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD4 <sup>+</sup> .....	125
<b>Tabela 27</b> – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD8 <sup>+</sup> .....	126



<b>Tabela 28</b> – Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nas diferentes subpopulações leucocitárias.....	128
<b>Tabela 29</b> – Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nos fenótipos linfocitários.	130
<b>Tabela 30</b> - Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD4 <sup>+</sup> .....	132
<b>Tabela 31</b> – Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD8 <sup>+</sup> .....	133
<b>Tabela 32</b> – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes indicadores de stresse oxidativo.....	135
<b>Tabela 33</b> – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.....	135
<b>Tabela 34</b> – Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes indicadores de stresse oxidativo.....	136
<b>Tabela 35</b> – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.....	136
<b>Tabela 36</b> – Efeito da prova de triatlo <i>sprint</i> nos diferentes indicadores de stresse oxidativo.....	137
<b>Tabela 37</b> – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós prova de triatlo <i>sprint</i> .....	137



## ABREVIATURAS

- ATP** – trifosfato de adenosina
- ALT** – alanina-aminotransferase
- AST** – aspartato-aminotransferase
- AU** – ácido úrico
- CAT** - catalase
- CGR** – concentração de glóbulos rubros
- CHGM** – concentração de hemoglobina globular média
- CK** – creatinaquinase
- ERON** – espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio
- GGT** – gama-glutamyltransferase
- GPx** – glutathione peroxidase
- GSH** – glutathione reduzida
- GSSG** – glutathione oxidada
- Hct** - hematócrito
- HGM** – hemoglobina globular média
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogénio
- Ig** - imunoglobulina
- Lan** – limiar anaeróbio
- MAD** – malondialdeído
- Mb** – mioglobina
- NADH** – dinucleótido de adenina nicotinamida (forma reduzida)
- NADPH** – fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida (forma reduzida)
- NK** – natural killer (linfócitos)
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** anião superóxido
- PMN** – neutrófilo polimorfonucleares
- RDW** – índice de amplitude de distribuição dos eritrócitos
- SOD** – superóxido dismutase
- TBARS** – substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico
- TRAP** – capacidade antioxidante plasmática total
- TAS** – *status* antioxidante total
- VGM** – volume globular médio
- VO<sub>2max</sub>** – consumo máximo de oxigénio



## RESUMO

O objectivo deste estudo foi analisar as alterações bioquímicas agudas induzidas por três diferentes provas de triatlo (Triatlo Longo - TL; Triatlo Olímpico - TO e Triatlo *Sprint* - TS). Foram avaliados os comportamentos de diversos biomarcadores enzimáticos, hematológicos, de stresse oxidativo e da função imune em atletas masculinos de triatlo. A amostra foi constituída por 30 atletas (31,5 ±1,2 anos de idade; 69,3 ±1,9 kg de peso; 177,7 ±1,4 cm de altura; 22,0 ± 0,8 de IMC; 10,1 ± 2,2 %GC), divididos em grupos de 10 atletas por prova, subdivididos em 2 grupos de 5 atletas, de acordo com o nível competitivo (Elite e não-Elite). Foram recolhidas amostras de sangue venoso periférico antes e imediatamente após a realização das respectivas provas. Os procedimentos estatísticos incluíram a média, desvio-padrão, os testes não-paramétricos de Wilcoxon para medidas repetidas e Mann-Whitney para amostras independentes e o coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados foram tratados e analisados nos programas Excel™2000 e SPSS™. Versão 16.0. O nível de significância foi estabelecido em 5%. A prova de TL induziu os aumentos mais pronunciados da actividade da enzima CK e do número de leucócitos circulantes em ambos os grupos experimentais, sendo estes aumentos proporcionais à duração das provas e mais acentuados nos triatletas dos grupos não-Elite. O maior incremento da actividade da enzima AST nos Triatletas não-Elite foi verificado na prova de TL. A prova de TS induziu o maior aumento da actividade da enzima GGT nos triatletas de Elite. Foram verificados aumentos da CGR, Hb, HGM, CHGM e diminuição do VGM nos triatletas de Elite após a prova de TL. Após a prova de TO, foram constatados aumentos da Hb e CHGM nos triatletas de Elite. Foram encontradas, nas provas de TO e TS, diferenças significativas entre os grupos relativamente aos valores basais de Hb e RDW. A prova de TL induziu nos triatletas não-Elite uma diminuição do *ratio* CD4/CD8, sendo também observados aumentos das concentrações dos linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup>reg, TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (p<0.05). Ambos os grupos de triatletas registaram aumentos da concentração de linfócitos TCD4<sup>+</sup>45RO<sup>+</sup> após a prova de TO. Foram constatadas evidências de stresse oxidativo nos triatletas de Elite durante as provas de TL e TS. Ambos os grupos experimentais apresentaram aumentos do TAS na prova de TO e das concentrações plasmáticas de AU na prova de TS (p<0.05). Em conclusão, verificamos que a intensidade e a duração das provas de triatlo condicionam as respostas dos biomarcadores em função do nível de treino dos triatletas.

**Palavras-chave: TRIATLO, ACTIVIDADE ENZIMÁTICA, INDICADORES HEMATOLÓGICOS, SISTEMA IMUNE, STRESSE OXIDATIVO.**



## ABSTRACT

This study's goal was to analyse the acute biochemical changes induced by three different performances of triathlon (Long Distance Triathlon – LDT; Olympic Triathlon – OT and Sprint Triathlon - ST). The behaviour of several enzymatical and haematological biomarkers, of oxidative stress and immune function in triathlon male athletes was assessed. The sample comprised 30 athletes (  $31,5 \pm 1,2$  years old, ;  $63,3 \pm 1,9$  kg weight ;  $177,7 \pm 1,4$  cm height;  $22,0 \pm 0,8$  Body Mass Index ;  $10,1 \pm 2,2$  % Body Fat), divided into 10 athlete's group per performance and subdivided into 2 groups of 5 athletes each according the performing level ( Elite and non Elite). Samples of peripheral venous blood were taken before and immediately after the performances. The statistics procedures included the average and the standard deviation, Wilcoxon non- parametric tests for repeated measures and Mann – Whitney for independent samples and the Spearman's rank correlation coefficient. Excel™2000 and SPSS™ Version 16.0 programs were employed to care and analyse the outcomes. The significative level was established in 5%. The highest raising of Ck enzyme activity and the number of circulating leucocytes in both experimental groups was induced by LDT performance, being these increasing proportional to performance's length of time and higher on Non Elite groups. The AST enzyme highest activity increasing on Non Elite Triathletes was shown on LDT performance. The ST performance induced the highest raising of GGT enzyme on Elite Triathletes. After LDT performance the Elite Triathletes evidenced increasing on CGR, Hb, HGM, CHGM and a shortening on VGM. After the OT performance the Elite Triathletes gave evidence of increasing of Hb and CHGM. Significative differences were found between the groups concerning the base values of Hb and RDW when performing the OT and the ST. The Long Distance Triathlon led to a shortening of CD4/ CD8 *ratio* on Non Elite Triathletes and to an increasing of lymphocyte concentration namely TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup>reg, TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ). Both groups gave evidence of TCD4<sup>+</sup>45RO<sup>+</sup> lymphocyte concentration increasing after the Olympic Triathlon performance. During the LDT and ST performances evidence of oxidative stress were shown among Elite Triathletes. Both experimental groups gave proof of TAS increasing during the OT performance and of Au plasmatic concentrations during the ST ( $p < 0.05$ ). The outcomes show that the intensity and the time length of triathlon performances work as conditioners upon the biomarkers responses concerning the Triathletes training level.

**KEYWORDS: TRIATHLON, ENZYMATIC ACTIVITY, HAEMATOLOGICAL MARKERS, IMMUNE SYSTEM, OXIDATIVE STRESS.**





## RESUMÉ

Le but de cet étude a été d'analyser les changements biochimies aigues induits par trois compétitions différentes de triathlon (Triathlon de Long Distance – TLD ; Triathlon Olympique TO et Triathlon Sprint – TS). Les conduites des distincts biomarqueurs enzymatiques et hématologiques, du stress oxydatif et de la fonction immunitaire des athlètes masculins de triathlon ont été estimés. L'échantillon a été composée par 30 athlètes ( $31,5 \pm 1,2$  ans ;  $69,3 \pm 1,9$  Kg de poids ;  $177,7 \pm 1,4$  cm hauteur ;  $22,0 \pm 0,8$  IMC ;  $10,1 \pm 2,2\%$  GC), divisés en groupes de 10 athlètes par compétition, subdivisés en 2 groupes de 5 athlètes, d'accord avec le niveau compétitive (Élite et non Élite). On a recueillies des échantillons de sang veineux périphérique avant et immédiatement après les compétitions. Les procédés statistiques ont comporté la moyenne, la déviation standard, les tests non – paramétriques de Wilcoxon pour mesures répétitives et Mann – Whitney pour des échantillons indépendantes et le coefficient de corrélation de Spearman. Les résultats ont été soignés et analysés par les programmes Excel™2000 et SPSS™ version 16.0. Le niveau de signification a été établi en 5%. La performance de TLD a provoqué l'augmentation plus prononcée de l'activité de l'enzyme CK et du numéro de leucocytes en circulation en tous deux groupes expérimentaux, en étant ces augmentations proportionnelles à la durée des compétitions et plus intensifiées dans les triathlètes des groupes non Élite. Le plus grand accroissement de l'activité de l'enzyme SAT dans les triathlètes non Élite a été constaté dans la compétition de TLD. La compétition de TS a induite la plus grande augmentation d'activité de l'enzyme GGT dans les triathlètes d'Élite.

Ont été constatés des accroissements de CGR, Hb, HGM, CHGM et diminution du VGM dans les triathlètes d'Élite après la compétition de TLD. Après la compétition de TO, ont été constatés les accroissements de Hb et CHGM dans les triathlètes d'Élite. Ont été trouvées dans les compétitions de TO et TS, des différences importantes entre les groupes, en concernant les valeurs de base de Hb et RDW. La compétition de TLD a provoquée dans les athlètes de Non Élite une décroissance du *ratio* CD4/CD8, en étant aussi visualisés des accroissements dans les concentrations des lymphocytes TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup> reg, TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> et TCD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ). Tous les deux groupes ont enregistré des agrandissements de la concentration de lymphocytes TCD4<sup>+</sup>45RO<sup>+</sup> après la compétition de TO. Ont été constatées des évidences de stress oxydatif dans les triathlètes d'Élite pendant les compétitions de TLD et TS. Tous les deux groupes d'expérimentation ont présenté des accroissements du TAS dans la compétition de TO et des concentrations plasmatiques d'AU dans la compétition de TS ( $p < 0,05$ ). Les résultats obtenus mettent en évidence que l'intensité et la durée des compétitions de triathlon conditionnent les réponses des biomarqueurs en regardant le niveau d'entraînement des triathlètes.

**MOTS- CLEF : TRIATHLON, ACTIVITÉ ENZYMATIQUE, MARQUEURS HÉMATOLOGIQUES, SYSTÈME IMMUN, STRESS OXYDATIF.**



## 1. Introdução

Os sistemas biológicos respondem aos diferentes estímulos provenientes do exercício físico levando a adaptações que se traduzem num incremento da capacidade funcional do atleta. Dentro desta perspectiva, a problemática traduz-se no nível da agressão sofrida pelo organismo, que embora possa apresentar-se transitória, é tanto mais expressiva quanto mais severa for a intensidade do exercício, considerada esta como intensidade propriamente dita ou como duração de uma dada intensidade. A prática do triatlo implica a realização de três diferentes desportos desenvolvidos em regime aeróbio (natação, ciclismo e corrida), podendo por vezes, prolongar-se por mais de 10 horas com intensidades superiores a 65%  $VO_{2max}$  (Cleave et al., 2001; Laursen et al., 2001; Laursen et al., 2002; Neumayr et al., 2002; Basset e Boulay, 2003; Hue et al., 2003). Estudos têm demonstrado que atletas de esforços prolongados apresentam reduções na taxa de concentração de hemoglobina, contagem eritrocitária e hematócrito (Keizer et al., 2005; Noakes et al., 2007). É geralmente aceite, que tais alterações decorram de um desproporcional aumento do volume plasmático relativamente à massa eritrocitária (hemodiluição) em resposta aos treinos contínuos vigorosos (Green et al., 1991). Contudo, baixos valores de hematócrito mostram-se significativamente correlacionados com as melhores prestações em provas de endurance (Pizza et al., 1997; O`Toole et al., 1999; Sawka et al., 2000; Schumacher et al., 2000; Nagao et al., 2002; Mujika et al., 2004; Rietjens et al., 2005; Skenderi et al., 2006), o que valoriza funcionalmente a hemodiluição induzida pelo treino de resistência aeróbia. No entanto, a superior capacidade de utilização metabólica do oxigénio está relacionada com o incremento da produção de espécies reactivas que acentuam o stresse oxidativo (Pallazetti et al., 2003). Neste sentido, tem sido referido por diversos autores que a realização de esforços físicos, particularmente de elevada intensidade, fomenta a formação acrescida de radicais livres de oxigénio, provocando a instalação de um desequilíbrio oxidante/anti-

oxidante que conduz à perda do controlo da respiração mitocondrial, desencadeando alterações funcionais e estruturais das cadeias lipídicas das membranas celulares, resultando no aumento da sua permeabilidade e perda da homeostasia celular (Pollack e Leeuwenburgh, 2000; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Banerjee et al., 2003; Cadenas, 2004; Benard e Rossignol, 2008a).

Actualmente, as provas de triatlo também têm merecido atenção relevante no que concerne ao estudo da performance em função das alterações de diversos biomarcadores, principalmente nas provas do triatlo Ironman (3,8 km/180 km/42,2 km), de forma a possibilitar uma melhor compreensão da relação destes indicadores com importantes variações na função neuromuscular, actividades enzimáticas e respostas hematológicas (Palazzetti et al., 2003; Chenaoui et al. 2004; Kuipers et al., 2005; Armstrong et al., 2007). Adicionalmente, diversos estudos têm sugerido uma relação entre a susceptibilidade aumentada às infecções e a prática regular de exercícios intensos ou competições exaustivas, resultando em alterações significativas nos sistemas endócrino, nervoso e imunológico dos atletas (Moldeveanu et al., 2002; Nemet et al., 2003; Nieman et al., 2004; Gleeson, 2005; Nieman et al., 2005; Finaud, 2006). Estudos realizados com nadadores de elite verificaram um aumento da incidência de infecções nas vias aéreas superiores (IVAS), tendo sido evidenciados, após as provas, aumentos expressivos da concentração leucocitária, expressos principalmente pelo aumento de neutrófilos, acompanhados da redução da concentração de imunoglobulina A (Ig A), para além de alterações na actividade citotóxica das células NK (Shinkai et al., 2003; Ahmed et al., 2004). Contudo, o comportamento dos indicadores bioquímicos, hematológicos e imunológicos parece apresentar uma elevada variabilidade inter-individual em função do nível de treino dos atletas, estando directamente relacionado a especificidade da intensidade e duração do esforço realizado.

Perante os pressupostos apresentados, o propósito central deste estudo foi verificar, em atletas masculinos de triatlo de elevado nível competitivo (Elite) e praticantes regulares (não-Elite), o efeito de diferentes provas de triatlo (Triatlo Longo - TL, Triatlo Olímpico - TO e

Triatlo *Sprint* - TS) na modulação da resposta aguda de diversos biomarcadores enzimáticos, hematológicos, de stresse oxidativo e da função imune, de modo a proporcionar uma melhor compreensão dos distúrbios homeostáticos induzidos pelo exercício físico prolongado e intenso e suas respectivas repercussões sistémicas.

A estrutura do presente estudo inclui a sua divisão em oito capítulos. Deste modo, a fim de distribuir didacticamente cada capítulo da dissertação, seguiu-se a seguinte ordenação e descrição:

Capítulo 1 (Introdução) – Descreve o enquadramento teórico, pressupostos e o propósito da investigação que levaram à realização deste trabalho, referindo a sua pertinência e respectiva estruturação.

Capítulo 2 (Revisão da Literatura) – Descreve de forma detalhada, o enquadramento teórico conceptual da temática, com a definição dos principais conceitos abordados na dissertação relacionados à alteração das diferentes actividades enzimáticas e parâmetros hematológicos induzidos pelo exercício físico de diferentes intensidades e durações, assim como a influência de diferentes esforços na modulação da resposta dos sistemas antioxidante e imune em atletas de diferentes níveis de competição.

Capítulo 3 (Objectivos) – Contempla os objectivos do estudo (geral e os específicos), assim como as variáveis que estão na origem de todo o trabalho prático.

Capítulo 4 (Material e Métodos) – Relata a devida caracterização dos atletas das amostras estudadas, descreve o referido procedimento experimental utilizado na investigação, juntamente com discriminação dos materiais empregados e dos respectivos procedimentos estatísticos adoptados ao longo deste trabalho.

Capítulo 5 (Resultados) - Apresenta de forma didáctica e concisa a descrição dos resultados obtidos nas respectivas provas de triatlo analisadas.

Capítulo 6 (Discussão) – Descreve uma discussão dos principais resultados através da análise e interpretação dos dados, tendo em conta o quadro conceptual de referência da literatura consultada.

Capítulo 7 (Conclusões) – Concretiza a análise de todo o processo de investigação com a apresentação sintética das conclusões do estudo, de forma a responder aos objectivos propostos.

Capítulo 8 (Bibliografia) – Relata a base científica da presente investigação, através das referências bibliográficas consultadas para a realização deste estudo.

## 2.Revisão da Literatura

### 2.1 O exercício físico como modelo indutor da lesão muscular esquelética

É consensual na literatura, que a prática regular do exercício físico de intensidade moderada constitui um importante benefício para o organismo humano (Tricoli, 2001; Yu et al., 2002; Mougios, 2007; Foschini et al., 2008). Contudo, a realização de esforços físicos de elevada intensidade e longa duração podem representar uma importante forma de agressão ao tecido muscular esquelético, perturbando a homeostasia das fibras musculares e provocando o surgimento de lesões musculares caracterizadas por alterações morfológicas mioelulares (Ebbeling e Clarkson, 1989; Fridén e Lieber, 1992; Margaritis et al., 1997; Clarkson et al, 2002).

O aumento da actividade sérica de determinadas proteínas musculares como a creatinaquinase (CK), a desidrogenase láctica (LDH), a mioglobina (MG), a aspartato-aminotransferase (AST) e a presença de fragmentos de cadeia de miosina pesada consequente a realização de esforços físicos, representam indicadores de alteração na permeabilidade da membrana celular, permitindo, ainda que indirectamente, determinar o grau de agressão imposto pelo exercício (Sayers et al., 2000; Clarkson et al, 2002; Mikami et al., 2002; Skenderi et al., 2006; Mougios, 2007; Brancaccio et al., 2007). Adicionalmente, o aumento do volume mitocondrial, a activação das células satélite e dos fibroblastos com evolução para mioblastos, a alteração do padrão estriado das fibras musculares, o surgimento de áreas de necrose segmentar e núcleos centrais, a activação lisossómica e a disrupção e vacuolização sarcoplasmática constituem algumas alterações histológicas musculares induzidas pelos esforços físicos intensos, principalmente aqueles nos quais se verifica uma elevada incidência de contracções excêntricas (Fridén e Lieber, 1992; Duarte, 1993; Lieber e Fridén, 1993; Clarkson e Newham, 1995; Tricoli, 2001; Peake et al, 2005; Liu et al., 2005). Efectivamente, os danos à fibra muscular são atribuídos à desorganização na estrutura das miofibrilas incluindo a ruptura, alargamento ou prolongamento da linha Z (Newhan et al., 1987; Friden e Lieber, 1992). No entanto, tem sido referido que filamentos intermediários como

a desmina sejam igualmente susceptíveis à lesão (Lieber et al., 1996; Friden et al., 1998, 2001). Estas alterações possuem, de uma forma geral, um carácter localizado e reversível, que resulta numa perturbação transitória da homeostasia das fibras musculares (Armstrong et al., 1991; Pedersen e Bruunsgaard, 1995). Neste sentido, alguns autores tem sugerido que a quantidade de fibras lesadas e os diferentes mecanismos de lesão muscular parecem estar relacionados a factores como o tipo e forma de inervação do músculo e as características do exercício realizado (Mac Intyre et al., 1995; Kirolainen et al., 1998). Dentro desta perspectiva, as fibras musculares glicolíticas tipo IIb, presentes nos músculos extensores, se apresentam como as mais susceptíveis à agressão imposta pelo exercício (Kirolainen et al., 1998). O referido padrão de distribuição das lesões, baseado no perfil da fibra muscular, poderá estar relacionado com o carácter selectivo do recrutamento das unidades motoras, durante a realização do exercício físico (Duarte, 1989; Fridén e Lieber, 1992)

A agressão e lesão tecidual induzidas pelo esforço de elevada intensidade promovem uma resposta inflamatória aguda caracterizada por um conjunto de reacções sistémicas humorais, designada de “resposta de fase aguda”, a qual constitui um importante indicador da ocorrência de reacção inflamatória tecidual motivada pelo exercício físico (Cannon et al., 1989; Cannon et al., 1990). Esta infiltração das células inflamatórias, nomeadamente neutrófilos, linfócitos e monócitos (Almekinders e Almekinders, 1992) para o tecido lesado recebe a denominação de “degeneração extrínseca” e tem como função principal a remoção dos agentes agressores, a fagocitose dos detritos resultantes da destruição celular e a preparação dos tecidos para a posterior reparação (Evans e Cannon, 1991; Almekinders e Almekinders, 1992; MacIntyre et al., 1995). Todavia, em resposta a este processo inflamatório, observa-se um agravamento das alterações das estruturas lipídicas e proteicas das células lesadas, acentuando de forma significativa a destruição das fibras musculares, quer pela acção das enzimas proteolíticas e lisossómicas ou através das espécies reactivas de oxigénio libertadas pelos leucócitos (Appell et al., 1992; Lieber et al., 1994).

Paralelamente aos processos de degeneração e as alterações estruturais e ultra-estuturais do tecido muscular esquelético, é possível a constatação de



evidências de lesão muscular a partir de marcadores indirectos, dentre os quais se salientam a sensação retardada de desconforto muscular, redução prolongada da força muscular, diminuição da amplitude articular do movimento e o aumento da actividade e da concentração de determinadas proteínas musculares (Newham et al., 1987; Ebbeling e Clarkson, 1989; Armstrong et al., 1991; Friden e Lieber, 1992; Yu et al., 2002).

## **2.2 Estudo dos biomarcadores enzimáticos**

### **2.2.1 Aumento da actividade e concentração das enzimas séricas**

A prestação de um atleta numa determinada prova pode ser condicionada por uma diversidade de factores. A refinada coordenação neuromuscular, a força e a resistência musculares constituem factores determinantes para o sucesso em provas de endurance (Landers et al., 2000; Spiropoulos e Trakada, 2003; Bentley et al., 2003). Nesta perspectiva, a capacidade de adaptação do tecido muscular ao exercício, expressa através da cinética enzimática, assume relevante importância na performance do atleta, fornecendo importantes indicações do grau de adaptação metabólica e bioquímica do organismo frente às diferentes exigências impostas pelo exercício físico (Nosaka e Clarkson, 1994; Margaritis et al., 1997; Hoffman et al., 2005).

Tem sido frequentemente referido na literatura, o aumento da actividade sérica de proteínas musculares e hepáticas no período subsequente a realização de esforços prolongados e intensos (Padilla et al., 2000; Halson et al., 2002; Wu et al., 2004; Rietjens et al., 2005; Mougios, 2007; Brancaccio et al., 2007).

A difusão de proteínas intracelulares para o espaço extra-celular e conseqüentemente para a circulação sanguínea está relacionada com a perda da integridade do sarcolema e das demais estruturas teciduais em decorrência de agressões metabólicas (Armstrong, 1984; McCully, 1986; Duarte, 1993) e mecânicas (Ebbeling e Clarkson, 1989; Armstrong et al., 1991; Duarte, 1993) induzidas pelo exercício. Adicionalmente, importa referir que de acordo com Armstrong et al. (1991), a elevada temperatura produzida em resposta ao grande número de reacções químicas pode alterar a estrutura proteica e a fluidez da membrana lipídica, conduzindo a modificações iónicas celulares,

comprometendo desta forma o seu funcionamento normal. De acordo com estes mesmos autores, a redução dos níveis de ATP anexos ao sarcolema ou ao retículo sarcoplasmático, constitui também um factor que pode comprometer a homeostasia de determinadas estruturas ao nível da fibra muscular. Assim sendo, os esforços prolongados podem também originar lesões nos grupos musculares solicitados, tendo como precursores a depleção de substrato energético e o aumento da temperatura intramuscular (agressão térmica).

Relativamente a amplitude destas alterações estruturais, factores como a duração e a intensidade do esforço, assim como o tipo predominante de contracção muscular realizada, parecem condicionar a dimensão e variabilidade estrutural e sintomatológica das lesões musculares (Mougios, 2007; Bracaccio et al., 2007). Neste sentido, a realização de esforços físicos exaustivos que evidenciem uma grande incidência de contracções musculares excêntricas constitui uma importante forma de agressão ao tecido muscular esquelético, induzindo nas fibras musculares solicitadas, elevadas tensões de stresse mecânico, comprometendo diversas estruturas, em particular o sarcolema e a membrana do retículo sarcoplasmático (McCully, 1986; Duarte e Soares, 1991; Appell et al., 1992; Friden e Lieber, 1992).

Relativamente a actividade e concentração das proteínas presentes no fígado, salienta-se o facto dos sinusóides hepáticos não possuírem membrana basal e os endotélios apresentarem uma vasta porosidade, o que permite nos casos de alteração hepatocelular e comprometimento dos canais biliares, um aumento dos valores séricos destas proteínas na circulação sanguínea (Giercksky et al., 1999). Esta disposição anatómica apresentada pelo fígado permite, em parte, justificar a ocorrência de uma alteração precoce das concentrações plasmáticas das proteínas hepáticas, podendo em determinados casos, indiciar o surgimento de lesões agudas (Giercksky et al., 1999).

Diversas lesões hepáticas originadas por traumatismos são, na sua grande maioria, cálcio-dependentes e envolvem a interacção com o citocromo P- 450, resultando na formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e metabólitos tóxicos para as células (Nishikawa, 1994; Kedderis, 1996). Estas espécies reactivas, ao se ligarem de forma covalente em determinados pontos da membrana celular dos hepatócitos, promovem a lipoperoxidação, alterando a morfofuncionalidade das mitocôndrias, modificando o cálcio intracelular com a

activação de proteínas catabólicas de efeito celular potencialmente deletério, dentre as quais importa salientar as fosfolipases, ATPases e proteases envolvidas no transporte transmembranar e na síntese de proteínas, necessárias a renovação dos fosfolípidos (Nicotera, 1992; Gincel, 2001). Em resposta a estas alterações, podem ser observados aumentos dos níveis plasmáticos de proteínas como a alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e gama-glutamiltanspeptidase (GGT), as quais constituem importantes marcadores da função hepática.

No entanto, o estado de treino do indivíduo constitui uma das determinantes do tipo e grau de resposta da actividade sérica ao esforço, podendo em decorrência de uma exposição regular e sistemática a determinados estímulos, promover adaptações de carácter duradouro e específico, possibilitando a realização de uma resposta motora mais eficiente, mantendo as condições homeostáticas fundamentais (Nuviala, 1994). Este fenómeno é actualmente referido na literatura como efeito protector da carga repetida (Lieber et al., 2002).

A creatinaquinase (CK), a aspartato-aminotransferase (AST), a alanina-aminotransferase (ALT) e a gama-glutamiltansferase (GGT) são enzimas com actividade nas fibras musculares e nos hepatócitos e têm sido conjuntamente referidas na literatura especializada como indicadores de lesões provocadas pelo exercício físico (Skenderi et al., 2006; Brancaccio et al., 2007; Foschini et al., 2007).

#### 2.2.1.1 Creatinaquinase (CK)

É uma enzima intracelular, catalisadora da formação e degradação da fosfocreatina (CP) nas fases iniciais do exercício, permitindo a ressíntese do ATP consumido pelo mecanismo de contracção muscular (Maughan et al., 2000).

A CK consiste numa proteína globular dimérica composta de duas subunidades (B e M) de peso molecular 43 kDa, e encontra-se presente na parte externa da membrana mitocondrial e nas soluções citosólicas ligada às proteínas contrácteis do sarcómero e apresenta na sua estrutura, três formas isoenzimáticas: a CK-MM, predominante no músculo-esquelético; a CK-MB, forma

híbrida, presente principalmente no músculo cardíaco, considerada como um bom indicador de lesão no miocárdio e a CK-BB, predominante no cérebro, e em pequenas concentrações na bexiga e no estômago (Fredericks et al., 2002).

O aumento da concentração plasmática da enzima CK decorre da alteração na permeabilidade da membrana da célula, sendo considerada um indicador de proteólise muscular relacionada com a intensidade e duração do exercício, apresentando um pico máximo de actividade sérica no período entre 24 e 48 horas após a realização do esforço (Clarkson e Hubal, 2002). De facto, dada a sua elevada dimensão, não se verifica a passagem directa da enzima CK do interstício muscular para o sangue capilar, o que obriga a sua drenagem pela via linfática, justificando desta forma o seu surgimento tardio na circulação sanguínea (Ebbeling e Clarkson, 1989).

O aumento dos níveis da CK pode também dever-se as alterações da membrana da célula muscular, possivelmente devido às reacções de hipoxia e esquema musculares decorrentes do exercício exaustivo ou a perda da homeostasia celular dos iões  $Ca^{+2}$ , desencadeando um processo de auto-destruição das células caracterizado pela lide das miofibrilas e consequente disrupção das mitocôndrias, do sarcolema e do retículo sarcoplasmático, denominado processo de degeneração intrínseca (Armstrong et al., 1991). De acordo com estes autores, as elevadas forças mecânicas, particularmente durante as contracções excêntricas, provocam distúrbios nas proteínas estruturais presentes na célula muscular e no tecido conectivo. Associado a estes factores, os danos estruturais no sarcolema são acompanhados pelo influxo de iões cálcio do interstício para o interior da fibra muscular, resultando numa sobrecarga de cálcio intracelular que precipita uma fase autogénica, onde um aumento na acção de proteases e fosfolipases resulta na degradação das miofibrilas e da membrana celular.

Embora constitua um importante indicador de lesão muscular em resposta ao exercício físico, existe, na opinião de diversos autores, alguma conflitualidade no que respeita a proporcionalidade entre o aumento da concentração plasmática e o grau de severidade da lesão muscular, dada a elevada variabilidade intra e inter-individual observada (Clarkson et al., 1992; Kuipers, 1994, Malm et al. 2000; Raastad e Hallén, 2000). Relativamente a variabilidade

da resposta da enzima CK ao exercício físico, pode-se classificar os indivíduos em *low CK responders* e *high CK responders*, em função da dimensão do aumento apresentado no período pós-esforço (Clarkson et al., 1992). De acordo com estes autores, os indivíduos *low CK responders* não exibem aumentos significativos da actividade plasmática da enzima CK após a realização de esforços físicos, permanecendo os valores no intervalo situado entre 300-500 U.L<sup>-1</sup>, enquanto os denominados *high CK responders* evidenciam aumentos acentuados desta actividade plasmática, registando valores superiores a 2000 U.L<sup>-1</sup>. Importa ainda salientar que conforme postulado pelos referidos autores, esta variabilidade pode estar relacionada com uma maior capacidade de remoção desta enzima pelo sistema retículo-endotelial, evidenciada em determinados indivíduos, que lhes confere uma diminuição mais acentuada desta proteína no plasma.

A resposta da enzima CK ao exercício físico pode também ser condicionada por características biológicas como a idade (Yagi, 1992; Nakagawa et al., 1995; Marzático et al., 1997), massa corporal (Olzewsk e Engeseth, 1985) e sexo (Amelink et al., 1988; Ebbeling e Clarkson, 1989; Northoff et al., 1995), mostrando-se igualmente sensível a factores ambientais como altitude, frio e temperaturas elevadas (Astrand e Rodhal, 1986; Jansen et al., 1989).

A realização de acções musculares excêntricas, comparativamente aos exercícios concêntricos, apresenta uma maior probabilidade de dano muscular, comprometendo a integridade do sarcolema e/ou da membrana do retículo sarcoplasmático, em resposta ao elevado stresse mecânico imposto nas fibras musculares solicitadas, induzindo um aumento da concentração plasmática de proteínas musculares (Clarkson e Hubal, 2002; Mujika et al., 2004). Neste contexto, Fiedler (2006) estudou o comportamento da enzima CK nos diferentes segmentos de uma prova de triatlo olímpico (1,5km/40km/10km), tendo verificado que relativamente aos segmentos de natação e ciclismo precedentes, a corrida evidenciava valores de concentração plasmática mais elevados. De salientar que, em actividades como a natação, onde o impacto directo é praticamente nulo, a libertação de enzimas do tecido muscular esquelético tem sido atribuída à lesão do sarcolema decorrente da indisponibilidade intracelular em gerar ATP para sua ressíntese e manutenção funcionais (Gunderson et al., 1983) ou à acção de agentes agressores,

nomeadamente de radicais livres resultantes da lipoperoxidação induzida pelo exercício físico (Kanter et al., 1988).

A observação de correlações negativas entre os níveis plasmáticos da enzima CK e os esforços físicos realizados sugerem a intensidade como factor determinante na libertação desta proteína intramuscular (Rowbottom et al. 1997; Margaritis et al., 1999). Todavia, outros autores referem o efeito dominante da duração do esforço na actividade enzimática (Noakes, 1987; Driessen-Kletter et al., 1990; Palazzetti et al., 2003; Reid et al., 2004). De facto, num estudo realizado por Niemela et al. (1984) com ultramaratonistas, foi observado que após a estabilização das velocidades de corrida, a elevação dos níveis da enzima CK se relacionava de forma positiva com a extensão da prova, permitindo constatar a influência da duração do esforço na expressão enzimática.

Fallon et al. (1999) estudaram as alterações bioquímicas induzidas por uma prova de ultramaratona de 1600 km de corrida, realizada em 16 dias, tendo verificado que, ao quarta dia de prova, os valores da enzima CK apresentavam aumentos superiores a 1000% quando comparados aos valores pré-esforço ( $2656 \pm 2130$  vs  $123 \pm 64$  U.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Nesta perspectiva, aumentos significativos das concentrações séricas da CK ( $178,1 \pm 17,9$  vs  $43762,2 \pm 6763,9$  U.L<sup>-1</sup>) foram igualmente encontrados por Skenderi et al. (2006) em atletas finalistas da ultramaratona de 246 km, suportando a hipótese da elevação desta proteína ser condicionada principalmente pela duração do esforço e não pelo tempo final de prova, embora estudos relacionados com a velocidade de execução das acções excêntricas sugiram que, acções realizadas com maior velocidade promovam maior grau de danos musculares (Farthing e Chilibec, 2003; Shepstone et al., 2005; Chapman et al., 2006)

#### 2.2.1.2 Aspartato-aminotransferase (AST)

A enzima aspartato-aminotransferase (AST) ou transaminase-glutámico-oxaloacética (TGO) encontra-se distribuída a nível celular pelo citoplasma (20%) e pelas mitocôndrias (80%), estando presente no coração, rins, eritrócitos e principalmente no fígado e no músculo esquelético (Brooks et al., 1995). A enzima AST, assim como as demais aminotransferases, estão

relacionadas a produção de energia e reflectem a integridade dos hepatócitos. Possui uma meia vida sanguínea de 17 horas. Esta enzima catalisa a conversão dos  $\alpha$ -cetoácidos em aminoácidos por transferência de grupos amino:



Assim como a CK, em virtude das suas elevadas dimensões, a enzima AST apresenta uma remoção lenta do tecido lesado para a circulação sanguínea, podendo a sua concentração plasmática ser observada algum tempo após o término do exercício físico (Koutedakis et al., 1993). Entretanto, uma elevada variabilidade na sua resposta frente ao exercício tem sido referida na literatura. De acordo com Margaritis et al. (1999), o treino regular parece atenuar os efeitos provocados pelo exercício físico, diminuindo a expressão das concentrações séricas das enzimas CK e AST.

A elevação da concentração plasmática da enzima AST, juntamente com o aumento das concentrações de mioglobina (MG), fragmentos da cadeia pesada de miosina (MHC), troponina-I, CK total, CK-MB e da enzima lactato-desidrogenase (LDH), em resposta ao exercício físico agudo, tem sido utilizada no diagnóstico de lesões musculares cardíacas e lesão no tecido muscular esquelético (Brown et al., 1997; Shaskey e Green, 2000; Spiropoulos e Trakada, 2003). No entanto, elevados níveis de AST também estão relacionados com uma diversidade de desordens clínicas como hepatite, lesões no parênquima hepático, cirrose, anemia e distrofias musculares (Warburton et al., 2002).

Um estudo realizado por Skenderi et al. (2006) com corredores da ultramaratona observou um aumento de 4726% ( $24,5 \pm 1,9$  vs  $1182,4 \pm 165,1$  U.L<sup>-1</sup>) nos valores referentes a actividade sérica da AST ao final de 246 km de corrida realizados de forma contínua durante o período de 36 horas. De acordo com alguns autores, a actividade da enzima AST modulada pelo exercício físico, constitui um importante indicador de danos no tecido muscular esquelético, evidenciando situações de rabdomiólise induzidas por esforços intensos, enquanto a actividade da enzima alanina-aminotransferase constitui um

marcador mais específico de danos hepáticos (Nuviola et al., 1992; Fallon et al., 1999; Spiropoulos e Trakada, 2003; Smith et al., 2004).

Aumentos dos níveis séricos da enzima AST foram igualmente observados por Bielavsky et al. (2008) em atletas finalistas de uma prova de triatlo longo. Neste estudo foi verificado que, relativamente aos valores séricos da enzima hepática ALT, os atletas evidenciavam uma relação AST/ALT (Quociente DeRitis, 1972) nos períodos pré e pós-prova superior a 1 ( $1,16 \pm 0,40$  e  $1,88 \pm 0,78$ , respectivamente), o que poderia indicar sobrecarga ou a extensão de danos hepáticos. Contudo, a magnitude das alterações na relação AST/ALT não parece ser conclusiva no diagnóstico de resultados de danos hepáticos ou musculares, devido ao facto das respectivas concentrações enzimáticas estarem condicionadas a factores como idade, nível de actividade física e dieta (Dufour et al., 2000; Dufour et al., 2001).

#### 2.2.1.3 Alanina-aminotransferase (ALT)

A enzima alanina-aminotransaminase (ALT) ou transaminase-glutâmico-pirúvica (GPT) constitui um marcador de lesão hepática, especialmente, após a realização de esforços intensos e/ou prolongados (Lutoslawska e Sendekci, 1990; Nagel et al., 1990; Nuviola et al., 1992; Spiropoulos e Trakada, 2003). A enzima ALT catalisa a reacção:



A ALT encontra-se em muito maior concentração no fígado comparativamente ao músculo esquelético, rim e coração, o que pode sugerir a possibilidade de lesão hepática, quando observado um aumento significativo dos níveis plasmáticos desta enzima ( $> 50\text{U.L}^{-1}$ ) (Nagel et al., 1990). Possui uma meia vida sanguínea de 47 horas. No hepatócito, a enzima ALT localiza-se em maior concentração no citoplasma (90%) e também na mitocôndria (10%), podendo em virtude de uma lesão tecidual ou doença que afecte o parênquima hepático, ser libertada em maior quantidade para a circulação sanguínea, elevando desta forma o seu nível plasmático (Ideo, 1972).



A avaliação paralela das enzimas ALT e AST aplica-se, portanto, na distinção entre as lesões do músculo cardíaco ou esquelético e as lesões hepáticas. A razão AST/ALT é utilizada no diagnóstico diferencial das doenças e lesões hepáticas, sendo que a razão  $<1$  indica lesão hepática ligeira, enquanto valores superiores a 1 estão associados a doenças hepáticas mais graves ou crónicas. A função preditora de lesão hepática evidenciada pelo aumento dos níveis séricos da enzima ALT, em resposta ao exercício físico, foi observada por Margaritis et al. (1999) após a realização de uma prova de triatlo longo (4km/120km/30km), onde foi verificado um aumento significativo de 31,9% (26,3 vs 34,7 U.L<sup>-1</sup>) nas concentrações sanguíneas dos atletas. Estes resultados corroboram os estudos de Kanter et al. (1986), Nagel et al. (1990) e Rehrer et al. (1992), com atletas de esforços prolongados, onde foram constatados aumentos significativos das enzimas ALT e GGT, ambas relacionadas a função hepática. Resultados similares foram encontrados por Fallon et al. (1999) em corredores da ultramaratona de Nanango, na Austrália, onde foram observados aumentos estatisticamente relevantes nas concentrações séricas das enzimas CK, AST e ALT no decorrer da prova. De acordo com estes autores, a permanência de elevados valores da enzima ALT, enquanto se observa uma diminuição dos valores referentes as enzimas CK e AST pode constituir um indicativo da ocorrência de danos hepáticos induzidos pelo exercício.

Smith et al. (2004) analisaram os efeitos de uma prova de corrida da maratona em indivíduos treinados, constatando que a expressão das alterações enzimáticas encontrava-se significativamente relacionada com o nível de treino, estando o aumento da actividade plasmática pós-prova da enzima ALT e consequente agressão ao hepatócito mais evidenciados em indivíduos que se apresentavam menos treinados.

#### 2.2.1.4 Gama-glutamyltransferase (GGT)

A actividade da enzima gama-glutamyltransferase (GGT/  $\gamma$ -GT) ou gama-glutamyltranspeptidase, assim como as demais aminotransferases, exerce durante a realização de esforços físicos prolongados, um papel fundamental na manutenção da velocidade das vias glicolítica e oxidativa (Kayashima et al.,

1995; Van Hall et al., 1995). A enzima GGT promove a entrada dos L-aminoácidos na célula, requerendo contudo, a presença do glutationo reduzido (GSH) como co-factor (Van Hall et al., 1995). Desta forma, o L-aminoácido liga-se ao centro activo da enzima GGT na presença da GSH, formando um dipeptido AA-glutamato e cisteinil-glicina:



Embora esteja presente em maior quantidade nas membranas, a enzima GGT é também encontrada no citosol, especialmente nos epitélios dos ductos biliares e renais (Fleisher, 1968). Sua concentração se mostra relativamente elevada nos rins e no pâncreas, apesar de constituir um indicador sensível de doenças obstrutivas hepatobiliares (Witfield, 1972) e de lesões hepáticas agudas motivadas pelos esforços físicos, particularmente de duração intensa e prolongada (Nagel et al., 1990). Esta enzima possui diferentes isoformas, facto que lhe confere uma grande variabilidade do peso molecular (90000 – 350000 daltons). No que respeita a avaliação de doenças hepáticas, a enzima GGT revela-se mais específica que as enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e alcalina-fosfatase (ALP) devido ao facto de não elevar-se nas situações que se evidencie a ocorrência de doenças ósseas e músculo esqueléticas (Szasz, 1969).

De acordo com Lawlor et al. (2005) e Yokoyama et al. (2006), uma taxa reduzida de actividade física está relacionada com níveis plasmáticos mais elevados da enzima GGT, enquanto indivíduos que apresentam uma regularidade da prática desportiva tendem a apresentar um padrão de normalidade na sua concentração, evidenciando desta forma, o carácter protector do exercício físico sobre a função hepática.

Aumentos da actividade sérica da enzima GGT foram observados após a realização de provas de ultra-maratona de 100 km (Nagel et al., 1990), embora permanecendo dentro dos valores normais de referência. Posteriormente, Rehrer et al. (1992) encontraram resultados similares desta actividade enzimática após o término de uma prova de 67 km de corrida, corroborando os

resultados obtidos por Nagel et al. (1992) numa prova de corrida de 1000 km (realizada em 20 dias) e Rama et al. (1994) numa ultra-maratona de 100 km. Fallon et al. (1999) verificaram um aumento significativo da concentração sérica da enzima GGT ao término de uma ultramaratona de corrida, onde comparativamente aos valores de repouso ( $22 \pm 8 \text{ U.L}^{-1}$ ), foram observados no decorrer do quarto, décimo-primeiro e décimo-sexto dia de prova, aumentos da actividade enzimática ( $24 \pm 8$  vs  $26 \pm 7$  vs  $35 \pm 14 \text{ U.L}^{-1}$ , respectivamente) os quais eram sugeridos estarem directamente relacionados à elevada distância percorrida pelos atletas, comprometendo desta forma a integridade dos hepatócitos. Contudo, após uma ultramaratona de corrida de 246 km, Skenderi et al. (2006) verificaram uma actividade enzimática menos sensível da enzima GGT ao esforço intenso ( $32,2 \pm 3,0$  vs  $34,5 \pm 4,4 \text{ U.L}^{-1}$ ) comparativamente a expressão da enzima hepática ALT ( $20,3 \pm 1,6$  vs  $264,1 \pm 36,5 \text{ U.L}^{-1}$ ).

## **2.3 Estudo dos biomarcadores hematológicos**

### **2.3.1 Efeito do exercício aeróbio nos diversos indicadores eritrocitários**

Embora diversos estudos tenham descrito a influência do exercício físico nos diferentes parâmetros hematológicos e, no metabolismo de ferro, em particular, resultados obtidos a partir da análise destas variáveis em diferentes desportos e níveis distintos de performance tem se mostrado conflituais. A realização de esforços físicos prolongados e de elevada intensidade induz um stresse físico e metabólico capaz de promover importantes alterações no perfil hematológico dos atletas participantes de provas de resistência (Trakada e Spiropoulos, 2003; Rietjens et al., 2005; Yusof et al., 2007). Indivíduos treinados em esforços de longa duração (nadadores, ciclistas, maratonistas, ultra-maratonistas, triatletas) buscam constantemente aprimorar as suas performances através da optimização das adaptações fisiológicas induzidas pelas cargas de treino. Neste sentido, a melhoria da capacidade de transporte de oxigénio para o tecido muscular esquelético assume fundamental relevância no metabolismo aeróbio (Saris et al., 1998; Neumayr et al., 2001). Diversos autores referem a constatação de reduções significativas nos valores relacionados a concentração de hemoglobina, ao hematócrito e a contagem

eritrocitária em atletas, independentemente das suas respectivas disciplinas, quando comparados com indivíduos sedentários (Pizza et al., 1997; Sawka et al., 2000; Schumacher et al., 2000; Mujika et al., 2004). De facto, num estudo realizado por Schumacher et al. (2002) em 92 ciclistas masculinos treinados, verificou-se uma diminuição significativa dos níveis séricos referentes a eritrometria, hematócrito e hemoglobina concomitante ao aumento das respectivas cargas de treino. Estas alterações têm sido atribuídas a factores como a hemodiluição acentuada, a desproporção entre a hematopoiese e a ocorrência da hemólise intravascular ou a deficiência/redução de ferro no organismo (O`Toole et al., 1999; Schumacher et al., 2000). Contudo, o comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários em atletas pode mostrar-se conflitual, podendo ser condicionado por diversos factores, entre os quais salientam-se a duração e a intensidade das cargas de treino, o estatuto nutricional e o nível de treino do atleta (Shinkai et al., 1993). No que respeita a intensidade das cargas de treino, Wilkinson et al. (2002) constataram uma redução significativa de 73% dos níveis séricos de ferritina, após submeterem um grupo de 11 ciclistas treinados a um programa de 6 semanas de treino intenso intervalado. Este resultado corrobora o estudo anterior de Nielsen et al. (1998) que estabeleceram evidências de que a realização de esforços físicos de elevada intensidade induz uma diminuição dos níveis séricos de ferritina, aumento da absorção intestinal de ferro e redução das reservas de ferro no fígado e na medula óssea.

Um aumento da massa eritrocitária traduz-se na melhoria da prestação em esforços de carácter aeróbio, visto que os eritrócitos novos apresentam uma maior capacidade de deformação, o que favorece um transporte mais eficiente do oxigénio para o tecido muscular (Schumacher et al., 2002). Neste contexto, Shepley et al. (1992) observaram acréscimos significativos na massa eritrocitária de nadadores treinados, ao final de um período de treino intenso, corroborando os resultados de Van Resburg et al. (1986), Yamamoto et al. (1988) e Nuviala et al. (1992), enquanto Rudzki et al. (1995) e et al. (2003) ao estudarem triatletas competitivos em regime de treino intenso, verificaram apenas um ligeiro aumento dos valores do hematócrito. Entretanto, Reinhart et al. (1993) não encontraram qualquer alteração referente ao hematócrito de corredores de ultra maratona, divergindo dos resultados obtidos por Nagel et al.

(1992) que observaram uma diminuição do hematócrito em corredores de provas de longa duração.

A deformabilidade do eritrócito combinada com o hematócrito, os constituintes plasmáticos e a capacidade de agregação determinam a viscosidade sanguínea (Telford et al., 1994; Smith, 1995). A deformação do eritrócito é influenciada pela fluidez interna, pela relação volume/área da superfície celular e pelas propriedades físicas da membrana, como por exemplo, a composição dos fosfolípidos da membrana (Kamada et al., 1993; Smith, 1995). Um estudo realizado por Smith et al. (1999) com ciclistas treinados constatou que os eritrócitos presentes nestes atletas apresentavam uma maior capacidade de deformação comparativamente aos indivíduos destreinados, sendo também verificada uma menor percentagem de células densas e um volume globular médio (VGM) superior, o que constitui um indicativo de elevada proporção de células jovens (*turnover* eritrocitário). Estes resultados corroboram estudos anteriores efectuados com atletas de diferentes desportos de carácter aeróbio, onde foram verificadas elevadas percentagens de reticulócitos (Mairbaurl et al., 1983; Clark, 1988; Schimidt et al., 1988; Smith, 1995). O aumento dos reticulócitos reflecte, na extensão sanguínea, a policromatofilia, sendo esta condição acompanhada pelo aumento do índice de amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW).

De igual forma, a taxa de concentração de hemoglobina dos atletas pode mostrar-se inalterada (Nuviala, 1992; Rama et al., 1994), aumentada (Lutoslawska e Sendeki, 1990; Shinkai et al., 1993) ou mesmo reduzida (Gonin, 1985).

Schumacher et al. (2002) ao analisarem 851 indivíduos, dos quais 747 atletas de diferentes modalidades e 104 indivíduos fisicamente inactivos encontraram diferenças significativas na contagem eritrocitária, não sendo constatadas no entanto, alterações no que respeita a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e valores do hematócrito.

Um estudo longitudinal realizado por Rietjens et al. (2005) com triatletas treinados na distância olímpica (1,5km/40km/10km) analisou o comportamento dos diversos indicadores eritrocitários, tendo sido verificado que somente a contagem eritrocitária apresentava uma diminuição significativa durante o período competitivo comparativamente aos diferentes períodos de treino. No

entanto, estes autores destacam o facto de 46% dos triatletas avaliados apresentarem valores hematológicos abaixo dos limites inferiores da amplitude normal durante o período não competitivo.

No que concerne à hemodiluição observada em atletas de esforços aeróbios prolongados, caracteriza-se por um desproporcional aumento do volume plasmático relativamente a massa eritrocitária, resultando num estado de anemia relativa denominado pseudo-anemia dilucional (Eichner, 1996). Esta expansão do volume plasmático aumenta o aporte de sangue para o músculo esquelético e promove uma eficiência termoregulatória através do aumento do volume sistólico, embora, possa em resposta a um reduzido valor do hematócrito, limitar a quantidade de oxigénio transportado por unidade de sangue. Adicionalmente, a diminuição na viscosidade do sangue promove um aumento da microcirculação devido a uma menor resistência ao fluxo sanguíneo, o que se traduz numa melhor libertação do oxigénio para o tecido muscular (El-Sayed et al., 2005). A hipervolemia evidenciada em atletas de provas de endurance, por vezes superior a 20%, pode ser atribuída ao aumento dos níveis plasmáticos de renina, aldosterona e vasopressina, como forma de compensação da redução aguda no volume plasmático sanguíneo durante o esforço, e ao aumento da concentração plasmática de albumina, a qual eleva a osmolalidade do sangue, aumentando de forma significativa o volume líquido extracelular (Foss e Keteyian, 2000). O aumento do volume plasmático constitui uma das primeiras adaptações do organismo ao exercício aeróbio intenso, e parece resultar da sobrecompensação induzida pelas repetidas fases de hemoconcentração aguda motivadas pelas cargas de treino (Eichner, 1996). Dentro deste contexto, a eficiência do suprimento de oxigénio se mostra relacionada com diversos factores, dentre os quais o volume sanguíneo e principalmente, a capacidade de transporte de oxigénio, a qual é determinada pela concentração de hemoglobina e a concentração dos eritrócitos circulantes (Szygula, 1990).

### 2.3.1.1 Eritrócito (Góbulos Rubros)

Consiste numa célula anucleada que embora desprovida de organelos como as mitocôndrias, apresenta na sua estrutura citoplasmática todo o aparato

enzimático para efectuar a produção de energia necessária para assegurar a integridade da membrana celular, a manutenção das concentrações iónicas e a conversão do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em ião bicarbonato, prevenindo também, a oxidação da hemoglobina, impedindo a sua conversão numa forma não funcional, a meta hemoglobina (Telen, 1998). O eritrócito, para além de ser responsável por transportar  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ , possui a capacidade de regular a contractilidade vascular através de ciclos de ligação/libertação do óxido nítrico (NO) pela hemoglobina em função das alterações na tensão do oxigénio (Pawloski e Stamler, 2002). A eritropoiese responsável pelo controlo da produção do eritrócito é exercida pela hormona eritropoietina, produzida nas células endoteliais dos rins, que actua na medula óssea, estimulando a proliferação das células progenitoras do eritrócito e suas diferenciações (Sherman et al., 1994). O aumento da massa eritrocitária constitui um indicador importante na melhoria da prestação da performance aeróbia (Schumacher et al., 2002). Tal facto pode decorrer particularmente, da maior concentração de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) presente nos eritrócitos mais jovens, responsável por reduzir a afinidade da hemoglobina pelo oxigénio, deslocando a curva de dissociação da hemoglobina para a direita, permitindo uma maior libertação do oxigénio presente no sangue para os músculos em actividade (Maughan et al., 2000).

Com a destruição do eritrócito, ocorre a libertação da hemoglobina, que ao unir-se à proteína haptoglobina, forma o complexo haptoglobina-hemoglobina. Este complexo, em virtude do seu tamanho, não pode ser filtrado nos rins, sendo por isso transportado para o fígado, onde o ferro presente na hemoglobina será armazenado, enquanto a haptoglobina irá retornar posteriormente para a corrente sanguínea (Mateo e Laínez, 2000; Hawswirth e Lehénaff, 2001). Reduzidos níveis de haptoglobina sérica têm sido observados em atletas de natação e corrida de média e longa distância (Dufaux et al., 1981; Casoni et al., 1985; Selby e Eichner, 1986; Pizza et al., 1997). Entretanto, sob circunstâncias específicas, como no exercício de elevada intensidade, a vida dos eritrócitos pode ser reduzida, sendo esta destruição prematura com origem nos vasos sanguíneos denominada hemólise intravascular (Telford et al, 2003). O conceito de hemólise pode também estar relacionado com a ocorrência de contínuos traumas mecânicos observados durante o impacto dos pés contra o

solo (hemólise por impacto), responsáveis por provocar um enfraquecimento progressivo da membrana de eritrócito, que resulta na origem de uma micro-hemólise acelerada (Kiefer e Snyder, 2000; Mateo e Laínez, 2000; Hawsswirth e Lehénaff, 2001) que pode ser observada com frequência na intensificação dos treinos de corrida de longa distância (Fallon e Bishop, 2007). Adicionalmente, factores como o aumento da temperatura corporal, a acidose metabólica ou aumento das catecolaminas circulantes podem contribuir para a ocorrência de hemólise (Mateo e Laínez, 2000, Shaskey e Green, 2000). Neste contexto, diversos estudos tem analisado o aumento expressivo do *turnover* eritrocitário em desportos classificados como de baixo impacto (i.e., natação, ciclismo) relacionando a ocorrência da hemólise intravascular a outros factores como a presença de lisolecitina, libertada para o baço durante a realização do exercício, que aumenta a fragilidade osmótica do eritrócito (Weight et al., 1991) ou a ocorrência da chamada microturbulência do fluxo sanguíneo nos músculos em actividade (Selby e Eichner, 1986). Danos na membrana do eritrócito podem causar deterioração da capacidade de deformação e aumento da rigidez, o que conduz a ocorrência de hemólise (Kiefer e Snyder, 2000). A modificação de proteínas presentes na superfície do citoplasma dos eritrócitos, como a espectrina, responsável pelas propriedades e deformabilidade e estabilidade, parece resultar num aumento da susceptibilidade à hemólise, principalmente em resposta a realização de esforços prolongados como as corridas de maratona e ultramaratona (Altmann et al., 2002; Yusof et al., 2007). De acordo com estes autores, a hemólise induzida pelo exercício físico prolongado ocorre particularmente nas fases iniciais de esforços, onde são preferencialmente removidos da circulação, os eritrócitos mais maduros que apresentam uma maior fragilidade das membranas.

Níveis reduzidos de haptoglobina têm sido igualmente encontrados em ciclistas de Elite durante o início da época desportiva, provavelmente em resposta a destruição dos eritrócitos maduros (Chatard et al., 1999). Corroborando estes resultados, Guglielmini et al. (1999) referem que a hemólise intravascular pode estar associada com a diminuição significativa da eritropoiese em ciclista profissionais que perfazem volumes de treino médios de 30.000km por ano, o que resulta em valores reduzidos de hemoglobina.



Tem sido sugerido por alguns autores, que o aumento da contagem eritrocitária observado em nadadores e triatletas, durante o período pré-competitivo, pode estar relacionado a redução dos volumes de treino (*tapering*), promovendo desta forma, um aumento da eritropoiese em relação a hemólise intravascular (Neufer, 1989; Houmard, 1991; Houmard, 1994; Mujika e Padilla, 1997; Mujika e Padilla, 2003). Em conformidade com estes resultados, Mujika et al. (2000) observaram um aumento significativo de 40% na contagem dos reticulócitos em atletas de corrida de fundo, após um período de *taper* de 1 semana. Este aumento dos reticulócitos na circulação sanguínea expressa uma maior libertação de eritrócitos imaturos, os quais apresentam reduzidos conteúdos de hemoglobina e reduzidos valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) (Mairbaur et al., 1983; Brodthagen et al., 1985; Seiler et al., 1989).

Um balanço positivo na produção eritrocitária pode também ser evidenciado através do aumento da haptoglobina sérica, uma importante glicoproteína relacionada com a conservação do ferro no organismo e com a diminuição da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), tendo em vista que, uma elevada amplitude de distribuição têm sido associada com uma reduzida capacidade de deformação, reduzida resistência osmótica e aumentada fragmentação do eritrócito (Bessman et al., 1983; Kaiser et al., 1989).

#### 2.3.1.2 Hematócrito (Hct)

Um valor reduzido do hematócrito pode representar uma adaptação crónica induzida pela realização de esforços prolongados em resposta ao treino de resistência. (Weight, 1999). Esta suposição é confirmada por O`Toole et al. (1999), que ao analisarem atletas de triatlo de diferentes distâncias (triatlo *sprint*, triatlo olímpico e triatlo longo), constataram que quanto maior a duração da prova, menor era o valor médio referente ao hematócrito dos triatletas (45,0%, 43,4% e 42,5%, respectivamente), corroborando os resultados obtidos por Eichner (1988) e Convertino (1991), nos quais se sugeriu que, a magnitude da expansão do volume plasmático estava relacionada com a prática regular do treino de resistência, mostrando também, uma elevada correlação com o consumo máximo de oxigénio ( $VO_2max$ ).

Efectivamente, os níveis de hematócrito são influenciados por diversos factores externos, principalmente através do modo, intensidade e duração do exercício (Neuhaus e Gaehtgens, 1994; Parisotto et al., 2000). O valor óptimo do hematócrito para os atletas de provas de resistência se mostra dependente da relação entre a capacidade de transporte de oxigénio e a viscosidade sanguínea (Kujala et al., 2000). É geralmente aceite, que elevados valores do hematócrito consubstanciam na melhoria das performances em esforços aeróbios. Contudo, quando estes valores se mostram exponencialmente elevados (acima de 50%), verifica-se um aumento significativo da viscosidade sanguínea e da resistência periférica total (Pate, 1983; Simon, 1994). Neste sentido, alguns estudos demonstram que valores do hematócrito superiores a 55% estão associados a ocorrência de reacções adversas como a trombocitose induzida pela hiperviscosidade, deterioração da circulação sanguínea com resultante hipoxia tecidual, embolia pulmonar, enfarto do miocárdio e encefalopatias (Simon, 1994; Selby e Eichener, 1994; El-Sayed et al., 2005).

Um estudo realizado por Rodrigues dos Santos (2002) investigou os efeitos de um intenso programa de treino de corrida de 17 semanas nos diversos parâmetros hematológicos de atletas treinados, onde foi verificada uma diminuição média de 5.2% no valor do hematócrito dos atletas ao término do período de treino. Entretanto, Cameron et al. (2006) estudaram as respostas hematológicas em um grupo de atletas corredores de fundo, durante o período pré-competitivo, verificando um aumento médio de 9% nos valores referentes ao hematócrito.

O aumento do hematócrito eleva a viscosidade sanguínea, que associada ao comprimento do vaso sanguíneo exerce potencial influência na resistência ao fluxo sanguíneo, principalmente nas arteríolas, onde se verifica uma redução da pressão arterial média em torno de 70 a 80% (Powers e Howley, 2007).

#### 2.3.1.3 Hemoglobina (Hb)

Consiste numa proteína globular conjugada, presente no eritrócito, formada por 4 cadeias polipeptídicas (globina) e 4 grupos heme (ferro em seu estado ferroso –  $Fe^{2+}$ ), tendo por função principal, a fixação e transporte do oxigénio na circulação sanguínea (Foss e Keteyian, 2000). A concentração média do

conteúdo de hemoglobina presente no sangue, em indivíduos masculinos, situa-se entre 14 e 18g/dl (Sherman et al., 1994), sendo sugerido um estado de anemia, quando a concentração se mostra expressivamente reduzida ( $\leq 12$ g/dl). Esta anemia pode resultar de uma baixa produção, perda ou destruição dos eritrócitos, causadas por factores externos adversos, como por exemplo, um exercício físico de elevada intensidade e/ou duração prolongada (Escanero et al., 1997). Reduzidos valores de concentração de hemoglobina, principalmente em atletas de esforços prolongados, podem ser atribuídos entre outros factores, a uma diminuição da eritropoiese causada por uma deficiência latente de ferro no organismo, que pode resultar numa diminuição da performance aeróbia do atleta (Hinton et al., 2000; Horton e Levin, 2001; Haas e Brownlie, 2001). Adicionalmente, a combinação da hemoglobina com as moléculas de óxido nítrico, forma através de uma ligação com o ião ferro, a nitro-hemoglobina, que contribui para a diminuição dos valores de hemoglobina (Kruzsina et al., 1998; Chawla-Sakar et al., 2003).

Factores como a demanda energética e a produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}^+$  exercem uma influência significativa no processo de libertação de oxigénio para as células musculares (Guyton e Hall, 1998; Maughan et al., 2000). Neste sentido, importa referir a participação da hemoglobina na remoção de iões hidrogénio e moléculas de dióxido de carbono resultantes do processo de respiração celular. Desta forma, o aumento da concentração de hemoglobina contribui positivamente para cinética do oxigénio durante o exercício aeróbio (Saad et al., 2002).

A redução da eritropoiese é acompanhada por uma queda da concentração de ferritina, como consequência da perda aumentada de ferro e/ou diminuição na sua produção, reflectindo desta forma, em baixas reservas plasmáticas de ferro (Escanero et al., 1997). De acordo com Murray et al. (1990), em situações fisiológicas, um sujeito adulto destrói por hora 1 a  $2 \times 10^8$  eritrócitos, o que resulta num *turnover* diário de aproximadamente 6g de hemoglobina. No que respeita à saturação da hemoglobina, pode ser condicionada por factores como a pressão parcial de oxigénio ( $\text{pO}_2$ ), pH, a temperatura, a pressão parcial de dióxido de carbono ( $\text{pCO}_2$ ) e a concentração de 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) (Maughan et al., 2000). Os atletas de esforços prolongados apresentam normalmente, níveis inferiores de saturação de hemoglobina comparativamente

aos demais atletas e sedentários, estando este facto em concordância com uma menor percentagem na concentração de hemoglobina presente nestes atletas, determinando assim, um menor conteúdo arterial de oxigénio. Relativamente ao processo de distribuição do oxigénio, a hemoglobina contida nos eritrócitos do sangue arterial encontra-se com aproximadamente 96% de saturação pelo oxigénio, enquanto no sangue venoso, esta saturação é de 64%, o que resulta numa diferença de pressão de aproximadamente 32%.

A presença de hemoglobina na urina (hemoglobinúria) pode resultar de um esgotamento das reservas de haptoglobina, não permitindo a formação do complexo haptoglobina-hemoglobina livre e posterior transporte da hemoglobina aos hepatócitos ou de uma situação de anemia por deficiência de ferro (O`Neil et al., 1986). A hemoglobinúria ocorre frequentemente no período de uma a três horas após a realização do exercício, enquanto a mioglobinúria (presença de mioglobina na urina) é detectada posteriormente, no período de 24 a 48 horas à seguir a realização do esforço e parece resultar de alterações nas fibras musculares motivadas por esforços intensos, promovendo um aumento da mioglobina plasmática, que devido ao facto de apresentar reduzido peso molecular, é facilmente filtrada pelo glomérulo (Abarbanel et al., 1990).

#### 2.3.1.4 Volume Globular Médio (VGM)

O volume globular médio (VGM) é definido pelo quociente entre o hematócrito (Hct) e a concentração eritrocitária, expresso em fentolitros (fl), constituindo um importante indicador de diagnóstico da anemia, permitindo a diferenciação das situações de anemia microcítica (VGM<80fl), provavelmente de origem ferropénica e a anemia macrocítica (megaloblástica), evidenciada pelo aumento expressivo do tamanho dos eritrócitos devido principalmente, a carência de ácido fólico ou vitamina B<sub>12</sub> (VGM > 100fl) (Aguilar, 2002).

Os valores normais do VGM estão compreendidos entre 80 e 100fl, podendo, no entanto, sofrer alterações por distorções de forma e aglutinação eritrocitária. De acordo com Eichner (1988), a hemólise plantar representa um fenómeno relacionado com o treino de corrida de duração, conduzindo à designada “macrocitose do corredor”, na qual a destruição de eritrócitos maduros promove uma reticulose compensatória.

A diminuição do VGM pós-exercício sugere uma redução do volume eritrocitário e do hematócrito, que pode estar relacionada com o aumento do volume de água no plasma (Magalhães, 2000). Esta diminuição do volume corpuscular médio se mostra fortemente correlacionada com o aumento da sensação de desconforto muscular ( $r=0.83$ ), que juntamente com o aumento da actividade plasmática e concentração de determinadas proteínas musculares, constituem importantes indicadores de lesão muscular (Schwane et al., 2000; Raastad Hallén, 2000).

#### 2.3.1.5 Hemoglobina Globular Média (HGM)

O valor médio do conteúdo de hemoglobina por eritrócito é definido como hemoglobina corpuscular média (HGM) e reflecte o quociente entre a concentração de hemoglobina (Hb) e a concentração dos eritrócitos, expresso em picogramas (pg). A HGM constitui assim, um indicador hematológico essencial, podendo apresentar-se elevada em situações de macrocitose e diminuída onde se verifique a presença de eritrócitos microcíticos.

Valores normais da HGM oscilam entre  $30 \pm 3$  pg, não podendo contudo, permitir por si só, a conclusão de hipocromia ( $HCM < 30$  pg) ou normocromia ( $HCM = 27-33$  pg). Segundo Rietjens et al. (2001), factores como o período de treino e o tipo de exercício podem condicionar os valores referentes a HGM.

De acordo com estes autores, foi verificado que comparativamente ao período de transição, o período de treino específico evidenciou um aumento do valor médio de HCM ( $1,83 \pm 0,11$  vs  $1,87 \pm 0,11$  fmol) sendo este valor inferior a média obtida no decorrer do período competitivo ( $1,87 \pm 0,11$  vs  $1,90 \pm 0,13$  fmol).

De forma a analisar o efeito agudo do exercício físico intenso e prolongado, nos diferentes parâmetros hematológicos, Yusof et al. (2007) encontraram num grupo de corredores participantes de uma ultramaratona (216 km) aumentos significativos nos valores referentes a HGM.

### 2.3.1.6 Concentração da Hemoglobina Globular Média (CHGM)

A concentração da hemoglobina globular média (CHGM) corresponde ao quociente entre a concentração de hemoglobina (Hb) por litro de eritrócitos (isento de plasma) e o hematócrito (Hct), permitindo assim, a avaliação do grau de saturação de hemoglobina no eritrócito. A saturação da hemoglobina normal indica a presença de eritrócitos normocrómicos (CHGM=31-36%), enquanto ao apresentar-se diminuída (CHGM <30%), evidencia a presença de eritrócitos denominados hipocrómicos. De acordo com Crespilho et al. (2006), o desequilíbrio na relação eritrócito/hemoglobina observado após a realização de exercícios físicos intensos, pode apresentar uma relação directa com a lesão de eritrócitos e concomitante libertação da hemoglobina do interior da célula lesada.

A observação de um aumento significativo na CHGM após a realização do exercício sugere uma saída de água dos eritrócitos para o plasma, aumentando assim, o gradiente de concentração da hemoglobina no interior dos eritrócitos (Magalhães, 2000). Este mesmo autor refere que, o aumento da CHGM pós-exercício apresentou uma correlação significativa ( $r=0.52$ ) com a sensação de dor e desconforto muscular, provavelmente decorrentes das agressões mecânicas e metabólicas induzidas pelo exercício físico agudo.

### 2.3.1.7 Índice de Anisocitose Eritrocitária (RDW)

O RDW (Red blood cell Distribution Width) é o índice que analisa a heterogeneidade de distribuição do volume dos eritrócitos. O RDW reflecte de forma mais objectiva, o coeficiente de variação do volume dos eritrócitos e pode ser considerado um índice de heterogeneidade, equivalente à anisocitose observada no esfregaço sanguíneo. A amplitude de distribuição dos eritrócitos pode mostrar-se precocemente alterada numa situação onde se verifique a deficiência de ferro no organismo (Oppenheimer, 2001). Seu valor normal situa-se no intervalo entre 11,5 e 14,5%. O RDW é analisado em associação com volume globular médio (VGM) do eritrócito e auxilia na conclusão de diagnósticos referenciais da anemia ferropriva, onde se verificam valores de RDW maiores comparativamente aos casos de talassemias menores, que

evidenciam eritrócitos microcíticos em resposta a uma síntese deficiente de cadeias globulínicas, o que torna os valores do RDW relativamente constantes (Aslan et al., 2002; Trent, 2006). De acordo com Jayarane e Sthaneshwar (2006) o RDW pode também contribuir de forma significativa na diferenciação das anemias microcíticas e hipocrómicas. Acresça-se que, de acordo com Dusse et al. (2008), o aporte intermitente de ferro à medula óssea, reflexo da progressiva redução das reservas de ferro do organismo e da ingestão deficiente, durante dias sucessivos, pode igualmente corroborar para uma anisocitose aumentada.

Elevados valores de RDW evidenciados por atletas de esforços prolongados como os maratonistas e ultramaratonistas podem ser indicativos de uma aumentada fragmentação mecânica ou uma diminuição da capacidade de deformação e resistência osmótica do eritrócito (Bessman et al., 1983; Galea e Davidson, 1985).

Kaiser et al. (1989) verificaram um aumento significativo dos valores basais referentes ao RDW de indivíduos submetidos a um período prolongado de treinos intensos para uma corrida da maratona. Importa referir que, conforme postulado pelos autores, durante o período inicial de treino, foi observada uma diminuição dos respectivos valores, o que caracteriza uma maior homogeneidade da população eritrocitária. No entanto, em resposta as intensas cargas de treino presentes no período específico, foi constatado um aumento notório dos valores basais, expresso numa maior amplitude de distribuição destas células.

## **2.4 Estudo dos biomarcadores da função imune**

### **2.4.1 Sistema Imune: considerações gerais**

O sistema imunológico compreende um conjunto de respostas complexas, no qual estão integradas diversas células, órgãos com características específicas, tecido linfóide e múltiplos factores solúveis, que actuam de forma determinante na protecção, ataque e destruição de microrganismos ou macromoléculas estranhas ao organismo (Schulenberg et al., 2004; Gleeson, 2005). Este sistema organizado dos mecanismos de defesa do organismo denominado

imunidade, pode ser sistematizado em duas formas funcionais de resposta: a resposta imunológica inata – caracterizada por responder aos estímulos de forma não específica. Constitui a primeira linha de defesa do organismo, compreendendo componentes celulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos/macrófagos e células *natural killer* e factores solúveis (sistema do complemento, proteínas de fase aguda e diversas enzimas); e a resposta imunológica adquirida – também designada por resposta imunológica específica, apresenta uma elevada variabilidade sendo definida por responder ao estímulo de modo específico, apresentando memória e reagindo de forma direccionada para determinado patógeno específico. De forma similar a resposta inata, a resposta adquirida dá-se pela imunidade celular, mediada pelos linfócitos T, pelos linfócitos B e pelos factores humorais, através das imunoglobulinas (Ig) (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Gleeson, 2006).

Os leucócitos, presentes no sangue periférico com uma concentração de  $7 \times 10^3$  /mm<sup>3</sup>, são as células responsáveis por mediar as respostas imunológicas, e derivam de um precursor comum, a célula estaminal hematopoiética, a partir da qual, serão originados pela linhagem mielóide, os granulócitos (neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos) e os monócitos, enquanto a linhagem linfóide será responsável por dar origem aos linfócitos T, linfócitos B e as células *natural killer* (Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994; Crivellato et al., 2004). Os leucócitos exibem proteínas específicas na sua superfície celular responsáveis pelas funções de identificação e origem. Estas proteínas celulares possuem diversas funções relacionadas com a adesão de moléculas, sendo a sua identificação caracterizada pelo uso internacional do prefixo CD (*Cluster of Differentiation*) (Mackinnon, 1999).

Os granulócitos compreendem as células de linhagem mielóide, com origem no mieloblasto, e representam 60 a 70% dos leucócitos circulantes, dos quais 90% são neutrófilos, 2 a 5% eosinófilos e 0,2% basófilos (Gleeson, 2006). Após a sua libertação da medula óssea, os neutrófilos polimorfonucleares possuem um tempo de vida de 4 a 8 horas na corrente sanguínea e de 4 a 5 dias nos tecidos, embora, esse tempo de vida se mostre reduzido em situações de infecção grave nos tecidos (Guyton, 2002). Os neutrófilos apresentam-se como células fagocíticas, capazes de realizar um processo de endocitose, no qual ocorre a captura e ingestão de partículas de material estranho ao organismo, incluindo



as bactérias e outros microrganismos patogénicos (Mackinnon, 1999). Estudos realizados com atletas de corrida e de ciclismo verificaram significativos aumentos na contagem dos neutrófilos (375% e 349%, respectivamente) após esforços competitivos (Gmunder et al., 1988; Berk et al., 1990).

#### 2.4.1.1 Neutrófilos

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) apresentam elevada actividade fagocítica, sendo capazes de reconhecer, aderir e engolir bactérias e outros microrganismos patogénicos, eliminando-os através do conteúdo presente nos seus grânulos citoplasmáticos (desgranulação) (Pyne, 1994). Os PMN, na sua grande maioria, encontram-se marginados ao endotélio de pequenos vasos, podendo ser mobilizados durante infecções ou diferentes tipos de inflamações (Schulenburg et al., 2004). São células sensíveis a factores quimiotácticos libertados por leucócitos, (macrofágos, basófilos e mastócitos, assim como a activação do sistema do complemento (Mabott, 2004), actuando também como mediadores de lesões teciduais durante o processo inflamatório através da libertação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e outros factores tóxicos (Pyne et al., 1996).

Evidências morfológicas comprovam a libertação de neutrófilos imaturos pela medula óssea em atletas de endurance durante períodos de treinos intensos ou competitivos, sugerindo assim, um aumento da renovação destas células (Keen et al., 1995; Blannin et al., 1996). Após a realização de um exercício físico, verifica-se um aumento do número de neutrófilos circulantes, estando a persistência destas alterações, relacionada com a intensidade e a duração do esforço (Bury e Pirnay, 1995, Suzuki et al., 1996).

De acordo com Gray et al. (1993) e Nieman et al. (1995e), quanto mais intenso for o exercício físico, maior será o aumento do número de neutrófilos (neutrofilia). Entretanto, a continuidade do treino de endurance, principalmente os treinos de elevada intensidade, parece reduzir a extensão da mobilização dos neutrófilos, possivelmente através da diminuição das respostas hormonais relacionadas ao esforço (Pyne et al., 1994; Pyne et al., 1995). Esta mobilização efectiva dos neutrófilos em resposta ao exercício envolve uma complexa série de acontecimentos que consiste na sua migração para o local afectado em

resposta aos factores quimiotácticos; aderência ao endotélio vascular e diapedese através da parede dos vasos, libertação de enzimas proteolíticas pelos grânulos intercelulares (elastase e mieloperoxidase) e produção espécies reactivas oxigénio (Mackinnon, 1999).

#### 2.4.1.2 Eosinófilos

Os eosinófilos presentes nas mucosas, tecidos e circulação periférica, apresentam reduzida actividade fagocítica, actuando principalmente na produção de espécies reactivas de oxigénio e na desgranulação sobre parasitas (helmintos), sendo esta acção activada pela imunoglobulina G (IgG), podendo também, participar nos mecanismos associados as reacções alérgicas e asma (Nieman et al., 2005). Embora na literatura não sejam evidenciadas alterações expressivas nesta subpopulação leucocitária em resposta aos diferentes esforços físicos realizados, foram detectadas reduções na concentração sanguínea no período subsequente (60 minutos) a realização de exercícios de carácter aeróbio, podendo esta diminuição ser justificada por uma progressiva remarginação e posterior infiltração destas células para os tecidos lesados (Magalhães, 2000).

#### 2.4.1.3 Basófilos e Mástócitos

Os basófilos, presentes na circulação sanguínea, actuam no mecanismo de resposta inflamatória (secreção de histamina) e estão envolvidos na eliminação de parasitas, principalmente em determinadas reacções alérgicas, onde apresentam afinidade com a IgE actuante em respostas alérgicas e anafilácticas (Guyton & Hall, 2006). Os mastócitos, presentes nos tecidos, actuam como células efectoras nas respostas alérgicas, constituindo um importante componente da imunidade inata (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000), fagocitando microrganismos e produzindo mediadores inflamatórios como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), leucotrieno B4 e histamina (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Gleeson, 2005).

#### 2.4.1.4 Monócitos e Macrófagos

Os monócitos (CD4, CD11) são células mononucleares fagocíticas presentes no sangue periférico, que após migrarem para os tecidos, se diferenciam em macrófagos (Mackinnon, 1999). Os macrófagos (CD16) apresentam elevada actividade anti-tumoral e microbicida, capacidade de aderência, quimiotaxia e produção de ERO ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , HOCl), manifestando uma função celular acessória como células apresentadoras de antigénio e constituindo uma fonte de citocinas mediadoras das diversas reacções inflamatórias (Adams e Hamilton, 1992; Mackinnon, 1999; Boscolo et al., 2004). Os macrófagos encontram-se presentes em diversos tecidos e órgãos, recebendo em conformidade com o aspecto morfológico e a localização, diferentes denominações (macrófagos alveolares-pulmão, células de Kupffer-fígado, células mesangiais-rins, células microgliais-sistema nervoso, histiócitos-tecido conjuntivo) (Newsholme e Costa Rosa, 1996). São células reguladas pelos linfócitos T e B, pelos mediadores químicos produzidos pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (Adams & Hamilton, 1992).

Tem sido referido por alguns autores, que períodos prolongados de esforços físicos intensos parecem diminuir a expressão dos receptores “Toll-Like” (TLRs) presentes em determinadas células, e nos monócitos em particular, incapacitando a sua função de apresentação de antigénios para o reconhecimento de patogénios e controlo da activação da resposta imunológica adaptativa (Nagler-Anderson, 2001; Medzhitov, 2001). Esta hipótese é corroborada por Lancaster et al. (2005), que verificaram uma diminuição significativa da expressão dos TLRs 1, 2 e 4 nos monócitos de indivíduos submetidos a 90 minutos de exercício em cicloergómetro a 65%  $VO_{2max}$ .

Os TLRs expressos pelos monócitos regulam a produção de diversas citocinas, dentre as quais as interleucinas IL-6, IL-8 e IL-12 e o factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), assim como a expressão de moléculas acessórias CD80 e CD86 e proteínas do complexo major de histocompatibilidade classe II (MHC II), as quais são requeridas para a activação dos linfócitos T naive (Gleeson, 2006).

Estudos para a determinação dos efeitos do exercício físico aeróbio na funcionalidade e actividade de monócitos e macrófagos tem se mostrado

inconclusivos. Neste sentido, dados conflituais tem evidenciado reduções, aumentos e ausência de alterações na funcionalidade destas células em resposta a realização de esforços físicos de diferentes intensidades e durações (McCarthy e Dale, 1988; Verde, 1992, Keast e Morton, 1992; Asselin et al., 1996; Bagby et al., 1996). Relativamente a contagem de monócitos pós-esforço, tem sido mostrado que após a realização de esforços curtos e exaustivos, verifica-se um aumento dos monócitos circulantes de aproximadamente 90% (Bieger et al., 1980; Field et al., 1991). No entanto, outros autores sugerem que a monocitose induzida pelo exercício parece não ser significativamente influenciada pela intensidade do esforço (Gabriel et al., 1992a). De acordo com Tvede et al. (1989), verifica-se um aumento da actividade dos macrófagos no período subsequente (duas horas) a realização de exercícios físicos moderados.

Simonson e Jackson (2004) observaram um aumento significativo da população de monócitos em indivíduos destreinados, após a realização de uma sessão de treino de força ( 3 séries de 10 repetições - 75% 1RM). Estudos realizados por Evans e Cannon (1991) sugerem que os monócitos, assim como os neutrófilos, não retornam para a circulação ao término do período de esforço. De acordo com os referidos autores, estas células após atraídas, permanecem no tecido muscular lesado pelo exercício como parte da resposta de fase aguda. De facto, estudos tem referido a ocorrência de uma elevada concentração de monócitos no período entre 1 a 7 dias após a realização do exercício (Cormak, 1987; Cannon et al., 1989; Evans e Cannon, 1991).

#### 2.4.1.5 Linfócitos

Os linfócitos correspondem a 20-25% dos leucócitos circulantes com uma concentração de  $1.5$  a  $3.0 \times 10^9/L$  (Gleeson, 2006). Participam na resposta imunológica adquirida, sendo diferenciados quanto à razão núcleo/citoplasma e a presença ou não de grânulos citoplasmáticos (Hames e Glover, 1996) e classificados de acordo com a presença dos marcadores de membrana, locais de maturação e reacções a estímulos (Hames e Glover, 1996). Quando a maturação ocorre no Timo, os linfócitos adquirem características específicas transformando-se em linfócitos T ( $CD3^+$ ), expressando marcadores de

antígeno de superfície CD4<sup>+</sup>, designados por linfócitos “auxiliares” ou CD8<sup>+</sup> denominados linfócitos “citotóxicos” (Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994).

Os linfócitos T CD3<sup>+</sup> representam 60-75% dos linfócitos presentes no sangue periférico e embora não possuam a capacidade de sintetizar imunoglobulinas (anticorpos), sendo esta uma característica dos linfócitos B amadurecidos na medula óssea, actuam como moduladores da resposta imunológica mediada por células, interagindo com os macrófagos e as células dendríticas (Adams e Hamilton, 1992; Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994). Uma vez alcançados os órgãos linfóides secundários/periféricos (baço, linfonodos, tecido linfóide associado às mucosas), os linfócitos T proliferam-se e posteriormente, em resposta ao estímulo antigénico, completam a sua diferenciação podendo ser classificados como linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos ou linfócitos T reguladores e linfócitos T memória. (Janeway et al., 2007).

#### 2.4.1.5.1 Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

Os linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> representam 60-70% dos linfócitos presentes no sangue periférico e podem ser diferenciados, através do processo de polarização, em linfócitos T CD4<sup>+</sup> tipo 1 (Th<sub>1</sub>) ou T CD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th<sub>2</sub>), de acordo com as citocinas produzidas e libertadas (Ostrowski et al., 1998; Mackinnon, 1999). As células T CD4<sup>+</sup> Th<sub>1</sub> assumem um importante papel na defesa contra patógenos intracelulares, actuando na regulação das respostas celulares, sintetizando citocinas potencializadoras da resposta pró-inflamatória (IL-2, IL-3, INF-γ e TNF) estimulando a activação das células T, a actividade fagocítica dos macrófagos, a produção de espécies reactivas de oxigénio e óxido nítrico, a proliferação de células efectoras com receptores específicos (diferenciação dos linfócitos citotóxicos), assim como a imunidade celular e humoral, uma vez que também promovem a apoptose de células infectadas. (Fabbri et al., 2003).

As células CD4<sup>+</sup> Th<sub>2</sub>, desprovidas da capacidade de citólise, secretam as citocinas IL4, IL5, IL6, IL13 promovendo o aumento da resposta humoral através da síntese de anticorpos (imunoglobulinas) e outros factores solúveis, estando envolvidas na protecção contra parasitas extra-celulares (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Nos últimos anos, têm sido realizados diversos estudos para elucidar os mecanismos envolvidos na indução e regulação do perfil polarizado que caracteriza as subpopulações das células Th (<sup>para ref. ver</sup> Gleeson, 2006).

De salientar, o interesse particular relativamente ao papel das células apresentadoras de antígenos (CAA) na caracterização do fenótipo das células naive durante o período inicial, principalmente devido aos níveis de expressão diferencial presentes nas células dendríticas activadas, as quais podem exercer um impacto decisivo no processo de polarização (Liew, 2002). Neste contexto, a interacção do receptor CD28 dos linfócitos T com o CD80 nas CAA parece favorecer a diferenciação em linfócitos Th<sub>1</sub>, enquanto a interacção deste mesmo receptor com o CD86 promove o fenótipo Th<sub>2</sub> (Liew, 2002). Todavia, produtos derivados de patógenos, estágio de maturação das CAA, bem como factores genéticos podem influenciar de forma significativa o processo de diferenciação das células Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (Boonstra et al., 2003).

#### 2.4.1.5.2 Linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores

Relativamente aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as células T reguladoras podem assumir diferentes fenótipos, sendo actualmente mais estudados os fenótipos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3 (Belkaid et al., 2002). Estas células representam 5-10% da população periférica dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo timo-dependentes, uma vez que sofrem diferenciação no timo, constituindo uma subpopulação funcional dos linfócitos T maduros, e também MHC restritas. Podem ser classificados como linfócitos T reguladores naturais (originados no timo) ou linfócitos T reguladores adaptativos (originados na periferia a partir de células naive) (Joffre et al., 2004). Em particular, os linfócitos Treg CD4<sup>+</sup> expressam níveis elevados da molécula CD25, do factor de transcrição Fox P3-Forkhead box P3 (quando referido o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FoxP3), dos receptores CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen-4) e GITR (Glucocorticoid Induced TNF Receptor) (Belkaid et al., 2002; Enk, 2006). A molécula CD25 constitui a designação pela qual se reconhece a cadeia  $\alpha$  do receptor da interleucina 2 (IL-2), enquanto o CTLA-4 pode actuar na indução de sinais intracelulares, inibindo a proliferação e síntese de IL-2. No que respeita aos linfócitos T reg CD4<sup>+</sup>, a sua principal

função consiste na supressão das respostas mediadas pelos linfócitos T efectores auto-reactivos em situações inflamatórias e não-inflamatórias (Enk, 2006). Estas células desempenham uma importante função imunomoduladora, actuando também na prevenção da auto-imunidade e no controlo das respostas à infecção (Joffre et al., 2004). Embora alguns autores sugiram que a realização de exercícios físicos regulares de intensidade moderada atenuem a diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em particular, as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Fu et al., 2003), outros estudos divergem, afirmando que o efeito do treino não altera a contagem destas células (Baum et al., 1999; Kapazi et al., 2003).

#### 2.4.1.5.3 Linfócitos T CD8<sup>+</sup>

Os linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> possuem a capacidade de reconhecer e eliminar células próprias alteradas, tendo como principais funções a citotoxicidade, a supressão linfocitária, a lise de células infectadas, a lise de microrganismos e de células tumorais, estando restritos ao reconhecimento somente dos antígenos ligados ao complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC I) (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000).

Tem sido referido por diversos autores, aumentos da concentração absoluta das células T CD8<sup>+</sup> em resposta à diversos protocolos de esforços (Shinkai et al., 1992; Gabriel et al., 1992; Nieman et al., 1994b; Shek et al., 1995; Shinkai et al., 1996; Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Nehlsen-Cannarella, 1998; Natale et al., 2003). De acordo com Nieman et al. (1994b), a magnitude do aumento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> parece estar dependente da intensidade do exercício, tendo sido verificados acréscimos de 7% e 74% em resposta às intensidades de esforços a 50% e 80% VO<sub>2max</sub>, respectivamente. Estes resultados reforçam os dados obtidos por Gabriel et al. (1992) que constataram um maior incremento dos valores das células T CD8<sup>+</sup> (18% vs 15%) após um protocolo de exercício (100% vs 85% do limiar anaeróbio individual), sugerindo desta forma, a intensidade como factor determinante na modulação desta resposta imune. Todavia, Tvede et al. (1993) não observaram alterações significativas das células T CD8<sup>+</sup> ao submeterem ciclistas treinados a protocolos de esforço de diferentes intensidades (25%, 50% e 75% VO<sub>2max</sub>).

#### 2.4.1.5.4 Linfócitos NK ( Células *Natural Killer*)

Os linfócitos NK compreendem uma população de linfócitos originados a partir de uma célula progenitora da medula óssea, distinguidas pela presença da glicoproteína de membrana CD3<sup>-</sup> e identificada pela superfície dos antígenos CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup> (Gleeson, 2006). Correspondem a 10-15% dos linfócitos presentes no sangue periférico e possuem Receptores de Reconhecimento Padrão (RsRP), capazes de reconhecer e eliminar células tumorais e células infectadas por vírus (Pedersen et al., 1998; Gleeson, 2006). Uma vez reconhecida a célula infectada, as células NK libertam grânulos citotóxicos (citolisina e perforina) causando a lise da membrana da célula, resultando na desintegração ou lise da célula infectada (Cerwenka & Lanier, 2001)

Os linfócitos presentes na circulação periférica e nos tecidos encontram-se em estado quiescente, apresentando-se metabolicamente pouco activos (Hames e Glover, 1996). Contudo, um estímulo invasivo ou neoplásico pode desencadear a activação destas células, promovendo a sua proliferação e resultante produção de citocinas envolvidas na resposta imune (Adams e Hamilton, 1992).

#### 2.4.1.6 Linfócitos B

Os linfócitos B (CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup>) são células não-fagocíticas, precursoras dos plasmócitos, os quais actuam na resposta imune humoral através da síntese de glicoproteínas plasmáticas efectoras (imunoglobulinas) (Ostrowski et al., 1998). Todavia, os linfócitos B podem também, exercer a função de célula apresentadora, no caso do antígeno endocitado ser clivado e os péptidos associados ao complexo major de histocompatibilidade II (MHC II) serem apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Pedersen & Toft, 2000).

As células B distinguem-se por expressar na sua membrana plasmática um complexo proteico (BCR – receptor da célula B) constituído por uma imunoglobulina membranar (responsável pelo reconhecimento do antígeno) e um heterodímero composto de duas proteínas invariáveis (Ig $\alpha$  / Ig $\beta$ ), capaz de realizar a transdução de sinais (Doherty e Farrelly, 2000). Após o processo de maturação inicial na medula óssea, os linfócitos B imaturos que expressam a glicoproteína CD19 são posteriormente transportados pelo sangue para os



órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos e tecidos linfóides associados à mucosa-MALT) onde ocorre a sua diferenciação final e subsequente proliferação (Sherman et al., 1994). Neste sentido, importa salientar que é fundamental para o processo de maturação das células B, a presença do gene *Btk*, o qual codifica a enzima tirosina-quinase de Bruton, permitindo assim, o envio de sinais para a célula (McHeyzer-Willians, 2003).

Os linfócitos B podem ser divididos em três subpopulações distintas: os linfócitos B memória – que actuam como células apresentadoras de antigénio para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, os linfócitos B produtores de citocinas e os plasmócitos – células secretoras de imunoglobulinas (Igs) (McHeyzer-Willians, 2003).

As células B quiescentes respondem a diferentes tipos de antigénio, podendo desta forma serem activadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (antigénios timo-dependentes) ou directamente por antigénios livres, por meio de diferentes receptores e co-receptores de células B (antigénios timo-independentes) (Jenkins et al., 2001).

#### 2.4.2 Sistema imune e o exercício físico: regulação, integração e activação

O exercício físico, enquanto modelo indutor de stresse, promove a alteração do estado de homeostasia orgânica, conduzindo a reorganização da resposta de diferentes sistemas, entre os quais, o sistema imunológico (Pyne & Gleeson, 1998). Neste contexto, a realização de diferentes esforços físicos provoca alterações distintas nos diversos parâmetros imunológicos (Brenner et al., 1998; Natale et al., 2003; Mijika et al., 2004).

Em decorrência da activação do sistema nervoso simpático (SNS) durante o exercício, ocorre o aumento da secreção endócrina de catecolaminas (dopamina e noradrenalina a nível cerebral), estimulando o hipotálamo a aumentar a produção da hormona libertadora de corticotropina (CRH) (Brenner et al., 1998). Em resposta a estas alterações, é observado o aumento da libertação da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e  $\beta$ -endorfinas pela glândula pituitária anterior (Gaillard, 1994; Brenner et al., 1998), estimulando desta forma, o córtex supra-renal a produzir glucocorticóides e aminas biogénicas (Herbert e Cohen, 1993; Gaillard, 1994; Brenner et al., 1998). A

associação destes factores sugere uma estreita relação entre o sistema imunológico e os demais sistemas orgânicos, em particular, a interacção com os sistemas nervoso e endócrino (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Estes mecanismos de integração são multifactoriais quando associados as alterações imunológicas, e incluem diversos factores neuroendócrinos como a adrenalina, noradrenalina, hormona do crescimento, cortisol e  $\beta$ -endorfinas (Atanackovic et al., 2004)

A activação do sistema nervoso simpático durante o exercício físico influencia a resposta imunológica, estimulando a produção e libertação de catecolaminas e glucocorticóides (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). A acção das catecolaminas e do cortisol libertados durante o exercício promove a redistribuição dos linfócitos, exercendo uma acção imunossupressora sobre o organismo (Gleeson, 2005). De acordo com Millan et al. (1996), a expressão de  $\beta$ -receptores presentes nas diversas células imunes parece fornecer a base molecular para a acção das catecolaminas. Estudos anteriores evidenciaram a presença de receptores  $\beta$ -adrenérgicos em macrófagos peritoniais e células linfóides de ratos (Bermudez et al., 1990), sendo também constatada a inervação de diferentes órgãos linfóides por fibras nervosas (Vizi et al., 1998). Relativamente a densidade dos receptores adrenérgicos ( $\beta$  receptores) presentes nas diferentes subpopulações leucocitárias, os neutrófilos juntamente com os linfócitos NK parecem possuir um maior número de receptores, sendo seguidos, numa ordem decrescente, pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e os linfócitos B, enquanto os linfócitos T CD4<sup>+</sup> apresentam uma menor densidade (Gaillard, 1994).

O recrutamento de neutrófilos e linfócitos para o compartimento vascular durante o exercício parece ser mediado pela acção das catecolaminas, principalmente pela adrenalina, e em menor grau, pela noradrenalina (Ottaway e Husband, 1994). De acordo com Pedersen e Hoffman-Goetz (2000), a concentração sanguínea desses mediadores aumenta de forma linear com a duração do esforço e exponencialmente com a intensidade. No entanto, a activação do sistema nervoso simpático durante o exercício físico parece ser também influenciada pelo estado de treino, sendo observado um aumento mais pronunciado na concentração plasmática de noradrenalina em indivíduos destreinados comparativamente a atletas. (Sothmann et al., 1991).

O aumento da concentração de cortisol durante o exercício físico altera a taxa de degradação proteica do músculo, inibindo a libertação de glutamina pelo músculo esquelético, resultando numa diminuição dos níveis de glutamina plasmática (Field et al, 2000). A glutamina constitui um aminoácido versátil, actuando na detoxificação da amónia, transporte de nitrogénio entre os tecidos, e manutenção do equilíbrio ácido-base, sendo considerada um substrato essencial para diferentes células do sistema imune, particularmente linfócitos e macrófagos (Field et al, 2000). Estudos têm demonstrado, que a realização de exercícios prolongados e de elevada intensidade reduzem as concentrações plasmáticas de glutamina, comprometendo a proliferação de linfócitos e monócitos, a síntese de imunoglobulinas e a concentração de citocinas circulantes (Mackinnon & Hooper, 1996; Rowbottom et al., 2000; Nieman, 2000; Pedersen et al., 2001). As prostaglandinas e os radicais livres aumentados em resposta a activação dos neutrófilos e monócitos também influenciam a função linfocitária (Brenner et al., 1994; Suzuki et al., 2000).

Factores fisiológicos como, o aumento da temperatura corporal em resposta ao exercício físico, o balanço nitrogenado e o nível de glicemia podem condicionar as respostas imunológicas (Brenner et al., 1994; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Tzai-Li et al., 2004). Neste contexto, diversos estudos têm demonstrado que a manutenção das concentrações plasmáticas de glucose durante a realização de esforços prolongados atenua o aumento do tráfego leucocitário (Bingham et al., 1995); a resposta da adrenalina e do cortisol (Jackson, 1998); a relação neutrófilos/linfócitos (Leeuwenburgh e Heineck, 2001; Gleeson, 2006) e a concentração da IL-6 (Leeuwenburgh e Heineck, 2001). De acordo com Halliwell (1999), a hipoglicémia pode diminuir a eficiência da resposta imune neutrófilo-dependente e também provocar um aumento da apoptose destas células.

A realização de exercícios físicos intensos e prolongados ( $>70\%VO_{2max}$ ) e exercícios muito intensos de curta duração ( $>85\%VO_{2max}$ ) provocam um aumento das concentrações de  $\beta$ -endorfinas na circulação (Van Eeden et al., 1999; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Este aumento é sugerido influenciar de forma negativa a produção de imunoglobulinas em humanos (Mathews et al., 1983; Morgan et al., 1990), podendo, em animais, inibir a proliferação

linfocitária e promover um aumento da actividade fagocítica e da quimiotaxia de macrófagos peritonias (Carlson et al., 1989; Ortega et al., 1996).

Estudos têm demonstrado que a realização de exercícios de intensidade moderada ( $<70\%VO_{2max}$ ) provocam alterações na distribuição das células imunocompetentes, que coadjuvadas por alterações funcionais, promovem a melhoria das funções imunológicas, aumentando a actividade anti-tumoral e citotóxica de linfócitos e macrófagos, a acção fagocítica dos neutrófilos e a actividade citotóxica das células NK (Gabriel et al., 1992, Nieman et al., 1993; Nieman et al., 1994; Woods et al., 2000; Klentrou et al., 2002; Suzuki et al., 2003; Natale et al., 2003; Steensberg, 2003). No entanto, diversos autores tem proposto a existência de um período de imunossupressão transitória após a realização de esforços intensos ( $>70\%VO_{2max}$ ), (Cannon, 1993; Pedersen & Bruunsgaard, 1995; Mars et al., 1998; Matheus et al., 2002; Gleeson, 2005).

O exercício físico provoca alterações agudas no sistema imunológico, que se mostram condicionadas por diferentes factores como a intensidade e o volume dos estímulos-carga (Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994). As adaptações crónicas do sistema imune ao exercício físico, presentes em indivíduos treinados, permitem uma menor activação do SNS, resultando numa menor sensibilidade aos estímulos stressores e conseqüentemente, uma menor libertação de catecolaminas e cortisol (Cavaglieri et al., 2003).

A alteração transitória da resposta imune provocada por uma sessão de exercício físico é conhecida por resposta aguda ao exercício e pode ser modulada por três diferentes mecanismos:

- (i) hormonais - relacionados as acções das catecolaminas, dos glucocorticóides, da hormona do crescimento (GH) e das endorfinas (Pedersen et al., 1997);
- (ii) metabólicos – referentes a concentração de glutamina, a hipoxia e hipertermia (Pedersen et al., 1997; Curi et al., 1999);
- (iii) mecânicos – expressos pela lesão muscular motivada pelo exercício físico, gerando um processo inflamatório localizado (Evans e Calmon, 1991).

#### 2.4.2.1 Resposta do sistema imune ao exercício físico agudo

O exercício físico agudo pode alterar a contagem, redistribuição e capacidade funcional das diferentes células imunocompetentes (Green et al., 2002). Neste sentido, a libertação de catecolaminas pelo exercício parece constituir o principal factor indutor do aumento dos leucócitos circulantes (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Nieman, 2005).

Gabriel et al. (1992b) verificaram um aumento significativo na concentração leucocitária imediatamente após 1 minuto de exercício supra-máximo ( $>100\%VO_{2max}$ ). É sugerido por alguns autores, que em esforços com duração inferior a 1 hora, a leucocitose é mais dependente da intensidade do esforço e não da duração do mesmo (Gimenez, 1986; McCarthy e Dale, 1988).

A realização de exercícios de elevada intensidade está associada a uma alteração bifásica dos leucócitos circulantes. Imediatamente após o esforço, é observado um incremento de 50 a 100% no número total de leucócitos, principalmente através do aumento nas concentrações dos neutrófilos e linfócitos e em menor proporção dos monócitos (Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994). Entretanto, após um período de recuperação, próximo de 30 minutos, é detectada uma diminuição acentuada do número de linfócitos (30 a 50%) e em menor expressão do número de eosinófilos, persistindo a condição de neutrofilia (Kendall et al., 1990; Gabriel et al., 1991). Esta resposta dos leucócitos decorre da acção da adrenalina e cortisol libertados durante exercícios com elevada intensidade (70 a 85%  $VO_{2max}$ ), onde também se verifica um aumento da densidade dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Khan et al., 1986; Maisel et al., 1990). As concentrações de adrenalina diminuem rapidamente ao término do exercício, em contraste com o cortisol, cuja concentração permanece elevada na circulação por períodos superiores a 2 horas (Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994).

Esta perturbação bifásica da contagem leucocitária motivada pelo exercício físico foi estudada por Tvede et al. (1993) em ciclistas profissionais submetidos a um protocolo de 60 minutos em cicloergómetro a diferentes intensidades de esforço (25, 50 e 75%  $VO_{2max}$ ). Neste estudo foi observado que, imediatamente após o exercício realizado as intensidades de 50 e 75%  $VO_{2max}$ , os atletas evidenciavam uma linfocitose significativa, a qual era posteriormente seguida

de uma linfopenia no período subsequente (2 horas). De acordo com Hellstrand et al. (1985), a redistribuição destas células parece decorrer dos níveis aumentados das catecolaminas, embora, outros autores possam sugerir que estas alterações resultem da migração de células dos órgãos linfóides secundários, como o baço e os linfonodos, para a circulação sanguínea ou possam estar relacionadas ao mecanismo de resposta inflamatória às lesões no tecido muscular (Pedersen et al., 1998; Gabriel & Kindermann, 1998; Brenner et al., 1998).

A resposta dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN) ao exercício, embora apresente resultados contraditórios, parece estar condicionada à intensidade do esforço e ao estado de treino do indivíduo. Desta forma, a capacidade de aderência dos PMN ao endotélio vascular não se mostra afectada pelo exercício moderado (Ortega et al., 1993) ou de natureza exaustiva (Lewick et al., 1987; Rodriguez et al., 1991), embora, tenha sido observada uma redução desta função, durante uma sessão de exercício moderado em indivíduos treinados (Lewick et al., 1987). A quimiotaxia nos PMN observada em indivíduos destreinados parece ser aumentada em resposta a uma sessão de exercício moderado (Pyne et al., 2000; Suzuki et al., 2003; Nieman et al., 2005) ou permanece inalterada nos exercícios exaustivos (Rodriguez et al., 1991), enquanto em indivíduos treinados, esta capacidade se apresenta aumentada (Ortega et al., 1993).

Relativamente à actividade fagocítica dos leucócitos, Muns et al. (1994) observaram um aumento da actividade fagocítica dos neutrófilos, em indivíduos treinados, 24 horas após a realização de uma corrida de 20km a intensidade de  $60\%VO_{2max}$ . Posteriormente, Nieman et al. (1998) verificaram um aumento da actividade fagocítica dos granulócitos, especialmente dos PMN, em resposta a 150 minutos de exercício aeróbio a  $75\%VO_{2max}$ . No entanto, Chinda et al. (2003) ao analisarem a actividade fagocítica dos PMN em função da corrida da maratona, verificaram que ao final do esforço, a percentagem destas células engajadas na fagocitose estava aumentada, enquanto a capacidade fagocítica dos neutrófilos activados se mostrava diminuída.

O esforço físico moderado também parece promover o aumento da desgranulação dos neutrófilos (Smith et al., 1990; Suzuki et al., 2003), embora, de acordo com Hetherington e Quie (1985), os neutrófilos imaturos libertados

da medula óssea, pela acção do cortisol, parecem apresentar uma aumentada desgranulação espontânea. Nesta perspectiva, tem sido sugerido que a desgranulação induzida pelo exercício físico pode constituir parte de uma resposta inflamatória no músculo ou tecido lesado, estando associada a uma aumentada concentração plasmática de elastase e mieloperoxidase, principalmente, em exercícios caracterizados por uma elevada componente excêntrica (Camus et al., 1992; Blannin et al., 1996; Suzuki et al., 2003). Os efeitos do exercício físico na actividade oxidativa dos PMN permanecem conflituais. Tem sido sugerido por alguns autores, que esforços de intensidade moderada auxiliam a actividade oxidativa dos neutrófilos (Macha et al., 1990; Ortega et al., 1993; Muns et al., 1996; Smith et al., 1996). No entanto, Pyne et al. (1996) após submeterem um grupo de atletas a 40 minutos de esforço aeróbio moderado ( $65\%VO_{2max}$ ), encontraram uma diminuição desta actividade. Esta redução da actividade oxidativa parece ser mais pronunciada à seguir a realização de exercícios intensos ( $85\% VO_{2max}$ ) (Hack et al., 1992; Pyne et al., 1994; Pyne et al., 1996; Pyne, 2000). No entanto, a evidência de que o exercício progressivo, até a exaustão, provoca o aumento da capacidade fagocítica dos PMN, associada ao incremento da actividade de elastase plasmática, indicando desgranulação, sugere que a supressão das funções neutrofílicas possa estar relacionada a um período refractário pós-exercício (Dufaux e Order, 1989).

Apesar da magnitude da neutrofilia estar directamente relacionada com a intensidade do esforço, é sugerido por alguns autores, que a duração do exercício pode influenciar de forma significativa a sua resposta. De acordo com Pedersen e Bruunsgaard (1995), o estado de imunossupressão observado é somente evidenciado em situações de esforços intensos e de duração prolongada, superiores a 1 hora. Robson et al. (1999) analisaram as alterações nas funções dos neutrófilos moduladas pela duração do exercício, onde foi observado que a realização de um esforço de intensidade moderada ( $55\% VO_{2max}$ ) durante um período de 3 horas reduzia de forma mais pronunciada as actividades oxidativa e anti-bactericida dos PMN comparativamente ao exercício de intensidade mais elevada ( $80\% VO_{2max}$ ) realizado durante 1 hora. A leucocitose evidenciada pelo aumento dos neutrófilos, imediatamente após o término do esforço, decorre da desmarginação dos PMN das paredes dos

vasos sanguíneos para a circulação periférica, em resposta à acção das catecolaminas (Galbo, 1983) e ao aumento do débito cardíaco (Foster et al., 1986). De acordo com Boxer et al. (1980), associado ao aumento do débito cardíaco, ocorrem alterações hemodinâmicas como a mobilização do fluxo sanguíneo das vísceras para o pulmão (via receptores  $\alpha_1$ ), permitindo um aporte sanguíneo aumentado para os músculos esqueléticos (via receptores  $\beta_2$ ), que resulta numa desmarginação aumentada da parede destes vasos. A baixa regulação da expressão das moléculas de adesão presentes na superfície dos leucócitos, motivada pela acção da adrenalina durante o exercício, pode contribuir para a desmarginação dos leucócitos, reduzindo a aderências destas células ao endotélio vascular (Nielsen e Lyberg, 2004). Entretanto, nas situações de exercícios aeróbios prolongados, observa-se, após um período de recuperação, um novo incremento da contagem dos neutrófilos, (predominante de uma aumentada libertação da medula óssea) consequente à elevação da concentração de cortisol, referido como “leucocitose retardada” (Robson et al, 1999).

No que respeita às células fagocíticas mononucleares, o exercício exaustivo de curta duração parece reduzir a actividade fagocítica dos monócitos (Bierger et al. 1980). Em contraste, Nieman et al. (1998) observaram que após 150 minutos de exercício moderado ( $<75\%VO_{2max}$ ), a actividade fagocítica e a quimiotaxia se apresentavam aumentadas nos monócitos, embora, permanecendo a actividade oxidativa inalterada.

O exercício físico agudo, especialmente de intensidade moderada, parece estimular diversas funções dos macrófagos incluindo a aderência, a quimiotaxia, a produção de anião-superóxido e a capacidade fagocítica (Field et al., 1991; Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994; Nehlsen-Canarella, 1998; Costa Rosa et al., 1995; Woods et al., 2000), estando estes mecanismos subjacentes provavelmente associados a factores neuroendócrinos (Ortega et al., 1993; Ortega et al., 1999). Entretanto, a realização de esforços extenuantes e prolongados parece reduzir a actividade anti-viral de macrófagos alveolares (Davis et al., 1997), diminuindo também, a capacidade de apresentação de antígenos por macrófagos peritoniais (Woods et al., 2000). No entanto, o exercício exaustivo, em resposta ao aumento das concentrações plasmáticas das catecolaminas, está associado à diminuição da expressão do MHC de



classe II, assim como à queda da função antiviral dos macrófagos alveolares (Ceddia e Woods, 1998).

De acordo com Pedersen e Hoffman-Goetz (2000), o aumento da concentração linfocitária no decorrer do exercício físico parece constituir um mecanismo de resposta altamente específica. Assim, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentam um aumento de 50 a 100% na contagem periférica após a realização de um exercício agudo intenso (>75% VO<sub>2max</sub>), enquanto um esforço moderado (65 - 75% VO<sub>2max</sub>) parece não alterar as concentrações sanguíneas dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (Tvede et al., 1993; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000).

Em relação às subpopulações linfocitárias, verifica-se habitualmente, uma linfocitose durante e imediatamente após o exercício físico, sendo, no entanto, o seu aumento menor que o observado na concentração dos neutrófilos (Mackinnon, 1999). O grau de linfocitose provocada pelo exercício físico parece variar consoante o estado de treino, sendo maior nos indivíduos não-treinados (Ortega et al. 2003). Tem sido observado em alguns estudos, aumentos temporários nas concentrações das células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (memória) e células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (naive) em resposta a uma sessão de exercício físico agudo. No entanto, parece que o aumento observado na relação CD45RO/CD45RA decorre de uma maior mobilização da sub-população CD45RO<sup>+</sup> (Gannon et al., 2002; Lancaster et al., 2003).

As células NK demonstram as maiores alterações frente ao exercício agudo, podendo evidenciar aumentos de 150 a 300% na contagem do sangue periférico, provavelmente em decorrência da maior densidade de receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos presente na sua superfície celular (Gabriel et al. 1991; Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994; Gleeson, 2006). Com relação à actividade funcional das células NK, parece ser modulada por factores como tipo de exercício, duração e intensidade do esforço (Ceddia et al., 1999), podendo também ser influenciada pela acção de endorfinas (Nieman e Nehlsen-Cannarella, 1994). Diversos autores têm observado o aumento da actividade citolítica das células NK e da linfocina activadora das células NK ao término de exercícios físicos moderados (Pedersen et al., 1998; Bacurau et al., 2000; Woods et al., 2000) e intensos (Tvede et al., 1993; Natale et al., 2003; Roberts et al., 2004; Gleeson, 2005), embora, a realização de esforços extenuantes e prologados pareça

atenuar a actividade citolítica destas células (Kappel et al., 1991; Pedersen e Bruunsgaard, 1995; Nielsen et al., 1996; Pedersen et al., 2001; McFarlin et al., 2004).

A realização de esforços muito intensos ( $>85\%VO_{2max}$ ) parece provocar uma redução da concentração dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, permanecendo os valores sanguíneos dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> inalterados, o que resulta na diminuição da relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, comportamento este que pode reflectir uma situação de imunossupressão (Ceddia et al., 1999; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000).

Tem sido proposto, que o aumento da concentração linfocitária na circulação, em resposta ao exercício físico, em especial, os esforços de curta duração e elevada intensidade ( $>85\%VO_{2max}$ ) decorre principalmente da acção das catecolaminas, mobilizando, na sua grande maioria, linfócitos provenientes do baço e outros órgãos linfóides secundários (Gabriel et al., 2000; Pedersen et al., 2000; Minetto et al., 2005; Hong et al., 2005). Entretanto, a redução do número de linfócitos presentes na circulação, observada nos exercícios intensos de duração prolongada, parece decorrer, particularmente, da influência do cortisol (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Jozsa et al., 2005). O cortisol também parece inibir a proliferação de linfócitos por acção directa na célula e por inibição da produção de interleucina 2 (IL-2) (Newsholme et al., 1996). Um mecanismo adicional de inibição linfocitária pode ser a acção sobre os monócitos, diminuindo a expressão do MHC de classe II, portanto, a capacidade de actuar como célula acessória (Nieman & Nehlsen-Cannarella, 1994; Azevedo et al., 1997).

A resposta proliferativa mitogénica dos linfócitos T e a expressão do marcador de activação (CD 69) tem sido sugerido reduzidas em resposta a um esforço agudo intenso ( $85\%VO_{2max}$ ) (Tvede et al., 1994; Mackinnon, 1999; Ronsen et al., 2001), reforçando o efeito imunossupressivo do aumento da concentração de cortisol após exercício intenso.

A resposta dos linfócitos B a uma carga súbita de exercício demonstra que, contrariamente ao observado nas subpopulações dos linfócitos T, as quais evidenciam aumentos pronunciados, estas células não apresentam alterações significativas nos valores de repouso em resposta a um exercício de 45 minutos a intensidade de  $80\%VO_{2max}$  (Nieman et al., 1994), embora, no que concerne a concentração e actividade das imunoglobulinas (Ig), apresentam

resultados conflituais. Embora alguns estudos não tenham observado alterações nas concentrações das diferentes imunoglobulinas em resposta a realização de exercícios de intensidade moderada (Nieman et al., 1989; Tvede et al., 1989; Nieman et al., 1990a; Nieman et al., 1990b; Mackinnon et al., 1994; Nehlsen-Cannarella, 1998), tem sido referido por alguns autores, reduções significativas da concentração de IgA salivar, após sessões de treino de natação (Gleeson et al., 1999) e corrida prolongada (Blannin et al., 1998; Nieman et al., 2001). Relativamente ao exercício intenso e prolongado, parece influenciar a resposta dos linfócitos B, reduzindo as concentrações de IgA presentes na saliva e na mucosa nasal (Nieman et al., 1990b; Mackinnon et al., 1994; Nehlsen-Cannarella, 1998), aumentando, desta forma, a susceptibilidade a infecções no tracto respiratório superior (ITRS) (Gleeson, 2006).

O exercício de alta intensidade está associado à lesão de células musculares, e por consequência, o surgimento de uma resposta inflamatória tecidual (Stauber et al., 1988). No decorrer ou após a realização de exercícios físicos intensos, é desencadeado um conjunto de reacções sistémicas humorais, denominado **resposta de fase aguda** (Evans e Cannon, 1991). Esse mecanismo de resposta compreende alterações funcionais do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), aumento plasmático das concentrações de proteínas de fase aguda (neoptarina, proteína C reactiva,  $\alpha$ 1-antitripsina) e a mobilização e activação leucocitária (Almekinders e Almekinders, 1992; Pedersen e Bruunsgaard, 1995). Esta resposta inflamatória aguda, evidenciada pela infiltração dos neutrófilos, monócitos e linfócitos, para os tecidos lesados, designada por degeneração extrínseca, tem por funções, a fagocitose dos detritos resultantes da destruição celular e a preparação dos tecidos para uma posterior reparação (Almekinders e Almekinders, 1992). Este processo degenerativo mediado pelos leucócitos, que deveria constituir um processo de recuperação tecidual, pode, em razão da sua natureza catabólica, agravar a alteração das estruturas lipídicas e proteicas das células lesadas, acentuando de forma decisiva a destruição das fibras musculares, seja pela acção das enzimas proteolíticas e lisossómicas, activadas durante o processo de auto-destruição das células motivado pela perda da homeostasia dos iões cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) (*degeneração intrínseca*), ou através das espécies reactivas de oxigénio

(ERO) ou demais substâncias libertadas pelo interstício (Armstrong, 1990; Appell et al., 1992; Lieber et al., 1994).

No que respeita a produção sistémica das citocinas, são observados, no período pós-exercício, aumentos plasmáticos da IL-1 e IL-6, juntamente com o aumento da excreção urinária de IL-1 $\beta$  e dos receptores solúveis da IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Sprenger et al., 1992; Northoff et al., 1994; Shephard e Shek, 1994; Ostrowski et al., 2000; Nemet et al., 2003; Jankord e Jemiolo, 2004). No entanto, de acordo com Steensberg et al. (2001), a realização de um exercício concêntrico, como o ciclismo, resulta em aumentos menos pronunciados da IL-6 comparativamente com a corrida, a qual, apresenta predominância de acções excêntricas. Esta asserção é confirmada por Nieman et al. (2001), que constataram, após uma corrida da maratona, aumentos de 100% nas concentrações de IL-6 dos atletas competidores.

#### 2.4.2.1.1 Activação dos linfócitos T

O mecanismo de activação celular constitui o estágio inicial do processo que conduz a produção de citocinas pelos linfócitos T e respectiva proliferação e citotoxicidade. Diversos estudos têm avaliado os efeitos do exercício agudo intenso na activação dos linfócitos T que expressam marcadores de activação celular como CD69 (marcador de activação precoce), CD25 (receptor da IL-2), CD45RO (marcador de linfócitos T memória e efectores) e HLA-DR (determinante no MHC II). O marcador de activação linfocitária CD69 não parece ser particularmente responsivo a períodos de exercício físico próximos a 1 hora. Neste sentido, Ronsen et al. (2001) não verificaram alterações significativas na expressão do CD69 nas células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, *in vivo*, em resposta a 75 minutos de exercício em cicloergómetro a 75%VO<sub>2max</sub>. Corroborando este estudo, Green et al. (2003) não observaram diferenças significativas na expressão do CD69, estimulada por mitogénio, em indivíduos submetidos a 60 minutos de corrida em tapete rolante a 95% do limiar anaeróbio ventilatório (Lan<sub>vent</sub>). No entanto, resultados controversos foram constatados por DuBose et al. (2003), com indivíduos militares submetidos a uma corrida de 3200 metros, onde foi detectada uma significativa diminuição na percentagem de células CD4<sup>+</sup> expressando CD69 em resposta a estimulação

por mitogénios. Estes autores referem também, que a resposta estimulada por mitogénio nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> eram menos pronunciadas após o exercício e durante o período de recuperação em indivíduos submetidos a esforços sob elevadas temperaturas. Adicionalmente, Vider et al. (2001) observaram uma redução significativa da expressão do CD69 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, igualmente estimulada por mitogénios, em atletas jovens masculinos bem treinados, após a realização de um protocolo de corrida em tapete rolante até a exaustão. De acordo com estes autores, o referido comportamento do marcador de activação CD69 pode estar relacionado, entre outros factores, com a duração e a intensidade do esforço realizado. A activação das células T *in vivo* ou por estimulação de mitogénios pode reflectir o recrutamento selectivo de subpopulações de células activadas na circulação. Nesta perspectiva, Gray et al. (1993) encontraram um aumento significativo no número de linfócitos T expressando o antigénio HLA-DR imediatamente após a realização de um protocolo de corrida intervalada em tapete rolante até a exaustão. Este aumento reflecte, em particular, o recrutamento das células CD3<sup>+</sup>HLA-DR presentes na circulação, em resposta a linfocitose induzida pelo exercício (Gray et al., 1993). De forma similar, um estudo anterior realizado por Fry et al. (1992) verificou um aumento significativo no número de células mononucleares expressando a molécula CD25<sup>+</sup> imediatamente após a realização de um protocolo de exercício progressivo em tapete rolante até a exaustão. Entretanto, a relação entre as células CD3<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> não se mostrou alterada, sugerindo que o aumento relativo a expressão das células CD25<sup>+</sup> ocorreu principalmente devido ao maior recrutamento das células CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes na circulação e não em resposta as alterações induzidas no estado de activação das células T.

#### 2.4.2.3 Efeitos crónicos do exercício físico na resposta imune

Os efeitos crónicos do treino físico regular na função imune têm sido investigados através de uma diversidade de estudos, incluindo estudos longitudinais com populações sedentárias, estudos longitudinais de monitorização de atletas durante a época desportiva, estudos transversais de comparação entre atletas e indivíduos sedentários e estudos transversais

comparando atletas de diferentes níveis de prestação (Gleeson et al., 1995; Robson et al. 1999; Nieman, 2000; Mackinnon, 2000; Ronsen et al., 2001; Lancaster et al., 2003; Gleeson, 2005; Gleeson, 2006).

De uma forma geral, em estado de repouso, não se verificam diferenças significativas na função imune quando comparados atletas e indivíduos sedentários (Nieman, 2000). Entretanto, o número de leucócitos circulantes em atletas de resistência parece mostrar-se diminuído (Lehmann et al., 1997). Esta diminuição da contagem leucocitária pode resultar da hemodiluição acentuada, em resposta a expansão do volume plasmático, associada as elevadas cargas de treino (Gleeson, 2005), pode ainda indicar uma apoptose aumentada decorrente da produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio e do aumento nas concentrações de cálcio intracelular (Carraro e Franceschi, 1997; Bejma, 1999) ou estar atribuída a uma alteração da cinética leucocitária, incluindo a diminuição da libertação destas células pela medula óssea, em especial dos neutrófilos, em resposta a uma possível depleção das reservas de neutrófilos maduros (Nieman, 1998).

Pyne (1994) e Keen et al. (1995) observaram que atletas submetidos a períodos de treino intenso e prolongado apresentavam uma maior concentração de leucócitos imaturos comparativamente a indivíduos sedentários. Intervenções longitudinais realizadas com atletas de diferentes modalidades verificaram que indivíduos treinados apresentam valores de concentração sérica do complemento inferiores aos encontrados em indivíduos destreinados (Mackinnon, 1998), sendo também observada uma diminuição das actividades fagocítica e oxidativa dos neutrófilos em ciclistas treinados quando comparados com indivíduos sedentários (Blannin et al., 1996).

Lancaster et al. (2003) estudaram os efeitos de 4 semanas de treinos intensos ( $>74\%VO_{2max}$ ) nos diversos parâmetros imunes de ciclistas treinados, tendo sido observadas reduções significativas na produção de INF- $\gamma$  pelos linfócitos T, na actividade oxidativa dos monócitos e nos valores basais de IgA salivar.

Após 7 meses de treinos intensos, Gleeson et al. (1995) constataram em nadadores australianos de elevada performance uma supressão significativa dos níveis séricos de IgA, IgG e IgM e de IgA salivar, sendo também verificada uma redução na concentração de células NK. De acordo com estes autores, a concentração de IgA salivar (s-IgA), em repouso, estava correlacionada com a

incidência dos episódios de infecção durante o período de treino. Estes resultados corroboram o estudo de Mackinnon & Hooper (1994), que após submeterem um grupo de nadadores de Elite a 6 meses de treinos intensos, constataram uma redução acentuada nas concentrações de IgA salivar. A flutuação dos níveis séricos de IgA, IgG e IgM e IgA salivar em resposta ao treino físico parecem constituir indicadores úteis da imunidade humoral e da mucosa, respectivamente, estando estas concentrações associadas a incidência de episódios de infecções no tracto respiratório superior (ITRS) de atletas engajados em regimes de treino intenso (Nieman et al., 1989; Nehlsen-Cannarella, 1991; Gleeson et al., 1995; Gleeson et al., 1999; Gleeson, 2000; Gleeson e Pyne, 2000; Potteiger et al., 2001).

Embora se verifique uma grande variabilidade individual na resposta das imunoglobulinas ao treino físico regular, tem sido sugerido que indivíduos treinados apresentam valores basais de IgA salivar inferiores aos registados em sedentários (Tomasi et al., 1982; McDowell et al., 1992; Gleeson, 2002). Contudo, Klentrou et al. (2002) evidenciaram um aumento de 57% nas concentrações de IgA salivar após 12 semanas de treino aeróbio moderados (70%VO<sub>2max</sub>).

Relativamente as subpopulações linfocitárias, Baj et al. (1994) estudaram a influência de um período de 6 meses de treino ( $\pm$  500km/semana) na resposta imune de ciclistas competitivos, tendo encontrado uma diminuição significativa nos valores absolutos dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e na produção de IL-2.

Um estudo de Gleeson (2006) com uma equipa da liga inglesa de futebol observou, ao final de um período de 33 semanas de treino, uma diminuição significativa da contagem de células T CD45RO<sup>+</sup> (memória), enquanto os valores referentes às células T CD45RA<sup>+</sup> (naive) se mostravam aumentados.

Foram também evidenciadas, neste estudo, reduções na contagem das células NK, nos níveis de IgA salivar e na expressão do MHC II nos monócitos dos atletas.

Lin et al (1993) verificaram que ratos submetidos a 10 semanas de treino aeróbio moderado (70%VO<sub>2max</sub>) apresentavam, ao final de uma carga aguda de exercício físico intenso, uma diminuição da resposta mitogénica de linfócitos B do baço e dos níveis sanguíneos de IL-2. De forma similar, Fu et al. (2003) observaram que 4 semanas de treino moderado (60-70%VO<sub>2max</sub>) parece ter

exercido um efeito protector na resposta imune de ratos treinados, prevenindo a diminuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e estimulando concomitantemente o aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> após um esforço agudo exaustivo, atenuando, desta forma, a imunossupressão induzida pelos exercícios físicos intensos.

De acordo com Nieman et al. (2003), a modulação positiva do exercício físico crónico na resposta imune é evidenciada, a longo prazo, por uma maior protecção contra as infecções, a imunossupressão motivada pelo stresse e as doenças crónico-degenerativas.

Embora não se apresentem completamente esclarecidos os mecanismos subjacentes às respostas imunes condicionadas pelo treino regular, tem sido proposta uma possível associação com o aumento da tolerância das células imunes em resposta as diferentes situações indutoras de stresse (Pastori & Foyer, 2002). Assim, a chamada tolerância cruzada, parece permitir aos seres vivos uma adaptação a uma diversidade de estímulos indutores de stresse após a exposição a um único agente stressor (Foyer et al., 1997). Neste sentido, a associação entre o treino físico e as alterações na imunorregulação parece reforçada devido ao facto de uma única sessão de treino físico prévio promover uma atenuação das respostas homeostáticas induzidas por estímulos agressivos (Ascensão et al., 2003).

#### 2.4.3 Exercício físico e a susceptibilidade às infecções

A prática regular e sistemática do exercício físico moderado, está associada a melhoria da funcionalidade do sistema imune, diminuindo a ocorrência de episódios infecciosos, particularmente as infecções do tracto respiratório superior (ITRS). (Shephard e Shek, 1999; Kostka et al, 2000; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Mathews et al., 2002; Nieman et al., 2005; Nieman e Bishop, 2006). Estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos que se exercitam regularmente apresentam uma menor incidência de infecções bacterianas e virais, comparativamente a indivíduos inactivos (Hoffman-Goetz, 1994; Shephard e Shek, 1994; Nieman et al., 1998; Nieman, 2000; Nieman et al., 2005). No entanto, tem sido demonstrado que a realização de esforços intensos e elevados volumes das cargas de treino parecem enfraquecer os



mecanismos de resposta de defesa orgânica, alterando de forma significativa o fluxo linfático e o padrão dos leucócitos e suas subclasses circulantes, conduzindo para uma situação de imunossupressão transitória, com aumentada susceptibilidade às infecções (Pedersen et al., 1998; Mars et al., 1998; Nieman et al., 2000; Gleeson, 2006).

De acordo com Nieman (2000), a diminuição da incidência de ITRS motivada pelo exercício físico moderado, pode estar relacionada ao aumento da “vigilância imunológica”, proporcionando uma resposta mais efectiva do organismo contra os agentes infecciosos. Contudo, no que respeita à imunossupressão observada em atletas, parece resultar de um comprometimento das células imunes em resposta a uma carga intensa de esforço físico, evidenciando um desgaste aumentado das funções orgânicas com elevada produção de espécies reactivas de oxigénio e incremento do stress oxidativo ao nível tecidual.

O aumento da susceptibilidade às infecções e a incidência de episódios de “síndrome da baixa performance inexplicada” (UPS) (Budgett et al., 2000) decorrentes da realização de esforços físicos intensos possui diversas hipóteses e modelos de explicação descritos na literatura, que sob enfoques distintos, evidenciam a existência de um período de imunossupressão pós-exercício.

O modelo do “J” proposto por Nieman (1994) descreve a relação entre as diferentes cargas de treino e a incidência de infecções no tracto respiratório superior (ITRS). Este modelo, fundamentado em diversos estudos epidemiológicos, sugere que, enquanto indivíduos submetidos a esforços físicos moderados podem melhorar as suas funções imunológicas, reduzindo os episódios de ITRS, atletas engajados em treinos intensos e prolongados se apresentavam mais susceptíveis a imunossupressão, exibindo altos índices de infecções. Esta debilidade transitória do sistema imune acredita-se estar relacionada com o aumento da frequência respiratória durante o exercício intenso e prolongado, afectando a superfície das mucosas das vias respiratórias, resultando no aumento das alterações crónicas na função imunológica (Nieman et al., 2000).

A imunossupressão induzida pelo exercício prolongado intenso envolve importantes mecanismos multifactoriais incluindo, a alteração da concentração

de cortisol; a libertação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-1ra); a actividade citolítica das células NK e a redução das concentrações plasmáticas de glutamina (Gleeson e Bishop, 1999; Nemet et al., 2003).

A apresentação do modelo neuroendócrino, proposto por Smith e Weideman (1990) sugere a relação entre a susceptibilidade às infecções e a variação da intensidade do treino. De acordo com estes autores, durante a realização do exercício, ocorre a libertação de diversas hormonas imunomoduladoras que poderão estimular ou suprimir o sistema imunológico, dependendo da intensidade do esforço. Desta forma, o exercício físico de intensidade moderada libertaria hormonas imunoestimuladoras como a hormona do crescimento, a prolactina, as endorfinas e citocinas estimuladoras, enquanto a realização do exercício intenso resultaria na libertação de importantes hormonas imunossupressoras do hipotálamo como as catecolaminas e o cortisol.

A hipótese da chamada “janela aberta” sugerida por Pedersen e Ullum (1994), descreve o período de tempo (de 3 a 72 horas) após a realização de um exercício intenso, durante o qual, o atleta se mostra mais susceptível ao risco de contrair infecções. De acordo com estes autores, o exercício moderado estimula o sistema imunológico durante e após o exercício, enquanto o exercício intenso, estimula inicialmente o sistema imune, passando a suprimi-lo posteriormente. Este período de supressão se mostra propício para a contracção de infecções, denominadas “oportunistas”. Esta hipótese foi reforçada por Davis et al. (1997) que ao realizarem um estudo com modelo animal, observaram que a resistência anti-viral dos macrófagos alveolares de ratos submetidos a exercícios intensos até a exaustão permaneceu suprimida por 8 horas após a sua realização.

Proposta por Newsholme (1994), a hipótese da glutamina descreve a relação entre o aumento da susceptibilidade às infecções, em especial, as infecções no tracto respiratório superior e a diminuição das concentrações de glutamina plasmática induzida pelos exercícios físicos. Estudos têm demonstrado que atletas sujeitos a esforços físicos intensos e períodos de treino intensos e de longa duração apresentam uma diminuição das taxas de libertação de glutamina pelo músculo, resultando, desta forma, numa redução dos níveis de

glutamina plasmática (Newsholme, 1994; Kingsbury et al., 1998; McKenzie, 1999; Pedersen e Toft, 2000; Nieman, 2000; Mackinnon, 2000; Petibois, 2002). Esta diminuição, embora transitória, exerce influência funcional na resposta imune, comprometendo os níveis de proliferação de linfócitos e monócitos, aumentando a incidência de infecções em atletas (Pedersen, 2000; Nieman, 2000; Petibois, 2002).

Uma teoria apresentada mais recentemente por Smith (2003), denominada “teoria da lesão tecidual”, propõe que a imunossupressão induzida pelo exercício físico, associada a diminuição repentina da performance, parece decorrer de traumas teciduais excessivos (i.e., lesões nas fibras musculares) provocados por esforços intensos e prolongados, que activam a produção de citocinas específicas (IL-4, IL-5, IL-13) libertadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (th2), as quais estão relacionadas à imunidade humoral (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). A regulação dos linfócitos T th2 é sugerida estar associada a elevação dos níveis sanguíneos de glucocorticóides, catecolaminas e prostaglandinas E2, em resposta a realização de esforços físicos prolongados (Smith, 2003). De acordo com Liew (2002), a acção autócrina de determinadas citocinas, como a IL-4, secretada pelas células th2, promove a expansão desta subpopulação linfocitária, enquanto suprime a proliferação das células th1, reduzindo a imunidade mediada por células e aumentando a susceptibilidade às infecções virais. A susceptibilidade aumentada às ITRS em atletas de diferentes modalidades engajados em programas de treino intenso tem estado associada a uma elevada incidência de casos de *overtraining* (Lehmann et al., 1991; Hooper et al., 1997; Koutedakis e Sharp, 1998; Shona e Jeukendrup, 2004). Nieman et al. (1990a) estudaram a influência das cargas de treino na incidência de ITRS em atletas da maratona, tendo observado um aumento de 40% nos episódios de imunossupressão em corredores com volumes de corrida semanal superiores a 96 km. De forma similar, Koutedakis e Sharp, (1998) ao avaliarem 257 atletas de Elite de diferentes modalidades, encontraram um aumento de 17% nos casos de ITRS durante o período de 3 meses de treinos intensos e competições. Estes resultados corroboram o estudo de Morgan et al. (1997) realizado com nadadores de elevada prestação competitiva, onde foi evidenciado um aumento de 5-10% nos episódios de ITRS em atletas com volumes de treino superiores a 14 km/dia.

O processo de intensificação das cargas de treino ao qual os atletas são frequentemente submetidos na busca da otimização das suas capacidades funcionais pode ter como consequência, a percepção do sentimento de fadiga aguda e a diminuição transitória das suas respectivas performances (Urhausen e Kindermann, 2002). Esta imunossupressão induzida pelo exercício físico parece ser atenuada através de uma suplementação antioxidante, combinando as vitaminas C e E, reduzindo de forma significativa os níveis circulantes de IL-6, inibindo assim a acção do cortisol (Peters et al., 1993). A diminuição da concentração de IL-6 e da resposta do cortisol pela administração de suplementos antioxidantes pode atenuar a supressão da função imune induzida pelo exercício, permitindo a este mecanismo, reduzir a incidência de episódios de ITRS em esforços prolongados (Peters et al., 1993, Peters et al., 1996).

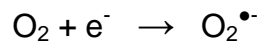
O consumo de hidratos de carbono durante os esforços físicos também atenua as elevações plasmáticas da IL-6, das catecolaminas, da hormona adrenocorticotrófica e do cortisol (Nehlsen-Cannarella et al., 1997; Nieman, 2000; Watson et al., 2005), resultando numa leucocitose menos pronunciada e uma redução menos expressiva da proliferação de linfócitos T estimulada por mitogénios, prevenindo a diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  (Lancaster et al., 2003). De acordo com Northoff et al. (1998) a supressão da produção de IFN- $\gamma$  pode constituir um factor decisivo no aumento do risco de infecções após exercícios prolongados.

## **2.5 Estudo dos biomarcadores de stresse oxidativo**

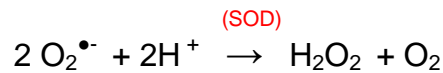
### **2.5.1 Radicais livres e espécies reactivas de oxigénio: considerações gerais**

Radicaís livres são definidos como qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais electrões desemparelhados nas suas camadas de valência, situação que lhes confere elevada instabilidade e reactividade bioquímica (Horenstein et al., 2000). Os radicaís livres são produzidos naturalmente no organismo através de processos metabólicos oxidativos, principalmente através da acção catalítica das enzimas durante os processos de transferência de electrões presentes no metabolismo celular (Cooper et al., 2002). Esta acção enzimática assume uma maior relevância na parte terminal da cadeia de transporte de

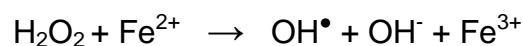
electrões (CTE), onde a enzima citocromo-oxidase, remove um electrão de cada uma das quatro moléculas de citocromo C, oxidando-as, e adiciona os quatro electrões ao oxigénio para subsequente formação de água. No entanto, tendo em vista a sua configuração electrónica, a redução do oxigénio à água, faz-se de forma univalente, com o recebimento de apenas um electrão por vez. A adição de um electrão a uma molécula de O<sub>2</sub>, no estado fundamental, forma o radical anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>):



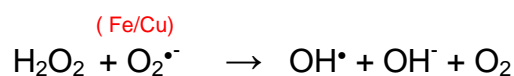
Ao receber mais um electrão e um ião hidrogénio, o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> forma o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), através do processo de dismutação, sendo esta reacção catalisada pela enzima superóxido-dismutase (SOD):



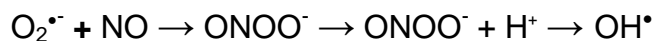
O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado é menos reactivo que o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, sendo electricamente neutro, o que facilita a sua difusão intra e extra-celular (Reid, 2001). Ao receber mais um electrão e um ião hidrogénio, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gera o radical mais reactivo dos intermediários, o radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), capaz de reagir com diferentes estruturas celulares, influenciando as actividades enzimáticas e comprometendo a integridade das membranas e o do ácido nucléico (Leewenburgh et al., 1999). A formação do radical OH<sup>•</sup> pode também resultar da reacção de uma molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com um átomo de ferro reduzidos (Fe<sup>2+</sup>), através da reacção de Fenton:



Os iões de metais de transição podem igualmente catalisar a reacção entre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, conduzindo à formação do radical OH<sup>•</sup> (reacção de Haber-Weiss):



De salientar, que o radical  $O_2^{\bullet-}$  pode, ao reagir directamente com o óxido nítrico (ON), um radical livre centrado no nitrogénio, gerar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) uma espécie reactiva de nitrogénio (ERN), a qual pode levar a formação de um oxidante com características do radical  $OH^{\bullet}$ .



São exemplos de radicais livres, o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), radical hidroperoxilo ( $ROOH^{\bullet}$ ) e o radical alcóxido ( $RO^{\bullet}$ ). (Sen, 2001). Os radicais  $OH^{\bullet}$  e  $O_2^{\bullet-}$  assumem uma maior relevância biológica, devido ao facto de serem formados durante o processo normal ou exacerbado de redução do oxigénio à água no interior das mitocôndrias, durante a metabolização das bases purínicas ou devido à redução do peróxido de hidrogénio pelo anião superóxido, reacção esta catalisada por iões redutores como o  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$  (Thomas, 2000; Sen, 2001). Existem no entanto, compostos celulares que embora não possam, por definição, serem designados como radicais livres, pelo facto de não possuírem qualquer electrão desemparelhado na sua estrutura química, mostram-se extremamente reactivos e apresentam elevada capacidade de gerar radicais livres. Estes compostos incluem: as **espécies reactivas de oxigénio** (ERO): ozónio ( $O_3$ ), oxigénio singleto ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e as **espécies reactivas de nitrogénio** (ERN): radical óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), radical dióxido nítrico ( $NO_2^{\bullet}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Finaud et al., 2006). De acordo com Halliwell e Gutteridge (1999), a maior reactividade exibida pelos radicais livres comparativamente às espécies reactivas pode ser evidenciada pelo menor tempo de vida média que possuem, comportamento este que lhes confere uma maior instabilidade electrónica.

O  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  são considerados espécies reactivas primárias, sendo formadas no organismo em diversas condições fisiológicas normais, enquanto as demais constituem espécies reactivas intermediárias (Banerjee et al., 2003). Devido ao facto do radical  $O_2^{\bullet-}$  não conseguir transpor com facilidade a membrana celular, permanece, normalmente, no seu local de formação, a matriz mitocondrial (Evans, 2000). No entanto, esta transposição é realizada de forma fácil pelo  $H_2O_2$ , cuja estabilidade encontra-se dependente, entre demais factores, da

reação com íons metálicos de transição como o ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e o cobre ( $\text{Cu}^{+}$ ) (Clarkson e Tompson, 2000).

A molécula de  $\text{O}_2$  constitui um bi-radical, embora possua na sua orbital externa dois electrões desemparelhados com *spins* paralelos, dificultando a reação química com as demais moléculas, tornando-a quimicamente mais estável que o oxigénio singleto ( ${}^1\text{O}_2$ ), o qual constitui uma ERO *spin*-alterada, apresentando-se mais reactivo que a molécula de oxigénio no estado fundamental (Reid, 2001).

A produção de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio (ERON) participa na regulação de uma diversidade de mecanismos celulares, incluindo a sinalização intracelular, a transcrição, a activação, a proliferação e a apoptose (Fehrenbach e Northoff, 2001; Cooper et al., 2002), podendo também contribuir para a biogénese mitocondrial (Nemoto et al., 2000; Cadenas, 2004). A formação destas espécies reactivas assume grande importância no processo de adaptação muscular ao stress oxidativo, promovendo a activação da transdução de sinais para a síntese de antioxidantes enzimáticos sensíveis ao estado redox da célula (Allen e Tresini, 2000). No entanto, evidências apresentadas por Powers e Howley (2001) sugerem que a produção aumentada das ERO, geradas pelo exercício físico intenso, pode resultar na lesão do retículo sarcoplasmático, implicando numa menor libertação de  $\text{Ca}^{+2}$  durante a despolarização, e consequentemente, na ocorrência de fadiga muscular.

### 2.5.2. Formação das espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio

O exercício físico, seja de carácter predominantemente aeróbio ou anaeróbio, pode promover importantes adaptações metabólicas e funcionais no organismo, embora sua prática esteja também relacionada à produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio (Ashton et al., 1999). Efectivamente, durante a realização do exercício físico, o consumo de oxigénio aumenta de forma significativa, resultando num aumento da demanda energética, que por vezes, supera em 35 vezes os valores de repouso (Vina et al., 2000). Neste sentido, a produção das ERO está inserida no processo metabólico normal de todos os seres vivos. Sob circunstâncias fisiológicas, a

produção destas espécies reactivas no organismo pode ocorrer através de diferentes mecanismos, dentre os quais se salientam, a formação mitocondrial, a formação associada à degradação acentuada de nucleótidos de adenina e a enzima xantina-oxidase, a formação intermediada pelos iões  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Cu}^+$ , a formação resultante da oxidação da hemoglobina e mioglobina e a formação pela activação das células fagocíticas imunocompetentes, entre outras (para ref. ver Finaud et al., 2006).

#### 2.5.2.1 Formação mitocondrial

Diversos estudos têm demonstrado ser a mitocôndria uma importante fonte celular da produção de ERO, principalmente, durante as reacções precedentes à fosforilação oxidativa (Ji, 1999; Pollack e Leeuwenburgh, 2000; Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Cadenas, 2004; Benard e Rossignol, 2008a). De acordo com Di Meo e Venditti (2001), a formação de intermediários oriundos da redução unieletrónica do oxigénio e a fuga de electrões para o oxigénio molecular, a partir da cadeia de transporte de electrões, nomeadamente durante as reacções catalisadas pela coenzima NADH Q, coenzima succinato e coenzima  $\text{QH}_2$  citocromo C-reductase, constituem os principais mecanismos de produção das ERO neste organelo celular. Segundo estes autores, a formação mitocondrial das ERO é proporcional a actividade da cadeia respiratória, onde a distribuição e quantidade das espécies reactivas, em especial, o radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , parece estar relacionada a indicadores como ATP,  $\text{VO}_2$  e temperatura central modelados pelo exercício físico. No entanto, Nohl et al. (2003) referem que a formação mitocondrial de ERO não ocorre espontaneamente, mas sim, quando é atingido o valor máximo do potencial da membrana.

A hipótese da mitocôndria constituir a principal via metabólica geradora de ERO no organismo mostra-se reforçada pela constatação de evidências indirectas de lesão mitocondrial, nomeadamente pela observação de indicadores de lipoperoxidação como a presença de malondialdeído (MDA) e substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos submetidos a condição de homeostasia celular alterada (Liu et al., 2000; Bejma et al., 2000). Contudo, tem sido sugerido por alguns autores, que a mitocôndria também



representa uma fonte de produção espécies reactivas centradas no nitrogénio (ERN), como óxido nítrico (ON), que revela grande importância nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). De facto, a matriz mitocondrial possui formas únicas de óxido nítrico sintetase (ONS), o Ihe confere um papel preponderante no metabolismo mitocondrial (Giulivi et al., 1998), uma vez que o óxido nítrico ao interagir com a citocromo C oxidase, resulta na inibição da respiração mitocondrial através da formação do radical  $O_2^{\cdot-}$  (Subudhi et al., 2001). A reacção do radical  $O_2^{\cdot-}$  com o ON exerce um efeito pró-oxidante, formando o peroxinitrito, um potente oxidante capaz de inibir a acção de importantes enzimas, afectando desta forma, a integridade e função mitocondrial (Brown e Borutaite, 2002; Radi et al., 2002).

#### 2.5.2.2 Activação da enzima Xantina-Oxidase (XO)

Constitui juntamente com a formação mitocondrial, uma das principais fontes geradoras de ERO, estando associada ao fenómeno de isquemia-reperfusão e degradação acentuada de nucleótidos de adenina (Hellsten, 2000; Fehrenbach e Northoff, 2001). Durante a realização de um exercício físico intenso, verifica-se a elevação da actividade do ciclo de degradação das purinas (citosol muscular), onde ocorre a desaminação da adenosina monofosfato (AMP) em inosina monofosfato (IMP) e amónia ( $NH_3$ ) pela acção da enzima AMP-desaminase (Maughan et al., 2000). A IMP permanece acumulada no músculo esquelético, devido à lenta difusão verificada durante os exercícios intensos, levando à necessidade de uma via secundária de metabolização, a qual dá origem à formação de hipoxantina, xantina, ácido úrico, oxi-radicais e peróxido de hidrogénio, produtos finais das adeninas (Maughan et al., 2000; Vina et al., 2000). Na presença de oxigénio molecular, a enzima xantina-oxidase (XO), localizada principalmente no endotélio vascular de diversos tecidos, incluindo o tecido muscular e cardíaco, catalisa a conversão da hipoxantina (Hx) em xantina e desta em ácido úrico (White et al., 2000). Em condições de repouso e na ausência de qualquer estímulo indutor de isquemia tecidual, a enzima xantina-oxidase encontra-se na forma de xantina-desidrogenase (XDH), utilizando a nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $NAD^+$ ) como receptor de

electrões Entretanto, em situações de exercício intenso, onde ocorre elevada taxa de degradação de nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP), diminuição do fluxo sanguíneo e de oxigénio para os tecidos (hipoxia) ou aumento das concentrações intracelulares de cálcio por interrupções temporárias das bombas de ATP dependentes de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), a XDH é convertida em XO, que passa a utilizar o oxigénio molecular ao invés do  $\text{NAD}^+$  como receptor de electrões, gerando assim  $\text{O}_2^{\bullet}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hellsten, 2000). A conversão da enzima XDH em XO exige duas condições essenciais: (i) elevada disponibilidade de hipoxantina (Hx) como substrato e (ii) aumento das concentrações intracelulares de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) pela activação das proteases citoplasmáticas presentes no músculo (calpaínas) (Hellsten et al., 1999; Hellsten, 2000).

### 2.5.2.3 Oxidação dos metais de transição ( $\text{Fe}^{+2}$ e $\text{Cu}^+$ )

Os iões ferro e cobre apresentam-se muitos activos em reacções de óxido-redução, desempenhando um papel fundamental na formação de ERO nos organismos (Jenkins et al., 1993). Estes iões, quando reduzidos e na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formam  $\text{OH}^{\bullet}$ , capaz de retirar um átomo de hidrogénio dos ácidos gordos polinsaturados da membrana celular e iniciar a lipoperoxidação, resultando na acumulação de hidroperóxidos que destroem a estrutura e função da membrana (Van Eeden et al., 2002). De acordo com Welch et al. (2002), em condições normais, o ferro e o cobre encontram-se ligados a proteínas específicas de transporte e armazenamento (transferrina, ferritina, hemosiderina e ceruloplasmina) o que permite prevenir ou minimizar as reacções de oxidação catalisadas por estes minerais. Efectivamente, a capacidade do organismo sequestrar ferro para as suas reservas intracelulares, resultando numa diminuição da sua concentração plasmática, reduz a disponibilidade deste nutriente para as bactérias, impedindo desta forma, o seu desenvolvimento e replicação (Jenkins et al., 1993).

A existência de “ferro livre”, não ligado a proteínas específicas, ou mesmo ligado a compostos de baixo peso molecular, presente nos hepatócitos, facilita a dissociação deste mineral na forma de ião, tornando-o cataliticamente activo e apto a participar das reacções de produção de ERO (Comporti et al., 2002). Entretanto, o exercício físico intenso pode provocar a destruição do eritrócito e

consequente libertação de ferro presente no compartimento celular, aumentando a sua concentração intramuscular (Jenkins et al., 1993). Neste sentido, Kanner et al. (1986) demonstraram que o ferro livre intramuscular pode difundir-se através da membrana celular e interagir com a vitamina C (ácido ascórbico) ou compostos tiólicos iniciando a lipoperoxidação.

Halliwell e Gutteridge (1999) referem que a queda da concentração plasmática de ferro é acompanhada normalmente pelo aumento dos níveis de cobre. De acordo com estes autores, elevadas concentrações plasmáticas de ferro e cobre podem resultar do treino de resistência aeróbia, promovendo uma elevada formação de oxi-radicais e  $H_2O_2$  em atletas, o que pode estar associado a maior incidência de lesões oxidativas e destruição de eritrócitos verificada em resposta a realização de esforços físicos intensos.

#### 2.5.2.4 Oxidação da hemoglobina, mioglobina e catecolaminas circulantes

Estudos demonstram que a oxidação da hemoglobina pode causar a formação de ERO (Thomas, 2000; Fehrenbach e Northoff, 2001). No corpo humano, 3% do total de hemoglobina sofre auto-oxidação, produzindo meta-hemoglobina e radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), podendo este valor aumentar, quando em situação de esforços físicos (Brantley et al., 1993; Cooper et al., 2002). De facto, o exercício físico ao promover uma descida do pH em resposta à formação de lactato sérico provoca uma deslocação da curva de dissociação da oxihemoglobina para a direita, reduzindo a afinidade do oxigénio pela hemoglobina, resultando numa possibilidade aumentada de formação de meta-hemoglobina e radical superóxido (Wallace et al., 1982). De acordo com Giulivi e Cadenas (1998), a formação de meta-hemoglobina pelo processo de auto-oxidação conduz ao aparecimento de hemicromos, que posteriormente participam na formação dos chamados corpos de Heinz responsáveis pela precipitação e desnaturação da hemoglobina.

Segundo alguns autores, a mioglobina também pode ser oxidada por auto-oxidação ou pela acção dos radicais livres durante o fenómeno de isquemia-reperfusão gerando espécies reactivas de oxigénio como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Brantley et al., 1993; Gunther et al., 1999). Desta forma, a

mioglobina pode reagir com o  $H_2O_2$  formando radicais ferril ou peroxil (Kelman et al., 1994; Giulivi e Cadenas, 1998).

A oxidação das catecolaminas durante a contracção muscular constitui outro possível mecanismo de formação de ERO (Evans, 2000; Duarte et al., 2004). A oxidação destas hormonas pode resultar da acção das enzimas monoamina-oxidase (MAO) e catecol-o-metiltransferase (COMT), com consequente formação de  $H_2O_2$ , ou da própria auto-oxidação, a qual a partir da formação de derivados quinónicos, poderá também formar ERO (Clarkson e Hubal, 2002; Obata, 2002; Fornai et al., 2004; Watson et al., 2005). De acordo com Powers e Howley (2001), o aumento da concentração de catecolaminas circulantes, em resposta a estimulação do sistema nervoso autónomo simpático durante a actividade física, parece ser proporcional a intensidade do esforço, o que pode condicionar, no caso dos esforços de elevada intensidade, uma formação acrescida de ERO, em particular, do  $H_2O_2$ . No entanto, tem sido sugerido por alguns autores, a possibilidade de outros sistemas enzimáticos participarem, à semelhança das MAO, na produção de peróxido de hidrogénio (Yeldandi et al., 2000; Lee et al., 2004; Agostinelli et al., 2004), embora, seja a dismutação do radical  $O_2^{\bullet-}$  pela acção catalisadora da enzima antioxidante superóxido-dismutase, a principal fonte de produção desta espécie reactiva (Lee et al., 2004).

#### 2.5.2.5 Activação das células fagocíticas imunocompetentes

A formação das ERO pelas células fagocíticas presentes no sistema imune consiste na activação de determinados leucócitos, nomeadamente neutrófilos e macrófagos, de forma a possibilitar uma melhoria dos mecanismos de defesa do organismo, em resposta aos danos musculares induzidos pelos exercícios físicos, especialmente, os esforços prolongados, as acções predominantemente excêntricas e os exercícios exaustivos (Sachdev e Davies, 2008). A activação destas células é acompanhada pelo aumento do consumo de oxigénio, seguido de redução unieletrónica, resultando na formação de ERO. Este processo de formação ocorre através da acção catalisadora da enzima NADPH oxidase.

(NADPH-oxidase)



Durante este processo, duas moléculas de oxigénio são necessárias para a efectuar a reacção conhecida por explosão oxidativa (*oxidative burst*), na qual uma importante quantidade de ERON assume um papel biológico essencial durante a resposta imunológica. A conversão do radical  $\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da acção da enzima SOD, permite que posteriormente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  possa ser convertido em ácido hipocloroso (HOCL), o qual assume grande importância na destruição do antigénio (Aruoma, 1999). De facto, os neutrófilos contêm em seus grânulos azurófilos a enzima mieloperoxidase (MPO) que, na presença do ião cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), converte o peróxido de hidrogénio em ácido hipocloroso, o qual induz lesão oxidativa, facilitando a destruição do antigénio (Quindry et al., 2003).

Relativamente aos esforços predominantemente aeróbios, Suzuki et al. (2003) encontraram aumentos significativos na actividade da enzima MPO presente no plasma e na urina de corredores ao término de uma prova de maratona. Este aumento da actividade da enzima MPO, em resposta a realização de um esforço exaustivo, parece ser sistémico, uma vez que Belcastro et al. (1996) encontraram incrementos significativos não somente no plasma, mas também no fígado (40%), coração (50%) e músculo gastrocnémio (41%). Diversos estudos têm referido aumentos significativos nos níveis plasmáticos de neutrófilos e ácido hipocloroso em animais e indivíduos submetidos a esforços prolongados e/ou intensos (Yamada et al., 2000; Quindry et al., 2003; Morozov et al., 2006). No entanto, em resposta ao exercício físico, a formação aumentada das ERO também pode provir da interrupção temporária das bombas de cálcio ATP-dependentes, que devido ao aumento das concentrações intracelulares pode activar a via enzimática da xantina-oxidase gerando o radical  $\text{O}_2^-$  ou activar a enzima fosfolipase  $\text{A}_2$  (PLA 2) presente no sarcolema, no sarcoplasma, na membrana de diversos organelos e no interior dos lisossomos, a qual sintetiza o ácido araquidónico a partir dos fosfolipídeos, e que ao reagir com as enzimas ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase gera as prostaglandinas, leucotrienos e o radical hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ) (Mastaloudis et al., 2001; Sackeck e Blumberg, 2001; Schneider e Reischak, 2004). De facto, a enzima xantina-oxidase, localizada ao nível do endotélio capilar, perante

determinadas situações como a elevada concentração dos iões cálcio, aumento da temperatura e activação leucocitária (Duarte, 1993; Mastaloudis et al., 2001; Satchek e Blumberg, 2001) pode ser activada e posteriormente convertida numa desidrogenase oxigénio-dependente, promovendo a partir desta reacção, a conseqüente formação de espécies reactivas de oxigénio (Duarte, 1993; Satchek e Blumberg, 2001; Schneider e Reischak, 2004).

### 2.5.3 Stresse oxidativo

O conceito de stresse oxidativo pressupõe a ruptura do equilíbrio entre os mecanismos de produção e os processos endógenos de neutralização das espécies reactivas de oxigénio (ERO) (Mastaloudis et al., 2006).

O aumento do consumo de oxigénio induzido pelo exercício físico se apresenta como uma situação favorável à produção acrescida de espécies reactivas de oxigénio (Alessio, 1993; Mastaloudis et al., 2001; Cooper et al., 2002; Palmer et al., 2003; Aguilo et al., 2005). Esta situação parece agravar-se particularmente em indivíduos treinados, uma vez que o treino da resistência aeróbia aumenta a possibilidade da realização de esforços que exijam um maior consumo de oxigénio (Finaud et al., 2006), agravando os efeitos deletérios do oxigénio, na medida que, cerca de 2 a 5% do oxigénio consumido pode sofrer redução univalente sequencial e formar radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), contribuindo para o incremento do stresse oxidativo (Satchek e Blumberg, 2001; Szweda et al., 2002; Wallace, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado que o treino da resistência aeróbia promove uma redução do stresse oxidativo e dos danos musculares (Mastaloudis et al., 2001; Cooper et al., 2002; Elosua et al., 2003; Schneider et al., 2004), embora, consoante a sua carga e especificidade, este pode também aumentar os efeitos do stresse oxidativo, em resposta ao acréscimo da produção de ATP induzido pelo exercício, resultando no aumento de fluxo de electrões através da CTE mitocondrial, originando uma fuga de electrões para o oxigénio molecular, potenciando desta forma, um aumento na produção de ERON (Benard e Rossignol, 2008a). De facto, a produção acrescida de ERON associada ao treino da resistência aeróbia pode promover alterações oxidativas de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos entre outros constituintes celulares

(Hartmann e Niess, 2000), podendo em casos extremos, conduzir a um ciclo vicioso de lesões oxidativas, que podem causar alterações no mDNA e na função mitocondrial, resultando num declínio da produção energética, desequilíbrios redox e consequente disfunção celular (Benard e Rossignol, 2008a). Contudo, tem vindo a ser reconhecido que, as ERON, quando em baixas concentrações, podem afectar positivamente quer o sistema antioxidante, quer os diferentes processos metabólicos relacionados com o transporte de glucose, actividade da ATPase, libertação de cálcio, actividades enzimáticas (CK), biogénese mitocondrial e diferenciação das fibras musculares (Sakamoto e Goodyear, 2002; Taylor e Starnes, 2003).

A acidose metabólica verificada no exercício intenso, pode igualmente agravar o stresse oxidativo, em virtude da libertação de ferro, a partir da hemoglobina, tornando-o disponível para participar na formação de radicais intracelulares, o que acordo com alguns autores, estaria associado a indução de fadiga e danos musculares (Vina et al., 2000; Leeuwenburgh e Heineck, 2001).

#### 2.5.3.1 Detecção do stresse oxidativo

A avaliação do stresse oxidativo nos sistemas biológicos pode ser estimada de forma directa, através do método espectroscópico por ressonância, o qual permite uma avaliação directa das propriedades paramagnéticas das diferentes ERO (Ashton et al., 1998; Ashton et al., 1999; Rimbach et al., 1999). Embora possa ser mensurada *in vivo* e *in vitro*, a forma mais precisa (*in vivo*), não é praticada em humanos devido a elevada toxicidade dos produtos utilizados (Rimbach et al., 1999; Clarkson e Thompson, 2000). A interpretação dos resultados pelo método directo pode também ser dificultada por factores como as concentrações extremamente baixas em que ocorrem ( $10^{-11}$ M) e as elevadas velocidades de reacção (Ashton et al., 1999; Cooper et al., 2002). Os métodos indirectos utilizados na investigação do stresse oxidativo em humanos compreendem a avaliação de subprodutos da lipoperoxidação, incluindo os dienos conjugados, os F-2 isoprostanos, a quimioluminescência urinária, os peróxidos lipídicos e as substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a modificação das proteínas (concentração de grupos carbonila), a alteração do DNA (8-hidroxideoxiguanosina-8-OHdG), assim como os níveis dos

componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Thompson, 2000; Mastaloudis et al., 2001; Cooper et al., 2002; Finaud et al., 2006). A enzima CK e a mioglobina constituem importantes indicadores de danos celulares, podendo no entanto, serem considerados marcadores indirectos de stresse oxidativo (Rimbach et al., 1999; Petibois., 2002). Todavia, a CK e a mioglobina não representam marcadores específicos de stresse oxidativo, especialmente em atletas, nos quais ambos os valores basais de referência se mostram elevados em virtude das características desportivas (Dawson et al., 2002).

#### 2.5.3.2 Lipoperoxidação (LPO)

Um dos principais mecanismos de lesão biológica promovido pela acção das ERO é a lipoperoxidação (LPO), que consiste na oxidação da camada lipídica da membrana celular, principalmente nas fibras musculares mais potenciadas para o metabolismo oxidativo (Halliwell e Gutterige, 1999). A LPO constitui um importante indicador da avaliação de danos celulares induzidos pelas diferentes espécies reactivas, diminuindo a funcionalidade da barreira celular, do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias. (De Zwart et al., 1999). Estudos anteriores comprovaram que, para além de apresentarem uma elevada reactividade, os lipoperóxidos formados são mutagénicos, carcinogénicos e imunossupressores (Bendich et al., 1990; Jenkins et al., 1993). A alteração das funções mitocondriais decorrentes da exposição as ERO e o ataque oxidativo a proteínas contrácteis e enzimas tem sido sugeridos como importantes factores indutores da fadiga muscular (Powers e Lennon, 2000). As mitocôndrias são organelos particularmente susceptíveis aos danos oxidativos induzidos pelas ERO, comprometendo o complexo respiratório, com consequente diminuição do transporte de electrões e formação de ATP (Finaud et al., 2006). Desta forma, observa-se uma menor eficiência das vias aeróbias de energia, o que pode representar efeitos negativos na actividade muscular, pois devido a consequente activação das vias anaeróbias, resultam elevadas concentrações de fosfato inorgânico e aumentados níveis de acidose, sendo estes os dois principais factores indutores da fadiga muscular durante o esforço (Powers e Lennon, 2000).



O radical  $O_2^{\bullet}$  pode promover reacções em cadeia nos ácidos gordos dos fosfolípidos, conduzindo a lipoperoxidação da membrana e a consequente perda da sua organização bipolar, para além da libertação de aldeídos tóxicos e alcanos capazes de inactivar diversas enzimas celulares, resultando na alteração das suas propriedades funcionais (Evans, 2000).

O malondialdeído (MDA) é o aldeído mais frequentemente utilizado como indicador de lipoperoxidação em resposta ao exercício físico, pois ao reagir com ácido tiobarbitúrico, origina as espécies reactiva ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), permitindo uma medida espectrofotométrica do produto final da degradação oxidativa dos lípidos, podendo também, reagir com aldeídos saturados e prostaglandinas (Ji, 2002). Apesar da determinação das TBARS não ser específica do MDA, podendo induzir uma sobrestimação, este método é aceite como um marcador geral da lipoperoxidação, devendo, contudo, ser analisado de forma cautelosa no estudo dos resultados (Groussard et al., 2003). O MDA é produzido durante a auto-oxidação dos ácidos gordos e representa um produto de oxidação secundária (Finaud et al., 2006). Relativamente a avaliação do stresse oxidativo induzido pelo exercício físico, em particular o comportamento dos TBARS, os estudos demonstram inconsistência dos resultados. Diversos autores evidenciaram aumentos significativos dos níveis plasmáticos de TBARS pós-esforço (Kanter et al., 1988; Sen et al., 1994; Alessio et al., 1997; Borsheim et al., 1999; Laaksonen et al., 1999; Ramel et al., 2004), dentre os quais salienta-se o estudo de Marzático et al. (1997) com corredores treinados, onde foi observado ao término de um protocolo de esforço máximo, um aumento significativo de 220% relativamente aos valores de partida ( $2,85 \pm 0,3$  vs  $9,12 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.05$ ). Todavia, alguns estudos não encontraram alterações na respectiva concentração plasmática (Maughan et al., 1989; Chung et al., 1999; Surmen-Gur et al., 1999; Akova et al., 2001; Sacke et al., 2003). Contrariamente a estes resultados, são referidos na literatura, estudos onde foram observadas diminuições significativas dos níveis de TBARS em resposta a realização de esforços agudos (Lovlin et al., 1987; Kretzschmar et al., 1991; Groussard et al., 2003). Apesar das diferenças nas metodologias experimentais poderem, em parte, justificar este tipo de discrepâncias nos resultados referentes ao comportamento dos TBARS, a ocorrência de falhas na correcção das

alterações plasmáticas induzidas pelo exercício tem sido sugerida como a principal causa do aumento significativo deste indicador em diversos estudos (Ashton et al., 1998; Ashton et al., 1999; Surmen-Gur et al., 1999; Volaard et al., 2005).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1999), as lesões induzidas pelas ERO nas membranas celulares do músculo esquelético, particularmente a LPO, podem alterar a permeabilidade e a capacidade de transporte através da membrana, resultando na libertação de enzimas que degradam os lisossomos, podendo conduzir à necrose e a uma resposta inflamatória aguda. Estudos realizados por Clarkson e Thompson (2000) e Banerjee (2003) determinaram que os produtos oriundos da LPO podem difundir-se do local das reacções, dando origem a edemas celulares, alterações da permeabilidade vascular, inflamação e quimiotaxia, além de alterar a actividade das enzimas fosfolipases e de induzir a libertação de ácido araquidónico, o qual ao reagir com a enzima ciclo-oxigenase (COX), promove a subsequente formação de prostaglandinas e leucotrienos.

#### 2.5.4. Sistema de defesa antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que auxiliam na redução dos danos induzidos pelo stresse oxidativo, promovendo a formação de radicais menos reactivos e inibindo as reacções em cadeia desencadeadas pelas ERO, as quais podem comprometer principalmente a integridade das proteínas, lípidos e DNA (Finaud et al., 2006). Neste sentido, Niess e Simon (2007) referem que os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos parecem possuir um efeito protector nas células, reduzindo as lesões e promovendo um equilíbrio entre as componentes pró-oxidantes e antioxidantes, corroborando desta forma os estudos de Marzatico et al (1997), Ji (1999) e Ji, (2007b) nos quais, foi demonstrada uma elevada adaptação dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos em situações agudas e crónicas do exercício físico. No entanto, o efeito modelador do treino físico na capacidade antioxidante mostra-se controverso (Adhietty et al., 2003), tendo sido referidos aumentos na actividade de determinadas moléculas antioxidantes em resposta ao treino regular (Miyazaki et al., 2001; Powers e Shanely, 2002), enquanto

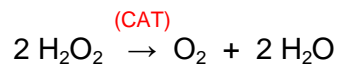
outros autores não observaram alterações nas respectivas concentrações (Venditti et al., 1999; Tonkonogi et al., 2000b).

O sistema de defesa antioxidante compreende uma diversidade de antioxidantes activos, incluindo os de origem enzimática (endógenos): superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-reductase (GR) e a glutathione-peroxidase (GPX) e os antioxidantes não-enzimáticos: vitamina A (carotenos), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), flavonóides, tióis (incluindo a glutathione-GSH), coenzima Q<sub>10</sub>/Ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina, ferritina e importantes micronutrientes como o ferro, zinco, cobre, selénio. Segundo Dekkers et al. (1996) a eficiência da acção do sistema antioxidante está intrinsecamente relacionada a factores como a ingestão de nutrientes e a biossíntese de enzimas e compostos antioxidantes endógenos, os quais podem ser alterados pelo exercício físico agudo e o treino regular, assim como pela nutrição e a idade.

#### 2.5.4.1 Sistema de defesa antioxidante enzimático

A enzima SOD catalisa a conversão do anião superóxido a oxigénio e peróxido de hidrogénio, sendo considerada a primeira linha de defesa contra o stresse oxidativo (Powers e Lennon, 1999). Encontram-se presentes no organismo, três isoenzimas SOD caracterizadas pela sua localização celular e pelo ião metálico (co-factor) ligado ao seu local activo. A Cu/Zn-SOD é encontrada predominantemente no citosol, em elevadas concentrações nos eritrócitos e fígado; a Mn-SOD localiza-se na matriz mitocondrial, estando presente principalmente no coração, rins e fígado e a Cu/Zn-SOD extracelular, predominante no espaço extracelular em altas concentrações no tecido pulmonar e rins (Nakao et al., 2000). Estudos demonstram que a actividade da enzima SOD, em resposta ao exercício físico, pode estar condicionada ao perfil oxidativo da fibra muscular, sendo maior nas fibras com elevada capacidade oxidativa (Powers et al., 1994; Powers e Sen, 2000). A actividade da SOD total na musculatura esquelética é inferior a actividade hepática e renal, sendo similar a observada no cérebro, coração e pâncreas, embora, se mostre superior a actividade eritrocitária (Halliwell e Gutteridge, 1999).

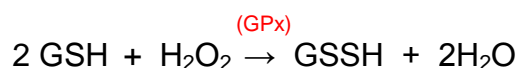
A enzima catalase (CAT) encontra-se presente principalmente nos peroxissomas e em menor concentração nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Sua principal função é catalisar a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado ao final da cadeia de transporte de electrões em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (Powers e Lennon, 2000). De forma similar ao observado na actividade da enzima SOD, a actividade da CAT mostra-se mais elevada nos tecidos predominantemente oxidativos do ponto de vista metabólico (Mastaloudis et al., 2001):



A CAT pode igualmente utilizar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  para promover a detoxificação de determinadas substâncias tóxicas, através da reacção via peroxidase, a qual requer a presença de substratos específicos como fenol, etanol(A) ou ácido fórmico (Finaud et al., 2006):



A enzima glutatião-peroxidase (GPX) encontra-se presente no citosol e nas mitocôndrias (Powers e Lennon, 1999). A isoforma GPX selénio-dependente encontra-se na mitocôndria e no citosol, enquanto a forma que independe deste metal como co-factor, a Glutathione-S-Transferase (GST), está presente apenas no citosol e metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos (Clarkson e Thompson, 2000). No exercício físico, a sua activação decorre do aumento no consumo de oxigénio ( $\text{VO}_2$ ), e a sua acção está direccionada à remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxidos orgânicos da célula (Halliwell e Gueridge, 1999). Efectivamente, a enzima GPX actua como mecanismo protector contra o stresse oxidativo, utilizando a GSH como dador de electrões/hidrogénios, convertendo a glutathione-reduzida (GSH) em glutathione-oxidada (GSSG) e água. (Halliwell e Gueridge, 1999)

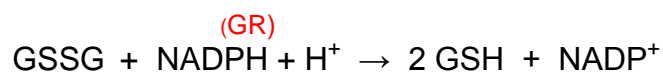


Desta forma, as enzimas CAT e GPX actuam de forma semelhante, inibindo a acumulação do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , evitando a consequente formação do

radical hidroxilo (OH), embora, a enzima GPX possua uma maior afinidade pelo  $H_2O_2$  relativamente a enzima CAT, o que lhe confere uma acção mais activa nas situações de remoção celular (Jenkins, 1993; Yu, 1994).

A maior actividade eritrocitária da enzima GPX observada por Mastaloudis et al. (2001) em atletas de esforços prioritariamente aeróbios quando comparados com indivíduos destreinados, é corroborada por diversos autores (Schneider et al., 1994; Tessier et al., 1995; Hellstein et al., 1996; Leeuwenburgh et al., 1997; Powers et al., 1999) sugerindo desta forma, a ocorrência alterações compensatórias positivas no sistema antioxidante dos atletas, as quais constituem importantes mecanismos de protecção do organismo contra a lipoperoxidação e danos na membrana celular.

A enzima glutationa-redutase (GR) não apresenta características antioxidantes directas, assumindo porém um papel fundamental no normal funcionamento do sistema antioxidante, uma vez catalisa a reacção de regeneração da GSH, utilizando a nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADPH) como co-factor, convertendo a GSSG novamente em GSH (Droge, 2002). Em condições fisiológicas normais, a enzima GR assegura mais de 98% da GSH intracelular na forma reduzida, desempenhando uma função preponderante na manutenção do meio intracelular (Powers e Sen, 2000).



Estudos têm demonstrado que atletas de esforços aeróbios apresentam maior actividade das enzimas antioxidantes SOD, GPX, GR e CAT, assim como uma capacidade antioxidante total plasmática (TAS) aumentada comparativamente a indivíduos não-treinados, evidenciando assim, uma maior adaptação do sistema de defesa enzimático ao exercício físico (Ashton et al., 1998; Selamoglu et al., 2000; Schneider et al., 2004). Neste sentido Marzático et al. (1997) relataram uma maior actividade da GPX eritrocitária, em repouso, nos corredores de velocidade e maratonista treinados, comparativamente a indivíduos não treinados, corroborando os resultados encontrados por Brites et al. (1999) que verificaram uma actividade aumentada da SOD plasmática em jogadores de futebol, em repouso, quando comparados a indivíduos

sedentários. Nesta perspectiva, Knez et al. (2007) estudaram atletas maratonistas e ultra-maratonistas durante os respectivos períodos de treinos, verificando que, em relação ao grupo controlo de indivíduos não treinados, os atletas maratonistas apresentavam uma maior actividade da enzima GPX eritrocitária em repouso, enquanto nos atletas de ultra-maratona, foram observados reduzidos níveis de malondialdeídos (MAD) em repouso e elevada actividade das enzimas GPX e CAT, indicando desta forma, que o processo sistemático de treino para os respectivos esforços resulta em diferentes efeitos nas actividades enzimáticas antioxidantes do organismo.

#### 2.5.4.2 Sistema de defesa antioxidante não-enzimático

Os efeitos do exercício físico aeróbio não estão limitados ao sistema enzimático antioxidante. Alterações nas concentrações de antioxidantes não-enzimáticos presentes no plasma, na urina e nos tecidos são referidas, embora, os resultados apresentados sejam frequentemente contraditórios (Finaud et al., 2006).

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático inclui os compostos antioxidantes directos: vitamina A, vitamina E, vitamina C, Coenzima Q<sub>10</sub>, ácido úrico, ácido glutatião, flavonóides; antioxidantes indirectos: proteínas de choque térmico (HSP), ceruloplasmina, bilirrubina, ferritina, albumina e importantes micronutrientes (ferro, cobre, zinco, manganês, selénio) que actuam como co-factores enzimáticos conferindo uma maior protecção ao organismo contra as ERON, exercendo também, importantes funções no sistema biológico como a síntese de proteínas, o equilíbrio redox, a biogénese celular, a inibição de enzimas pró-oxidantes (Dekkers et al., 1996; Powers e Lennon, 2000).

Segundo Ji (1999), as espécies reactivas de oxigénio constituem uma séria ameaça aos sistemas de defesa antioxidante da célula, podendo reduzir as reservas de importantes vitaminas antioxidantes e também da glutathiona (GSH), aumentando a susceptibilidade dos tecidos à lesão oxidativa. No entanto, diversos autores referem um significativo aumento dos níveis plasmáticos das vitaminas E, C e do ácido úrico, todos com elevado potencial

antioxidante, após a realização do exercício físico (Brites et al., 1999; Evelson et al., 2002; Cazzola et al., 2003).

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) constitui o principal antioxidante lipossolúvel (captador lipofílico), protegendo os ácidos gordos polinsaturados das membranas biológicas contra a lipoperoxidação mediada pelas espécies reactivas de oxigénio (Cachia et al., 1998). O  $\alpha$ -tocoferol encontra-se presente em todas as membranas celulares, em particular, na membrana interna da mitocôndria e actua de forma a impedir a propagação da lipoperoxidação através da interceptação de peróxidos lipídicos ( $L^{\bullet}$ ,  $LO^{\bullet}$  e  $LOO^{\bullet}$ ), evitando a ligação destes com os ácidos gordos polinsaturados da membrana e, sim, com um antioxidante possibilitando a formação de substâncias menos activas como o  $\alpha$ -tocoferil (Banerjee, 2003). A sua ingestão está associada com uma maior tolerância à glicose, maior eficácia da acção insulínica e melhora do perfil lipoprotéico (Evans, 2000). Entretanto, tem sido referido que elevadas quantidades de  $\alpha$ -tocoferol podem induzir um efeito pró-oxidante em lipoproteínas de baixa densidade (Schneider et al., 2003).

A vitamina A (retinol) representa uma vitamina lipofílica e encontra-se presente em diversas substâncias lipídicas e na membrana celular. Actua conjuntamente com as vitaminas C e E neutralizando a espécie reactiva  $^1O_2$  e os radicais ROOH, podendo ser formada a partir da conversão do  $\beta$ -caroteno, o qual é sugerido atenuar os efeitos deletérios da lipoperoxidação através da desactivação das espécies reactivas de oxigénio (Powers e Lennon, 2000).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um importante antioxidante hidrofílico (captador) presente no compartimento citoplasmático da célula e no fluido extracelular (Palmer et al., 2003) que actua prevenindo o início da lipoperoxidação, podendo também, realizar a reciclagem dos demais antioxidantes como a vitamina E e o urato (Mastaloudis et al., 2004). Ao efectuar a reciclagem da vitamina E, a vitamina C origina um radical denominado semi-desidroascorbato (Schneider et al., 2003), o qual pode retornar a vitamina C através da acção da enzima NADH semi-desidroascorbato-reductase ou por acção da glutathiona-reduzida (GSH) (Powers e Lennon, 1999). Tem sido sugerido por alguns autores, que o aumento da secreção do cortisol, em resposta ao exercício físico, promove a libertação da vitamina C da glândula adrenal (Hornsby e Crivello, 1983;

Gleeson et al., 1987) e/ou a mobilização desta vitamina dos demais tecidos como leucócitos e eritrócitos (Viguie et al., 1993). Posteriormente, Palmer et al. (2003) demonstraram uma correlação positiva entre os aumentos dos níveis de cortisol e ácido ascórbico plasmático em resposta a realização do exercício.

Estudos realizados por Fischer (2006) e Kassaf et al. (2003) observaram que a administração de vitamina C alterava a expressão de proteínas de choque térmico HSP70 e HSP72 relacionadas ao estado redox celular. As proteínas de choque térmico (HSPs) compreendem proteínas capazes de exercer efeitos protectores contra uma diversidade de agente stressores (Nishizawa et al., 1999; Smolka et al., 2000). Diversos estudos têm evidenciado aumentos significativos das HSP durante a realização de exercícios físicos, particularmente em situações de variações de temperatura corporal, processos inflamatórios e stresse oxidativo (Nishizawa et al., 1999; Smolka et al., 2000; Mikami et al., 2002; Hamilton et al., 2003). De acordo com Beere et al. (2000), as HSP70 localizadas no citosol e na mitocôndria constituem importantes moléculas com acção anti-apoptótica, possuindo a capacidade de se ligarem ao factor de activação apoptose-protease (Apaf-1) inibindo desta forma, a formação do complexo proteico denominado apoptosoma. Adicionalmente, Adhietty et al. (2008) referem que as HSP70 parecem também inibir o chamado factor indutor apoptótico (AIF), contribuindo de forma relevante na atenuação das vias apoptóticas no músculo esquelético.

O tripeptídeo gama-glutamilcisteinilglicina, (GSH), presente em quantidades milimolar (mmol) na maioria das células e tecidos, representa a via antioxidante não-enzimática mais importante nas células, reagindo e neutralizando os radicais livres e espécies reactivas de oxigénio no organismo (Reid, 2001; Fox, 2006). A sua acção antioxidante se deve à presença de um grupo sulfidril, o qual actua como dador de electrões (Sies, 1999). O GSH sintetizado no fígado, a partir de aminoácidos endógenos (cisteína ou metionina) ou provenientes da dieta, constitui um importante antioxidante hidrofílico capaz de reagir com o oxigénio singleto ( ${}^1_2\text{O}$ ), o radical hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ) e demais radicais carbono, cedendo-lhes um ião de hidrogénio, assumindo o estado oxidado (GSSG) (Ji, 1999; Powers e Lenon, 1999). Contudo, durante a realização do exercício, o estado redox da glutathiona, expresso pela relação GSSG/GSH, não se altera de forma expressiva, devido o facto do GSSG formado em resposta ao



aumento da produção de ERO, poder ser reduzido novamente a GSH através da acção da enzima glutathiona-reductase (GR) utilizando a NADPH como redutor (Leeuwenburgh et al., 1997). Entretanto, durante exercícios prolongados e intensos, pode ocorrer uma eventual diminuição da concentração muscular e plasmática de GSH em consequência da redução das reservas hepáticas e/ou quando a utilização de GSH exceder a sua síntese/absorção (Duthie et al., 1990). O desequilíbrio na relação GSSG/GSH altera o estado redox intracelular e, conseqüentemente, conduz ao stresse oxidativo, o qual activa o chamado factor de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) encontrado nos linfócitos B, linfócitos T, monócitos e macrófagos, cuja activação é responsável pela resposta inflamatória, como por exemplo, na doença isquémica do coração (DIC) (Droge, 1994). O factor de transcrição nuclear kB (NFkB) juntamente com a proteína MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) representam duas das principais vias de sinalização induzidas pelas ERON, capazes de modular a capacidade de defesa antioxidante da célula muscular (Ji, 2007). De salientar, a acção da GSH na diminuição de radicais de vitamina E provenientes das reacções em cadeia com os radicais alcoxilo (RO $\cdot$ ) e peroxilo (ROO $\cdot$ ) e radicais de vitamina C formados durante a reciclagem da vitamina E (Powers e Lennon, 1999; Reid, 2001). Estudos realizados por Shang et al. (2003) demonstram que uma reduzida concentração de GSH nas células pode estar associada a danos celulares e diminuição da eficiência imunológica, embora, estes efeitos possam ser compensados através da suplementação de vitaminas C e E.

#### 2.5.5 Exercício aeróbio agudo e o stresse oxidativo

Diversos estudos tem demonstrado a possibilidade de esforços de elevada intensidade e/ou duração prolongada, promoverem um stresse oxidativo ao organismo, em resposta a uma produção acrescida de ERON, devido a factores como: elevado consumo de oxigénio, aumentando o processo da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a produção de O $_2$  $\cdot^-$  mitocondrial, via reacções do oxigénio com os radicais flavina e ubisemiquinona (Cooper et al., 2002), elevada acidose metabólica e aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas (Tauler et al., 2002; Urso e Clarkson, 2003), elevada taxa de

auto-oxidação da hemoglobina (Cooper et al., 2002), hipertermia (Salo et al., 1991) e processo oxidativo das células inflamatórias mobilizadas durante um evento de lesão tecidual (Sacheck e Blumberg, 2001; Urso e Clarkson, 2003), incorrendo desta forma, numa potencial lesão da membrana celular e dos organelos presentes no tecido muscular, fígado, coração, sangue e demais tecidos periféricos (Nakao et al., 2000; Svensson et al. 2002; Groussard et al., 2003).

A realização de esforços físicos de carácter predominantemente aeróbios como a corrida, o ciclismo e a natação, está associada a um aumento do consumo de oxigénio ( $VO_2$ ), o qual poderá favorecer um aumento da produção de ERON, intensificando o stresse oxidativo (Alessio, 1993; Mastaloudis et al., 2001; Aguilo et al., 2005). De facto, resultados obtidos por Ashton et al. (1998) e Palmer et al. (2003) demonstram que, quanto mais elevada a intensidade do esforço, maior será a produção de ERO e consequentemente, o stresse oxidativo induzido. Apesar do exercício físico poder promover importantes alterações nas actividades antioxidantes enzimática e não enzimática, a intensidade e a duração do exercício, assim como o nível de treino do indivíduo, constituem factores que podem condicionar o surgimento dos produtos da lipoperoxidação (Leeuwenburgh e Heineck, 2001; Ji, 2002; Lekhi et al., 2007). Neste sentido, Lovlin et al. (1987) submeteram um grupo de indivíduos destreinados a diferentes protocolos de esforço em cicloergómetro (40%, 70% e 100%  $VO_{2max}$ ) demonstrando que a diminuição na peroxidação lipídica ocorreu a intensidade de 40% $VO_{2max}$ , permanecendo inalterada a 70% $VO_{2max}$ , enquanto aumentos significativos foram constatados a intensidade de 100% $VO_{2max}$ .

Margaritis et al. (1997) não observaram alterações significativas referentes as concentrações de TBARS e GSSH em triatletas altamente treinados, após a realização de uma prova de triatlo longo (4km/120km/30km). Entretanto, Marzático et al. (1997) ao estudarem uma amostra constituída por corredores treinados verificaram, após uma prova de corrida de 21km, aumentos nas concentrações plasmáticas de MDA e nas actividades enzimáticas da SOD e GPX, permanecendo a concentração da enzima CAT inalterada. Estes resultados divergem, em parte, dos dados obtidos por Videl et al. (2001) num estudo com indivíduos treinados, onde foram observados aumentos da

actividade da enzima CAT, enquanto as concentrações plasmáticas das enzimas SOD e GPX não evidenciaram alterações, embora o comportamento referente aos valores de TBARS se mostrasse similar.

A actividade da enzima CAT em resposta ao exercício agudo mostra-se conflitual. Rokitzki et al. (1994) não encontraram diferenças significativas nas concentrações da CAT eritrocitária em corredores treinados, após a realização de uma maratona. No entanto, numa amostra de ciclistas treinados, após um período de esforço submáximo de 90 minutos, Aguilo et al. (2000), observaram uma diminuição de aproximadamente 20% na respectiva actividade eritrocitária enzimática. Adicionalmente, Marzático et al. (1997) relataram que corredores velocistas que realizavam exercícios de potência, não apresentavam alterações na actividade da CAT eritrocitária, embora, corredores meio-fundistas e fundistas, após sessões de treino aeróbio, exibissem aumentos na sua actividade.

Hellstein et al (2001) verificaram aumentos significativos nos valores referentes a concentração plasmática de alantoina e ácido úrico muscular em ciclistas treinados, após a realização de um protocolo de esforço a 90%  $VO_{2max}$  até a exaustão, apesar das concentrações de GSH, cisteína e ácido úrico plasmático permanecerem estáveis. Contrariamente a estes resultados, Inal et al. (2001) ao avaliarem um grupo de nadadores treinados após uma prova de 800 metros, evidenciaram uma diminuição significativa das concentrações GSH. Neste estudo foram também observados aumentos significativos nas actividades das enzimas SOD e GPX eritrocitárias.

Myiazaki et al. (2001) ao submeterem 9 indivíduos destreinados a um teste de  $VO_{2max}$ , em cicloergómetro, verificaram aumentos nos valores das TBARS e dienos conjugados, corroborando o estudo de Vider et al. (2001) que observaram similares aumentos nos valores referentes as TBARS e dienos conjugados, acompanhados de aumentos nas concentrações de GSH e da enzima CAT, tendo sido também constatado um aumento da capacidade antioxidante plasmática total (TAS).

Aumentos nos valores de dienos conjugados e MAD plasmáticos foram igualmente evidenciados por Tauler et al. (2002), após o término de uma prova de ultramaratona, indicando desta forma que, em esforços desta magnitude, as defesas antioxidantes, por si só, não conseguem inibir a indução do stresse

oxidativo e consequente ocorrência de lipoperoxidação. Posteriormente, Palmer et al. (2003) num estudo similar com corredores de uma ultramaratona de 80 km constatou ao término da prova, aumentos expressivos nas concentrações de hidroperóxidos lipídicos e F2-isoprostanos.

A magnitude do stresse oxidativo agudo induzido por esforços prolongados foi estudada por Aguilo et al. (2005) ao avaliarem um grupo de ciclistas treinados após uma prova de estrada de 171 km, demonstrando indicativos consistentes da ocorrência de peroxidação lipídica expressos pelo aumento dos níveis de glutathiona-oxidada (GSSH) e TBARS. No entanto, foi ainda verificada na respectiva amostra, uma diminuição significativa da actividade da enzima glutathiona-peroxidase (GPX).

Evidências de stresse oxidativo elevado foram encontradas por Neubauer et al. (2008) em atletas finalistas da prova do triatlo ironman, onde foram verificados aumentos significativos nos valores referentes a concentração de dienos conjugados, produtos da oxidação avançada de proteínas (AOPP), ácido úrico, malondialdeído (MDA), lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) e actividade da enzima superóxido-dismutase (SOD).

Níveis elevados de stresse oxidativo foram recentemente observados por Ascensão et al. (2008) ao término de um jogo de futebol, tendo sido encontrados aumentos significativos nas concentrações plasmáticas de malondialdeídos (MDA) e mioglobina. De referir também, que no período de recuperação subsequente ao exercício, foi igualmente evidenciado o aumento nos níveis plasmáticos de ácido úrico e estado antioxidante total (TAS), que juntamente com a elevação dos níveis plasmáticos de CK apresentada pelos jogadores, indiciam a ocorrência de danos musculares e oxidativos.

Scheffer et al. (2009) ao analisarem a resposta de duas sessões diárias de natação sobre os parâmetros de stresse oxidativo em nadadores competidores encontraram aumentos significativos nos níveis de lipoperoxidação (TBARS), carbonilação de proteínas e actividade eritrocitária da enzima catalase, enquanto relativamente ao comportamento do conteúdo de tióis total (TT), utilizado como indicador de sulfidrilas não oxidadas, presentes nos aminoácidos, foi observada uma diminuição após a segunda sessão de exercício. Esta diminuição verificada no referido marcador de oxidação de proteínas, (TT), corrobora o estudo de Magalhães et al. (2007), e decorre do

aumento na concentração de cálcio intramuscular que ao activar as proteases, reduz o conteúdo de sulfidril, indiciando a ocorrência de dano oxidativo.

#### 2.5.6 Treino, stresse oxidativo e adaptações antioxidantes

Estudos realizados por Davies et al. (1982) propuseram que a formação acrescida de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio (ERON) e consequente indução de stresse oxidativo pudesse constituir o estímulo inicial para a biogénese mitocondrial numa situação de treino crónico. Contudo, a natureza e a magnitude da resposta adaptativa ao treino parecem estar condicionadas a factores como a intensidade, duração e frequência do exercício, tipo de treino, limitações genéticas, condição física do indivíduo e estado nutricional (Cooper et al., 2002; Volaard et al., 2005; Finaud et al., 2006). É consensual na literatura, a constatação dos efeitos positivos do treino aeróbio na actividade enzimática antioxidante, principalmente ao nível muscular, plasmático, hepático e cardíaco (para referências ver Finaud et al., 2006). Neste sentido, Ji (1999) observou evidências de que o treino da resistência aeróbia parece promover um aumento nas actividades antioxidantes enzimáticas (GPX, CAT e SOD), assim como, uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica determinados pela concentração de malondialdeídos tecidual e mitocondrial.

Robertson et al. (1991) compararam a actividade dos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático em corredores de Elite e indivíduos sedentários, verificando uma actividade eritrocitária aumentada da vitamina E, da GSH e da enzima CAT nos corredores, assim como, uma significativa correlação entre o volume de treino semanal e actividade enzimática antioxidante. De forma similar, Toskulkao e Glinsukon (1996), observaram que corredores treinados evidenciavam uma elevada actividade eritrocitária das enzimas SOD, GPx e CAT comparativamente a indivíduos não treinados. Adicionalmente, Evelo et al. (1992), observaram aumentos significativos na actividade eritrocitária da enzima glutathione-reductase (GR), ao submeterem um grupo de meio-maratonistas a um programa de treino regular durante 4 semanas. Neste sentido, a expressão das enzimas antioxidantes, parece assumir um papel preponderante na manutenção do equilíbrio redox, conferindo assim uma maior

protecção ao organismo (Viña et al., 2000; Selamoglu et al., 2000; Ji, 2007b). De facto, estudos realizados por Inal et al. (2001) e Subudhi et al. (2001) com atletas de Elite de natação e esqui de fundo, respectivamente, evidenciaram aumentos significativos na actividade das enzimas antioxidantes CAT e GPX ao término de um período de 8 semanas de treino, corroborando os resultados obtidos por Margaritis et al. (1997) num estudo com triatletas competitivos, onde foi sugerido que a magnitude da melhoria do sistema de defesa antioxidante estaria dependente das cargas de treino, uma vez que foi demonstrado neste estudo que, quanto mais elevado o consumo máximo de oxigénio ( $VO_{2max}$ ) do atleta, maior era a actividade eritrocitária da enzima GPX, conferindo-lhe uma maior protecção contra as ERO. Neste contexto, Leeuwenburgh et al. (1997) acrescentam que o stresse oxidativo induzido pelo exercício físico pode disparar adaptações específicas em respostas ao treino, sugerindo a ocorrência de um mecanismo de regulação complexo. No entanto, contrariamente ao observado no estudo de Margaritis et al. (1997), tem sido demonstrado por alguns autores, que as adaptações moduladas pelo treino na actividade enzimática antioxidante não se mostram relacionadas com o aumento dos níveis de  $VO_{2max}$ , sendo as referidas adaptações enzimáticas específicas, uma vez que estudos evidenciam maiores aumentos das actividades das enzimas SOD e GPx comparativamente a enzima CAT (Leeuwenburgh et al., 1999; Powers et al., 1999; Hollander et al., 1999; Miyazaki et al., 2001).

Relativamente a influência do treino de endurance na actividade da enzima SOD, observa-se alguma conflitualidade, pois enquanto estudos demonstram ocorrência de aumentos significativos em ambas as isoformas CuZn-SOD e Mn-SOD (Oyanagui, 1984; Toskulkao e Glinsukon, 1996; Ohishi et al, 1997; Brites et al., 1999), outros autores não verificaram quaisquer alterações na sua actividade (Tidus et al., 1996; Leeuwenburgh et al., 1997; Tauler et al., 1999). Na perspectiva do aumento da actividade antioxidante da enzima SOD no músculo esquelético induzido pelo treino de endurance Siu et al. (2004) observaram aumentos no conteúdo proteico da Mn-SOD e a existência de uma correlação negativa entre a referida actividade enzimática e o índice apoptótico e a actividade da caspase-3 (enzima-chave do processo apoptótico), o que sugere a ocorrência de um decréscimo dos índices pró-apoptóticos em

resposta a um programa de treino regular de endurance, que se reflecte no aumento da capacidade antioxidante. Adicionalmente, Adhietty et al. (2007a) referem que a actividade contráctil crónica atenua a libertação de citocromo c e do factor indutor apoptótico (AIF), para além de aumentar a expressão da HSP70, contribuindo para um efeito protector contra as vias apoptóticas. Possivelmente, diferenças nos procedimentos experimentais adoptados na determinação da actividade enzimática, nos protocolos de treino e na composição das fibras musculares avaliadas, possam explicar tais discrepâncias. De salientar, o facto do treino aeróbio induzir, concomitantemente, aumentos na actividade das enzimas oxidativas (citrato-sintetase, isocitrato-desidrogenase, oxoglutarato-desidrogenase) e na enzima SOD, em conformidade com os resultados demonstrados em diversos estudos (Booth e Thomason, 1991; Hammeren et al., 1992; Criswell et al., 1993; Powers et al., 1994). Contudo, de acordo com estes autores, o aumento da actividade oxidativa não se apresenta proporcional ao aumento da actividade enzimática antioxidante, evidenciando uma correlação relativamente baixa ( $r = 0,17$ ) (Hammeren et al., 1992).

No que respeita a actividade da enzima GPX modelada pelo treino aeróbio, a literatura mostra-se razoavelmente concordante quanto ao seu aumento (Venditti e Di Meo, 1997; Hellstein et al., 2001; Inal et al., 2001; Gul et al., 2002). Um estudo realizado por Selamoglu et al (2000) demonstrou serem significativas as alterações adaptativas modeladas pelo treino aeróbio regular, estando a actividade eritrocitária da enzima GPX aumentada em corredores fundistas de Elite comparativamente a indivíduos destreinados pertencentes ao grupo controlo. Posteriormente, Scheneider (2002) observou resultados similares, evidenciando uma maior actividade da enzima GPX em triatletas treinados quando comparados a indivíduos destreinados, sendo também constatado nos triatletas, um aumento da capacidade antioxidante total plasmática, provavelmente associada a maior libertação de substâncias antioxidantes como o ácido úrico. Corroborando estes resultados, Cazzola et al. (2003) demonstraram uma maior actividade eritrocitária da enzima GPX (12%), em repouso, nos jogadores de futebol quando comparados com sujeitos não treinados.

Palazzetti et al. (2003) estudaram triatletas submetidos a um incremento das cargas de treino na ordem de 21% na natação, 51% no ciclismo e 44% na corrida durante um período de 4 semanas, no qual, foi constatado um aumento significativo na actividade eritrocitária da enzima GPX, embora, fosse também verificada uma diminuição no estado antioxidante total (TAS) dos atletas.

Os resultados do efeito do treino aeróbio na actividade antioxidante não enzimática se mostram igualmente controversos, com estudos demonstrando aumentos e reduções da capacidade antioxidante total ou de um determinado antioxidante isolado em sujeito treinados comparativamente a indivíduos sedentários (Clarkson, 1995; Tessier et al., 1995; Liu et al., 1999; Powers et al., 1999). Tem sido sugerido, que o aumento nas concentrações das vitaminas C e E, em resposta ao treino aeróbio regular, parece decorrer da mobilização das respectivas reservas, de forma a contribuir para a preservação das estruturas celulares contra as ERO (Mastaloudis et al., 2001). Todavia, alguns estudos defendem que a concentração da vitamina E tende a diminuir no músculo esquelético, após a realização de um programa de treino de carácter aeróbio (Aikawa et al., 1984; Packer et al., 1989). Relativamente ao comportamento da GSH, alguns autores tem observado uma diminuição dos referidos níveis em resposta ao treino aeróbio (Leeuwenburgh e Ji, 1995; Ramires e Ji, 2001), apesar de outros estudos terem evidenciado incrementos no respectivo conteúdo, assim como, na actividade da enzima gama-glutamilcisteína-sintase (GCS), actuante na síntese da GSH (Ji, 2007a). Alguns autores têm também demonstrado que a adaptação antioxidante pode estar correlacionada com o volume de treino e o consumo máximo de oxigénio (Margaritis et al., 1999; Child et al., 1999). A relação entre as cargas de treino e o stresse oxidativo está bem documentada. Um estudo longitudinal, realizado com ciclistas de elevado nível competitivo, observou um aumento significativo da actividade da enzima GPx durante os períodos de treino intenso, enquanto durante os períodos de recuperação, caracterizados pela redução das cargas de treino, esta actividade se mostrou diminuída (Accominotti et al., 1991). Resultados similares foram verificados por Schroder et al. (2000) e Schippinger et al. (2002) em atletas profissionais de basquetebol e futebol, respectivamente, submetidos a períodos de treino exaustivos, sendo constatadas diminuições na eficiência do sistema antioxidante enzimático, no status antioxidante total e no



aumento do stresse oxidativo. Contudo, estudos recentes têm sugerido que o nível de treino parece influenciar de forma significativa a resposta do stresse oxidativo induzido pelo exercício físico (Chang et al., 2002; Metin et al., 2003; Cazzola et al., 2003). De facto, o treino aeróbio parece promover uma diversidade de mecanismos capazes de responder a situação de stresse oxidativo, em particular através de adaptações dos sistemas de defesa antioxidantes (Jenkins, 1988). Neste contexto, os mecanismos de sinalização de transdução sensíveis ao estado redox, induzidos pelas espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio (ERON), podem ser entendidos moduladores da capacidade de defesa antioxidante da célula muscular (Ji, 2007a). De facto, as vias de sinalização sensíveis ao estado redox utilizam as ERON como moléculas sinalizadoras na actuação de factores de transcrição (Meyer et al., 1994). O factor nuclear kB (NFkB) e a proteína MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) constituem duas vias fundamentais no combate ao stresse oxidativo induzido pelo treino de resistência aeróbia (Ji et al., 2004; Ji, 2007).



### 3. OBJECTIVOS

#### 3.1 Objectivos Gerais

O presente estudo tem como objectivo geral, analisar as alterações bioquímicas agudas induzidas por diferentes provas de triatlo no que respeita ao comportamento dos diversos biomarcadores enzimáticos, hematológicos, de stress oxidativo e da função imune em atletas portugueses de triatlo de diferentes níveis de prestação competitiva (Elite vs não-Elite).

#### 3.2 Objectivos Específicos

- (1) - Analisar o efeito agudo de três diferentes provas de triatlo (Longo, Olímpico e *Sprint*) na actividade sérica dos biomarcadores enzimáticos (CK, AST, ALT, GGT) em atletas de triatlo.
- (2) – Verificar a influência do nível competitivo dos triatletas (Elite vs não-Elite) no comportamento da actividade sérica dos diferentes biomarcadores enzimáticos nos momentos pré e pós-provas de triatlo.
- (3) - Analisar o efeito agudo de três diferentes provas de triatlo (Longo, Olímpico e *Sprint*) na resposta dos biomarcadores hematológicos (CGR, Hb, Hct, VGM, HGM, CHGM, RDW) em atletas de triatlo.
- (4) – Verificar a influência do nível competitivo dos triatletas (Elite vs não-Elite) no comportamento dos diferentes biomarcadores hematológicos nos momentos pré e pós-provas de triatlo.
- (5) -Analisar o efeito agudo de três diferentes provas de triatlo (Longo, Olímpico e *Sprint*) na contagem total e diferencial de leucócitos do sangue e na activação dos diferentes marcadores presentes nos fenótipos linfocitários T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em atletas de triatlo.

- (6) – Verificar a influência do nível competitivo dos triatletas (Elite vs não-Elite) no que respeita ao comportamento dos diferentes biomarcadores da função imune nos momentos pré e pós-provas de triatlo.
- (7) - Analisar o efeito agudo de três diferentes provas de triatlo (Longo, Olímpico e *Sprint*) na resposta dos biomarcadores de stresse oxidativo (SOD, GPx, CAT, AU, TAS, TBARS ) em atletas de triatlo.
- (8) – Verificar a influência do nível competitivo dos triatletas (Elite vs não-Elite) no comportamento dos diferentes biomarcadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós-provas de triatlo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da Amostra

A amostra total do presente estudo foi constituída por 30 atletas de triatlo, todos do sexo masculino, federados, com idades compreendidas entre os 30 e os 35 anos pertencentes ao escalão sénior, voluntários, participantes em provas dos calendários nacional e internacional nas diferentes distâncias frequentemente adoptadas (triatlo *sprint*, triatlo olímpico e triatlo longo). Importa salientar no entanto, que as amostras presentes em cada uma das três provas analisadas foram constituídas por 10 triatletas, os quais encontravam-se divididos em dois grupos (triatletas de Elite e triatletas não-Elite) de acordo com as suas respectivas posições no *ranking* individual do campeonato nacional e categoria de inscrição em competições internacionais (Elite ou *age-groups*) conforme classificação determinada pela ITU (International Triathlon Union) e ETU (European Triathlon Union).

#### 4.1.1 Triatlo Longo

**Tabela 1-** Características antropométricas, prática desportiva e volumes das cargas de treino relativos aos grupos experimentais participantes da prova de triatlo longo.

	Triatletas Elite (n=5) ( $\bar{x} \pm Dp$ )	Triatletas não-Elite (n=5) ( $\bar{x} \pm Dp$ )
<b>Idade (anos)</b>	30,8 ± 2,2	32,0 ± 3,0
<b>Peso (kg)</b>	67,4 ± 0,9	71,8 ± 2,3
<b>Altura (cm)</b>	179,8 ± 1,1	175,7 ± 4,2
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21,2 ± 0,4	23,1 ± 1,0
<b>Gordura Corporal (%)</b>	8,7 ± 2,6	12,4 ± 1,1
<b>Prática (anos)</b>	9,6 ± 1,5	6,4 ± 1,8
<b>Treino (horas/semana)</b>	36 ± 2,5	14 ± 1,4
<b>Natação (km/semana)</b>	26 ± 5,5	11,9 ± 3,5
<b>Ciclismo (km/semana)</b>	388 ± 92,6	186 ± 52,0
<b>Corrida (km/semana)</b>	98 ± 24,7	56 ± 12,5

Relativamente a análise antropométrica, importa salientar as diferenças entre os respectivos valores médios relativos a massa corporal (6,5%), IMC (8,9%) e percentagem de gordura corporal (42,5%) apresentados pelos triatletas. É notória a diferença no que respeita ao tempo de prática da modalidade (50%), horas de treino (157,1%) e principalmente no que respeita aos volumes de

treino referentes aos segmentos da natação (118,4%), do ciclismo (108,6%) e da corrida (75%).

#### 4.1.2 Triatlo Olímpico

**Tabela 2-** Características antropométricas, prática desportiva e volumes das cargas de treino relativos aos grupos experimentais de triatletas participantes da prova de triatlo olímpico.

	Triatletas Elite (n=5) ( $\bar{x} \pm Dp$ )	Triatletas não-Elite (n=5) ( $\bar{x} \pm Dp$ )
Idade (anos)	30,6 $\pm$ 2,6	33,6 $\pm$ 1,0
Peso (kg)	67,1 $\pm$ 0,8	70,0 $\pm$ 0,7
Altura (cm)	178,9 $\pm$ 4,8	177,8 $\pm$ 3,6
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21,0 $\pm$ 1,2	22,2 $\pm$ 0,8
Gordura Corporal (%)	8,1 $\pm$ 1,7	11,1 $\pm$ 2,1
Prática (anos)	8,8 $\pm$ 2,3	5,4 $\pm$ 2,4
Treino (horas/semana)	33 $\pm$ 1,7	13,4 $\pm$ 1,6
Natação (km/semana)	21,2 $\pm$ 2,5	9,8 $\pm$ 6,5
Ciclismo (km/semana)	323,6 $\pm$ 62,5	181,4 $\pm$ 48,5
Corrida (km/semana)	80,2 $\pm$ 17,1	46,9 $\pm$ 11,3

Embora menos acentuada, verificou-se uma diferença de 4,3% no que concerne aos valores médios relativos a massa corporal registados pelos triatletas na prova de triatlo olímpico, sendo as diferenças verificadas entre os valores relativos ao IMC (4,7%) e a % gordura corporal (26,1%) igualmente inferiores, quando comparadas aos valores obtidos na prova de triatlo longo. Registaram-se de forma similar, então menos pronunciadas, diferenças relativas ao tempo de prática da modalidade (62,9%), carga horária semanal de treino (146,2%) e volumes das cargas de treino inerentes a natação, ciclismo e corrida (116,3%, 78,3% e 71,0%, respectivamente).

#### 4.1.3 Triatlo Sprint

**Tabela 3-** Características antropométricas, prática desportiva e volumes das cargas de treino relativos aos grupos experimentais de triatletas participantes da prova de triatlo *sprint*

	Triatletas Elite (n=5) ( $\bar{x} \pm Dp$ )	Triatletas não-Elite (n=5) ( $\bar{x} \pm Dp$ )
Idade (anos)	30,4 $\pm$ 3,2	31,8 $\pm$ 2,5
Peso (kg)	68,6 $\pm$ 1,1	71,1 $\pm$ 2,7
Altura (cm)	177,9 $\pm$ 3,8	176,6 $\pm$ 5,3
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,0 $\pm$ 3,8	22,8 $\pm$ 1,4
Gordura Corporal (%)	8,5 $\pm$ 2,0	12,1 $\pm$ 2,2
Prática (anos)	7,2 $\pm$ 1,3	4,6 $\pm$ 1,5
Treino (horas/semana)	29,4 $\pm$ 1,6	13,6 $\pm$ 1,5
Natação (km/semana)	18,8 $\pm$ 2,2	8,7 $\pm$ 4,7
Ciclismo (km/semana)	259,0 $\pm$ 32,6	146,3 $\pm$ 28,2
Corrida (km/semana)	74,8 $\pm$ 9,0	45 $\pm$ 3,0

Em resposta a menor duração da presente prova comparativamente as anteriores provas analisadas, verificou-se uma redução percentual das diferenças relativas aos volumes das cargas de treino entre os respectivos grupos de triatletas, quando comparadas com as registadas nas provas de triatlo longo e triatlo olímpico. Todavia, foram observadas diferenças de 116%, 77,1% e 66,2% nos respectivos volumes de treino referentes as disciplinas de natação, ciclismo e corrida, respectivamente. Foram também detectadas diferenças inter-grupos nos dados antropométricos dos triatletas, das quais se salienta a percentagem de gordura corporal (42,3%), massa corporal (3,6%).

#### 4.2 Protocolo Experimental

Primeiramente, foi realizada uma anamnese com todos os triatletas integrantes da amostra, de forma a possibilitar uma recolha das informações pertinentes ao nível de prática desportiva do triatlo, incluindo anos de experiência competitiva, resultados obtidos em provas nacionais e internacionais, metodologia e distribuição das cargas de treino durante a época desportiva, assim como informações relacionadas as sessões diárias de treino nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida.

Todos os integrantes da amostra tiveram pleno conhecimento dos procedimentos experimentais aos quais seriam submetidos, assim como dos respectivos objectivos do estudo. Todos os triatletas integrantes da amostra apresentaram a ficha de exames médicos actualizada, excluindo desta forma, a existência de quaisquer sintomas de doenças ou limitações a prática desportiva, não apresentando os mesmos, quaisquer contra-indicações para a realização de exercícios físicos intensos.

O presente protocolo iniciou-se com a escolha de três provas de triatlo do calendário nacional, nas distâncias de triatlo longo (1,9km/90km/21km), triatlo olímpico (1,5km/40km/10km) e triatlo *sprint* (0.75km/20km/5km). As provas escolhidas tiveram lugar nos concelhos de Abrantes, Aveiro e Fafe, respectivamente. Uma vez determinada a prova a ser analisada, todos os triatletas seleccionados para a respectiva amostra foram previamente contactados no dia anterior, de forma a se apresentarem no local da prova com um período de antecedência a realização o *check-in* do material (bicicletas),

para efectuarem os procedimentos iniciais da avaliação, os quais compreendiam a determinação dos dados antropométricos e a realização da colheita sanguínea pré-esforço. Imediatamente após o término de cada prova, era efectuada a segunda colheita sanguínea nos respectivos atletas, concluindo assim o referido protocolo. Todas as colheitas sanguíneas efectuadas nas respectivas provas analisadas neste estudo foram efectuadas por profissionais licenciadas no curso de enfermagem e disponibilizadas pelo Centro de Análises Hilário de Lima (Braga).

#### 4.2.1 Determinação das Variáveis Antropométricas

Inicialmente, foram recolhidas as medidas antropométricas referentes à altura dos triatletas, através da utilização do estadiómetro (marca Rudolf Martin), sendo esta variável determinada pela medida entre o vértex e o plano de referência do solo, com o indivíduo em posição anatómica. A seguir, foram determinadas a massa corporal e respectiva percentagem de gordura corporal da cada triatleta integrante da amostra, utilizando-se a pesagem em balança digital de bioimpedância (marca Tanita-modelo TBF – 305), sendo o mesmo pesado em roupa interior e descalço.

#### 4.3 Colheita de Sangue e Preparação

As colheitas sanguíneas foram realizadas através de punção venosa, após a desinfecção da região cutânea antecubital anterior com álcool a 95%. Foram efectuadas duas colheitas em cada atleta pertencente às respectivas amostras estudadas, totalizando 20 amostras por prova analisada. A primeira colheita foi efectuada nos instantes precedentes ao início de cada uma das 3 provas de triatlo analisadas, sendo a segunda colheita realizada imediatamente após a conclusão da respectiva prova, totalizando 60 amostras no presente estudo.

As amostras foram colhidas em tubos ETDA-K<sub>3</sub> (sal tripotássico de ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético) de 4,5ml (BD Vacutainer) para a determinação dos parâmetros hematológicos, citometria de fluxo e estudos eritrocitários. As amostras de sangue periférico venoso colhidas em tubos sem anticoagulante, com gel Z - activador da coagulação (Serum Sep Clot Activator - BD



Vacutainer) de 5,0 ml para os estudos bioquímicos efectuados no soro foram centrifugadas (centrífuga “Jouan CR3”- Jouan) a 3000 rpm durante o período de 10 minutos. Não foi efectuado qualquer tipo de constrição através do uso de torniquete com o objectivo de minimizar o possível stress e lesão oxidativos induzidos pela manobra isquemia-reperusão (Bailey, 2001).

#### 4.4 Determinações Bioquímicas

A actividade sérica da enzima creatinaquinase (CK) foi determinada pelo método turbidimétrico a 340nm, utilizando um kit comercial ABX Pentra CK NAC CP (Montpellier, FR, Ref<sup>a</sup> A11A01632).

A actividade sérica da enzima aspartato-aminotransferase (AST) foi determinada pelo método turbidimétrico a 340nm, utilizando um kit comercial ABX Pentra AST CP (Montpellier, FR, Ref<sup>a</sup> A11A01629). Valor médio determinado para o factor: 3526.

A actividade sérica da enzima alanina-aminotransferase (ALT) foi determinada pelo método turbidimétrico a 340nm, utilizando um kit comercial ABX Pentra ALT CP (Montpellier, FR, Ref<sup>a</sup> A11A01627). Valor médio determinado para o factor: 3485.

A actividade sérica da enzima gama-glutamiltransferase (GGT) foi determinada pelo método turbidimétrico a 340nm, utilizando um kit comercial HORIBA ABX Pentra GGT CP (Montpellier, FR, Ref<sup>a</sup> A11A01625).

O conteúdo de ácido úrico foi determinado através de um método enzimático a 550nm utilizando um kit comercial HORIBA ABX Pentra (Montpellier, FR, Ref<sup>a</sup> A11A01670) de acordo com as determinações específicas do fabricante.

A actividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) nos eritrócitos foi determinada utilizando o kit comercial RANDOX RanSod Cat.No.SD 125 a 340nm. A Preparação da amostra consistiu inicialmente na centrifugação de 0,5ml do sangue total durante 10 min a 3000rpm e posterior separação do plasma. Em seguida, foram realizadas 4 lavagens dos eritrócitos com solução NACL 0,9% (3ml), sendo após cada lavagem efectuada uma centrifugação de 10 min a 3000 rpm. Ao final das lavagens e respectivas centrifugações dos eritrócitos, adicionou-se 2ml de água bidistilada fria, agitando e permanecendo

em repouso a 4°C durante 15 min. Concluindo o procedimento, foi realizada uma lavagem com 0.01mol/l de tampão fosfato pH 7,0.

A actividade sérica da enzima glutathiona-reductase (GR) foi determinada utilizando um kit comercial (RANDOX Glutathione Reductase Control Sera GR 2608) a 340nm, seguindo as especificações do fabricante. A preparação da amostra consistiu inicialmente na centrifugação de 0.5ml do sangue total a 2000 rpm durante 5 minutos e posterior separação do plasma. Foram efectuadas 4 lavagens dos eritrócitos com solução NaCl 0,9%, sendo após cada lavagem, os mesmos centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos.

O MDA plasmático foi analisado em concordância com o método descrito por Ronh et al. (1993) com algumas adaptações e mensurado através da formação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535nm. Sumariamente, o plasma foi incubado a 25°C em 500µL de uma solução contendo 175mM KCl, 10 mM Tris, pH 7.4. Amostras de 50 µL foram retiradas e diluídas com 450 µL de reagentes TBARS (1% ácido tiobarbitúrico, 0.6N HCl, 0.0056% hidroxitolueno butilado). Posteriormente, a mistura foi aquecida a 80-90°C durante o período de 15 minutos e recolocada em gelo por um período de 10 minutos que antecederam a centrifugação numa centrífuga de Eppendorf (1500g) durante 5 minutos. O conteúdo de TBARS formado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar de  $1.56 \times 10^5 \text{m}^{-1} \text{cm}^{-1}$  e expresso em nanomoles de MDA por miligrama de proteína.

A actividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) nos eritrócitos foi determinada utilizando um kit comercial RANDOX RanSel Cat.No.SC 692 a 340nm.

O TAS foi medido espectrofotometricamente utilizando um kit comercial (RANDOX NX2332 Crumlin, UK). Esta determinação foi baseada na redução de radicais livres (ABTS<sup>+</sup>-2,2-azinobis(3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) medida como um decréscimo na absorvência a 600nm aos 3 minutos. O radical ABTS<sup>+</sup> é formado pela interacção do ABTS com as espécies de radicais de ferilmioglobina, gerados pela activação da metmioglobina com o peróxido de hidrogénio. A diminuição da absorvência do radical por acção de antioxidantes plasmáticos foi comparada e induzida pelo Trolox (6-hidroxi-2,5,7 – tetrametichromano-2 ácido carboxílico). Os resultados foram expressos em mmol/l de equivalentes de Trolox (600nm).

#### 4.5 Determinações Hematológicas

Procedeu-se ao hemograma de todas as amostras de sangue periférico no contador hematológico GEN`S (Beckman Coulter-BC) e também a citometria de fluxo para determinação da contagem dos leucócitos e número de células linfocitárias. O Beckman Counter também providencia os dados relativos ao hemoglobina e hematócrito, os quais foram usados na determinação dos indicadores eritrocitários.

#### 4.6 Determinações Imunológicas

4.6.1 Imunomarcção – Os tubos de ensaio de polipropileno de 5ml para citómetro de fluxo (IZASA) foram identificados e os anticorpos com diferentes especificidades, conjugados com diferentes fluorocromos foram pipetados (pipetas automáticas de 10 µL) para os respectivos tubos, em conformidade com o apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4–Identificação dos anticorpos monoclonais utilizados na determinação da imunomarcção**

Caracterização dos Linfócitos T					
	FL1-FITC	FL2-PE	FL3-ECD	FL4-PC5	FL5-PC7
Tubos/ Anticorpos monoclonais	<b>CD8</b> (IOT; B9.11)	<b>CD 69</b> (IOT; TP1.55.3 )	<b>CD45RO</b> (IOT; UCHL1 )	<b>CD28</b> (IOT; CD28,2 )	<b>CD3</b> (IOT;UCHT1)
	<b>HLA-DR</b> (IOT; Immu- 357)	<b>CD 127</b> (IOT;R34.34 )	<b>CD4</b> (IOT; SFCH12T4D11)	<b>CD25</b> (IOT;B1,49,9 )	

**FIT C** - Isotiocianato de fluoresceína; **PE** - Ficoeritrina; **ECD** - Energy Coupled Dye; **PC5** – Ficoeritrina-Cy5-Tandem , **PC7** –Ficoeritrina Cianina 7.

A cada tubo foram adicionados 100 µL (pipetas automáticas) de sangue periférico e as amostras foram incubadas durante o período de 15 minutos, no escuro e a temperatura ambiente. No final do período de incubação, procedeu-se a lise dos eritrócitos e a fixação dos leucócitos, utilizando o Lisador automático TQ-Prep (BC) e os reagentes IMMUNOPREP Reagent System (BC). Seguidamente os tubos foram colocados no frigorífico durante 15 minutos. Finalmente, procedeu-se à aquisição das amostras no citómetro de fluxo .

#### 4.6.2 Aquisição das amostras no citómetro de fluxo

As amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo Cytomicas FC500 da Beckman Coulter (BC), utilizando o programa “CXP Versão 2.0” (Beckman Coulter). Uma combinação de anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE) foram utilizados para enumerar as subpopulações de linfócitos. A calibragem do citómetro foi realizada utilizando o FACScmp software (Immunocytometry system).

##### 4.6.2.1 Preparação das células mononucleares

Do sangue venoso periférico heparinizado, 3ml foram misturados com o mesmo volume da solução de fosfato tampão (PBS pH 7.4) nivelado por 4ml de gradiente Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) a 400g durante 30 minutos a temperatura ambiente. As respectivas camadas de células mononucleares foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução PBS (10ml), sendo posteriormente suspensas em solução FCS-RPMI-1640.

##### 4.6.2.2 Determinação das subpopulações linfocitárias

As amostras contendo  $1 \times 10^6$  células mononucleares em solução FCS-RPMI-1640 foram tratadas com  $10 \mu\text{l}$  de anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE), sendo as seguintes combinações: anti-CD3 (FITC)\anti-CD4 (PE), anti-CD3 (FITC)\anti-CD8 (PE), lavadas duas vezes com solução PBS+, e novamente suspensas em 1 ml de solução 0.5% de paraformaldeído-PBS+, sendo posteriormente analisadas pelo programa (Infinicyt Versão 1.1.1).

##### 4.6.3 Análise dos resultados

Para a análise dos resultados foi utilizado o programa “Infinicyt Versão 1.1.1” (Cytognos). Para cada determinante antigénico analisado foram registadas as percentagens de células positivas.

#### 4.7 Procedimentos Estatísticos

No tratamento estatístico dos dados foram utilizados como medidas descritivas a média, o desvio-padrão e a amplitude da variação, expressa em valores máximos e mínimos. Dado o reduzido valor das amostras e devido ao facto dos referidos parâmetros analisados no presente estudo não reunirem os pressupostos necessários para a adopção dos procedimentos paramétricos (homogeneidade da variância e normalidade da distribuição) foram utilizados os testes não-paramétricos. Relativamente a comparação das médias pré e pós-esforço obtidas nas respectivas provas de triatlo analisadas, foi utilizado o teste de Wilcoxon para medidas repetidas, enquanto para a análise inter-grupos recorreu-se ao teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Para verificar os níveis de associação entre as variáveis investigadas no estudo, recorreu-se ao coeficiente de correlação de Spearman. Os níveis de significância foram mantidos em 5% ( $p < 0.05$ ).

Os procedimentos estatísticos foram tratados e analisados nos programas Excel™2000 e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS™. Versão 16.0).



## 5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 Triatlo Longo

**Tabela 5-** Estatística descritiva das performances dos grupos experimentais de triatletas nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida durante a prova de triatlo longo.

	Triatletas Elite (n=5)		Triatletas não-Elite (n=5)		p
	$\bar{x} \pm Dp$	(Min. – Max.)	$\bar{x} \pm Dp$	(Min. – Max.)	
<b>Natação</b>	00:28:42 $\pm$ 02:42	(00:25:19 - 00:31:00)	00:34:19 $\pm$ 04:27*	(00:30:55 – 00:40:38)	0.027
<b>Ciclismo</b>	02:10:44 $\pm$ 06:39	(02:01:48– 02:16:37)	02:29:36 $\pm$ 07:05*	(02:19:55 - 02:39:38)	0.003
<b>Corrida</b>	01:07:13 $\pm$ 03:08	(01:03:45 – 01:11:08)	01:25:10 $\pm$ 04:27*	(01:20:29 - 01:30:01)	0.000
<b>TempoFinal</b>	03:48:16 $\pm$ 10:16	(03:12:30 – 03:57:53)	04:32:48 $\pm$ 12:15*	(04:23:11 - 04:53:13)	0.000

**Nota:** Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{X} \pm Dp$ ), expressos em horas: minutos: segundos (hms). Min – valor mínimo da amplitude; Max – valor máximo da amplitude.  $p < 0.05$ , vs Elite

No que respeita ao segmento de natação, verificou-se que os triatletas do grupo Elite apresentaram uma performance 20,3% superior ao grupo não-Elite, sendo esta diferença de 5 minutos e 23 segundos estatisticamente significativa ( $p=0.027$ ). De forma similar, no segmento subsequente de ciclismo, foi observada uma diferença significativa de 14,5% ( $p=0.003$ ) no tempo médio de conclusão do segmento. Relativamente ao segmento de corrida, os triatletas de Elite cumpriram os 17,5 km num tempo significativamente mais rápido (27,6%,  $p=0.000$ ) que o tempo médio realizado pelo grupo não-Elite. No que concerne ao tempo final de prova, detectou-se uma diferença significativa de 19,4% ( $p=0.000$ ) entre os respectivos grupos de triatletas analisados.

**Tabela 6** – Correlação entre os segmentos da prova de triatlo longo e o tempo final de prova

Prova de Triatlo Longo	Triatletas (Elite)			Triatletas (não-Elite)		
	Natação	Ciclismo	Corrida	Natação	Ciclismo	Corrida
Tempo Final de Prova	0.772*	0.864**	0.871**	0.812**	0.845**	0.857**

\* $P < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

Todos os segmentos analisados constituem fortes preditores do desempenho numa prova de triatlo longo, tendo apresentado elevados valores de correlação, conforme demonstrado na Tabela 5. Importa ressaltar que, de acordo com Coutts et al. (2000), a performance no segmento de corrida assume um papel determinante na performance do triatleta, principalmente em provas de longa duração, contribuindo em mais de 32% na constituição do tempo final de prova. Nossos dados corroboram esta asserção, sendo os valores das respectivas correlações encontradas nos grupos analisados ( $r=0.871$  e  $r=0.857$ ) muito

similares aos valores obtidos em provas da mesma magnitude (Maragaritis et al., 1997; Schabort et al., 2000; Rowlands e Downey., 2003). Acresça-se aos resultados, o segmento de natação apresentar o menor valor de correlação com a performance final de prova ( $r=0.772$ ), resultado corroborado pelos estudos de De Vito et al. (1994) e Bentley et al. (2002) com triatletas de provas de longa distância, onde segundo estes autores, esta justificação decorre da reduzida contribuição da natação para o tempo final de uma prova longa, podendo variar entre 17,4 e 18,9%.

## 5.2 Triatlo Olímpico

**Tabela 7-** Estatística descritiva das performances dos grupos experimentais de triatletas nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida durante a prova de triatlo olímpico

	Triatletas Elite (n=5)		Triatletas não-Elite (n=5)		p
	$\bar{X} \pm Dp$	Min. – Max.	$\bar{X} \pm Dp$	Min. – Max.	
<b>Natação</b>	00:20:10 $\pm$ 00:42	(00:19:37 -00: 20:42)	00:29:31 $\pm$ 03:14*	(00:26:24 - 00:33:05)	0.009
<b>Ciclismo</b>	01:04:03 $\pm$ 00:33	(01:03:40 - 01:04:12)	01:16:44 $\pm$ 03:20*	(01:13:03 - 01:20:35)	0.008
<b>Corrida</b>	00:35:33 $\pm$ 00:39	(00:34:43– 00:35:27)	00:49:23 $\pm$ 05:01*	(00:45:10 - 00:52:37)	0.000
<b>TempoFinal</b>	01:59:51 $\pm$ 01:38	(01:58:00– 02:00:46)	02:35:31 $\pm$ 08:18*	(02:25:37 - 02:46:17)	0.000

**Nota:** Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão, expressos em horas: minutos: segundos (hms). Min – valor mínimo da amplitude; Max – valor máximo da amplitude.  $p < 0.05$ , vs Elite

Relativamente ao segmento de 1500 metros de natação efectuado na prova de triatlo olímpico (Tabela 7), observa-se uma diferença significativa de 45,8% ( $p=0.009$ ) referente às performances apresentadas pelos grupos experimentais de triatletas. Diferenças inter-grupos significativas de 18,9% ( $p=0.008$ ) e 39,3% ( $p=0.000$ ) foram também constatadas relativamente aos segmentos de 40km de ciclismo e 10km de corrida, respectivamente. No que respeita ao tempo final de prova, verifica-se uma diferença significativa de 29,9% ( $p=0.000$ ), facto que possibilitou aos triatletas de Elite concluírem a prova com uma vantagem de 35 minutos.

**Tabela 8** -Correlação entre os segmentos da prova de triatlo olímpico e o tempo final de prova

Prova - Triatlo Olímpico	Triatletas (Elite)			Triatletas (não-Elite)		
	Natação	Ciclismo	Corrida	Natação	Ciclismo	Corrida
Tempo Final de Prova	0.822**	0.873**	0.899**	0.830**	0.853**	0.874**

\* $P < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



De forma similar ao verificado na prova de triatlo longo, o segmento de corrida na prova de triatlo olímpico foi contemplado como principal preditor da performance em ambos os grupos de triatletas. Relativamente as correlações apresentadas no âmbito da prova de triatlo olímpico, estão em concordância com os dados de Coutts et al. (2000) com triatletas da mesma distância, onde foi registado um valor de correlação muito similar ao obtido pelos triatletas de Elite ( $r=0.896$  vs  $r=0.899$ , respectivamente), sendo este ligeiramente superior ao valor encontrado por Fiedler (2006) com triatletas de Elite da referida distância ( $r=0.853$ ). De referir ainda, as elevadas correlações registadas entre segmento de natação e o tempo final de prova obtido pelos respectivos grupos, que contrariamente ao observado na prova de triatlo longo, assume relevância preponderante na prova olímpica, dada a redução do segmento subsequente de ciclismo (80km vs 40km), o qual representa nesta distância 49,1 a 51,9% do tempo total de prova. Importa ainda aduzir, que os nossos dados relativos aos valores de correlação dos segmentos de natação e ciclismo corroboram os resultados encontrados por Landers et al. (2000) em estudo com triatletas da referida distância.

### 5.3 Triatlo Sprint

**Tabela 9** - Estatística descritiva das performances dos grupos experimentais de triatletas nos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida durante a prova de triatlo olímpico.

	Triatletas Elite (n=5)		Triatletas não-Elite (n=5)		p
	$\bar{X} \pm Dp$	Min. – Max.	$\bar{X} \pm Dp$	Min. – Max.	
<b>Natação</b>	00:10:24 $\pm$ 00:10	(00:10:13 - 00:10:33)	00:13:35 $\pm$ 01:38*	(00:10:57 - 00:14:15)	0.012
<b>Ciclismo</b>	00:35:53 $\pm$ 01:13	(00:34:42 - 00:36:37)	00:41:02 $\pm$ 01:14*	(00:40:05 - 00:42:49)	0.033
<b>Corrida</b>	00:18:38 $\pm$ 01:25	(00:17:09 – 00:19:12)	00:23:40 $\pm$ 01:28*	(00:22:42 - 00:24:58)	0.003
<b>TempoFinal</b>	01:04:08 $\pm$ 01:51	(01:02:16 – 01:06:23)	01:16:06 $\pm$ 01:17*	(01:14:34 – 01:17:21)	0.000

**Nota:** Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão, expressos em horas: minutos: segundos (hms). Min – valor mínimo da amplitude; Max – valor máximo da amplitude. \*  $p < 0.05$ , vs Elite

Com base na observação da Tabela 9, constata-se uma performance superior dos triatletas de Elite no segmento de natação (30,3%) relativamente ao tempo médio de conclusão dos 750 metros do referido segmento. De forma similar ao observado nas provas de triatlo longo e triatlo olímpico, foram encontradas nesta prova, diferenças inter-grupos estatisticamente significativas relativamente aos segmentos de ciclismo (15,3%,  $p=0.033$ ) e corrida (27,3%,

$p=0.003$ ). Quando comparados os tempos finais de prova, foi verificada uma diferença significativa de 18,6% ( $p=0.000$ ) entre os presentes grupos de triatletas, traduzida numa diminuição de 12 minutos referente ao tempo médio de prova realizado pelos triatletas de Elite.

**Tabela 10** - Correlação entre os segmentos da prova de triatlo *sprint* e o tempo final de prova

Prova de Triatlo <i>Sprint</i>	Triatletas (Elite)			Triatletas (não-Elite)		
	Natação	Ciclismo	Corrida	Natação	Ciclismo	Corrida
Tempo Final de Prova	0.881**	0.888**	0.910**	0.870**	0.889**	0.904**

\* $P<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

É notório os elevados valores de correlação registados por ambos os grupos de triatletas na presente prova, embora como constatado nas demais provas do presente estudo, o segmento de corrida mostra-se como o mais forte preditor de performance. De facto, dentre as provas analisadas no presente estudo, a prova de triatlo *sprint* caracteriza-se pela elevada intensidade do esforço, uma vez que as distâncias percorridas nos respectivos segmentos mostram-se reduzidas (1,5km/40km/10km vs 0.75km/20km/5km), e onde a influência dos segmentos de natação e ciclismo no segmento subsequente de corrida se revela significativa (Laursen et al., 2000; Bentley et al., 2002; Delextrat et al., 2003). Neste sentido, Bernard et al. (2003) refere que a elevada contribuição do metabolismo anaeróbio no gasto energético do segmento de natação tem envolvimento na maior perfusão da massa muscular activa no início do segmento subsequente de ciclismo. Assim, quando realizado na posição de drafting, o segmento de natação reduz de forma significativa os valores referentes ao consumo de oxigénio ( $VO_2$ ) e a concentração de lactato [LA], proporcionando uma maior eficiência no segmento de ciclismo subsequente. Relativamente ao segmento de corrida, tem sido relatados diversos factores responsáveis pela diminuição da performance, dentre os quais salienta-se: a desidratação, a depleção das reservas de glicogénio pelo ciclismo, diminuição da actividade pulmonar e principalmente, a alteração da mecânica da corrida após o ciclismo em decorrência de factores de controlo motor, devido a diferença no padrão de recrutamento das unidades motoras (Hauswirth et al., 2000; Millet et al., 2002; Boussana et al., 2003)

## 5.4 Biomarcadores Enzimáticos

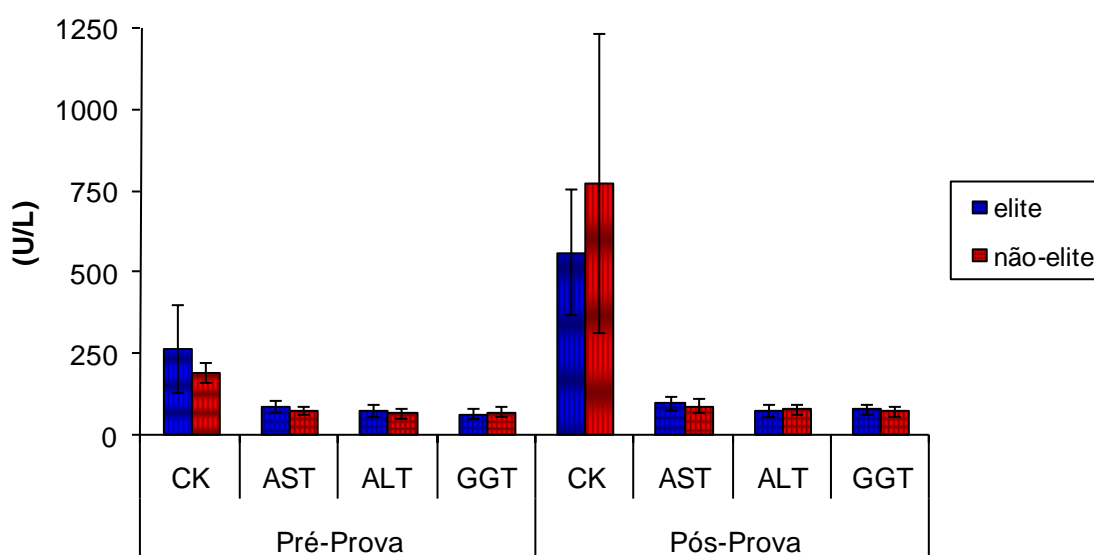
### 5.4.1 Triatlo Longo

**Tabela 11** – Efeito da prova de triatlo longo nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas

Enzimas	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
CK (U.L <sup>-1</sup> )	268,6±135,4	562,4 ± 194,7*	0.011	190,4 ± 30,0	776,2 ± 458,7*	0.043
AST (U.L <sup>-1</sup> )	39,8 ± 9,1	48,2 ± 11,0*	0.016	26,2 ± 2,1	40,8 ± 8,8*	0.014
ALT (U.L <sup>-1</sup> )	25,4 ± 7,3	27,2 ± 7,8	0.279	17,4 ± 5,5	20,6 ± 6,1	0.056
GGT (U.L <sup>-1</sup> )	18,4 ± 2,1	21,6 ± 1,2*	0.014	21,0 ± 6,0	23,6 ± 7,2	0.065

Nota: Valores expressos pela média ± desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Os dados apresentados na Tabela 11 permitem-nos verificar que, relativamente ao grupo Elite, todas as enzimas analisadas apresentaram aumentos das suas actividades após a prova de triatlo longo, sendo CK (109,3%), AST (21,1%), GGT (17,3%), embora relativamente a enzima ALT, o aumento constatado de 7% não se mostrou estatisticamente significativo ( $p=0.279$ ). Em relação aos triatletas do grupo não-Elite, foram igualmente observados aumentos em todas as actividades enzimáticas estudadas, apesar de somente as actividades das enzimas CK e AST apresentarem aumentos com significado estatístico (307,6%,  $p=0.043$  e 55,7%,  $p=0.014$ , respectivamente).



**Figura 1** – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente as actividades das enzimas musculares e hepáticas nos momentos pré e pós prova de triatlo longo. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

Face ao exposto na Figura 1, é possível observar que relativamente aos valores basais das enzimas estudadas, não foram detectadas diferenças significativas entre os respectivos grupos de triatletas, embora importe referir o facto dos triatletas de Elite apresentarem valores médios superiores em todas as actividades enzimáticas. O aumento da actividade destas enzimas indicia alterações na permeabilidade da membrana celular, estando normalmente correlacionado com a ocorrência de lesão consequente ao exercício (Brancaccio et al., 2007). No que respeita aos valores da actividade enzimática pós-prova, é de salientar a pronunciada variabilidade inter-individual relativamente a expressão da enzima CK, expressa pela elevada amplitude dos valores dos desvios-padrão. Quanto as demais actividades enzimáticas analisadas no período pós-esforço, não foram encontradas diferenças significativas entre os respectivos grupos.

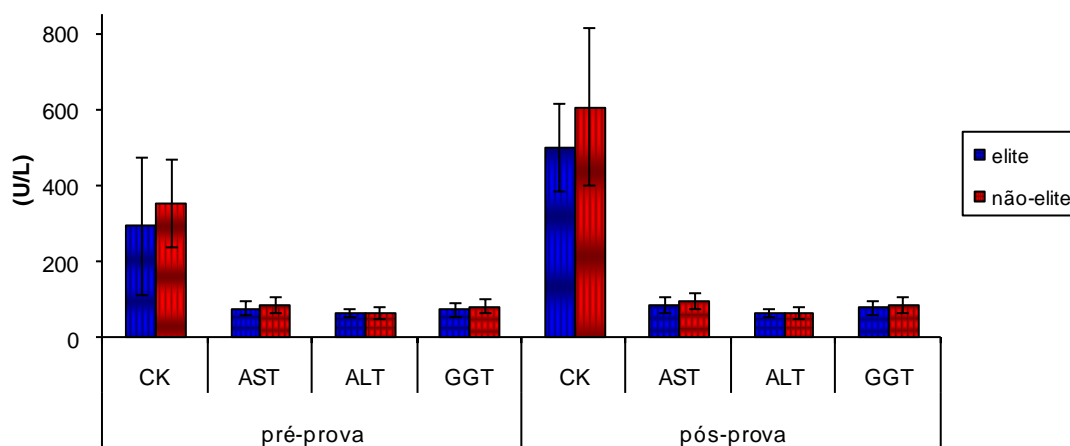
#### 5.4.2 Triatlo Olímpico

**Tabela 12** - Efeito da prova de triatlo olímpico nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas

Enzimas	Triatletas (Elite)			Triatletas (não-Elite)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
<b>CK (U.L<sup>-1</sup>)</b>	294,2±179,6	500 ± 195,6*	0.021	352,8 ± 115,5	607,8 ± 207,3*	0.012
<b>AST (U.L<sup>-1</sup>)</b>	27,6 ± 10,6	35 ± 8,5*	0.042	33,8 ± 11,5	45,2 ± 10,8*	0.036
<b>ALT (U.L<sup>-1</sup>)</b>	14,1 ± 0,7	15,6 ± 0,8	0.054	14,2 ± 5,3	15,6 ± 4,9	0.066
<b>GGT (U.L<sup>-1</sup>)</b>	23,4 ± 7,4	29 ± 8,6*	0.043	32,0 ± 9,1	33,8 ± 11	0.343

Nota: Valores expressos pela média ± desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Constatou-se após a prova de triatlo olímpico, um aumento de todas as actividades enzimáticas em ambos os grupos de triatletas. Relativamente aos triatletas de Elite, foram verificados aumentos significativos de 69,9% (CK), 26,8% (AST) e 23,9% (GGT), embora o aumento de 10,6% na actividade da enzima ALT não se mostrasse significativo ( $p=0.054$ ). Quanto aos triatletas do grupo não-Elite, foram igualmente observados acréscimos significativos nas concentrações das enzimas CK (72,2%,  $p=0.021$ ) e AST (33,7%,  $p=0.042$ ), enquanto que relativamente ao comportamento das enzimas ALT e GGT pós-prova, os respectivos aumentos de 9,8% e 5,6% verificados não se mostraram estatisticamente relevantes ( $p > 0.05$ ).



**Figura 2** – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente às actividades das enzimas musculares e hepáticas nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

Ao compararmos os dados ilustrativos presentes na Figura 2, podemos verificar que não foram observadas diferenças significativas entre os respectivos grupos analisados, relativamente ao comportamento das diferentes actividades enzimáticas, quer nos valores basais ou imediatamente após o final da prova.

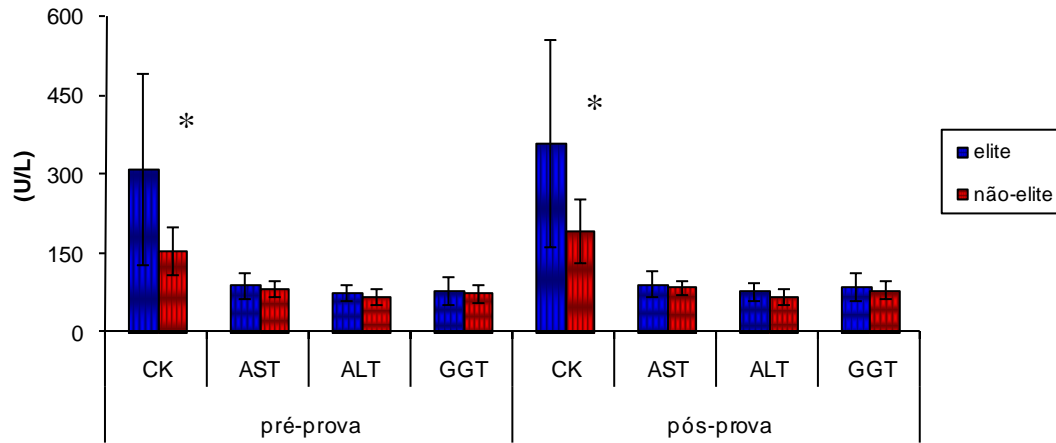
#### 5.4.3 Triatlo Sprint

**Tabela 13** – Efeito da prova de triatlo *sprint* nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas

Enzimas	Triatletas (Elite)			Triatletas (não-Elite)		
	Pré-Prova	Pós-Prova	p	Pré-Prova	Pós-Prova	p
CK (U.L <sup>-1</sup> )	310,8 ± 183,6	358,6 ± 197,4*	0.011	155 ± 44,1	192,6 ± 59,8*	0.031
AST (U.L <sup>-1</sup> )	39,0 ± 14,6	40,4 ± 14,8	0.644	31,4 ± 5,3	35,2 ± 3,7*	0.012
ALT (U.L <sup>-1</sup> )	24,2 ± 6,0	27,2 ± 7,3*	0.023	17,2 ± 4,3	18,0 ± 5,0	0.099
GGT (U.L <sup>-1</sup> )	23,2 ± 15,5	32,0 ± 16,3*	0.021	24,8 ± 7,2	26,6 ± 7,1	0.071

Nota: Valores expressos pela média ± desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

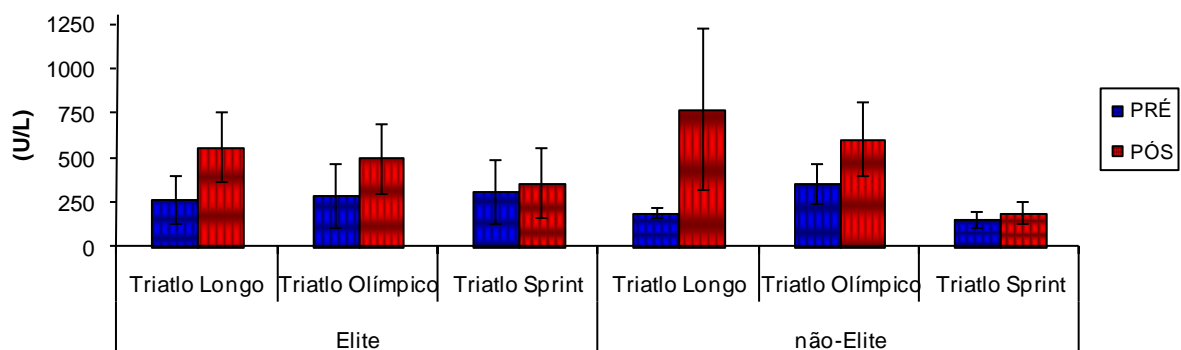
Foram observados aumentos significativos de 15,3%, 12,3% e 24,1% nas respectivas actividades séricas das enzimas CK, ALT e GGT nos triatletas do grupo Elite após a prova de triatlo *sprint*. Contudo, no que diz respeito a enzima AST, o aumento verificado de 3,5% não se mostrou estatisticamente significativo ( $p = 0.644$ ). Relativamente ao grupo não-Elite, foram evidenciados acréscimos significativos de 24,2% e 12,1% nas actividades das enzimas CK e AST, enquanto em relação as enzimas ALT e GGT, os respectivos aumentos de 4,6% e 8,4%, não se mostraram significativos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 3**– Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente às actividades das enzimas musculares e hepáticas nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*. \*  $p < 0.05$  vs Elite.

Da figura 3, salienta-se a diferença significativa de 100% ( $p=0.028$ ) relativamente aos valores de partida da enzima CK entre os grupos analisados. De referir a acentuada variabilidade inter-individual verificada no grupo Elite, evidenciada pelos elevados valores dos desvios-padrão, que juntamente com o valor basal apresentado, superior aos valores de referência laboratorial, parece reflectir o efeito das sistemáticas cargas de treino as quais os triatletas de elevada prestação competitiva são submetidos no decorrer da época desportiva.

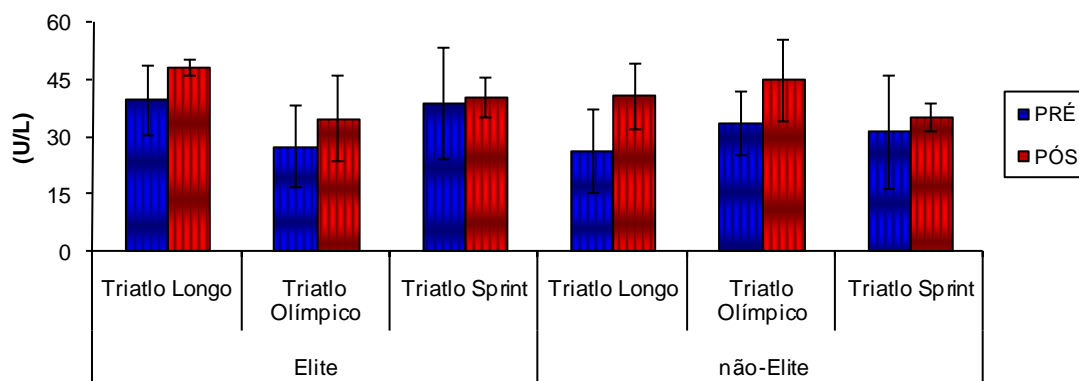
#### 5.4.4 Actividade da enzima CK



**Figura 4** – Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima CK apresentada pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.

Dos dados apresentados na Figura 4, relativamente a actividade plasmática da enzima CK nas diferentes provas de triatlo analisadas no presente estudo, há que reiterar dois considerandos: o comportamento similar nos respectivos grupos experimentais estudados, evidenciado pelo aumento da actividade directamente proporcional a duração da prova, sendo este mais pronunciado na prova de triatlo longo relativamente as provas de triatlo olímpico e *sprint* e a elevada variabilidade individual, caracterizada pelos elevados valores referentes aos desvios-padrão, particularmente no grupo não-Elite após a prova de triatlo longo.

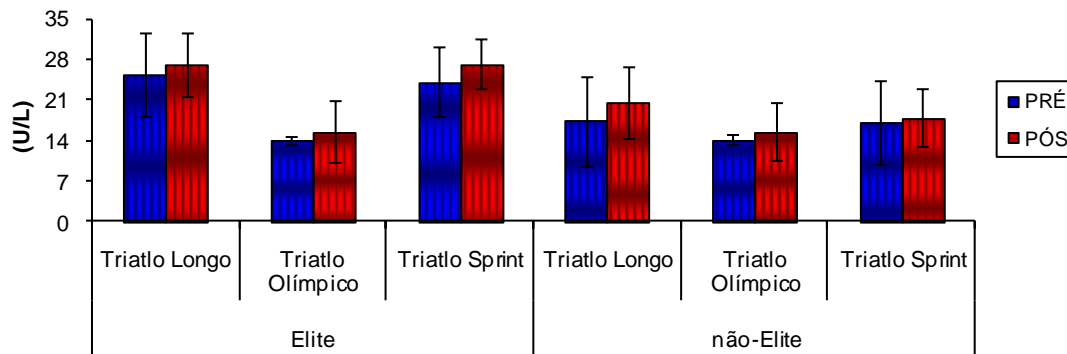
#### 5.4.5 Actividade da enzima AST



**Figura 5** – Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima AST apresentada pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.

No que respeita a actividade da enzima AST, também utilizada como marcador indirecto de lesão muscular esquelética, é possível constatar, em todos os momentos pós-prova analisados, um aumento dos respectivos valores médios em ambos os grupos de triatletas estudados, igualmente caracterizados pela elevada amplitude dos desvios-padrão registados pelas amostras. Importa salientar no entanto, que de forma similar ao verificado no comportamento da enzima CK, a expressão plasmática verificada na actividade da enzima AST pós-prova parece estar relacionada ao estado de treino, sendo tanto maior, quanto menos treinado for o atleta.

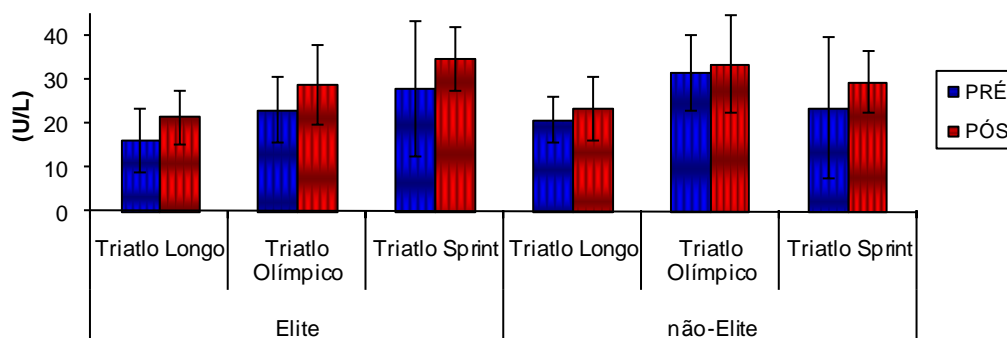
#### 5.4.6 Actividade da enzima ALT



**Figura 6** – Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima ALT apresentada pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.

Dado o facto da enzima ALT estar em muito maior concentração no fígado comparativamente aos valores presentes no músculo esquelético (aproximadamente 7 vezes) (Nagel et al., 1990), pensamos que os valores aumentados nos respectivos momentos pós-prova poderão indicar não somente a ocorrência de lesão muscular esquelética mas também, hepática. Acresça-se aos resultados, a constatação de uma correlação negativa ( $r=-0.83$ ), e estatisticamente significativa ( $p=0.019$ ), entre o valor médio da enzima ALT pós-prova e o tempo final da prova de triatlo *sprint* nos triatletas de Elite, sugerindo a intensidade do esforço realizado como importante factor modulador desta expressão sérica.

#### 5.4.6 Actividade da enzima GGT



**Figura 7** – Análise comparativa inter-provas relativamente ao comportamento da actividade da enzima GGT apresentada pelos grupos experimentais nas diferentes provas de triatlo.



Com base nos dados apresentados na Figura 7, constata-se a notória influência da intensidade do esforço na actividade da enzima GGT, em ambos os grupos experimentais de triatletas, onde se observa um aumento da actividade sérica directamente proporcional a intensidade do esforço realizado, embora menos pronunciada na prova de triatlo *sprint* realizada no âmbito do grupo não-Elite. Importa ainda destacar, a grande variabilidade inter-individual expressa pelos elevados valores dos desvios-padrão nos respectivos analisados, principalmente no que respeita aos valores basais observados na prova de triatlo *sprint*.

#### 4.5 Biomarcadores Hematológicos

##### 5.5.1 Triatlo Longo

**Tabela 14** – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes indicadores eritrocitários dos triatletas

Indicadores Hematológicos	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
<b>CGR (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,8	5,0 $\pm$ 0,1*	0.038	4,9 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,3	0.540
<b>Hb (g/dL)</b>	14,4 $\pm$ 1,5	14,7 $\pm$ 1,2*	0.045	14,5 $\pm$ 0,5	14,6 $\pm$ 0,1	0.371
<b>Hct (%)</b>	41,5 $\pm$ 0,9	42,2 $\pm$ 0,7	0.322	42,0 $\pm$ 4,5	42,0 $\pm$ 3,4	0.922
<b>VGM (fL)</b>	84,9 $\pm$ 3,6	83,8 $\pm$ 3,7*	0.020	85,9 $\pm$ 1,8	85,6 $\pm$ 1,6	0.078
<b>HGM (pg)</b>	29,3 $\pm$ 1,5	29,7 $\pm$ 1,4*	0.017	30 $\pm$ 0,5	30,1 $\pm$ 0,5	0.893
<b>CHGM (g/dL)</b>	34,5 $\pm$ 1,0	35,4 $\pm$ 1,2*	0.010	34,9 $\pm$ 0,6	35,1 $\pm$ 0,3	0.412
<b>RDW (%)</b>	13,0 $\pm$ 0,8	13,1 $\pm$ 0,7	0.749	13,0 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 0,3	0.290

Nota: Valores expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Relativamente aos indicadores eritrocitários pré-esforço analisados na prova de triatlo longo, (Tabela 14), observa-se que ambos os grupos de triatletas apresentam valores normais de referência laboratorial, demonstrando contudo, uma diversidade das respostas. No entanto, são de salientar, os aumentos significativos relativos à concentração de glóbulos rubros (CGR), a concentração de hemoglobina (Hb) e índices hematimétricos pós-prova observados nos triatletas de Elite, nomeadamente, a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e na hemoglobina globular média (HGM) e a diminuição no volume globular médio (VGM). No que respeita ao chamado índice de anisocitose (RDW), responsável por analisar a heterogeneidade de distribuição do tamanho dos eritrócitos, não foram constatadas alterações nos respectivos grupos analisados.

**Tabela 15** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários nos momentos pré e pós-prova de triatlo longo.

Parâmetros Hematológicos	Pré-Prova			Pós-Prova		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Elite	Não-Elite		Elite	Não-Elite	
<b>CGR (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,8	4,9 $\pm$ 0,4	0.567	5,0 $\pm$ 0,1	5,0 $\pm$ 0,3	0.646
<b>Hb (g/dL)</b>	14,4 $\pm$ 1,5	14,5 $\pm$ 0,5	0.979	14,7 $\pm$ 1,2	14,6 $\pm$ 0,1	0.888
<b>Hct (%)</b>	41,5 $\pm$ 0,9	42,0 $\pm$ 4,5	0.815	42,2 $\pm$ 0,7	42,0 $\pm$ 3,4	0.894
<b>VGM (fL)</b>	84,9 $\pm$ 3,6	85,9 $\pm$ 1,8	0.596	83,8 $\pm$ 3,7	85,6 $\pm$ 1,6	0.386
<b>HGM (pg)</b>	29,3 $\pm$ 1,5	30 $\pm$ 0,5	0.392	29,7 $\pm$ 1,4	30,1 $\pm$ 0,5	0.653
<b>CHGM(g/dL)</b>	34,5 $\pm$ 1,0	34,9 $\pm$ 0,6	0.441	35,4 $\pm$ 1,2	35,1 $\pm$ 0,3	0.588
<b>RDW (%)</b>	13,0 $\pm$ 0,8	13,0 $\pm$ 0,5	0.967	13,1 $\pm$ 0,7	12,9 $\pm$ 0,3	0.529

Nota: Valores expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Uma análise dos dados apresentados na Tabela 15, referentes aos valores dos indicadores eritrocitários dos triatletas, permite-nos verificar que não foram encontradas diferenças significativas entre respectivos grupos de triatletas estudados no que respeita aos valores basais e pós esforço da prova de triatlo longo. Importa salientar que todos os resultados apresentados pelos grupos experimentais em estudo se encontram em conformidade com os valores de referência laboratorial.

### 5.5.2 Triatlo Olímpico

**Tabela 16** – Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes indicadores eritrocitários dos triatletas.

Indicadores Hematológicos	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
<b>CGR (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,7 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,2	0.074	4,9 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2	0.207
<b>Hb (g/dL)</b>	14,4 $\pm$ 0,1	14,6 $\pm$ 1,0*	0.013	14,6 $\pm$ 0,8	14,7 $\pm$ 1,0	0.211
<b>Hct (%)</b>	41,7 $\pm$ 2,1	42,3 $\pm$ 2,5	0.152	42,1 $\pm$ 2,4	43,2 $\pm$ 2,3	0.113
<b>VGM (fL)</b>	84,0 $\pm$ 0,8	83,8 $\pm$ 0,7	0.393	88,5 $\pm$ 3,7	88,5 $\pm$ 3,8	0.811
<b>HGM (pg)</b>	28,8 $\pm$ 1,0	29,0 $\pm$ 0,9	0.078	30,7 $\pm$ 1,4	30,8 $\pm$ 1,4	0.305
<b>CHGM (g/dL)</b>	34,4 $\pm$ 0,9	34,6 $\pm$ 0,8*	0.040	33,6 $\pm$ 2,3	34,5 $\pm$ 0,4	0.459
<b>RDW (%)</b>	13,3 $\pm$ 0,8	13,0 $\pm$ 0,9*	0.035	13,8 $\pm$ 0,4	13,7 $\pm$ 1,4	0.456

Nota: Valores expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Uma observação dos dados apresentados na Tabela 16 permite-nos constatar que ao término da prova, o grupo de triatletas de Elite evidenciou um aumento significativo do valor médio referente a concentração de hemoglobina (Hb), não sendo este comportamento observado nos triatletas do grupo não-Elite.

A partir da análise dos índices hematimétricos pós-prova, verifica-se no grupo dos triatletas de Elite, um aumento significativo do valor médio relativo a concentração de hemoglobina globular média ( $p=0.040$ ). Contrariamente ao

observado no grupo Elite, nos triatletas do grupo não-Elite, constatou-se que o valor médio do VGM permaneceu inalterado após a prova, sendo o mesmo comportamento verificado relativamente a hemoglobina globular média ( $p=0.305$ ). De referir que, foi também constatada no grupo de triatletas de Elite, uma diminuição significativa do valor médio referente ao índice RDW ( $p=0.035$ ), comportamento este igualmente verificado no grupo não-Elite, embora sem significado estatístico ( $p=0.456$ ).

**Tabela 17** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.

Indicadores Hematológicos	Pré-Prova			Pós-Prova		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Elite	Não-Elite		Elite	Não-Elite	
<b>CGR (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,7 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,2*	0.033	4,9 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2	0.564
<b>Hb (g/dL)</b>	14,4 $\pm$ 0,1	14,6 $\pm$ 0,9*	0.034	14,6 $\pm$ 1,0	14,7 $\pm$ 0,1	0.022
<b>Hct (%)</b>	41,7 $\pm$ 2,5	42,1 $\pm$ 2,4	0.797	42,3 $\pm$ 2,5	43,2 $\pm$ 2,3	0.566
<b>VGM (fL)</b>	84,0 $\pm$ 0,8	88,5 $\pm$ 3,7	0.053	83,8 $\pm$ 0,7	88,5 $\pm$ 3,8	0.051
<b>HGM (pg)</b>	28,8 $\pm$ 1,0	30,7 $\pm$ 1,4	0.051	29,0 $\pm$ 0,9	30,8 $\pm$ 1,4	0.055
<b>CHGM(g/dL)</b>	34,4 $\pm$ 0,9	33,6 $\pm$ 2,3	0.506	34,6 $\pm$ 0,8	34,5 $\pm$ 0,4	0.863
<b>RDW (%)</b>	13,3 $\pm$ 0,8	13,8 $\pm$ 0,4*	0.043	13,0 $\pm$ 0,9	13,7 $\pm$ 1,4	0.395

Nota: Valores expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Através da observação dos resultados apresentados na Tabela 17, podemos constatar na prova de triatlo olímpico a existência de diferenças significativas entre os respectivos grupos experimentais de triatletas no que concerne aos valores basais dos indicadores CGR ( $p=0.033$ ) e Hb ( $p=0.034$ ). Relativamente aos valores pós-prova registados pelos triatletas dos grupos experimentais, não foram observadas diferenças significativas.

### 5.5.3 Triatlo *Sprint*

**Tabela 18** - Efeito da prova de triatlo *sprint* nos diferentes indicadores eritrocitários dos triatletas.

Parâmetros Hematológicos	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
<b>CGR(<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,8 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,3	0.110	4,9	4,9 $\pm$ 0,2	0.686
<b>Hb (g/dL)</b>	13,8 $\pm$ 0,9	14,3 $\pm$ 1,1*	0.049	14,5 $\pm$ 0,1	14,6 $\pm$ 0,7	0.498
<b>Hct (%)</b>	39,8 $\pm$ 2,7	40,4 $\pm$ 2,7	0.365	41,9 $\pm$ 1,1	42,2 $\pm$ 2,1	0.269
<b>VGM (fL)</b>	87,4 $\pm$ 2,7	86,5 $\pm$ 2,6*	0.011	86,5 $\pm$ 2,1	85,5 $\pm$ 0,2	0.345
<b>HGM (pg)</b>	30,5 $\pm$ 1,3	30,6 $\pm$ 1,7	0.721	29,8 $\pm$ 0,5	30,3 $\pm$ 0,6	0.705
<b>CHGM (g/dL)</b>	34,6 $\pm$ 0,3	35,3 $\pm$ 0,5*	0.021	34,4 $\pm$ 0,2	34,8 $\pm$ 0,3	0.180
<b>RDW (%)</b>	13,0 $\pm$ 0,4	13,3 $\pm$ 0,8	0.245	13,3 $\pm$ 0,4	13,0 $\pm$ 0,5*	0.023

Nota: Valores expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Não foram verificadas alterações significativas referentes ao comportamento da CGR em ambos os grupos de triatletas estudados. Relativamente ao valor médio da concentração de hemoglobina apresentado pelos triatletas de Elite, importa salientar a detecção de um valor basal inferior aos valores de referência laboratorial (14-18 g/dl) (Bossche et al., 2002), embora este valor corrobore os dados obtidos com atletas de endurance de elevada prestação competitiva. Após a realização da prova, foi verificada no grupo Elite, uma diminuição significativa no valor médio relativo ao VGM ( $p=0.011$ ) e um aumento estatisticamente relevante da CHGM ( $p=0.021$ ). De destacar, a diminuição estatisticamente significativa do valor relativo a RDW pós-prova observado no grupo não-Elite ( $p=0.023$ ).

**Tabela 19** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos diferentes indicadores eritrocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*.

Indicadores Hematológicos	Pré-Prova			Pós-Prova		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Elite	Não-Elite		Elite	Não-Elite	
<b>CGR (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	4,8 $\pm$ 0,2	4,9	0.091	4,9 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,2	0.351
<b>Hb (g/dL)</b>	13,8 $\pm$ 0,9	14,5 $\pm$ 0,1*	0.035	14,3 $\pm$ 1,1	14,6 $\pm$ 0,7	0.095
<b>Hct (%)</b>	39,8 $\pm$ 2,7	41,9 $\pm$ 1,1	0.090	40,4 $\pm$ 2,7	42,2 $\pm$ 2,1	0.090
<b>VGM (fL)</b>	87,4 $\pm$ 2,7	86,5 $\pm$ 2,1	0.584	86,5 $\pm$ 2,6	86,5 $\pm$ 2,1	0.648
<b>HGM (pg)</b>	30,5 $\pm$ 1,3	29,8 $\pm$ 0,5	0.310	30,6 $\pm$ 1,7	30,3 $\pm$ 0,6	0.421
<b>CHGM(g/dL)</b>	34,6 $\pm$ 0,3	34,4 $\pm$ 0,2	0.917	35,3 $\pm$ 0,5	34,8 $\pm$ 0,3	0.092
<b>RDW (%)</b>	13,0 $\pm$ 0,4	13,3 $\pm$ 0,4*	0.041	13,3 $\pm$ 0,8	13,0 $\pm$ 0,5	0.841

Nota: Valores expressos pela média  $\pm$  desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova.

Tendo por base os dados referentes aos indicadores eritrocitários ilustrados na Tabela 19, verificamos que, relativamente aos valores basais registados, o grupo de triatletas de Elite exhibe um valor médio significativamente inferior ao apresentado pelos triatletas não-Elite ( $p=0.035$ ), sendo este comportamento também observado no que respeita à amplitude de distribuição dos eritrócitos ( $p=0.041$ ).

## 5.6 Biomarcadores Imunológicos

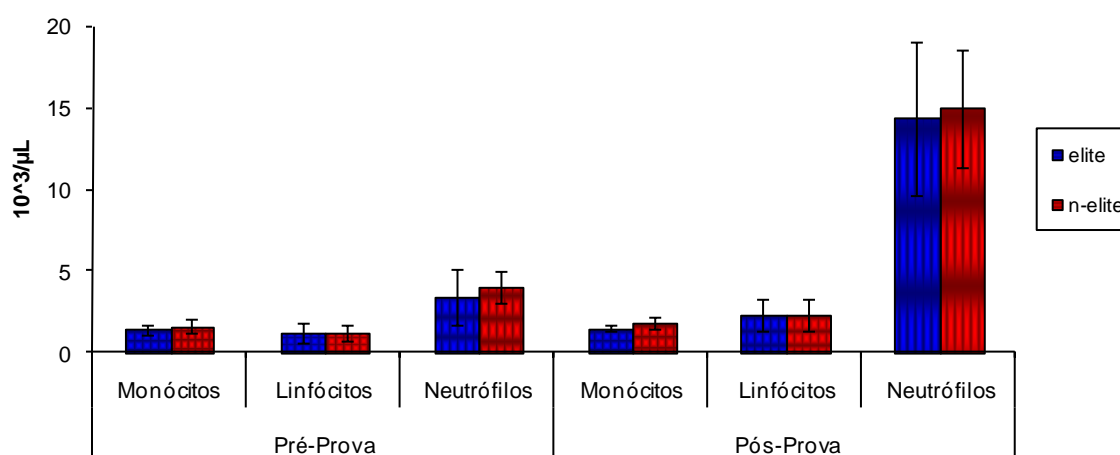
### 5.6.1 Triatlo Longo

**Tabela 20** – Efeito da prova de triatlo longo nas diferentes subpopulações leucocitárias dos triatletas.

Parâmetros Imunológicos	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
Monócitos (%)	2,6 ± 2,0	8,3 ± 2,0**	0.007	4,8 ± 1,9	9,6 ± 5,4	0.138
Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2*	0.046	0,6 ± 0,4	0,8 ± 0,4*	0.041
Linfócitos (%)	9,1 ± 4,1	26,0 ± 3,8**	0.003	9,1 ± 4,8	26,1 ± 4,6**	0.005
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,2 ± 0,6	2,3 ± 1,0*	0.036	1,3 ± 0,5	2,3 ± 1,0*	0.049
Neutrófilos (%)	51,8 ± 14,5	88,1 ± 5,4**	0.001	60,2 ± 10,3	85,9 ± 6,6**	0.003
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	3,4 ± 1,7	14,4 ± 4,7**	0.002	4,0 ± 1,0	15,0 ± 3,6**	0.003
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	6,3 ± 1,5	16,3 ± 5,0**	0.003	6,7 ± 1,4	17,5 ± 4,1**	0.001

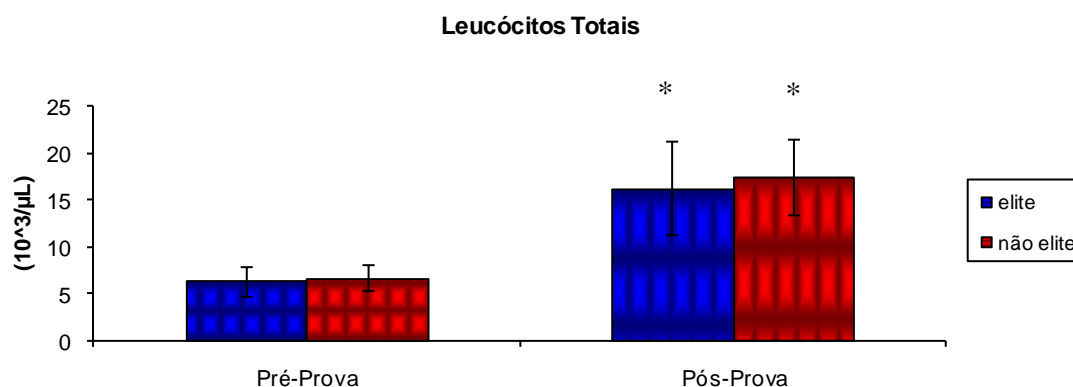
Valores expressos pela média ± desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova. \*\*  $p < 0.01$ , vs Pré-Prova

A análise da Tabela 20 permite-nos verificar um aumento significativo dos leucócitos totais circulantes em ambos os grupos avaliados, onde foram registados acréscimos de 158,7% e 161% nos grupos Elite e não-Elite, respectivamente. Esta leucocitose reflecte principalmente uma neutrofilia, expressa pelo aumento de 323,5% nos triatletas de Elite ( $p=0.002$ ) e 275% nos triatletas não-Elite ( $p=0.003$ ). De salientar a monocitose ( $p=0.046$ ) e a linfocitose ( $p=0.036$ ) verificadas após o término da prova nos triatletas do grupo Elite. No que diz respeito ao grupo não-Elite, foram igualmente constatados aumentos significativos nos valores médios pós-prova referentes a concentração dos monócitos ( $p=0.041$ ) e linfócitos ( $p=0.049$ ).



**Figura 8** – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento das subpopulações leucocitárias nos momentos pré e pós-prova de triatlo longo. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

De modo a analisar o efeito crónico das sucessivas cargas de treino na resposta imune dos triatletas presentes neste estudo, foram comparadas as médias dos respectivos biomarcadores imunológicos nos momentos pré e pós-esforço, onde de acordo com a Figura 1, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos de triatletas, embora relativamente a concentração de leucócitos totais (Figura 9), o grupo não-Elite evidenciou valores basais mais elevados ( $6,7 \pm 1,4$  vs  $6,3 \pm 1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.834$ ), sendo o mesmo comportamento verificado nos valores pós-prova ( $17,5 \pm 4,1$  vs  $16,3 \pm 5,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.754$ ).



**Figura 9** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a concentração dos leucócitos totais nos momentos pré e pós prova de triatlo longo. \*  $p<0.05$ , vs Pré-prova; •  $p<0.05$ , vs Elite.

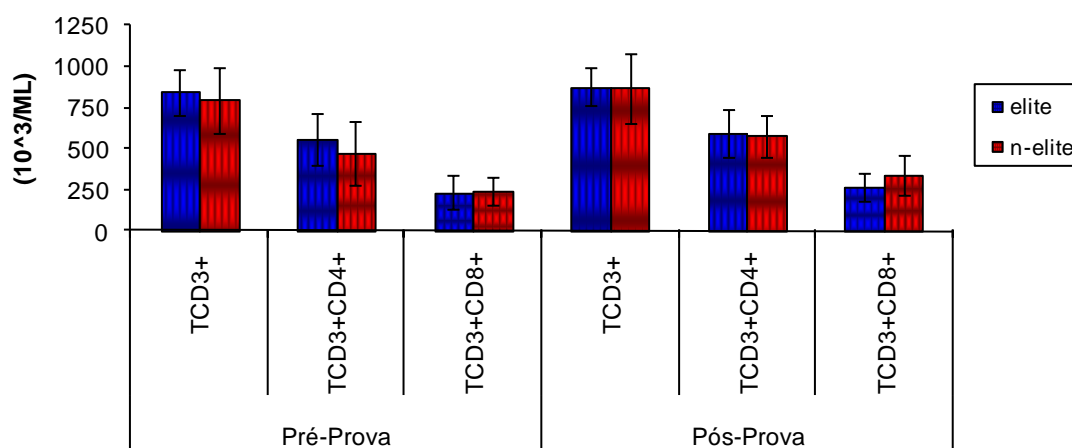
**Tabela 21** – Efeito da prova de triatlo longo nos diferentes fenótipos linfocitários dos triatletas

Linfócitos T CD 3 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD3 <sup>+</sup> (%)	61,4 ± 12,8	64,0 ± 10,5*	0.043	61,0 ± 8,3	69,6 ± 10,0*	0.040
T CD3 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	846,4 ± 137,7	878,6 ± 119,3	0.688	799,0 ± 200,0	868,6 ± 209,1	0.086
T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	66,0 ± 11,0	67,6 ± 8,5	0.518	59,2 ± 15,2	66,6 ± 5,3	0.158
TCD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	558,6 ± 162,4	593,9 ± 147,9	0.686	473,0 ± 197,9	578,4 ± 127,9	0.066
T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	27,4 ± 6,6	29,8 ± 7,1	0.716	30,0 ± 5,3	36,4 ± 6,2	0.078
TCD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	231,9 ± 103,7	261,8 ± 84,1	0.136	239,7 ± 87,9	342,2 ± 122,2*	0.032
T CD4 <sup>+</sup> /T CD8 <sup>+</sup>	2,4 ± 0,8	2,2 ± 0,7	0.057	1,9 ± 0,8	1,6 ± 0,5*	0.042

\*  $p<0.05$ , vs Pré-Prova

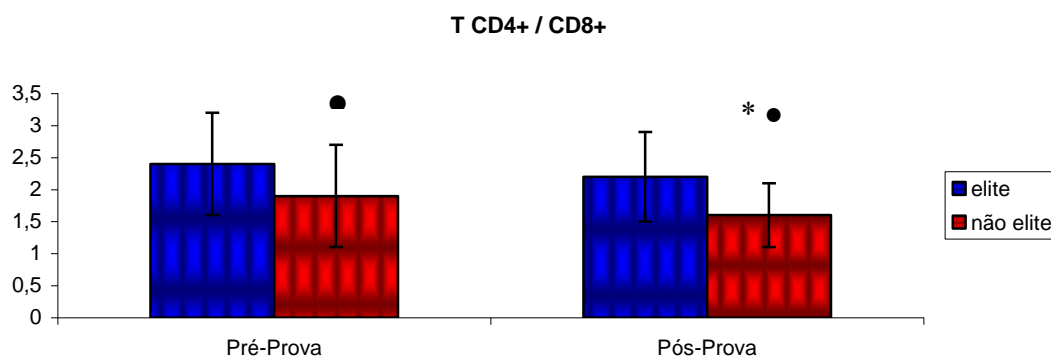
Relativamente a leitura da Tabela 21, podemos constatar que após a prova de triatlo longo, ambos os grupos experimentais de triatletas apresentaram aumentos significativos, em valores percentuais ( $p<0.05$ ), da concentração de linfócitos T CD3<sup>+</sup>. De referir o aumento mais acentuado observado no grupo não-Elite ( $61,0 \pm 8,3$  vs  $69,6 \pm 10,0\%$ ;  $p=0.040$ ) comparativamente ao grupo

Elite ( $61,4 \pm 12,8$  vs  $64,0 \pm 10,5\%$ ;  $p=0.043$ ), embora este comportamento não se tenha reflectido num aumento significativo, em valores absolutos, nos respectivos grupos. Ambos os grupos exibiram após a realização da prova, aumentos dos valores relativos aos linfócitos citotóxicos T CD8<sup>+</sup>, sendo esta alteração somente significativa nos triatletas do grupo não-Elite (42,7%;  $p=0.032$ ). Relativamente as células T CD4<sup>+</sup> (linfócitos auxiliares), verificou-se um comportamento similar, onde ambos os grupos apresentaram aumentos percentuais e absolutos, que apesar de não se revelarem significativos ( $p>0.05$ ), foram mais pronunciados no grupo não-Elite (22,2% vs 6,3%).



**Figura 10** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos fenótipos linfocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo longo. \*  $p<0.05$ , vs Elite.

Da Figura 10, relativamente aos valores pré-prova, salienta-se a grande variabilidade inter-individual apresentada pelos triatletas de Elite, expressa pela elevada amplitude do desvio-padrão, referente as concentrações basais dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $558,6 \pm 162,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), que embora se mostrasse superior a média registada pelo grupo não-Elite ( $473,0 \pm 197,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), não diferiu de forma significativa ( $p=0.688$ ), sendo este resultado igualmente observado no período pós-prova ( $593,9 \pm 147,9$  vs  $578,4 \pm 127,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.840$ ). No que respeita aos linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> analisados na prova de triatlo longo, foi encontrada uma diferença significativa entre os respectivos grupos experimentais relativamente aos valores pós prova ( $261,8 \pm 84,1$  vs  $342,4 \pm 122,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.032$ ).



**Figura 11** - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao efeito da prova de triatlo longo na relação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup>. \* p<0.05, vs Pré-prova; ● p<0.05, vs Elite.

Relativamente ao *ratio* dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> apresentado pelos triatletas, verificamos que ao término da prova, ambos os grupos evidenciaram uma diminuição da respectiva proporção, embora somente no grupo não-Elite, esta alteração se mostrou significativa (1,9 ± 0,8 vs 1,6 ± 0,5; p=0.042). Foi encontrada uma diferença inter-grupos de 26,3% referente aos valores basais (2,4 ± 0,8 vs 1,9 ± 0,8; p=0.036) dos triatletas, sendo também constatada após a realização da prova, uma diferença significativa de 37,5% (2,2 ± 0,7 vs 1,6 ± 0,5; p=0.018).

**Tabela 22** – Efeito da prova de triatlo longo nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup>.

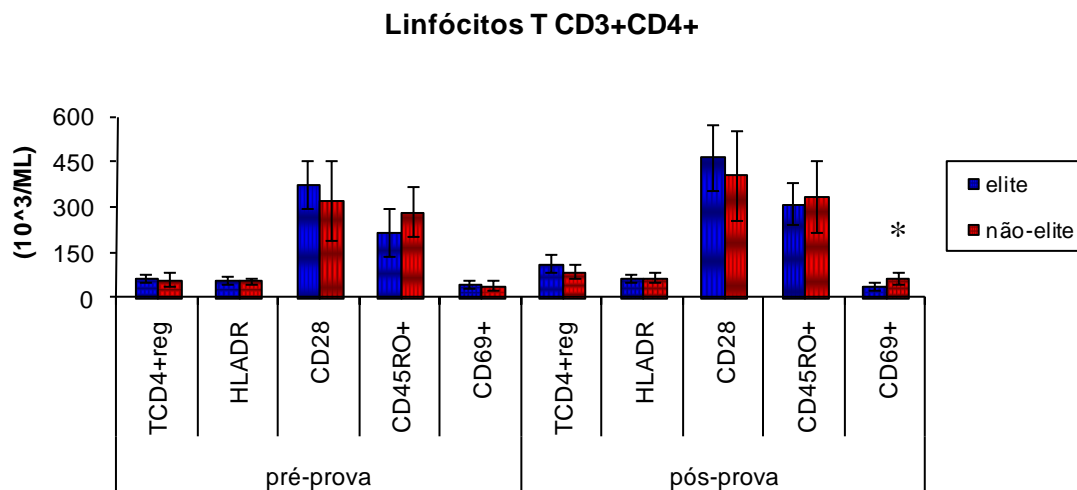
Linfócitos T CD 4 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	Pré-Prova	Pós-Prova	p	Pré-Prova	Pós-Prova	p
T CD4 <sup>+</sup> reg (%)	7,8 ± 4,6	15,0 ± 6,7*	0.012	6,2 ± 1,7	15,6 ± 3,6**	0.005
TCD4 <sup>+</sup> reg (10 <sup>3</sup> /μL)	33,6 ± 13,2	84,4 ± 27,5*	0.015	31,6 ± 20,2	57,0 ± 23,0**	0.000
HLA-DR (%)	6,0 ± 5,1	6,2 ± 4,9	0.317	6,2 ± 1,3	6,6 ± 1,6	0.317
HLA-DR (10 <sup>3</sup> /μL)	28,0 ± 14,7	35,0 ± 14,3	0.083	27,2 ± 9,5	36,2 ± 17,6	0.068
CD 28 (%)	92,4 ± 12,0	97,2 ± 12,0	0.109	83,0 ± 21,2	95,4 ± 4,6	0.108
CD 28 (10 <sup>3</sup> /μL)	375,8 ± 80,6	465,0 ± 111*	0.015	322,6 ± 133,6	407,0 ± 148*	0.017
CD 45 RO <sup>+</sup> (%)	55,0 ± 14,8	60,0 ± 14,5	0.049	71,0 ± 12,6	76,0 ± 14,9	0.102
CD 45RO <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	217,4 ± 81,7	309,8 ± 69,7	0.024	285,4 ± 80,7	334,8 ± 117	0.080
CD 69 <sup>+</sup> (%)	2,6 ± 2,0	1,4 ± 1,1	0.548	2,6 ± 2,0	4,0 ± 1,5	0.174
CD 69 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	15,0 ± 4,0	8,0 ± 2,5**	0.009	10,6 ± 7,0	23,8 ± 10,1*	0.023

Valores expressos pela média ± desvio-padrão ( $\bar{x} \pm Dp$ ). \* p<0,05, vs Pré-Prova, \*\* p<0,01, vs Pré-Prova

Em resposta a prova de triatlo longo, podemos constatar que ambos os grupos de triatletas evidenciaram aumentos significativos nas concentrações de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras (importantes na homeostase da tolerância periférica), sendo estes acréscimos mais pronunciados no grupo não-Elite comparativamente aos triatletas de Elite, quer em termos percentuais, quer em



valores absolutos, conforme apresentado na Tabela 22. No que respeita a activação das proteínas codificadas (HLA-DR), não foram verificadas alterações nos valores pós-prova em ambos os grupos analisados. Relativamente ao efeito da prova de triatlo longo no marcador de activação CD28<sup>+</sup>, constata-se um comportamento similar em ambos os grupos experimentais, Elite e não-Elite, expresso pelo incremento significativo nos respectivos valores médios pós-prova (23,7%; p=0.015 e 26,1%; p=0.017, respectivamente). No que diz respeito ao fenótipo CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> observa-se um aumento das respectivas concentrações nos referidos grupos, embora somente no grupo Elite este incremento se apresentasse significativo (p=0.049). O comportamento do marcador de activação CD69<sup>+</sup> se revelou conflitual, uma vez que no grupo Elite, verificou-se uma diminuição significativa em termos absolutos ( $15,0 \pm 4,0$  vs  $8,0 \pm 2,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; p=0.009), enquanto nos triatletas não-Elite foi registado um aumento significativo de 124,5% ( $10,6 \pm 7,0$  vs  $23,8 \pm 10,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; p=0.023).



**Figura 12** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo longo. \* p<0.05, vs Elite

Relativamente ao comportamento dos marcadores de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, ilustrado na Figura 12, verifica-se que não foram encontradas diferenças significativas inter-grupos nos fenótipos analisados referentes aos valores pré-

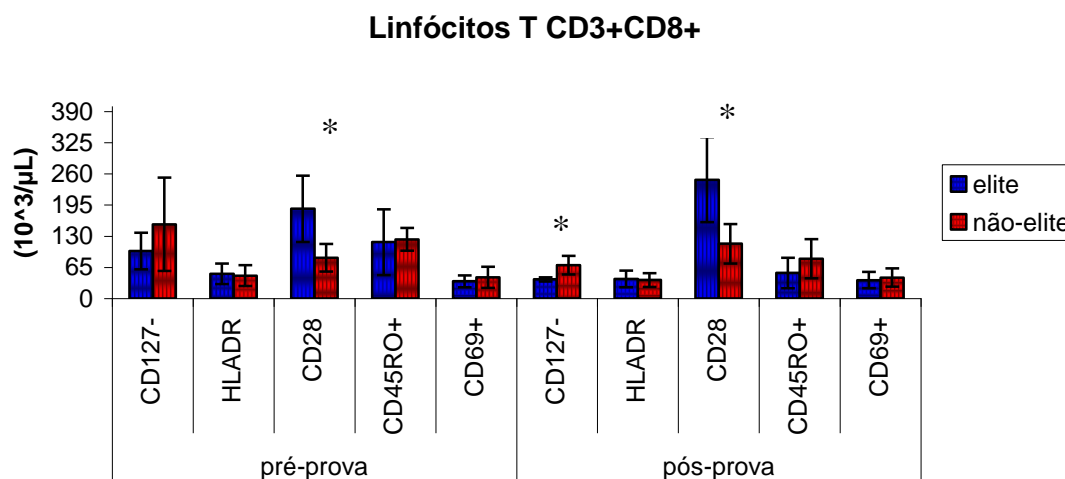
prova. Todavia, no que respeita aos valores pós-esforço, foi detectada uma diferença significativa entre os respectivos grupos de triatletas nos valores do marcador de activação CD69<sup>+</sup> ( $8,0 \pm 2,5$  vs  $23,8 \pm 10,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.010$ ).

**Tabela 23** – Efeito da prova de triatlo longo nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8<sup>+</sup>.

Linfócitos T CD 8 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD 127 <sup>-</sup> (%)	34,8 ± 15,8	18,2 ± 8,5*	0.043	52,8 ± 17,3	31,6 ± 10,2*	0.025
TCD 127 <sup>-</sup> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	99,2 ± 38,1	30,0 ± 4,4*	0.039	154,8 ± 97,2	59,4 ± 19,4*	0.043
HLA-DR (%)	7,4 ± 3,3	4,6 ± 2,5	0.465	6,4 ± 3,7	4,8 ± 2,2	0.256
HLA-DR ( $10^3/\mu\text{L}$ )	21,6 ± 11,6	10,8 ± 7,4	0.225	17,8 ± 11,7	8,6 ± 4,3	0.178
CD 28 (%)	51,2 ± 15,3	71,8 ± 9,2*	0.040	34,6 ± 15,8	62,0 ± 14,2**	0.004
CD 28 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	187,0 ± 69,0	247,8 ± 88,7**	0.004	84,8 ± 28,8	114,2 ± 41,3*	0.043
CD 45 RO <sup>+</sup> (%)	25,2 ± 13,2	50,0 ± 18,7*	0.026	39,2 ± 13,5	47,4 ± 17,6*	0.040
CD 45RO <sup>+</sup> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	53,4 ± 31,7	117,6 ± 68,6*	0.043	82,8 ± 40,7	123,4 ± 23,9*	0.028
CD 69 <sup>+</sup> (%)	3,4 ± 2,8	4,6 ± 3,1	0.326	5,4 ± 4,2	5,2 ± 1,7,8	0.547
CD 69 <sup>+</sup> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	5,8 ± 2,3	8,4 ± 6,9	0.215	14,4 ± 12,0	13,6 ± 9,0	0.261

\*  $p < 0.05$ , vs Pré-prova, \* \*  $p < 0.01$ , vs Pré-prova

Analisando os dados apresentados na Tabela 23, relativamente ao comportamento dos diversos marcadores de activação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, constata-se que ao final da prova, ambos os grupos de triatletas evidenciaram uma diminuição significativa ( $p < 0.05$ ), em termos percentuais e absolutos, dos valores referentes ao fenótipo T CD8<sup>+</sup>CD 127<sup>-</sup>, enquanto relativamente ao fenótipo T CD8<sup>+</sup>CD45 RO<sup>+</sup> foi observado nos respectivos termos, um aumento estatisticamente relevante ( $p < 0.05$ ) nos referidos grupos experimentais. Ambos os grupos experimentais exibiram aumentos significativos, percentuais e absolutos, dos valores pós-prova relativos ao fenótipo T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, sendo este mais pronunciado no grupo Elite ( $p=0.004$ ) comparativamente ao grupo não-Elite ( $p=0.043$ ).



**Figura 13** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário T CD8<sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo longo \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

Da análise inter-grupos ilustrada na Figura 13, observa-se que relativamente aos valores de partida, somente no fenótipo T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> foi detectada uma diferença significativa de 120,2% ( $p=0.032$ ). Entretanto, no que respeita aos valores pós-prova dos respectivos marcadores de activação analisados, foram encontradas diferenças significativas, em termos absolutos, nos parâmetros CD127<sup>-</sup> ( $p=0.008$ ) e CD28<sup>+</sup> ( $p=0.032$ ).

### 5.6.2 Triatlo Olímpico

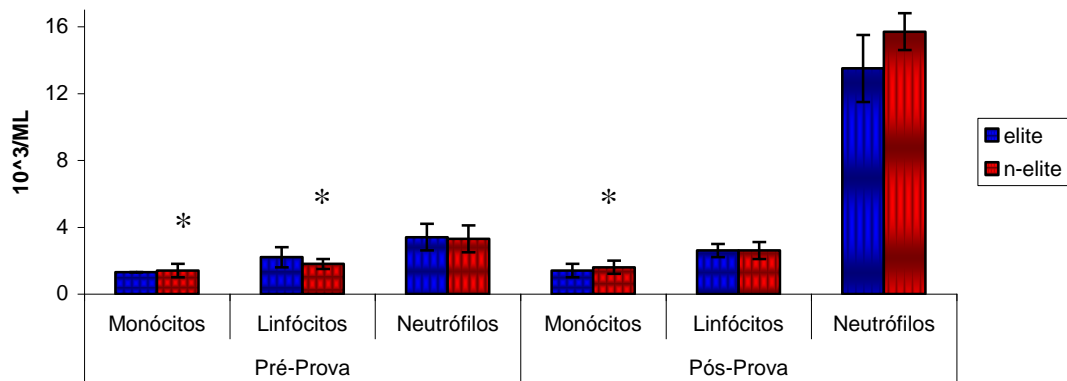
**Tabela 24** - Efeito da prova de triatlo olímpico nas diferentes subpopulações leucocitárias dos triatletas.

Parâmetros Imunológicos	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	Pré-Prova	Pós-Prova	p	Pré-Prova	Pós-Prova	p
Monócitos (%)	4,0 ± 1,9	8,3 ± 2,7*	0.024	3,5 ± 0,8	7,7 ± 2,5**	0.009
Monócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	0,3	0,4 ± 0,1*	0.033	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1*	0.040
Linfócitos (%)	10,6 ± 7,4	29,2 ± 7,0**	0.000	8,0 ± 4,0	29,0 ± 8,8**	0.001
Linfócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	1,2 ± 0,6	1,6 ± 0,4*	0.029	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2**	0.001
Neutrófilos (%)	58,3 ± 6,7	84,9 ± 9,2**	0.000	57,4 ± 9,2	91,4 ± 4,0**	0.000
Neutrófilos(10 <sup>3</sup> /μL)	3,4 ± 0,8	13,5 ± 2,0**	0.001	3,3 ± 0,8	15,7 ± 1,1**	0.000
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /μL)	5,7 ± 1,1	13,3 ± 2,7**	0.001	5,8 ± 1,1	14,9 ± 5,9**	0.000

\*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova, \*\*  $p < 0.01$ , vs Pré-Prova

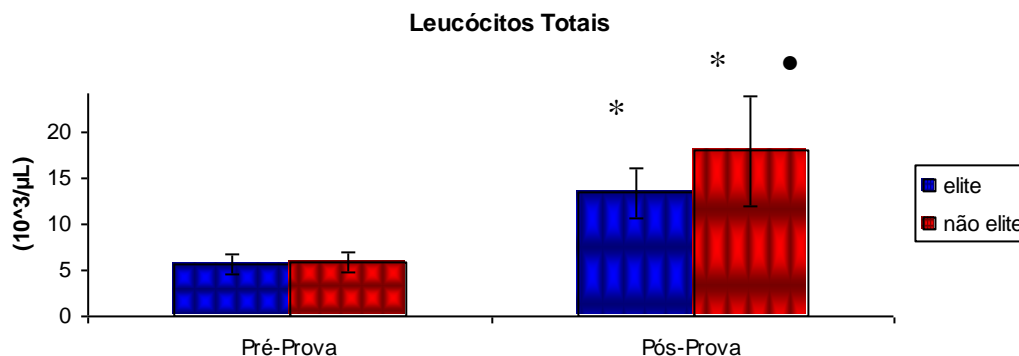
Imediatamente após a prova de triatlo olímpico, foi verificado, à semelhança do comportamento constatado na prova de triatlo longo, um aumento significativo na concentração dos leucócitos totais em ambos os grupos avaliados, sendo também este aumento mais pronunciado nos triatletas do grupo não-Elite

(156,8%  $p=0.000$ ), comparativamente ao grupo Elite (133,3%;  $p=0.001$ ). Esta leucocitose foi expressa principalmente por uma neutrofilia significativa de 297% nos triatletas de Elite ( $p=0.001$ ) e de 375,7% nos triatletas não-Elite ( $p=0.000$ ). Foram também verificados em ambos grupos, aumentos significativos das concentrações de monócitos e linfócitos ( $p<0.05$ ), sendo a referida monocitose mais significativa nos triatletas de Elite (33,3%;  $p=0.029$ ), enquanto no grupo não-Elite foi evidenciado um maior acréscimo da concentração de linfócitos pós-esforço (100%;  $p=0.001$ ).



**Figura 14** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento das subpopulações leucocitárias nos momentos pré e pós-prova de triatlo olímpico. \*  $p<0.05$ , vs Elite

Relativamente aos valores basais dos monócitos, foi observada uma diferença significativa ( $p=0.030$ ) entre os respectivos grupos analisados, sendo esta diferença também constatada no momento pós-esforço ( $p=0.036$ ), onde ambos os grupos de triatletas evidenciaram aumentos significativos dos valores médios em termos percentuais e absolutos. No que concerne aos valores de partida dos linfócitos, foi encontrada uma diferença significativa de 50% ( $p=0.028$ ) entre os respectivos valores médios registados.



**Figura 15** - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao comportamento da concentração de leucócitos totais nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico. \*  $p < 0.05$ , vs Pré-prova; ●  $p < 0.05$ , vs Elite.

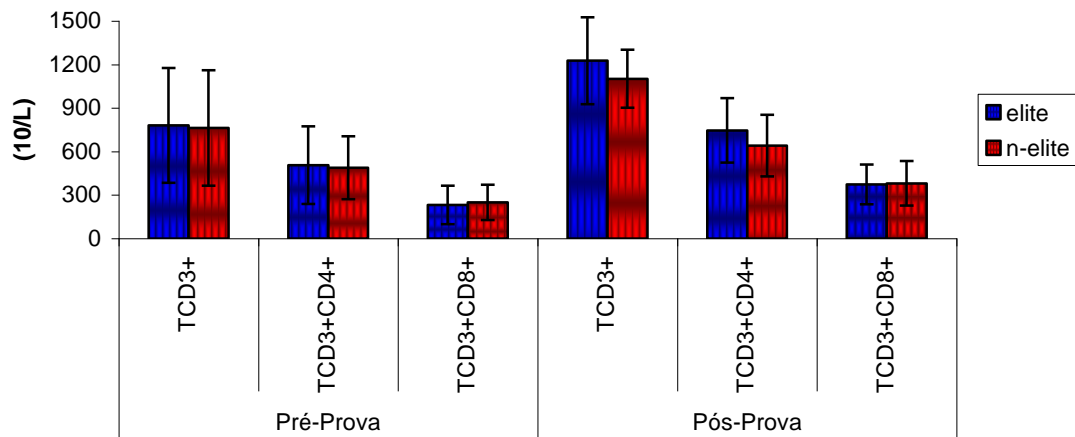
De acordo com os resultados ilustrados na Figura 15, constata-se que não foram encontradas diferenças significativas inter-grupos relativamente aos valores basais das concentrações leucocitárias dos triatletas participantes da prova de triatlo olímpico ( $5,7 \pm 1,1$  vs  $5,8 \pm 1,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.841$ ). Todavia, no que respeita a activação das células imunocompetentes em resposta ao esforço físico realizado, foram verificadas alterações significativas ( $p < 0.05$ ) nos valores médios leucocitários, expressas pelos aumentos de 133,3% nos triatletas de Elite e 208,6% no grupo não-Elite. Importa ainda salientar que, esta leucocitose evidenciada em ambos os grupos analisados foi mais pronunciada nos triatletas do grupo não-Elite comparativamente aos triatletas de Elite, sendo detectada uma diferença significativa de 34,5% ( $p=0.016$ ) relativamente aos valores pós-prova registados pelos respectivos grupos.

**Tabela 25** – Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes fenótipos linfocitários.

Linfócitos T CD 3 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{x} \pm Dp$		p	$\bar{x} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD3 <sup>+</sup> (%)	64,0 ± 7,4	66,6 ± 6,5*	0.042	61,0 ± 8,5	67,8 ± 9,1*	0.040
T CD3 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	780,8 ± 396,5	1227,4 ± 300**	0.005	763,5 ± 398	1102,8 ± 200**	0.008
T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	55,8 ± 8,5	60,8 ± 12,1	0.472	52,7 ± 13,5	58,2 ± 14,3	0.208
TCD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	506,4 ± 268,0	746,6 ± 222,2	0.370	489 ± 215,8	642,4 ± 212,1	0.385
T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	28,6 ± 7,8	30,2 ± 6,7	0.255	33,7 ± 12,6	34,4 ± 12,2	0.078
TCD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	231,8 ± 132,7	374,4 ± 136,7	0.740	250,2 ± 122	381,2 ± 153,3	0.946
T CD4 <sup>+</sup> /T CD8 <sup>+</sup>	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,9	0.084	1,9 ± 0,5	1,6 ± 0,4	0.053

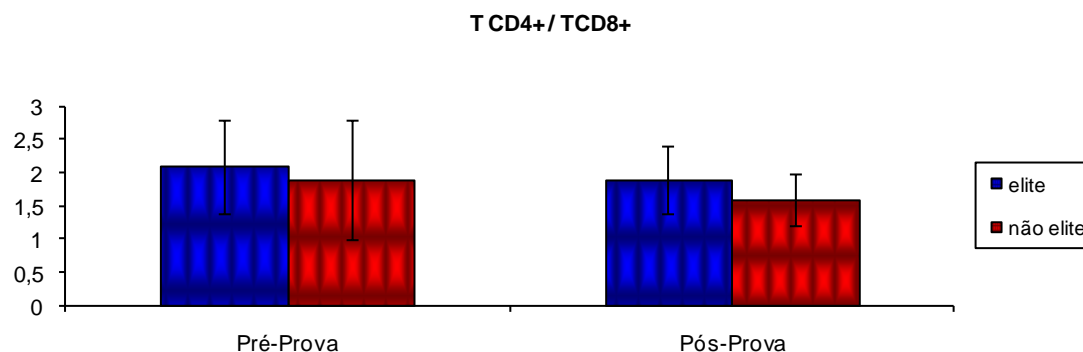
\*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova, \*\*  $p < 0.01$ , vs Pré-Prova

Uma análise da Tabela 25, permite-nos constatar que após a realização da prova de triatlo olímpico, ambos os grupos estudados evidenciaram uma resposta similar no que respeita ao comportamento dos linfócitos T CD3<sup>+</sup>, caracterizada por um aumento significativo das respectivas concentrações, sendo de 57,1% ( $p=0.005$ ) nos triatletas de Elite e de 44,4% ( $p=0.008$ ) nos triatletas do grupo não-Elite. Relativamente aos fenótipos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, foram igualmente verificados no momento pós-prova, aumentos dos respectivos valores médios que embora não apresentassem significado estatístico ( $p>0.05$ ), foram mais pronunciadas nos triatletas do grupo Elite.



**Figura 16** – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos fenótipos linfocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico. \*  $p<0.05$ , vs Elite.

Conforme ilustrado na Figura 16, observa-se que não foram encontradas diferenças significativas inter-grupos relativamente aos valores basais e pós-prova de triatlo olímpico, no que se refere aos diferentes fenótipos linfocitários analisados.



**Figura 17** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao efeito da prova de triatlo olímpico na relação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.. \* **p<0.05**, vs Pré-prova; • **p<0.05**, vs Elite.

Relativamente ao efeito induzido pelo exercício agudo na resposta imune dos triatletas, verificamos ao término da presente prova de triatlo, uma diminuição na relação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> (Figura 17) em ambos os grupos analisados, sendo esta redução mais pronunciada no grupo não-Elite (p=0.053) comparativamente ao grupo Elite (p=0.084).

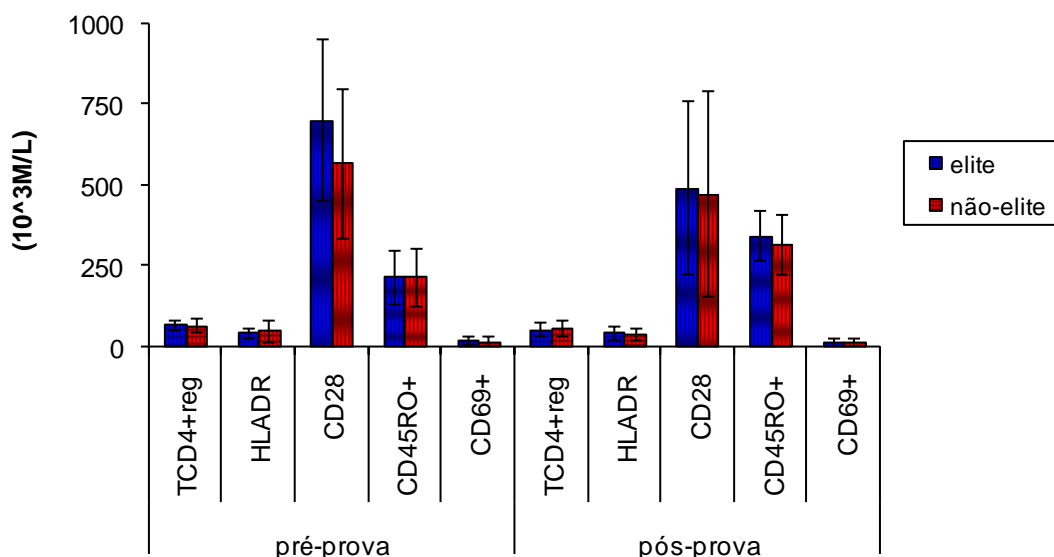
**Tabela 26** – Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup>.

Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	Pré-Prova	Pós-Prova	p	Pré-Prova	Pós-Prova	p
T CD4 <sup>+</sup> reg (%)	9,4 ± 2,0	11,8 ± 4,7	0.118	10,0 ± 1,5	12,2 ± 3,5	0.180
TCD4 <sup>+</sup> reg (10 <sup>3</sup> /μL)	68,0 ± 16,2	52,8 ± 19,6*	0.043	64,4 ± 21,4	55,2 ± 24,7	0.097
HLA-DR (%)	6,2 ± 3,3	9,2 ± 4,0	0.068	7,2 ± 4,0	9,0 ± 2,1	0.461
HLA-DR (10 <sup>3</sup> /μL)	42,6 ± 14,7	41,6 ± 20,0	0.906	48,0 ± 33,0	41,0 ± 18,8	0.357
CD 28 (%)	92,6 ± 10,0	96,6 ± 4,3	0.200	87,6 ± 7,6	95,7 ± 3,3	0.084
CD 28 (10 <sup>3</sup> /μL)	701,4 ± 250,3	490,6 ± 268,7*	0.042	570,0 ± 231,9	472 ± 319,1	0.064
CD 45 RO <sup>+</sup> (%)	46,6 ± 12,5	48,2 ± 13,8	0.412	48,2 ± 11,9	51,0 ± 12,7	0.065
CD 45RO <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	215,4 ± 82,0	344,2 ± 75,9*	0.044	216,7 ± 90,5	319,0±93,3*	0.043
CD 69 <sup>+</sup> (%)	1,2 ± 0,4	1,0	0.391	1,0 ± 0,7	1,0	0.394
CD 69 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	7,4 ± 2,3	5,8 ± 3,1	0.197	6,4 ± 3,9	5,0 ± 3,3	0.593

\* p<0.05, vs Pré-Prova; \*\* p<0.01, vs Pré-Prova

Respeitante aos marcadores de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> na prova de triatlo olímpico, salienta-se a diminuição significativa de 27,8% (p=0.043) verificada na concentração das células T CD4<sup>+</sup>reg dos triatletas de Elite. Relativamente a este grupo experimental, foi ainda observada uma diminuição significativa de 42,9% (p=0.042) referente ao fenótipo T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e um aumento significativo de 57,9% (p=0.044) nas células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. No que concerne ao grupo não-Elite, foi constatado um comportamento similar nos

referidos fenótipos analisados, embora somente nas células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> tenha sido observada uma redução significativa de 47,2% (p=0.043).



**Figura 18** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

Relativamente aos diferentes marcadores de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, podemos verificar que não foram encontradas diferenças significativas nos momentos pré e pós-prova de triatlo olímpico. No entanto, uma observação mais detalhada dos resultados apresentados na Figura 18, permite-nos constatar uma elevada variabilidade inter-individual nos valores pré e pós-prova de ambos os grupos analisados, expressa pela elevada amplitude dos desvios-padrão, referente ao marcador CD28<sup>+</sup>.

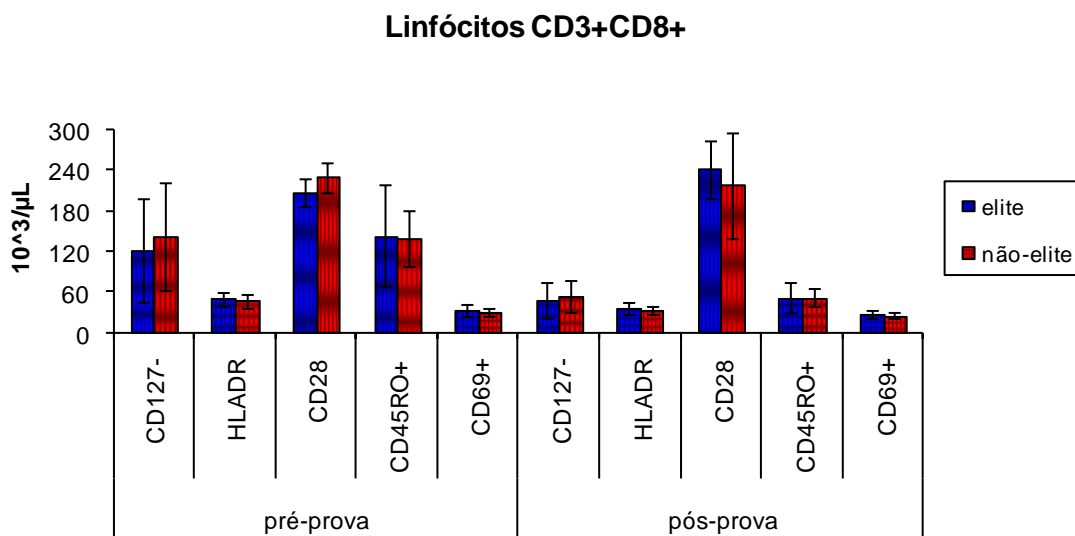
**Tabela 27** – Efeito da prova de triatlo olímpico nos diferentes marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8<sup>+</sup>.

Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	Pré-Prova	Pós-Prova	p	Pré-Prova	Pós-Prova	p
T CD 127 <sup>+</sup> (%)	30,4 ± 15,1	18,6 ± 7,6	0.060	36,8 ± 9,4	24,0 ± 13,2*	0.025
TCD 127 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	121,0 ± 67,0	47,0 ± 26,6*	0.039	141,2 ± 79,3	53,5 ± 22,6	0.082
HLA-DR (%)	7,6 ± 4,2	7,2 ± 3,5	0.803	7,4 ± 5,0	6,0 ± 3,3	0.256
HLA-DR (10 <sup>3</sup> /μL)	29,6 ± 11,4	15,2 ± 9,4*	0.015	27,0 ± 11,0	14,0 ± 6,3*	0.037
CD 28 (%)	67,8 ± 13,3	80,8 ± 8,1*	0.010	61,4 ± 12,7	75,0 ± 10,9*	0.023
CD 28 (10 <sup>3</sup> /μL)	207,2 ± 21,5	241,2 ± 42,2*	0.047	229,4 ± 22,0	218,7 ± 78,3	0.908
CD 45 RO <sup>+</sup> (%)	38,6 ± 17,1	26,6 ± 10,1*	0.026	38,8 ± 10,3	24,7 ± 13,6*	0.020
CD 45RO <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	143,2 ± 76,0	52,0 ± 21,5	0.052	139,8 ± 40,7	52,2±13,0*	0.018
CD 69 <sup>+</sup> (%)	4,0 ± 2,1	3,0 ± 1,2	0.326	3,4 ± 1,5	2,2 ± 0,5	0.215
CD 69 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	12,2 ± 9,4	7,2 ± 3,2	0.215	11,2 ± 6,0	5,5 ± 1,9	0.261

\*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova



Analisando a Tabela 27, podemos verificar que embora ambos os grupos evidenciassem uma nítida diminuição dos valores referentes a concentração dos linfócitos T  $CD8^+CD127^-$  após a prova de triatlo, somente no grupo Elite esta redução (157,4%) se revelou significativa ( $p=0.039$ ), quando expressa em termos absolutos, enquanto relativamente ao grupo não-Elite, apenas foi constatada uma diminuição significativa dos valores percentuais (12,8%;  $p=0.025$ ). Esta diminuição, em termos absolutos, foi também observada no comportamento do marcador de activação HLA-DR, quer no grupo Elite (94,7%;  $p=0.015$ ), quer nos triatletas não-Elite (92,8%;  $p=0.037$ ). De salientar ainda, a diminuição de 167,8% ( $p=0.018$ ) verificada no fenótipo T  $CD8^+CD45RO^+$  dos triatletas do grupo não-Elite e o aumento estatisticamente relevante de 16,4% ( $p=0.047$ ) relativo a concentração dos linfócitos T  $CD8^+CD28^+$  nos triatletas de Elite.



**Figura 19** - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário T  $CD8^+$  nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico. \*  $p<0.05$ , vs Elite.

Embora evidenciando os valores mais elevados dentro dos respectivos marcadores de activação analisados, não foram observadas diferenças inter-grupos no que respeita ao fenótipo T  $CD8^+CD28^+$ , seja no momento pré-prova

ou imediatamente após o esforço. De referir, que a expressão da molécula CD28<sup>+</sup> nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresenta uma elevada variabilidade, podendo estar dependente de factores como o estado de diferenciação do linfócito T (Tuma e Pamer, 2002). Relativamente aos demais parâmetros analisados, não foram detectadas diferenças entre os referidos grupos de triatletas analisados.

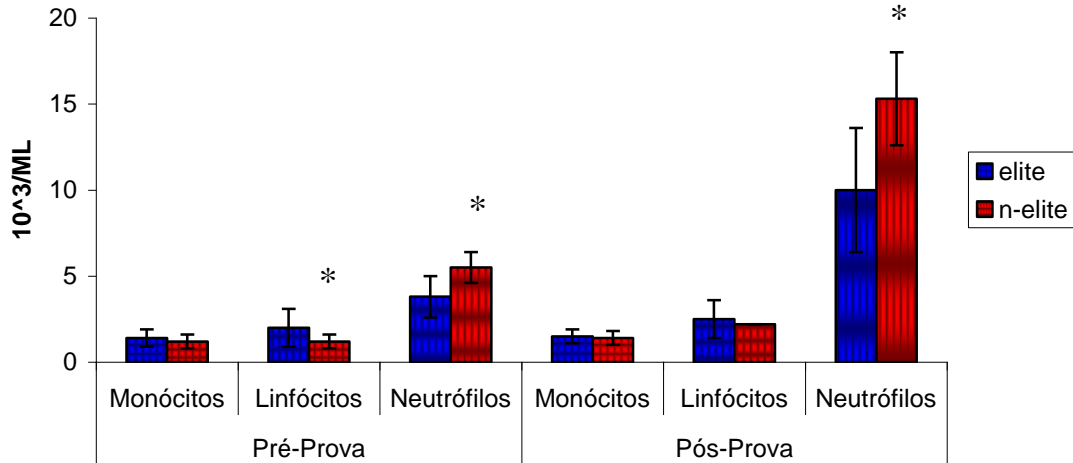
### 5.6.3 Triatlo Sprint

**Tabela 28** – Efeito da prova de triatlo *sprint* nas subpopulações leucocitárias dos triatletas.

Parâmetros Imunológicos	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
Monócitos (%)	3,8 ± 1,3	6,3 ± 0,9**	0.006	3,8 ± 1,9	5,5 ± 0,9*	0.035
Monócitos(10 <sup>3</sup> /μL )	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1*	0.046	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1*	0.042
Linfócitos (%)	21,1 ± 10,3	36,5 ± 9,8**	0.000	9,4 ± 4,0	25,3 ± 3,2**	0.000
Linfócitos(10 <sup>3</sup> /μL )	2,0 ± 0,8	2,3 ± 0,8*	0.040	1,2 ± 0,2	2,0**	0.004
Neutrófilos (%)	56,3 ± 7,7	74,3 ± 11**	0.006	67,3 ± 3,8	86,5 ± 5,3**	0.000
Neutrófilos(10 <sup>3</sup> /μL )	3,8 ± 1,2	10,0 ± 3,6**	0.006	5,5 ± 0,9	15,3 ± 2,7**	0.000
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /μL )	7,1 ± 1,0	13,1 ± 2,8**	0.003	8,3 ± 1,1	17,3 ± 2,1**	0.000

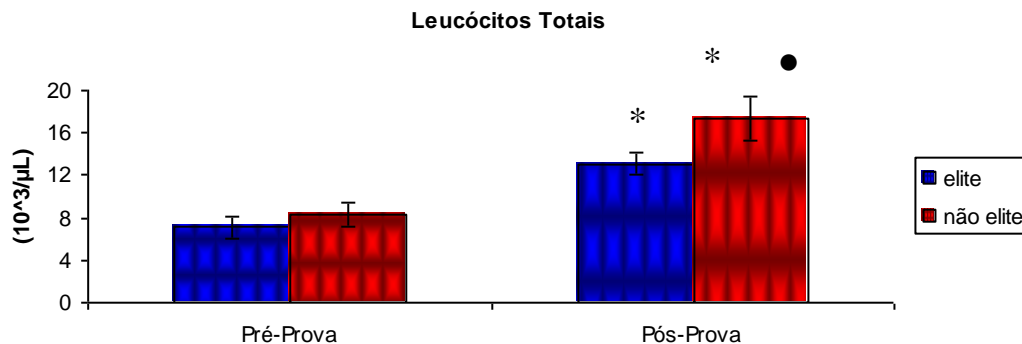
\* p<0.05, vs Pré-Prova, \*\* p<0.01, vs Pré-Prova

Relativamente as alterações provocadas pela prova de triatlo *sprint* nas diferentes subpopulações de leucócitos, observa-se a ocorrência de uma monocitose e linfocitose pós-esforço significativas ( $p<0.05$ ) em ambos grupos experimentais de triatletas. No que respeita ao perfil de evolução dos monócitos, verifica-se um incremento mais acentuado nos triatletas de Elite, enquanto que relativamente ao tráfego de linfócitos, os triatletas não-Elite evidenciaram um aumento mais acentuado, conforme resultados apresentados na Tabela 28. É de salientar a leucocitose induzida pela prova de triatlo *sprint* nos respectivos grupos experimentais, sendo esta mais pronunciada nos triatletas não-Elite (108,4%;  $p=0.000$ ) comparativamente aos triatletas de nível mais elevado (84,5%;  $p=0.003$ ). Adicionalmente, importa destacar que em resposta a esta leucocitose foram constatados, ao término da presente prova, aumentos significativos de 163,1% ( $p=0.006$ ) e 178,1% ( $p=0.000$ ) referentes às contagens dos neutrófilos nos grupos Elite e não-Elite, respectivamente.



**Figura 20** – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento das subpopulações leucocitárias nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

No que diz respeito a comparação inter-grupos, podemos verificar que, mesmo em termos de valores basais, os triatletas do grupo não-Elite já evidenciavam valores significativamente mais elevados da concentração dos neutrófilos comparativamente aos triatletas de Elite ( $5,5 \pm 0,9$  vs  $3,8 \pm 1,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.042$ ), comportamento este que viria consequentemente indiciar uma maior neutrofilia pós-esforço, como pode ser comprovado na Figura 20, sendo esta diferença de 53% ( $15,3 \pm 2,7$  vs  $10,0 \pm 3,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) estatisticamente significativa ( $p=0.034$ ). Foi também verificada uma diferença significativa 66,6% ( $p=0.049$ ) referente aos valores de partida dos linfócitos entre os presentes grupos de triatletas.



**Figura 21** -Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento da concentração de leucócitos totais nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*. \*  $p < 0.05$ , vs Pré-prova; •  $p < 0.05$ , vs Elite.

Observando os dados ilustrados na Figura 21, podemos constatar que não foram encontradas diferenças significativas relativamente aos valores de partida dos leucócitos entre os respectivos grupos estudados, embora o valor médio do grupo não-Elite se mostrasse 16,9% superior ( $7,1 \pm 1,0$  vs  $8,3 \pm 1,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ;  $p=0.075$ ). Todavia, após a realização da prova de triatlo *sprint*, foram evidenciados acréscimos significativos de 84,5% ( $p=0.003$ ) e 108,4% ( $p=0.000$ ) na contagem de leucócitos totais dos grupos Elite e não-Elite respectivamente. Estes aumentos relevantes corroboram estudos anteriores onde a magnitude da leucocitose após esforços prolongados e intensos foi superior a 80% (Chinda et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Nielsen e Lyberg, 2004). Neste contexto, importa ainda salientar que, apesar de ambos os grupos exibirem um comportamento similar relativamente a leucocitose pós-prova, esta foi mais pronunciada nos triatletas do grupo não-Elite quando comparados ao grupo Elite, evidenciando uma diferença significativa ( $p=0.032$ ) de 32% ( $17,3 \pm 2,1$  vs  $13,1 \pm 2,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ , respectivamente).

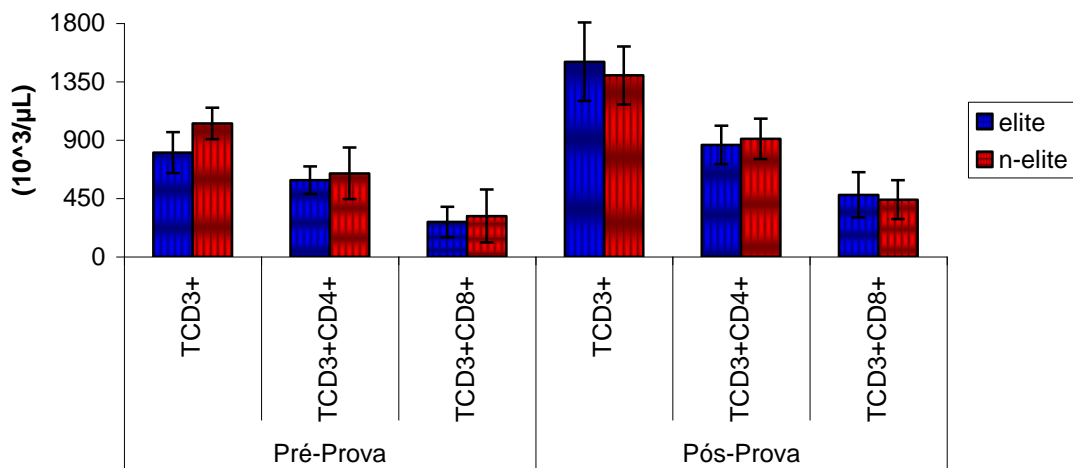
**Tabela 29** – Efeito da prova de triatlo *sprint* no comportamento dos fenótipos linfocitários dos triatletas.

Linfócitos T CD 3 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD3 <sup>+</sup> (%)	66,2 ± 4,9	73,5 ± 9,3*	0.041	70,7 ± 8,5	73,5 ± 4,7	0.564
T CD3 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	802,5 ± 158,1	1504 ± 303,3*	0.014	1028,3 ± 121	1399 ± 223,7*	0.021
T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	56,2 ± 12,0	63,5 ± 15,5	0.242	62,7 ± 13,1	65,0 ± 11,4	0.794
TCD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	591,0 ± 106,1	862,2 ± 148,1*	0.028	643,7 ± 199	909,3 ± 155,3	0.133
T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	31,2 ± 9,6	35,4 ± 9,7	0.406	30,7 ± 10,4	31,5 ± 10,6	0.876
TCD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	268,5 ± 117,8	477,5 ± 174,5	0.056	315 ± 204,7	440,6 ± 149,7	0.428
T CD4 <sup>+</sup> /T CD8 <sup>+</sup>	2,2 ± 1,1	1,8 ± 0,8	0.390	2,0 ± 1,2	2,0 ± 0,6	0.663

\*  $p < 0.05$  vs Pré-prova

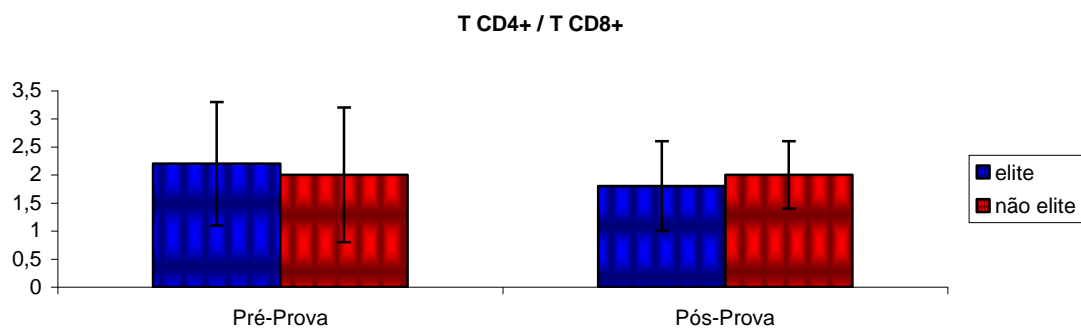
Conforme apresentado na Tabela 28, é possível verificarmos que imediatamente após a prova de triatlo *sprint*, ambos os grupos analisados exibiram um comportamento similar relativamente ao aumento significativo da subpopulação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, sendo esta linfocitose mais relevante nos triatletas do grupo Elite (87,4%;  $p=0.014$ ) comparativamente ao grupo não-Elite (36%;  $p=0.021$ ). Relativamente ao efeito do exercício agudo na contagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foram constatados aumentos de 45,8% e 39,0% nos grupos

Elite e não-Elite, respectivamente. Entretanto, quando relativizado em termos absolutos, somente o aumento observado no grupo Elite mostrou-se estatisticamente significativo ( $p=0.028$ ). No que respeita aos linfócitos T citotóxicos (T CD8<sup>+</sup>), foram igualmente evidenciados aumentos 77,8% e 39,8% dos valores médios pós-prova nos respectivos grupos estudados, embora não apresentando importância estatística significativa ( $p>0.05$ ).



**Figura 22** – Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos fenótipos linfocitários nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*. \*  $p<0.05$  vs Elite.

A análise comparativa ilustrada na Figura 22, permite-nos constatar que, não foram observadas diferenças significativas entre os respectivos grupos de triatletas relativamente as subpopulações dos linfócitos T CD3<sup>+</sup> analisadas nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*.



**Figura 23** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao efeito da prova de triatlo *sprint* na relação dos linfócitos T CD4+/CD8+.. \*  $p<0.05$ , vs Pré-prova; •  $p<0.05$ , vs Elite.

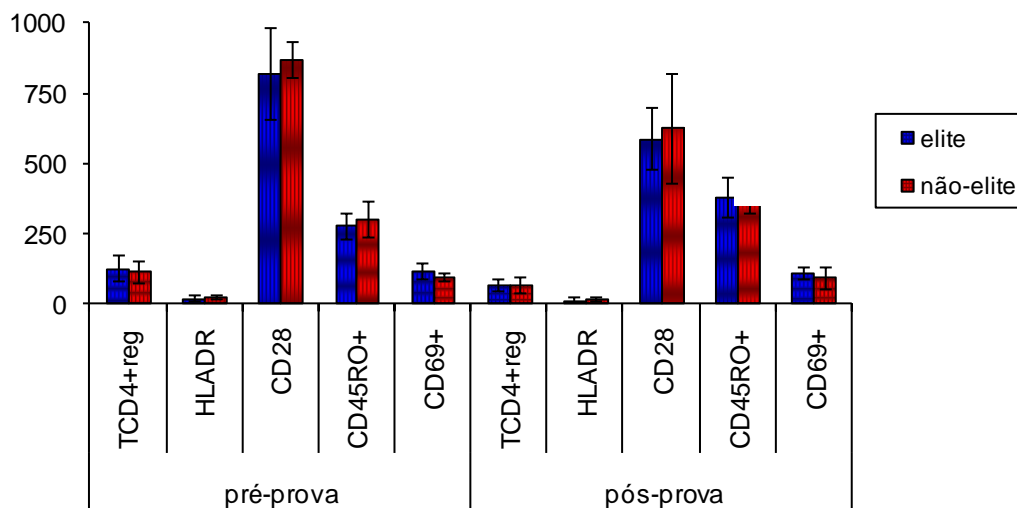
Referente à relação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> apresentada pelos triatletas, constatamos que embora sem relevância significativa, foi observada no grupo Elite, uma diminuição de 22,2% (p=0.390) na referida proporção, que de acordo com alguns autores, quando induzida pelo aumento das células T CD8<sup>+</sup> e não pela alteração das células T CD4<sup>+</sup>, pode estar associada a estados de imunossupressão (Berk et al., 1989; Fry et al., 1992; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). De salientar que não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos Elite e não-Elite, nos momentos pré-prova (p=0.436) ou pós-prova de triatlo *sprint* (p=0.916).

**Tabela 30** – Efeito da prova de triatlo *sprint* nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup>.

Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD4 <sup>+</sup> reg (%)	18,2 ± 8,8	9,5 ± 1,7	0.068	15,5 ± 7,5	10,2 ± 2,2	0.238
TCD4 <sup>+</sup> reg(10 <sup>3</sup> /μL)	126,7 ± 44,4	66,7 ± 24,4*	0.030	116,0 ± 38,0	67,2 ± 27,3*	0.038
HLA-DR (%)	2,4 ± 1,1	2,0 ± 1,4	0.391	2,7 ± 0,9	2,5 ± 0,5	0.391
HLA-DR (10 <sup>3</sup> /μL)	21,0 ± 9,3	13,5 ± 8,3	0.133	24,5 ± 7,8	16,2 ± 6,3	0.119
CD 28 (%)	90,6 ± 12,4	91,0 ± 16,0	0.664	97,2 ± 2,2	97,2 ± 1,5	1.000
CD 28 (10 <sup>3</sup> /μL)	822,2 ± 160,9	590,2 ± 110,3*	0.037	871,5 ± 160,8	626,7 ± 198	0.144
CD 45 RO <sup>+</sup> (%)	41,0 ± 5,4	43,2 ± 2,2	0.340	45,7 ± 3,7	50,5 ± 3,3**	0.002
CD 45RO <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	279,0 ± 46,8	382,7 ± 70,8	0.182	303,0 ± 64,6	388,7 ± 67,3	0.221
CD 69 <sup>+</sup> (%)	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,7	0.726	1,5 ± 0,8	1,6 ± 0,5	0.553
CD 69 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	11,0 ± 2,2	10,7 ± 0,8	0.693	10,8 ± 2,0	10,5 ± 1,2	0.879

\* p<0.05, vs Pré-Prova

Uma leitura dos resultados apresentados na prova de triatlo *sprint*, relativamente ao comportamento dos marcadores de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Tabela 30), denuncia as diminuições significativas de 89,9% (p=0.030) e 72,6% (p=0.038) na contagem das células T CD4<sup>+</sup>reg nos grupos Elite e não-Elite, respectivamente. Este comportamento foi também constatado no fenótipo T CD4<sup>+</sup>HLA-DR de ambos os grupos de triatletas, embora sem apresentar relevância estatística significativa. No que respeita a molécula CD28<sup>+</sup>, foi observada uma redução significativa de 39,3% (p=0.037) no valor médio pós-prova registado pelo grupo Elite, enquanto no grupo não-Elite, a diminuição de 39% verificada não se mostrou significativa (p=0.144).



**Figura 24** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup> nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

Uma vez estabelecida a comparação inter-grupos referente aos respectivos indicadores de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, podemos assumir que não foram encontradas diferenças significativas entre os presentes triatletas nos diferentes momentos de prova, conforme ilustrado na Figura 24.

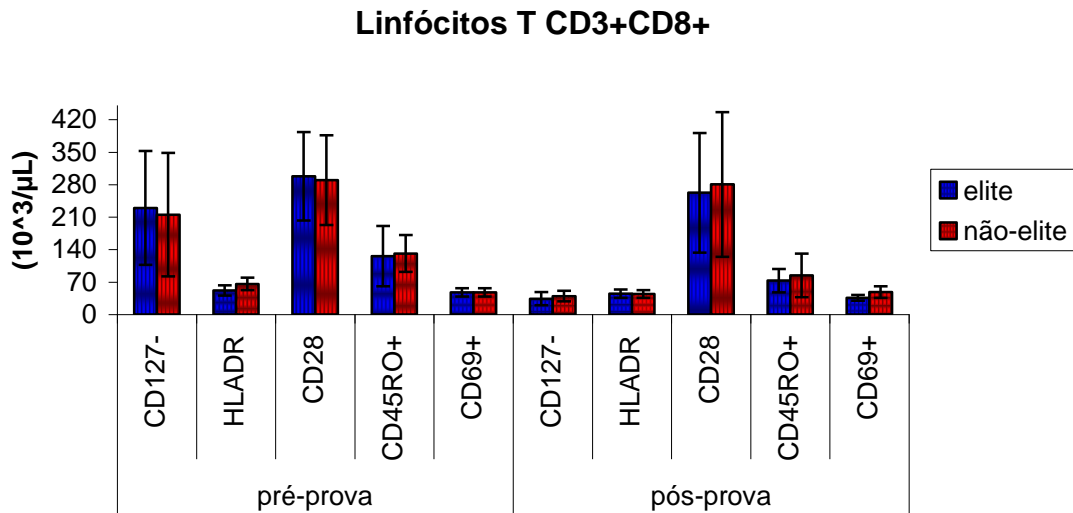
**Tabela 31** – Efeito da prova de triatlo *sprint* nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8<sup>+</sup>.

Linfócitos T CD 8+	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD 127 <sup>-</sup> (%)	61,2 ± 18,3	14,0 ± 2,8*	0.022	56,0 ± 13,2	17,0 ± 4,2*	0.018
TCD 127 <sup>-</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	229,6 ± 122,7	34,2 ± 14,4**	0.000	215,2 ± 133	39,7 ± 11,7**	0.000
HLA-DR (%)	5,4 ± 2,7	3,2 ± 1,7	0.092	8,5 ± 3,0	4,2 ± 0,9*	0.031
HLA-DR (10 <sup>3</sup> /μL)	22,0 ± 11,0	15,0 ± 9,0	0.704	36,0 ± 13,4	14,2 ± 8,0*	0.045
CD 28 (%)	65,0 ± 17,2	82,7 ± 20,7	0.215	68,2 ± 7,8	80,5 ± 3,1*	0.016
CD 28 (10 <sup>3</sup> /μL)	297,8 ± 95,2	262,5 ± 129	0.792	289,7 ± 96,6	280,5 ± 155,8	0.868
CD 45 RO <sup>+</sup> (%)	20,7 ± 5,6	28,2 ± 5,7	0.080	25,5 ± 6,4	31,7 ± 9,5	0.157
CD 45RO <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	73,2 ± 25,3	126 ± 56,0	0.111	84,2 ± 46,9	131,5 ± 39,8*	0.049
CD 69 <sup>+</sup> (%)	4,2 ± 2,1	4,8 ± 1,3	0.278	4,0 ± 0,9	4,2 ± 0,8	1.000
CD 69 <sup>+</sup> (10 <sup>3</sup> /μL)	15,8 ± 2,3	17,8 ± 4,8	0.353	17,7 ± 4,9	18,5 ± 8,3	0.853

\*  $p < 0.05$ , vs Pré-Prova

Com base na observação da Tabela 31, verifica-se, em ambos os grupos de triatletas, um decréscimo significativo dos valores absolutos pós-prova, relativos ao marcador de activação CD127<sup>-</sup> ( $p < 0.01$ ). Constata-se um comportamento similar, embora menos pronunciado, no marcador de activação HLA-DR apresentado pelos triatletas do grupo não-Elite. Relativamente a

activação das células memória  $CD8^+ CD45RO^+$ , é de salientar o acentuado aumento (56,1%,  $p < 0.05$ ) registado pelos triatletas com menor nível de treino no momento imediatamente após a realização da prova.



**Figura 25** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos marcadores de activação do fenótipo linfocitário  $CD8^+$  nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*. \*  $p < 0.05$ , vs Elite.

Conforme ilustrado na Figura 25, é possível observar que não foram constatadas diferenças inter-grupos significativas relativamente ao comportamento dos diferentes marcadores de activação das células T  $CD8^+$  nos momentos pré e pós-prova de triatlo *sprint*.



## 5.7 Stresse Oxidativo

### 5.7.1 Triatlo Longo

**Tabela 32** – Efeito da prova de triatlo longo nos indicadores de stresse oxidativo dos triatletas.

Stresse Oxidativo	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
SOD (U/gHb)	538,4±108,8	733,8 ± 119,8*	0.019	510,1 ± 135,6	694,3±138,3	0.138
GPX (U/gHb)	55,5 ± 7,4	53,6 ± 3,9	0.500	50,1 ± 9,2	45,6 ± 8,3	0.225
GR (U/l)	73,5 ± 1,6	79,7 ± 4,4*	0.043	66,8 ± 3,8	81,3 ± 13,4*	0.049
TAS (mmol/l)	1,7	1,8 ± 0,1	0.068	1,8 ± 0,1	1,8	0.893
TBARS(μmol/l)	4 ± 1,1	4,4 ± 0,8	0.225	3,7 ± 0,7	3,9 ± 0,9	0.786
AU (mg/dl)	5,6 ± 1,1	6,3 ± 2,1	0.334	6,0 ± 1,4	6,6 ± 2,0	0.588

\* p<0.05, vs Pré-Prova

Após a prova de triatlo longo, foram observados no grupo Elite, aumentos significativos de 36,2% na actividade da enzima SOD eritrocitária (p=0.019) e de 8,4% na actividade plasmática da enzima glutaciona-reductase (p=0.043), enquanto no grupo não-Elite, verificou-se somente o aumento significativo de 21,7% da actividade plasmática da enzima GR (p=0.049), conforme demonstrado na Tabela 32.

**Tabela 33** –Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos indicadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós prova de triatlo longo.

Stresse Oxidativo	Pré-Prova			Pós-Prova		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Elite	Não-Elite		Elite	Não-Elite	
SOD (U/gHb)	538,4±108,8	510,1 ± 135,6	0.602	733,8 ± 119,8	694,3±138,3	0.602
GPX (U/gHb)	55,5 ± 7,4	50,1 ± 9,2	0.347	53,6 ± 3,9	45,6 ± 8,3	0.076
GR (U/l)	73,5 ± 1,6	66,8 ± 3,8*	0.028	79,7 ± 4,4	81,3 ± 13,4	0.548
TAS (mmol/l)	1,7	1,8 ± 0,1	0.462	1,8 ± 0,1	1,8	0.109
TBARS(μmol/l)	4 ± 1,1	3,7 ± 0,7	0.530	4,4 ± 0,8	3,9 ± 0,9	0.525
AU (mg/dl)	5,6 ± 1,1	6,0 ± 1,4	0.465	6,3 ± 1,1	6,6 ± 2,0	0.917

\* p<0.05, vs Elite.

Ao efectuarmos uma comparação inter-grupos dos referidos indicadores de stresse oxidativo analisados na prova de triatlo longo, podemos verificar que relativamente aos valores basais, os triatletas de Elite apresentam valores significativamente mais elevados da enzima GR comparativamente aos triatletas do grupo não-Elite (p=0.028). No que respeita aos valores pós-esforço, não foram encontradas diferenças entre os respectivos grupos analisados.

5.7.2 Triatlo Olímpico**Tabela 34** - Efeito da prova de triatlo olímpico nos indicadores de stresse oxidativo dos triatletas.

Stresse Oxidativo	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
SOD (U/gHb)	393,2 ± 46,4	386,2 ± 54,9	0.686	430,6 ± 43,2	419,2±62,0	0.603
GPX (U/gHb)	51,6 ± 8,3	48,1 ± 10,3	0.273	40,4 ± 13,7	44,1 ± 11,0	0.074
GR (U/l)	67,5 ± 10,5	53,6 ± 9,2	0.080	49,0 ± 5,1	54,1 ± 6,9	0.345
TAS (mmol/l)	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,4**	0.002	1,4 ± 0,1	1,7*	0.012
TBARS(μmol/l)	4,8	5,2 ± 0,6	0.343	4,1 ± 0,1	4,8 ± 1,4	0.500
AU (mg/dl)	5,4 ± 1,0	8,0 ± 2,0*	0.013	6,3 ± 1,5	8,8 ± 0,8*	0.015

\* p<0.05, vs Pré-Prova; \*\* p<0.01, vs Pré-Prova

Da leitura da Tabela 34, observa-se que ambos os grupos experimentais de triatletas não registaram alterações da actividade das enzimas SOD e GPX eritrocitárias. Foram encontrados aumentos significativos de 23% e 21,4% no *status* antioxidante total (TAS) dos grupos Elite e não-Elite, respectivamente. No que concerne as concentrações plasmáticas de ácido úrico, foram evidenciados nos respectivos grupos de triatletas, aumentos de 48,1% (p=0.013) e 39,6% (p=0.015) após a realização da prova.

**Tabela 35** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos indicadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós prova de triatlo olímpico.

Stresse Oxidativo	Pré-Prova			Pós-Prova		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Elite	Não-Elite		Elite	Não-Elite	
SOD (U/gHb)	393,2 ± 46,4	430,6 ± 43,2	0.251	386,2 ± 54,9	319,2 ± 62,0	0.076
GPX (U/gHb)	51,6 ± 8,3	40,4 ± 13,7	0.175	48,1 ± 10,3	44,1 ± 11,0	0.602
GR (U/l)	67,5 ± 10,5	49,0 ± 5,1**	0.008	53,6 ± 9,2	54,1 ± 6,9	0.754
TAS (mmol/l)	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0.141	1,6 ± 0,1	1,7	0.917
TBARS(μmol/l)	4,8	4,1 ± 0,1*	0.047	5,2 ± 0,6	4,8 ± 1,4	0.059
AU (mg/dl)	5,4 ± 1,0	6,3 ± 1,5	0.465	8,0 ± 2,0	8,8 ± 0,8	0.347

\* p<0.05, vs Elite; \*\* p<0.01, vs Elite

Uma análise inter-grupos permite-nos constatar uma diferença significativa de 37,7% relativamente aos valores basais da actividade plasmática da enzima GR (p=0.008). No que se refere aos valores de TBARS, foi detectada uma diferença inter-grupos estatisticamente significativa relativa aos valores pré-esforço (p=0.047) .

5.7.3 Triatlo Sprint**Tabela 36** – Efeito da prova de triatlo *sprint* nos diferentes indicadores de stresse oxidativo dos triatletas.

Stresse Oxidativo	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
<b>SOD (U/gHb)</b>	331,2±103,4	415,2 ± 53,0*	0.026	425,8 ± 112,1	433,9±108,6	0.893
<b>GPX (U/gHb)</b>	46,3 ± 14,1	44,3 ± 13,6	0.345	39,6 ± 9,5	44,5 ± 3,3	0.686
<b>GR (U/l)</b>	63,5 ± 20,2	63,4 ± 12,3	0.893	51,8 ± 8,6	61,3 ± 14,7	0.225
<b>TAS (mmol/l)</b>	1,8	1,8	0.078	1,8	1,8	0.109
<b>TBARS(μmol/l)</b>	5,0 ± 0,5	5,2 ± 0,5	0.343	4,1 ± 0,6	4,8 ± 0,9	0.498
<b>AU (mg/dl)</b>	6,0 ± 0,5	8,3 ± 1,6*	0.023	7,1 ± 1,3	9,9 ± 1,7*	0.013

\* p&lt;0.05, vs Pré-Prova; \*\* p&lt;0.01, vs Pré-Prova

Uma análise dos dados apresentados na Tabela 36 permite-nos constatar um aumento significativo de 25,3% na actividade da enzima SOD eritrocitária no grupo Elite (p=0.026), sendo este comportamento similar ao observado no mesmo grupo após a realização da prova de triatlo longo. Foi também verificado ao término desta prova, um aumento significativo (p<0.05) da concentração plasmática de ácido úrico em ambos os grupos, sendo contudo mais pronunciado no grupo não-Elite comparativamente ao grupo Elite (39,4% vs 38,3%, respectivamente).

**Tabela 37** - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente ao comportamento dos indicadores de stresse oxidativo nos momentos pré e pós prova de triatlo *sprint*.

Stresse Oxidativo	Pré-Prova			Pós-Prova		
	$\bar{X} \pm Dp$		p	$\bar{X} \pm Dp$		p
	Elite	Não-Elite		Elite	Não-Elite	
<b>SOD (U/gHb)</b>	331,2±103,4	425,8 ± 53,0	0.347	415,2 ± 53,0	433,9±108,6	0.742
<b>GPX (U/gHb)</b>	46,3 ± 14,1	39,6 ± 9,5	0.347	44,3 ± 13,6	44,5 ± 3,3	0.976
<b>GR (U/l)</b>	63,5 ± 20,2	51,8 ± 8,6	0.347	63,4 ± 12,3	61,3 ± 14,7	0.602
<b>TAS (mmol/l)</b>	1,8	1,8	0.206	1,8	1,8	1.000
<b>TBARS(μmol/l)</b>	5,0 ± 0,5	4,1 ± 0,6*	0.034	5,2 ± 0,5	4,8 ± 0,9	0.480
<b>AU (mg/dl)</b>	6,0 ± 0,5	7,1 ± 1,3	0.172	8,3 ± 1,6	9,9 ± 1,7	0.156

\* p&lt;0.05, vs Elite

No que respeita a comparação inter-grupos, é possível constatar uma diferença significativa relativamente aos valores basais de TBARS, apresentando os triatletas do grupo Elite, valores pré-prova significativamente mais elevados comparativamente aos valores registados pelos triatletas do grupo não-Elite (p=0.034)



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Considerações gerais sobre o estudo

No que respeita a escolha dos indivíduos da amostra, constituída por atletas de triatlo, optamos por realizar o presente estudo com atletas do mesmo sexo, dado o facto das diferenças morfológicas e fisiológicas inter-sexuais poderem resultar na ocorrência de respostas orgânicas distintas, quer ao nível local quer ao nível sistémico (Stromme et al., 2004; Wu, 2006). Neste sentido, justificamos a participação nas respectivas amostras, de indivíduos do sexo masculino, de forma a atenuar o efeito protector dos estrogénios na agressão induzida pelo exercício físico de elevada intensidade no tecido muscular esquelético, em particular os esforços com elevada predominância de contracções excêntricas (Bar et al., 1988). De facto, o estrogénio parece ser um importante factor na manutenção da estabilidade da membrana no período pós-esforço, limitando desta forma, o efluxo da proteína muscular CK (Amelink et al., 1990; Tiidus, 2000; Brancaccio et al., 2007). Neste sentido, Mougios (2007) reforça a influência significativa da diferença inter-sexual nos intervalos de referência da enzima CK, onde se verifica que atletas masculinos exibem valores de referência de limite superior duas vezes maiores aos encontrados em atletas femininas. Estes dados estão em concordância com os resultados de Hartmann (2000) e Nikolaidis et al. (2003).

Os indicadores bioquímicos utilizados no presente estudo constituem marcadores indirectos de lesão muscular e hepática e agressão oxidativa, tendo sido determinados ao nível sanguíneo. Esta metodologia justifica-se pelo facto do sangue reflectir o metabolismo global dos tecidos, sendo também o meio mais acessível para o conhecimento da constituição dos líquidos corporais (Harper, 2006).

No que respeita a análise dos biomarcadores enzimáticos, optámos pelas enzimas CK e a AST, dado o facto de serem proteínas que, quando libertadas para o espaço extracelular ao resposta ao exercício físico, permitem determinar, ainda que de forma indirecta, a existência de lesão muscular (Clarkson et al., 1992; Sayers et al., 2000; Bracaccio et al., 2007). Relativamente as enzimas ALT e GGT A ALT encontram-se em muito maior

concentração no fígado (Nagel et al., 1990) e epitélios dos ductos biliares e renais (Fleisher, 1968), respectivamente, o que pode sugerir a possibilidade de lesão hepática, quando observado um aumento significativo dos níveis plasmáticos desta enzima em resposta ao exercício físico (Rama et al., 1994).

A dimensão das amostras constituídas nas respectivas provas de triatlo analisadas neste estudo, embora reduzida, está de acordo outros estudos similares realizados com diferentes atletas de provas de endurance (Lancaster et al., 2005; Schneider et al., 2007; Simpson et al., 2007; Antunes-neto et al., 2007). Uma vez que as respectivas amostras analisadas em cada prova de triatlo contemplaram somente atletas do sexo masculino, uma outra questão metodológica que pensamos ser importante esclarecer, prende-se ao facto de, na formação dos respectivos grupos de triatletas estudados (Elite e não-Elite), garantir a homogeneidade da variável idade, sendo todos os integrantes pertencentes ao mesmo intervalo de faixa etária (seniores - 30 a 35 anos).

Esta preocupação deve-se, em parte, ao facto de evidências científicas sugerirem um declínio da capacidade do sistema imune relativamente ao avançar da idade, em particular das células T CD3<sup>+</sup> (Pedersen, 1997; Yan et al., 2001), subpopulação esta de importância fulcral no presente estudo, tendo em vista a análise dos marcadores de activação presentes nos linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, assim como no comportamento da relação CD4/CD8. De acordo com Hirokawa e Makinodan (1975), o declínio dos linfócitos T CD3<sup>+</sup> com o avançar da idade parece reflectir a involução do timo (órgão linfóide primário), a qual se mostra acelerada após a puberdade.

O nível de treino foi igualmente considerado um aspecto relevante, tendo a escolha das respectivas amostras recaído em indivíduos com diferentes níveis de prestação em competições de triatlo (Elite versus não-Elite), os quais apresentaram diferenças significativas no que concerne aos dados antropométricos analisados e ao volume das cargas de treino (expressas em Km/semana) dos respectivos segmentos de natação, ciclismo e corrida. Esta distinção se justifica dada a ocorrência de um efeito protector, quer ao nível local, quer ao nível sistémico, face às diferentes agressões metabólicas, oxidativas e mecânicas induzidas pelos exercício físico agudo de elevada intensidade (Ebbeling e Clarkson, 1989; Armstrong et al., 2001; Kuipers, 1994; Lieber et al., 2002). Neste sentido, Senturk et al. (2005) e Finaud et al. (2006)

observaram diferentes respostas dos biomarcadores hematológicos em indivíduos treinados versus sedentários ao determinarem a contribuição do stresse oxidativo na ocorrência de hemólise induzida pelo exercício físico. A substantivar estas evidências, Nieman et al. (1995) constataram significativas diferenças relativamente a concentração dos leucócitos circulantes e subpopulações linfocitárias ao compararem a resposta imune em atletas e não atletas. Em linha de convergência com estes dados, Hong et al. (2005) verificaram em indivíduos treinados uma atenuação da desmarginação dos linfócitos T em resposta a realização de um protocolo de exercício aeróbio de intensidade moderada.

## 6.2 Discussão dos Resultados

O presente estudo pretendeu analisar o efeito agudo de diferentes esforços aeróbios nos diversos biomarcadores enzimáticos, hematológicos, imunológicos e de stresse oxidativo em atletas portugueses de triatlo com diferentes níveis de prestação competitiva. Para tanto, estabelecemos a realização de três provas de triatlo de estrutura idêntica, porém diferenciadas no que respeita a vertente duração do esforço. Para além de existir a preocupação quanto à homogeneidade da amostra, uma vez que todos os triatletas do presente estudo estão inseridos na mesma categoria de faixa etária (sénior 30-35 anos), procuramos discriminar de forma clara, o nível de prestação competitiva dos triatletas, justificando a denominação de triatletas de Elite com base na disposição do ranking nacional e representações internacionais relevantes nas respectivas provas as quais constituíram amostras. De facto, verificamos que as performances dos respectivos grupos de triatletas (Elite vs não-Elite) nas 3 provas de triatlo analisadas foram estatisticamente significativas nos diferentes segmentos de natação, ciclismo e corrida, e conseqüentemente, no tempo final de prova.

Da análise global dos resultados obtidos no presente estudo, é de salientar as diferenças estatisticamente significativas relativas ao perfil antropométrico, volume das cargas de treino, nível de prestação competitiva, actividade das proteínas musculares e hepáticas em resposta as situações de agressão ou lesão das fibras musculares induzidas pelo esforço realizado, com

repercussões nos diferentes parâmetros hematológicos e na homeostasia dos sistemas anti-oxidante e imunológico.

### 6.2.1 Influência do perfil antropométrico na performance do triatleta

Os dados concernentes à caracterização antropométrica dos triatletas analisados no presente estudo, permitem-nos constatar que os triatletas integrantes dos grupos Elite apresentam valores médios relativos à altura superiores aos triatletas dos grupos não-Elite, sendo os valores médios referentes à massa corporal inferiores, o que consequentemente se reflecte em valores médios inferiores de índice de massa corporal. O perfil antropométrico apresentado pelos triatletas de Elite nas provas de triatlo longo, triatlo olímpico e triatlo *sprint* corrobora os resultados de estudos realizados com atletas internacionais de triatlo de elevada performance (Sleivert e Rowland, 1996; Hue et al., 1998; Landers et al., 2000; Schabort et al., 2000; Nevill et al., 2003; Bentley e Naughton, 2003; Schabort et al., 2004). Todavia, no que respeita à altura dos triatletas de Elite, importa salientar que, o valor médio mais elevado foi verificado na amostra pertencente a prova de triatlo longo, reforçando os dados de Tittel e Wutscherk (1992) e Sleivert e Rowlands (1996) que observaram que triatletas de Elite das provas de ultraendurance (ironman triatlo e triatlos longos) evidenciavam valores superiores de estatura corporal comparativamente à triatletas de nível similar participantes de provas de distâncias inferiores. De acordo com estes autores, uma maior estatura corporal pode constituir uma vantagem para o atleta, uma vez que, assumindo como constante a aplicação da força, os segmentos corporais mais longos permitem uma maior amplitude dos movimentos, principalmente durante as disciplinas de natação e corrida. Esta perspectiva assenta no facto do aumento da amplitude do movimento durante a realização da braçada no nado e da passada durante a etapa subsequente da corrida possuir uma relevância fundamental, constituindo um importante factor intrínseco da prestação do atleta, pois resulta na redução da frequência dos movimentos para uma determinada velocidade, caracterizando uma maior economia de esforço para os respectivos valores de consumo de oxigénio e concentração de lactato (Tittle e Rowlands, 1988). Adicionalmente, Clarys (1978) refere a contribuição



de um maior comprimento dos segmentos corporais constitui uma vantagem hidrodinâmica significativa em nadadores que apresentam elevada relação envergadura/altura e elevada razão diâmetro biacromial/diâmetro bicristal, dado o facto de estes atletas possuírem um menor coeficiente de arrasto. De acordo com Craig e Norton (2001), uma elevada estatura corporal constitui uma vantagem adjacente no segmento do ciclismo, pois permite ao atleta a utilização de desmultiplicações mais elevadas a altas rotações.

A semelhança do observado relativamente à estatura corporal, foram encontradas diferenças inter-grupos significativas ( $p < 0.05$ ) no que respeita aos valores médios de massa corporal registados pelos triatletas. Constatamos assim, que nas diferentes provas analisadas neste estudo, os triatletas de Elite apresentaram valores inferiores de massa corporal comparativamente aos registados pelos triatletas dos grupos não-Elite, corroborando os resultados de estudos anteriores (Miura et al., 1997; Hauswirth et al., 1999; Hue et al., 1998; Landers et al., 2000; Schabort et al., 2000; Nevill et al., 2003; Bentley e Naughton, 2003; Schabort et al., 2004). Embora um elevado peso corporal possa, por vezes, se mostrar negativamente correlacionado com o sucesso em provas de endurance (Atwater, 1990; Hauswirth et al., 1999), durante a realização do segmento do ciclismo, pode constituir uma importante vantagem, uma vez que o aumento da superfície corporal é compensado pelo aumento da potência absoluta produzida, principalmente quando o perfil do terreno for plano, reduzindo o custo energético do atleta (Neumann, 1992; Swain, 1994). Nesta perspectiva, entendemos que a influência da massa corporal do atleta no segmento de ciclismo em provas de triatlo pode sofrer variações em resposta a topografia do percurso. Reforçando os nossos dados, Swain (1994) refere que em percursos caracterizados por aclives acentuados, a massa corporal do atleta pode representar uma variação entre 10 a 20% nos tempos finais de prova.

A composição corporal pode influenciar a performance de forma significativa nos respectivos segmentos da prova de triatlo, ainda que de diferentes formas. Neste sentido, a reduzida percentagem de gordura corporal (%GC) evidenciada pelos triatletas de Elite comparativamente aos valores médios registados pelos triatletas não-Elite corrobora os dados de estudos anteriores (Garcia-Webb e Morton, 1997; Landers et al., 2000; Maw et al., 2000; Novaes et al., 2003).

Todavia, importa referir que, no que respeita ao segmento da natação, a gordura corporal proporciona uma melhor flutuabilidade e auxilia na redução do arrasto hidrodinâmico (Gullstrand, 1992). Esta influência se mostra mais relevante quando o referido segmento é realizado em água salgada, dado o facto de uma maior densidade resultar no aumento da flutuabilidade durante o nado (Hay, 1993). Esta asserção é reforçada por Goldsmith et al. (2000), que referem que durante a natação, a relação entre a %GC e o arrasto hidrodinâmico se mostra significativamente relevante, dado este último ser fortemente influenciado pela superfície corporal e a velocidade do nado, para além dos diversos aspectos técnicos. No entanto, durante o segmento de corrida, a influência da %GC torna-se inversamente proporcional, visto que ao contrário do arrasto hidrodinâmico, presente na natação, a força da gravidade assume no referido segmento uma importância fundamental, onde a performance se mostra significativamente influenciada pela adiposidade (Millet et al., 2002). De facto, Blanksby et al. (2000) encontraram uma correlação significativa ( $r=0.80$ ) entre a percentagem de gordura corporal e a performance dos atletas de triatlo participantes nos Jogos Olímpicos de Sydney (2000) demonstrando desta forma, a elevada correlação deste factor da análise morfológica com a performance dos atletas. Os dados do presente estudo relativos a percentagem de gordura corporal registada pelos triatletas de Elite nas respectivas provas estão de acordo com a literatura (Garcia-Webb e Morton, 1997; Landers et al., 2000; Le Gallais et al., 2000; Maw et al., 2000), sendo estes significativamente inferiores aos registados pelos triatletas dos grupos não-Elite ( $p<0.05$ ).

### 6.2.2 Comportamento dos diferentes biomarcadores enzimáticos

O exercício físico intenso e prolongado provoca múltiplas alterações bioquímicas cuja interpretação pode, por vezes, conduzir a resultados conflituais, principalmente em atletas com elevado nível de treino. O aumento da actividade das enzimas séricas indicia alterações na permeabilidade da membrana celular, e está normalmente correlacionado com lesão celular consequente ao exercício (Totsuka et al., 2002; Brancaccio et al., 2007). No entanto, muitas referências laboratoriais para indicadores bioquímicos

encontram-se desajustadas para atletas, já que o carácter crónico das adaptações induzidas pelo treino sistemático torna difícil discernir entre adaptações crónicas e adaptações agudas (Mougios, 2007). Neste contexto, uma observação dos resultados referentes ao comportamento dos biomarcadores enzimáticos analisados nas respectivas provas de triatlo permite-nos constatar os aumentos significativos das actividades das enzimas CK e AST em ambos os grupos analisados, o que sugere a ocorrência de uma elevada agressão sobre as fibras musculares, que conduz a sua ruptura e consequente libertação de proteínas para o sangue, através da circulação linfática (Newham et al., 1987; Ebbeling e Clarkson, 1989). Relativamente a actividade da enzima CK, verificamos em ambos os grupos, uma grande variabilidade inter-individual dos valores pós-prova, demonstrada pelos elevados desvios-padrão, facto que corrobora diversos estudos anteriores realizados com diferentes atletas de provas de endurance (Clarkson et al., 1992; Kuipers, 1994, Malm et al. 2000; Raastad e Hallén, 2000; Totsuka et al., 2002; Warburton et al., 2002; Rietjens et al., 2005). Esta variabilidade pode ser, em parte, justificada pelo nível de treino dos triatletas, uma vez que quanto mais elevado o estado de treino, maior a possibilidade da realização de esforços intensos, com melhor tolerância às elevações enzimáticas relacionadas com focos de lesão muscular (McHugh, 2003; Stromme, 2004; Mougios, 2007). Esta atenuação da expressão da lesão tecidual, evidenciada pela menor acumulação plasmática da enzima CK, mostrou-se conclusiva no nosso estudo. De facto, após a prova de triatlo longo, ambos os grupos de triatletas apresentaram aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) da actividade da enzima CK, sendo no grupo Elite (109,3%) e não-Elite (307,6%). Esta marcada redução da actividade da enzima CK pós-prova, evidenciada pelo grupo Elite, pensamos estar relacionada ao denominado efeito protector da carga repetida (Lieber et al., 2002), o qual, segundo Paddon-Jones e Abernethy (2001), reflecte-se numa redução dos danos estruturais ou funcionais induzidos pelo exercício físico. Independentemente da variabilidade individual, mais evidente no grupo não-Elite, quer-nos parecer que as sucessivas cargas de treino, pela sua duração, intensidade e periodicidade, promoveram nos triatletas de Elite importantes adaptações metabólicas ao esforço prolongado exaustivo, reduzindo desta forma, o nível da agressão muscular induzida pelo exercício

físico. Esta hipótese é corroborada por Rodrigues dos Santos (2004) que verificou em sujeitos com elevado nível de treino, valores plasmáticos da enzima CK significativamente mais reduzidos, quando comparados aos registados por sujeitos menos treinados após uma ultramaratona de 50-km, e isto malgrado os sujeitos treinados terem realizado a referida distância de corrida com um tempo significativamente inferior. De igual forma, após a prova de triatlo olímpico, ambos os grupos analisados evidenciaram aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) da actividade da enzima CK, sendo novamente constatada uma maior magnitude desta resposta no grupo não-Elite (72,2% vs 69,9%).

Relativamente ao grupo dos triatletas de Elite da prova olímpica, importa referir os valores basais tendencialmente mais elevados que os registados pelo grupo homólogo da prova de triatlo longo, sendo estes inferiores aos exibidos pelos triatletas de Elite participantes da prova sprint. Estas diferenças podem ser circunstanciais e resultantes das alterações induzidas pelos treinos anteriores ou, em virtude das cargas de treino para esta prova triatlo serem mais intensas, provocar adaptações crónicas expressas por valores basais de CK mais elevados (McHugh, 2003; Nikolaidis et al., 2003; Brancaccio et al., 2007). Neste sentido, está bem estabelecido na literatura, que a realização de treinos com elevada intensidade determina elevações dos valores da CK basal, acima dos valores normais de referência laboratorial (Fallon et al., 1999; Yu et al., 2002; Rietjens et al., 2005; Mougios, 2007). A ser assim, os valores médios pré e pós-prova registados pela respectiva amostra (triatletas de Elite) na prova de triatlo olímpico, encontram-se inseridos no intervalo de referência proposto por Clarkson et al. (1992) e Totsuka et al. (2002) para indivíduos classificados como *low CK responders*, os quais respondem a uma determinada carga de exercício físico apresentando uma curva individual dos valores absolutos da actividade sérica da enzima CK pouco acentuada ( $< 500 \text{ U.L}^{-1}$ ), contrastando com o comportamento observado nos triatletas pertencentes ao grupo não-Elite, os quais evidenciaram após o término da prova, um aumento relevante desta actividade, estando o valor médio registado compreendido entre 500 e  $2000 \text{ U.L}^{-1}$ , característica esta que lhes confere a classificação de *medium CK responders* pelos referidos autores. A resposta atenuada da actividade enzimática pós-esforço observada nos denominados *low CK responders* (neste

caso, os triatletas de Elite) pode, de acordo com alguns autores, ser justificada por diferentes mecanismos, dentre os quais se salientam, a incapacidade de drenagem da enzima CK do interstício para a circulação sanguínea, através do sistema linfático, em resposta ao possível aumento da pressão dos fluidos intersticiais (Donnelly et al., 1992) e a ocorrência de stresse oxidativo, evidenciado pela acrescida formação de espécies reactivas de oxigénio durante o exercício, facto que poderia, segundo Thomas et al. (1995) estar relacionado a existência de um sistema de inactivação enzimática. De facto, ao analisarmos o comportamento das diferentes actividades enzimáticas séricas e eritrocitárias, as quais constituem indicadores sensíveis do stresse oxidativo induzido pelas respectivas provas de triatlo, podemos constatar nos triatletas de Elite, uma maior actividade da enzima superóxido-dismutase eritrocitária (SOD) comparativamente aos triatletas dos grupos não-Elite, o que sugere a ocorrência de danos oxidativos infligidos as membranas dos tecidos, reforçando a hipótese proposta por Thomas et al. (1995), o que poderia condicionar uma menor expressão da actividade da enzima CK nestes atletas em resposta ao stresse oxidativo. Neste sentido, importa considerar que diversos estudos têm referido a existência no período pós-esforço, de uma relação entre a lipoperoxidação das membranas e o efluxo da enzima CK para o meio extra-celular, através da qual, poderia decorrer uma maior libertação desta proteína muscular em resposta a alteração da permeabilidade selectiva das membranas (Noakes, 1987; Kuipers, 1994; Davies, 1995). Em convergência com a referida relação, pensamos estar um pouco condicionados no que respeita a comparação com outros estudos, dado o facto de apenas termos considerado os momentos pré e pós esforço, o que não nos permite realizar uma análise temporal da evolução da actividade da enzima CK e a sua relação com o stresse oxidativo induzido pelas presentes provas.

A prova de triatlo *sprint*, embora se mostre reduzida no que respeita a vertente duração, representando apenas a metade da distância da prova de triatlo olímpico, promoveu em ambos os grupos, Elite e não-Elite, aumentos significativos da actividade sérica da enzima CK (15,3% e 24,4%, respectivamente). Importa salientar a diferença significativa ( $p=0.028$ ) relativa as concentrações basais de CK entre os referidos grupos. Pensamos que estas diferenças se prendem ao perfil de treino de cada grupo, dado o facto das

cargas de treino referentes aos segmentos da prova diferirem significativamente no que respeita aos volumes realizados pelos respectivos grupos de triatletas (Tabelas 1, 2 e 3).

Apesar dos elevados volumes das cargas de treino poderem justificar os elevados valores basais da CK apresentados pelos triatletas de Elite nas presentes provas de triatlo analisadas, evidencia-se a importância das adaptações funcionais provenientes do treino aeróbio regular e sistemático na actividade enzimática pós-esforço, constituindo, em paralelo com o que sucede com a variação dos demais parâmetros fisiológicos, um efeito profilático sobre as alterações na permeabilidade e integridade da membrana muscular. Tal facto pode ser constatado através da menor expressão plasmática da referida actividade enzimática nos triatletas de Elite, em resposta as diferentes provas de triatlo efectuadas. Importa ainda referir que, inerente ao efeito protector da melhoria da condição de treino sobre a permeabilidade da membrana, assume relevante importância a menor resposta hormonal ao esforço realizado (Falvo e Bloomer, 2006).

Embora o nível de treino mais elevado dos triatletas de Elite possa atenuar de forma significativa a expressão da lesão tecidual, evidenciada pela menor acumulação plasmática da enzima CK nas respectivas provas comparativamente aos triatletas do grupo não-Elite, nossos dados permite-nos concluir que contrariamente ao sugerido por Hunter e Critz (1981) e Stansbie et al. (1983), é a duração do esforço, e não a intensidade, o factor determinante na libertação desta proteína para circulação sanguínea, corroborando os resultados de estudos anteriores realizados com atletas de provas de maratona, ultramaratona e triatlos longos (Noakes, 1976; Dressendorfer e Wade, 1983; Taylor et al., 1987; Rehrer et al., 1992; Rama et al., 1994; Fallon et al., 1999; Clarkson e Hubal, 2002; Skenderi et al., 2006). A substantivar, encontramos no presente estudo, relativamente a prova de triatlo longo, uma correlação positiva e estatisticamente significativa, entre os valores da CK pós-prova e o tempo final de prova. No que respeita as provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint*, foram também constatadas correlações positivas, embora com menor relevância significativa ( $r=0.61$  e  $r=0.55$ , respectivamente). Este dado revelou que, quanto mais extensa a duração da prova, tanto maior será a

expressão da respectiva actividade enzimática. Acresça-se que a referida correlação da prova de triatlo longo se fixou num valor  $r=0.76$ .

A semelhança do observado na actividade da enzima CK, foi também constatado um aumento da actividade sérica da enzima AST ao término de cada uma das provas de triatlo, sendo este comportamento evidenciado por ambos os grupos de triatletas analisados. De facto, está bem descrito na literatura, que o aumento da actividade das referidas proteínas musculares no período subsequente a realização de esforços físicos reflecte a ocorrência de lesão no tecido muscular esquelético (Margaritis et al., 1997; Tricoli, 2006; Mougios, 2007). Embora a enzima CK se mostre mais específica para a avaliação da necrose muscular comparativamente a enzima AST, alguns autores salientam que a determinação simultânea destas enzimas em atletas constitui um valioso potencial diagnóstico e auxílio no prognóstico, em razão das diferentes taxas de desaparecimento das suas actividades no soro ou no plasma (Koutedakis et al., 1993; Margaritis et al., 1997; Rietjens et al., 2005). Nossos dados reforçam esta relação, uma vez que foram encontradas neste estudo, correlações significativas entre as respectivas actividades enzimáticas no momento pós-esforço das provas de triatlo longo ( $r=0.79$ ), triatlo olímpico ( $r=0.73$ ) e triatlo *sprint* ( $r=0.71$ ). Embora se revelassem menos pronunciados comparativamente aos valores da CK nas respectivas provas de triatlo analisadas neste estudo, os aumentos constatados na actividade da enzima AST se mostraram igualmente correlacionados com a magnitude do esforço no que respeita a vertente duração da prova, sendo o coeficiente de correlação encontrado na prova de triatlo longo significativo ( $r=0.69$ ), e superior aos valores registados nas provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint* ( $r=0.57$  e  $r=0.51$ , respectivamente). A menor expressão da actividade plasmática da enzima AST nos momentos pós-esforço comparativamente à enzima CK, está de acordo com o referido na literatura e pode ser justificado pelas elevadas dimensões moleculares apresentadas pela enzima AST, o que resulta numa dificuldade acrescida da sua remoção, via sistema linfático, do interstício para a circulação sanguínea (Koutedakis et al., 1993; Shaskey e Green, 2000; Clarkson e Hubal, 2002; Chevion et al., 2003; Skenderi et al., 2006). Verificou-se também, embora menos pronunciada que na actividade da enzima CK, uma grande variabilidade inter-individual nos valores relativos a AST, em ambos os grupos

experimentais, comportamento este que reforça os dados referidos na literatura. De acordo com alguns autores (Clarkson et al., 1992; Nosaka e Clarkson, 1995; Brown et al., 1997), a justificativa para esta variabilidade reside, provavelmente, nos mecanismos similares referenciados para explicar a variabilidade inter-individual da libertação da enzima CK.

A actividade plasmática da enzima AST constitui um marcador clinicamente útil na identificação de danos nos tecidos muscular e hepático (Koutedakis et al., 1993; Fallon et al., 1999). No entanto, de acordo com Margaritis et al. (1999), o treino regular parece atenuar os efeitos provocados pelo exercício físico, diminuindo a expressão dos valores plasmáticos das enzimas CK e AST. De facto, numa perspectiva conotada nas adaptações agudas induzidas pelas respectivas provas de triatlo analisadas neste estudo, podemos observar uma menor expressão da actividade da enzima AST nos triatletas de Elite quando comparados aos triatletas não-Elite. Tal ficar-se-á a dever, segundo Lieber et al. (2002) a uma redução dos danos estruturais ou funcionais induzidos pelo exercício físico. Esta atenuação da resposta da enzima AST pós-prova evidenciada pelos triatletas de Elite pode, no entanto, estar também relacionada com a activação da resposta de choque térmico (Heat Shock Response - HSR) e a uma aumentada expressão das proteínas de choque térmico HSP70 (Heat Shock Protein 70 - HSP70) em resposta ao treino de endurance. De acordo com estes autores, estas proteínas apresentam uma elevada actividade *chaperone* celular quando expostas a um stresse térmico ou oxidativo (Nollen et al., 1999). De facto, esta bem estabelecido na literatura, que as HSPs, em particular as HSP70, exercem significativos efeitos protectores contra uma diversidade de agentes stressores (Nishizawa et al., 1999; Smolka et al., 2000; Kassaf et al., 2003; Fischer, 2006), inibindo também, o chamado factor indutor apoptótico (AIF), o que contribui de forma relevante na atenuação das vias apoptóticas no músculo esquelético (Adhietty et al., 2008). Corroborando estes dados, Fehrenbach et al. (2000) verificaram em corredores finalistas de uma prova de maratona, aumentos significativos na percentagem de neutrófilos, monócitos e linfócitos expressando diferentes proteínas de choque térmico (HSP27, HSP60 e HSP90). Assim, de acordo com Lee et al. (1995) as células que sintetizam as HSP parecem estar protegidas



contra novas exposições a agentes stressores, o que traduz-se numa menor evidência de lesões no organismo.

De forma a reforçar estes dados, Mikami et al. (2004) verificaram concomitantemente ao aumento da expressão das HSP70, uma menor actividade sérica da enzima AST pós-esforço em ratos submetidos a um programa de treino de endurance de quatro semanas, o que sugere uma menor severidade dos danos hepáticos induzidos pelo exercício físico de elevada intensidade. Esta atenuação das alterações homeostáticas observada em indivíduos treinados parece resultar do fenómeno denominado por tolerância cruzada (Kihlstrom et al., 1990; Ji et al., 1993).

Relativamente ao comportamento da actividade da enzima ALT, verificamos o seu aumento significativo ( $p < 0.05$ ) somente no grupo dos triatletas de Elite após a prova de triatlo *sprint*. A enzima ALT, à semelhança da enzima AST, encontra-se conotada com o metabolismo dos aminoácidos, sendo libertada para a circulação sanguínea quando se verifica a ocorrência de danos na membrana do hepatócito, resultando no aumento da permeabilidade. De facto, é referido na literatura que níveis elevados de transaminases, em particular da enzima ALT, reflectem situações de lesão hepatocelular induzidas por exercício físico (Hassanein et al., 1992; Thornton et al., 2001; Parolin et al., 2009). Embora o envolvimento hepático, sob forma de elevação das suas actividades enzimáticas, constitua um dos indicadores sensíveis da lesão hepática, o aumento absoluto das transaminases requer uma interpretação cuidadosa. Nos casos de desordens mais sérias, como a necrose hepática extensa, são observadas alterações adjacentes como a elevação da actividade da enzima fosfatase-alcalina, bilirrubinas e prolongamento da protrombina (Bouchama et al., 2002).

Os dados do presente estudo relativos ao aumento da actividade sérica da enzima ALT evidenciada pelos triatletas de Elite na prova de triatlo *sprint* corrobora os estudos anteriores realizados com atletas de provas de endurance de diferentes distâncias (Lutoslawska e Sendeki, 1990; Nagel et al., 1990; Nuviola et al., 1992; Spiropoulos e Trakada, 2003; Rietjens et al., 2005; Skenderi et al., 2006), reforçando desta forma, os indícios de agressão hepática sofrida durante a realização do esforço. Pensamos que este aumento da actividade da enzima ALT poderá prender-se ao tipo de esforço, em

particular caracterizado pela elevada intensidade, dado o facto da realização de esforços prolongados e de elevada intensidade conduzir a uma quantitativa redistribuição do fluxo sanguíneo, onde o tecido muscular esquelético requer um maior suprimento de oxigénio e substratos, reduzindo o aporte sanguíneo para os tecidos centrais como o fígado, o que poderia resultar em danos hepatocelulares induzidos por uma isquemia. De facto, a hipertermia provocada pelo exercício físico constitui um importante factor indutor da lesão hepática (Hassanein et al., 1992; Heijnen et al., 2001), visto que a vasodilatação cutânea induzida pelo aumento da temperatura corporal leva à redistribuição do sangue da área esplénica para a pele, resultando numa consequente isquemia hepática, o que poderia estar relacionado com o aumento dos níveis enzimáticos pós-esforço verificado nos triatletas de Elite. Nesta perspectiva, importa reter, com base no suporte bibliográfico, que factores como a acidose respiratória e/ou hipoxia observadas em estudos *in vivo*, referentes ao processo de isquemia/reperfusão, exercem substancial impacto na extensão das lesões hepáticas induzidas pelo exercício físico (Heijnen et al., 2002). De forma similar, foi constatado nos grupos dos triatletas de Elite, um aumento significativo nos valores pós-esforço da actividade da enzima GGT, a qual é considerada um indicador sensível de distúrbios hepáticos (Ohno et al., 1988), possuindo também, um papel modulador na velocidade das vias glicolítica e oxidativa (Kayashima et al., 1995; Van Hall et al., 1995). Em conformidade com o comportamento da enzima ALT, a actividade da enzima GGT parece ser condicionada pela intensidade do esforço, uma vez que a sua actividade catalítica aumentou proporcionalmente a intensidade da prova, sendo a respectiva actividade mais elevada na prova de triatlo *sprint* comparativamente a prova de triatlo longo (17,3 vs 37,9%).

### 6.2.3 Resposta dos diferentes indicadores eritrocitários ao exercício

Os valores médios basais apresentados pelos triatletas dos grupos experimentais Elite e não-Elite relativos aos diversos indicadores eritrocitários analisados nas provas de triatlo longo, triatlo olímpico e triatlo *sprint*, encontram-se inseridos nos respectivos intervalos de referência para indivíduos fisicamente activos (Bossche et al., 2002), o que sugere um bom estado de

hidratação e ausência de sintomas de anemias. No entanto, importa referir que, no que concerne à análise descritiva dos dados apresentados pelos triatletas de Elite na prova de triatlo *sprint* (Tabela 18), foi encontrado um valor médio referente ao hematócrito ligeiramente inferior aos valores de referência, embora, esteja em concordância com valores obtidos em estudos similares relacionados ao perfil hematológicos de atletas de provas endurance (Malcovati et al., 2003; Fallon et al., 2004; Cosendey et al., 2004). De facto, assumindo uma perspectiva longitudinal, centrada nas adaptações crónicas moduladas pelo treino aeróbio regular e sistemático, a constatação de reduzidos valores do hematócrito, como verificado nos triatletas de Elite do presente estudo, se mostra consensual na literatura e parece resultar de uma sobrecompensação induzida pelos diversos episódios de hemoconcentração aguda determinados pelas intensas cargas de treino, o que por vezes, se traduz numa incorrecta interpretação dos valores presentes do eritrograma, indicando um falso estado de anemia, denominada pseudo-anemia dilucional ou anemia do desportista (Green et al., 1991). Todavia, este reduzido valor basal do hematócrito, pode, em determinadas ocasiões, reflectir uma situação de destruição (hemólise), de origem intravascular ou mecânica, induzida pelas sucessivas e acentuadas cargas de treino inerentes à modalidade (Rietjens et al., 2005; Yusof et al., 2007). De acordo com Shaskey e Green (2000), a frequência e severidade da hemólise se mostram positivamente correlacionadas com o grau de stresse mecânico imposto aos atletas de corrida.

Uma análise do perfil hematológico referente aos índices hematimétricos VGM, HGM e o RDW apresentados pelos triatletas no momento pré-prova, permite-nos constatar a ausência de sintomas de anemias microcítica (VGM<80fl) ou macrocítica (VGM>100fl), assim como quadros sugestivos de hipocromia (HGM<27pg) e talassemia (VGM<80fl; HGM<27pg e RDW>15%). Embora a sua prevalência em atletas se mostre relativamente baixa, próxima de 3%, a anemia caracterizada pela deficiência de ferro apresenta-se como a forma mais frequentemente observada na população em geral e nos indivíduos treinados (Fallon et al., 2004).

Foram detectadas diferenças significativas ( $p<0.05$ ) entre os respectivos experimentais nas provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint*, relativamente aos indicadores eritrocitários CGR, Hb e RDW. De facto, constatamos que os

triatletas pertencentes aos grupos Elite evidenciaram, nas referidas provas, valores inferiores de concentração eritrocitária e concentração de hemoglobina, sendo igualmente menor o denominado índice de anisocitose, relativo à amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW). Ao considerarmos como critério fundamental os distintos níveis de prestação competitiva dos triatletas no presente estudo, os resultados revelados pelos triatletas de Elite corroboram estudos anteriores realizados com diversos atletas de provas de endurance (Schmacher et al., 2002a; Schumacher et al., 2002b; Fallon et al., 2002; Rietjens et al., 2005; Mayr et al., 2006), onde foram constatados valores reduzidos destas variáveis, quando comparados com indivíduos activos destreinados e indivíduos praticantes do treino de força. De facto, quando comparados relativamente aos valores basais da concentração de hemoglobina (Hb), foram verificadas diferenças entre os respectivos grupos de triatletas nas provas de triatlo olímpico ( $p=0.034$ ) e triatlo sprint ( $p=0.035$ ). Estas observações eram expectáveis, uma vez que é referido na literatura, que o treino de endurance regular de elevada intensidade induz uma significativa hemodiluição e conseqüente redução da concentração eritrocitária e de hemoglobina em atletas altamente treinados (Schmidt et al., 2000; Neumayr et al., 2001; Cosendey et al., 2004), apesar de um aumento na massa da hemoglobina total (Boning et al., 2004). Todavia, os valores basais ligeiramente inferiores de Hb exibidos pelos triatletas de Elite podem ser, em parte, atribuídos a uma diminuição da eritropoiese como resultado de uma deficiência latente de ferro no organismo (Colt e Heymann, 1984).

A hipervolemia e o efeito dilucional do sangue induzidos pelo de treino de carácter aeróbio, traduzidos em menores valores da concentração de glóbulos rubros, concentração de hemoglobina e hematócrito mostram-se vantajosos para o atleta, uma vez que promovem o aumento do débito cardíaco e a diminuição da viscosidade, optimizando a microcirculação (El-Sayed et al., 2005). No que diz respeito ao reduzido valor registado pelos grupos Elite relativamente ao biomarcador RDW nas provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint*, parece constituir uma adaptação positiva aos esforços prolongados, uma vez que traduz uma maior homogeneidade da distribuição dos eritrócitos (Bessman et al., 1983). Todavia, os elevados valores basais verificados nos triatletas não-Elite nas provas de maior intensidade (triatlo olímpico e sprint)

podem indicar uma aumentada fragmentação mecânica, em decorrência das elevadas tensões produzidas durante as consecutivas contracções de carácter excêntrico, evidenciadas nos treinos de corrida (Bessman et al., 1983; Galea e Davidson, 1985).

Após a realização da prova de triatlo longo, foram constatados nos triatletas de Elite, aumentos dos valores relativos à concentração de glóbulos rubros e a concentração de hemoglobina. De uma forma geral, imediatamente após a realização de esforços físicos prolongados, verifica-se uma situação de hemoconcentração, reflectida na alteração de diversos parâmetros hematológicos (Wu et al., 2004; Rietjens et al., 2005; Wehrlin et al., 2006), hemorreológicos (Galy et al., 2005; Yusof et al., 2007) e, particularmente, índices hematimétricos, nomeadamente o volume globular médio (VGM) (Cosendey et al., 2004; Robinson et al., 2005; Diez, 2008). O aumento da viscosidade sanguínea verificado no período imediatamente após o exercício físico é normalmente atribuído ao incremento dos valores do hematócrito, resultante da transferência de fluidos do sangue para o espaço intersticial, por meio de uma aumentada permeabilidade capilar e elevada pressão osmótica na musculatura activa (Kargotich et al., 1998; Schumacher et al., 2002). Tal asserção é suportada por O`Toole et al. (1999) e Schimidt et al. (2000) que constataram que as variações agudas dos valores do hematócrito encontradas em triatletas competidores do ironman triatlo não decorriam de uma redução da concentração eritrocitária, mas sim, de uma hemodiluição secundária em resposta as alterações do volume plasmático motivadas pela acção de gradientes osmóticos e/ou pressão hidrostática aumentada. Neste contexto, cabe ressaltar que a hemoconcentração consequente a realização esforços prolongados reflecte-se nos diversos indicadores hematológicos, sendo mais evidente quanto menos eficaz for o processo de hidratação.

A diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) dos valores pós-prova relativos ao VGM dos triatletas de Elite nas provas de triatlo longo e triatlo *sprint* sugere uma diminuição do volume eritrocitário, facto que pode estar relacionado com o aumento do volume de água no plasma. Esta hipótese parece reforçada pelo aumento dos valores pós-prova referentes a CHGM destes triatletas nas respectivas provas, o que indicia uma possível saída de água dos eritrócitos para o plasma, aumentando desta forma o gradiente de concentração de

hemoglobina nos eritrócitos (Yusof et al., 2007). Nesta perspectiva e de forma complementar, importa referir o facto dos triatletas de Elite evidenciarem, ao término da prova de triatlo longo, um aumento significativo ( $p=0.017$ ) dos valores relativos a HGM, indicando desta forma a presença de células jovens hiperocrómicas (Yusof et al., 2007). Efectivamente, os eritrócitos mais jovens apresentam maior robustez, maior capacidade de deformação sob condição stress e menor susceptibilidade à hemólise comparativamente as células maduras (Morse e Warth, 1990). Esta resposta aguda dos indicadores eritrocitários à prova de triatlo longo, evidenciada pelos triatletas de Elite, traduzida pela diminuição dos valores do VGM e aumentos dos valores referentes à CHGM e HGM corrobora os resultados obtidos por Neumayr et al. (2001) com ciclistas de elevada prestação engajados em provas de duração prolongada. No que diz respeito ao comportamento dos respectivos índices hematemétricos (VGM, HGM, CHGM) nos triatletas dos grupos não-Elite, foi observado um comportamento similar nas provas analisadas, embora sem relevância significativa. De acordo com Mayr et al. (2006), uma possível justificativa para esta discrepância parece estar relacionada com as diferentes solicitações das fontes energéticas (aeróbia e anaeróbia), as quais estão associadas com a acidose láctica e baixos valores de pH. Neste sentido, a acidose metabólica pode induzir modificações nos referidos indicadores eritrocitários, aumentando ou diminuindo de forma mais saliente os valores em resposta ao exercício, através da alteração das propriedades da membrana dos eritrócitos. Adicionalmente, pensamos que uma outra justificativa plausível para o referido comportamento destes indicadores eritrocitários, em particular nos triatletas de Elite, possa dever-se a uma deficiente reposição dos fluidos durante a realização da prova, a qual é atribuído um papel crucial no sucesso da performance em esforços prolongados. De facto, a constatação de uma diminuição dos valores do VGM e aumento da CHGM indiciam a ocorrência de uma desidratação, caracterizada por uma alteração do fluido do compartimento intracelular do eritrócito para o espaço intravascular (Neumayr et al., 2001; Rietjens et al., 2002).

O aumento da concentração de Hb verificado nos grupos Elite nas provas de triatlo Longo, triatlo olímpico e triatlo *sprint*, foi acompanhado pelo aumento significativo ( $p<0.05$ ) da CHGM, estando desta forma associado ao aumento da

quantidade de hemoglobina intra-eritrocitária (Kaiser et al., 1989). No entanto, este comportamento dos respectivos índices hematimétricos não se verificou no grupo não-Elite da prova de triatlo olímpico, sugerindo que o aumento da concentração de Hb observado nestes atletas possa resultar do aumento do número de eritrócitos (Davidson et al., 1987). Neste sentido, é importa ressaltar que em resposta ao exercício físico, verifica-se uma maior mobilização dos eritrócitos do baço durante a contracção esplénica (solicitemos), de forma a aumentar a capacidade de transporte de oxigénio para os tecidos activos (Duvidoso et al., 1987).

#### 6.2.4 Alteração do perfil leucocitário dos triatletas nas diferentes provas

É geralmente aceite que indivíduos altamente treinados apresentam valores basais de contagem leucocitária mais baixos que sujeitos não treinados (Nieman et al., 1995; Lehman et al., 1996; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Nemet et al., 2003; Nielsen & Lyberg, 2004; Peake et al., 2005; Gleeson, 2005), embora os resultados se mostrem, por vezes, conflituais (McCarthy e Dale, 1988; Yan et al., 2001; Suzuki et al., 2003). No presente estudo, apesar de não terem sido constatadas diferenças inter-grupos significativas ( $p > 0.05$ ) nas respectivas provas de triatlo analisadas, verificamos que os triatletas de Elite apresentaram, sob condições de repouso, contagens de leucócitos totais ligeiramente inferiores às registadas pelos triatletas dos grupos não-Elite.

No que respeita a população de neutrófilos, observamos na prova de triatlo *sprint*, em particular nos triatletas de Elite, uma menor contagem relativamente aos valores basais, corroborando o estudo de Lewicki et al. (1987), onde foi constatada uma menor contagem e diminuída actividade oxidativa destas células em ciclistas de estrada altamente treinados. No entanto, em resposta ao exercício físico agudo de intensidade moderada, funções como a quimiotaxia, actividade oxidativa e desgranulação parecem ser aumentadas (Muns et al., 1996; Smith et al., 1996; Pyne et al., 2000), enquanto nos esforços prolongados e intensos verifica-se uma diminuição da capacidade oxidativa destas células (Pyne et al., 2000; Chinda et al., 2003; Suzuki et al., 2003).

O aumento do número de leucócitos circulantes após a realização de exercícios físicos constitui uma resposta aguda natural, e está dependente de

factores como a intensidade, a duração e tipo do esforço realizado (Fu et al., 2003; Nieman et al., 2005; Gleeson, 2006). Neste sentido, estudos anteriores demonstraram que em esforços físicos de curta duração, inferiores a 1 hora, a magnitude da leucocitose pós-esforço é condicionada pela intensidade do exercício (Gimenez et al., 1986; Mc Carthy e Dale, 1988; Field et al., 1991), sendo no entanto, menos pronunciada comparativamente a leucocitose produzida nos esforços aeróbios prolongados (Chinda et al., 2003; Suzuki et al., 2003). De facto, ao compararmos a expressão da leucocitose nas três provas de triatlo analisadas neste estudo (triatlo longo, triatlo olímpico e triatlo *sprint*) constatamos que quanto maior a duração da prova, mais acentuados foram os acréscimos no que respeita ao tráfego das células imunocompetentes, assumindo assim, a duração do esforço, um importante papel modulador da resposta imunológica pós-exercício. A leucocitose verificada imediatamente após o término do exercício físico é normalmente expressa pelo aumento do número de monócitos, linfócitos e principalmente, neutrófilos (Mc Carthy e Dale, 1988; Kaufman et al., 1994; Robson et al., 1999; Nieman, 2000; Su et al., 2001; Dohi et al., 2003; Nieman, 2006). Nossos dados corroboram estes resultados, sendo a respectiva activação e mobilização das diferentes populações leucocitárias confirmadas através da análise dos diferentes indicadores hematológicos verificados no presente estudo em ambos os grupos de triatletas. De facto, a agressão ao tecido muscular esquelético que, eventualmente, parecem ter sido submetidos os triatletas de ambos os grupos experimentais, durante a realização das respectivas provas, reforça a inter-relação entre exercício físico e a função imune, uma vez que foram encontradas no nosso estudo correlações fortes, e consequentemente significativas entre a expressão da leucocitose pós-esforço e o aumento da actividade sérica da enzima CK em ambos os grupos de triatletas (Elite vs não-Elite), em particular na prova de triatlo longo ( $r=0.77$ ,  $p=0.000$  e  $r=0.80$ ,  $p=0.000$ , respectivamente) onde o referido aumento dos leucócitos se mostrou mais pronunciado relativamente as provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint*. A presente correlação entre a libertação de proteínas musculares pós-esforço e activação do sistema imune corrobora os resultados obtidos por Kayashima et al. (1995). Nesta perspectiva, entendemos que sendo o segmento de corrida o principal factor indutor de stresse mecânico imposto na musculatura



esquelética durante a realização das referidas provas, quanto maior for o tempo de esforço com características predominantemente excêntricas, maior será o stresse contráctil imposto nas fibras musculares solicitadas, provocando elevadas tensões no sarcolema, responsável pela viabilidade homeostática da célula. Assim sendo, quer-nos parecer que, em resposta ao stresse mecânico imposto durante o referido segmento, o nível de agressão sofrida pela fibra muscular, expressa pela libertação de proteínas musculares, é tanto mais expressivo quanto mais prolongada for a duração do esforço.

Em concordância com os diversos estudos referidos na literatura, o aumento significativo dos leucócitos totais circulantes evidenciado por ambos os grupos experimentais ao final das provas de triatlo, terá resultado da desmarginação dos neutrófilos, a partir das paredes do endotélio, induzida pelo aumento do débito cardíaco e pelas alterações hormonais agudas, em particular pelo aumento dos níveis de cortisol e catecolaminas (Gabriel et al., 1992; Kayashima et al., 1995; McIntyre et al., 1995; Suzuki et al., 1996). Efectivamente, níveis elevados de adrenalina induzidos pelo exercício físico reduzem a afinidade dos leucócitos pela parede do endotélio, potenciando um fluxo aumentado destas células para a circulação sanguínea (Nieman et al., 1995). Adicionalmente, hormonas como a  $\beta$ -endorfina e outros neurotransmissores parecem assumir uma relevante função moduladora nas respostas imunes durante o exercício (Ortega et al., 1999). Neste sentido, evidências apresentadas por diversos estudos, em humanos, sugerem uma possível diminuição da produção de imunoglobulinas pela acção das  $\beta$ -endorfinas (Mathews et al., 1983; Morgan et al., 1990; Angelopoulos, 2001). Estudos anteriores realizados em ratos, sugerem que o aumento das  $\beta$ -endorfinas parece inibir a proliferação de linfócitos podendo no entanto, promover o aumento das funções de quimiotaxia e fagocitose de macrófagos peritoniais (Van Den Bergh et al., 1993; Ortega et al., 1999). Nesta complexa rede de sistemas interligados que actuam na funcionalidade da resposta imunológica induzida pelo exercício físico, importa salientar que, para além de promover o aumento da desmarginação leucocitária, o aumento dos níveis de cortisol verificados em resposta a realização de esforços prolongados e intensos parece também induzir a apoptose de linfócitos (Mars et al., 1998).

No que diz respeito a leucocitose pós-prova de triatlo longo, podemos constatar que, embora os triatletas do grupo não-Elite evidenciassem um incremento ligeiramente superior ao registado pelos triatletas de Elite (161 vs 158,7%), a mobilização dos neutrófilos nestes últimos foi superior (275% vs 323,5%, respectivamente). Pensamos que esta neutrofilia verificada nos triatletas de Elite possa estar relacionada a magnitude do esforço realizado, e consequentemente, a caracterização hemodinâmica do exercício. Esclarecemos. Dado o facto do processo de agressão ao tecido muscular esquelético, induzido pelo exercício físico exaustivo, exercer uma relevante influência no aumento e mobilização das diferentes populações leucocitárias (Gabriel et al., 1991; Gabriel et al., 1992b; Gleeson et al., 1995; Nehlsen-Cannarella, 1998), em particular na população dos neutrófilos, uma maior duração do esforço predominantemente excêntrico (segmento da corrida) apresentado pelos triatletas não-Elite poderá ter condicionado uma menor resposta desta células, uma vez que ao induzir uma maior tensão nas fibras musculares solicitadas, assim como no espaço intersticial, poderia contribuir para o aumento da resistência periférica, resultando numa diminuição do débito cardíaco. De facto, diversos autores tem referido a influência deste factor hemodinâmico na modulação da desmarginação dos neutrófilos, a partir das paredes endoteliais, em resposta ao exercício físico (Kayashima et al., 1995; Suzuki et al., 1996). Contrariamente a este comportamento observado na prova de triatlo longo, foi verificada na prova de triatlo olímpico, uma maior neutrofilia pós-esforço no grupo não-Elite, a qual se reflectiu numa significativa leucocitose, sendo este comportamento também observado na prova de triatlo *sprint*. Correlacionados os dados obtidos no presente estudo relativos a activação das células imunocompetentes e dada a respectiva análise inter-individual dos nossos resultados, verificamos que a leucocitose é tanto mais saliente, quanto mais baixo o nível de treino do atleta.

A activação da resposta imune, expressa pelo aumento dos leucócitos circulantes, reflecte-se também, embora de forma menos pronunciada, pelo incremento dos monócitos, decorrente da acção das catecolaminas, sendo igualmente referidos aumentos dos indicadores de diversas funções como a quimiotaxia, fagocitose e actividade citotóxica, possivelmente associados à secreção aumentada de cortisol, prolactina e tiroxina (Asselin et al., 1996;

Bagby et al., 1996; Mackinnon, 1999; Rosa & Vaisberg, 2002). Neste sentido, o exercício agudo, independente da sua duração ou intensidade, provoca uma monocitose transitória, a qual corresponde o processo inicial da activação dos macrófagos no mecanismo de resposta inflamatória (Ortega, 1999).

No presente estudo, foi evidenciada uma monocitose pós-esforço significativa ( $p < 0.05$ ), em ambos os grupos de triatletas nas respectivas provas analisadas, estando estes resultados em concordância com os dados referidos na literatura (Malm et al., 1999; Chinda et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Simonson & Jackson, 2004; Nielsen & Lyberg, 2004; Gleeson, 2005).

A reduzida quantidade de estudos relativos ao efeito do exercício físico nas concentrações sanguíneas de eosinófilos e basófilos, não permite uma análise consistente dos resultados obtidos durante o presente protocolo experimental. No nosso estudo, a constatação da inexistência de diferenças significativas, quer em termos percentuais quer em termos absolutos, dos valores médios referentes aos momentos pré e pós-prova, sugere uma alteração pouco relevante da concentração destas subpopulações leucocitárias. A inexistência de diferenças inter-grupos, Elite vs não-Elite, nas respectivas provas analisadas reforça o anteriormente exposto. Neste sentido, Benoni et al. (1995) referem o facto destas células não se mostrarem muito sensíveis às alterações teciduais e sistémicas induzidas pelo exercício físico ou às lesões musculares esqueléticas motivadas pelos esforços exaustivos.

#### 6.2.4.1 Activação da resposta imune específica

Apesar de alguns autores sugerirem que sessões de exercícios regulares em intensidades submáximas podem não alterar a contagem de linfócitos (Tvede et al., 1993; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000), tal facto não foi verificado nas respectivas provas de triatlo analisadas neste estudo. No entanto, importa referir que, a activação do sistema nervoso simpático, por meio do aumento agudo dos níveis plasmáticos de catecolaminas durante os exercícios, nomeadamente de carácter aeróbio, está associada a uma linfocitose expressiva e rápida, em resposta a libertação destas células provenientes dos órgãos linfóides periféricos (Nielsen e Pedersen, 1997; Brenner et al., 1998; Green et al., 2002; Dohi et al., 2003; Fu et al., 2003; Ronsen et al., 2004;

Nieman et al., 2005), principalmente do baço e gânglios linfáticos (Nielsen et al., 1997; Gabriel e Kindermann, 1998). Neste sentido, Ortega et al. (2003) referem que grau de linfocitose provocada pelo exercício físico parece variar consoante o estado de treino, sendo maior nos indivíduos não-treinados (Ortega et al. 2003). Nossos resultados suportam esta asserção, tendo sido verificada em todas as provas de triatlo analisadas no presente estudo, em ambos os grupos experimentais, uma significativa linfocitose pós-esforço, principalmente nos triatletas não-Elite, que associada a uma diversidade de eventos complexos incluindo a sinalização, activação, adesão e migração das demais populações leucocitárias, reflecte o início do desenvolvimento de uma reacção inflamatória tecidual. De facto, podemos constatar que a realização das respectivas provas de triatlo alterou a dinâmica das diferentes células imunes na circulação, promovendo alterações nos diversos parâmetros imunes analisados, dentre os quais se salienta o indicador de imunossupressão, expresso pela diminuição da relação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/T CD8<sup>+</sup>. No entanto, importa ressaltar que apesar de expressar um comportamento similar nas três provas realizadas, somente na prova de triatlo longo e particularmente, no grupo não-Elite, esta diminuição se revelou significativa ( $p < 0.05$ ). Neste sentido, Pizza et al. (1995) referem que o tipo de exercício parece exercer uma influência significativa na magnitude da linfocitose, reforçando o postulado por Keast et al. (1988), segundo o qual, diferentes tipos e cargas de exercício podem repercutir de forma distinta no sistema imune, influenciando de diferentes formas os parâmetros da imunidade celular e humoral. De facto, o aumento da concentração de linfócitos no sangue em resposta ao exercício físico agudo parece constituir uma resposta altamente estereotipada (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Assim sendo, a realização de exercícios com predominância de acções musculares excêntricas, como a corrida, parece induzir uma maior mobilização dos linfócitos em relação aos exercícios de carácter concêntrico, que se traduz em aumentos mais pronunciados dos valores referentes aos leucócitos totais (Pizza et al., 1995; Malm et al., 1999; Steensberg et al., 2001). De acordo com Wiegers et al. (1993), a diminuição da relação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> para valores inferiores a 1,5 indicia um estado de imunossupressão. Embora o valor registado após a prova de triatlo longo se mostre ligeiramente superior (1,6), verificámos que reflecte,

principalmente, um acréscimo significativo dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o qual pode estar associado a uma situação de imunossupressão (Cohen et al., 1992; Keast et al., 1992; Fry et al., 1992; Ceddia et al., 1999; Pedersen e Hoffmann-goetz, 2000). Nossos dados estão em concordância com os estudos de Pedersen e Bruunsgaard (1995) e Natale et al. (2003), os quais sugerem que o estado de imunossupressão é principalmente evidenciado em situação de esforços intensos de duração prolongada. Contudo, tem sido referido por alguns autores, que o aumento das células T CD8<sup>+</sup> pode representar um efeito benéfico na resposta imune, seja pelo aumento directo da capacidade de lise das células citotóxicas ou através de uma mais eficiente resposta imunoregulatória mediada pelas células supressoras (Cerrottini e Brunner, 1974; Wandlan et al., 1978). Esta modulação do sistema imune, caracterizada pelo recrutamento aumentado dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> para o compartimento vascular, em resposta ao exercício físico agudo, parece estar relacionada com a expressão dos  $\beta$ -receptores presentes nestas células (Milán et al., 1996; Faure et al., 2004). Conforme sugerido por estes autores, a expressão dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas diferentes células do sistema imune parece constituir a base molecular para a acção das catecolaminas, em particular da adrenalina. Neste sentido, importa reter o facto da referida subpopulação linfocitária (T CD8<sup>+</sup>) apresentar uma elevada densidade de receptores  $\beta$ -adrenérgicos relativamente aos linfócitos B e linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o que poderá justificar a sua dinâmica e respectiva responsividade na resposta imune ao esforço realizado pelos triatletas, uma vez que a concentração sanguínea das catecolaminas aumenta linearmente com a duração do esforço (Hellstrand et al., 1985; Gaillard, 1994). No que concerne ao aumento significativo das concentrações dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) verificado após a realização da prova de triatlo longo, em ambos os grupos de triatletas, pensamos estar relacionado a prolongada duração do esforço realizado e a consequente acção moduladora das catecolaminas sobre as diferentes subpopulações linfocitárias, uma vez que a cinética das catecolaminas tende a um aumento gradual com o prolongamento do exercício (Urhausen, 1995). Este comportamento foi somente observado na prova de triatlo longo, onde quer-nos parecer que a duração, significativamente superior as registadas nas provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint*, foi suficiente para permitir o denotar do processo

de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores, os quais são referidos apresentarem uma reduzida densidade de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sendo por isso activados e mobilizados posteriormente as subpopulações de neutrófilos, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (Urhausen, 1995; Reichlin, 1995).

No âmbito da linfocitose verificada em ambos os grupos de triatletas na prova de triatlo longo, há que reiterar dois considerandos: o reduzido aumento dos valores referentes aos linfócitos T CD3<sup>+</sup> e a atenuada resposta das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> verificada nos triatletas de Elite comparativamente aos triatletas menos treinados. Nossos dados corroboram os resultados de Hong et al. (2004) com indivíduos treinados em esforços de endurance, contrariando contudo, os resultados obtidos por Nieman et al. (2000) (atletas remadores) e Eliakim et al. (1997) (ginastas). Esta atenuação da resposta linfocitária não parece derivar dos referidos valores em condição de repouso, uma vez que não foram observadas diferenças significativas no que respeita aos respectivos valores basais inter-grupos. Especulamos assim, que malgrado o reduzido número amostral verificado no presente estudo, o efeito do nível de treino na resposta leucocitária, em particular no aumento dos linfócitos, durante a realização do exercício, parece ser específico de um determinado tipo de célula, assim como da sua activação. Esta suposição parece reforçada por Hong et al. (2004), uma vez que foi verificado no seu estudo que a resposta simpática relativa a adrenalina e a noradrenalina se mostraram marginalmente atenuadas nos indivíduos mais treinados durante a realização dos protocolos de esforço. Uma outra hipótese sugerida por alguns autores refere a possibilidade de uma atenuada inervação simpática dos órgãos linfóides secundários presente nos indivíduos mais treinados (Felten et al., 1987), facto que justificaria a sua menor responsividade na libertação destas células durante a desmarginação dos leucócitos induzida pelo exercício, reforçando os dados de Mills et al (1999) onde foi demonstrada a influência determinante do nível de condicionamento na alteração da resposta imune.

Inerente a análise dos diferentes marcadores de activação celular em resposta as diferentes provas de triatlo realizadas, foi estudado o comportamento dos linfócitos circulantes T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressavam o marcador de activação precoce CD69<sup>+</sup>. O *cluster* de diferenciação CD69<sup>+</sup> é a primeira glicoproteína da superfície celular a ser detectada após a activação (Testi et al.,

1989), sendo a sua expressão considerada como um importante determinante da resposta funcional dos linfócitos T a uma diversidade de estímulos (MacNeil et al., 1991; Maino et al., 1995; Caruso et al., 1997). De acordo com Moreta et al. (1991), a expressão do CD69 é induzida pela relação entre as células CD3 e o complexo TCR (receptor das células T) a partir da qual, uma vez expressa a sua activação, parece actuar na transmissão de sinais co-estimulatórios que conduzem a proliferação, secreção de citocinas e citotoxicidade. Os nossos dados se apresentam conflituais no que concerne a resposta deste marcador de activação, relativamente aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, dada a constatação de uma diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) nos valores pós-prova de triatlo longo registada pelos triatletas de Elite enquanto nos triatletas não-Elite foi observado um acentuado aumento ( $p < 0.05$ ) das concentrações. Esta responsividade, expressa pela diminuição da percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressando a glicoproteína CD69 imediatamente após a realização de esforços prolongados e intensos corrobora os resultados de Vider et al. (2001) e DuBose et al. (2003). Entretanto, estudos realizados por Ronsen et al. (2001) e Green et al. (2003) não encontraram alterações significativas relativamente ao efeito de uma sessão de exercício de endurance (60 minutos) na resposta dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando a glicoproteína CD69. Tal facto concorda com os nossos dados referentes a prova de triatlo sprint do presente estudo. Estes resultados embora se mostrem conflituais, permitem-nos especular a influência significativa da duração das diferentes provas realizadas na dinâmica da resposta imune, nomeadamente na activação da resposta imune adaptativa induzida pelo exercício físico, uma vez que a densidade de receptores adrenérgicos e a eficiência do sistema de transdução do AMPc se mostram diferentes nas diversas células imunocompetentes (Gaillard, 1994). Neste sentido, importa ressaltar que o aumento nos níveis plasmáticos de glucocorticóides parece influenciar as actividades citotóxica e proliferativa dos linfócitos T (Herbert e Cohen, 1993). Dentro deste contexto, pensamos que a diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) do fenótipo T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> apresentada pelos triatletas de Elite imediatamente após a prova de triatlo longo pode-se prender, em parte, aos níveis de cortisol, aumentados durante a realização de esforços prolongados e intensos (Tremblay et al., 1995), os quais poderiam provocar a inibição da produção de interleucina 1 (IL-1) pelos monócitos (Winskelstein,

1994) e conseqüentemente, reduzir a estimulação dos linfócitos T auxiliares ( $CD4^+$ ), com menor formação de interleucina-2 (IL-2), o que resultaria numa inibição da proliferação dos linfócitos T, diminuição da produção de imunoglobulinas e mediadores de inflamação e da actividade citotóxica (Keast et al., 1988; Reichlin, 1998). Relativamente ao comportamento verificado nos triatletas não-Elite, expresso pelo aumento das concentrações das células T  $CD4^+$  expressando a glicoproteína  $CD69^+$ , Viru et al. (1992) referem que o cortisol não apresenta uma dinâmica estável em resposta a realização de esforços físicos, sendo a variação dos padrões dependente das características individuais. Contudo, estes autores salientam a influência da intensidade e da duração do esforço, uma vez que ambos os factores possam determinar uma resposta do cortisol, à medida que possibilitem uma redução da glicemia.

Relativamente ao comportamento dos linfócitos T  $CD4^+CD45RO^+$  (células memória) foi constatado na prova de triatlo olímpico, em ambos os grupos experimentais de triatletas, um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) dos respectivos valores absolutos pós-prova, corroborando os resultados de Baum e Enneper (1994), Gannon et al. (2002) e Lancaster et al. (2003), onde foi observado que o aumento na relação  $CD45RO^+/CD45RA^+$  decorre de uma maior mobilização da subpopulação  $CD45RO^+$ . De facto, está bem documentado na literatura que comparativamente as células  $CD45RA^+$  (células naive), as células  $CD45RO^+$  apresentam aumentada capacidade de interacção com o endotélio activado (Lichtman et al., 1997). De acordo com alguns autores, esta maior mobilização dos linfócitos  $CD45RO^+$  parece resultar de um recrutamento selectivo para as áreas onde se verifica a ocorrência de um processo inflamatório (Pitzalis et al., 1991; Newman et al., 1993). Adicionalmente, Van Kooten et al. (1991) reportam o facto das células  $CD45RO^+$  serem produtoras de interleucinas (IL-1 e IL-6) sugerindo assim, a possibilidade destas células T memória estarem envolvidas na inflamação aguda e crónica, e potencialmente, na resposta inflamatória após o exercício excêntrico. Nossos dados reforçam esta suposição, dado o facto das células  $CD45RO^+$  presentes nos linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  dos triatletas não-Elite, os quais evidenciaram uma leucocitose mais pronunciada comparativamente aos triatletas de Elite, se mostrarem significativamente aumentados após as respectivas provas analisadas, corroborando a correlação entre leucocitose pós-esforço e activação/mobilização dos diferentes fenótipos



na resposta inflamatória tecidual induzida pelo exercício físico. Para além da comprovada interdependência entre os referidos indicadores, importa aduzir que segundo Gabriel et al. (1993) a realização de esforços de endurance prolongados e intensos pode induzir a conversão dos linfócitos CD45RA<sup>+</sup> em linfócitos CD45RO<sup>+</sup>, o que indica um superior estágio de activação e, talvez, uma maturação mais pronunciada destas células.

#### 6.2.5 Actividade dos diferentes sistemas antioxidantes

Os resultados obtidos no presente estudo expressam uma conflitualidade relativamente ao comportamento da enzima SOD nas diferentes provas de triatlo realizadas. Uma análise dos indicadores de stresse oxidativo referentes as provas de triatlo longo e triatlo *sprint* permiti-nos verificar um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) da actividade da enzima SOD eritrocitária no grupo Elite, o que evidencia uma condição acrescida de stresse oxidativo induzido pelas respectivas provas. Efectivamente, a enzima SOD tem como função principal catalisar a conversão do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em oxigénio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), estando o aumento da sua actividade relacionado com a resistência aumentada ao stresse oxidativo (Finaud et al., 2006; Jackson, 2007). O aumento da actividade da enzima SOD nos eritrócitos observado no nosso estudo corrobora estudos anteriores realizados com atletas de natação (Aguilar-Silva et al., 2002), ciclismo (Mena et al., 1991) e corrida (Marzático et al., 1997; Hessel et al., 2000; Selamoglu et al., 2000). No entanto, estes dados conflituam com os resultados encontrados por Palazzetti et al. (2003) em triatletas competitivos e por Aguilo et al. (2005) em ciclistas profissionais, onde a referida actividade enzimática pós-esforço se mostrou inalterada. Contrariamente aos resultados verificados nas provas de triatlo longo e triatlo *sprint*, foi observada, após a prova de triatlo olímpico, uma relevante diminuição da actividade da SOD eritrocitária nos triatletas do grupo não-Elite. Neste sentido, Schneider et al. (2007) e Knez et al. (2007) observaram de forma similar, uma diminuição significativa da actividade da enzima SOD, após submeterem um grupo de triatletas treinados as provas de triatlo longo half-ironman (1,9km/90km/21km) e triatlo ironman (3,8km/180km/42km), respectivamente. Posteriormente, Neubauer et al. (2008) encontraram uma

redução significativa de 7% ( $p < 0.001$ ) da actividade da SOD eritrocitária, ao estudarem as alterações agudas na capacidade antioxidante induzidas por uma prova de triatlo ironman em triatletas competitivos. Contrariamente a estes dados, Oztasan et al. (2004) verificaram, após a realização de um exercício físico agudo exaustivo, um aumento da actividade da enzima CuZn-SOD eritrocitária em ratos treinados. Esta discrepância no comportamento da actividade da enzima SOD pode resultar dos diferentes procedimentos de avaliação adoptados nos referidos estudos, assim como do modelo de exercício físico agudo realizado. Adicionalmente, Tauler et al. (2005) salientam a influência de factores como a intensidade do esforço e o balanço inicial das enzimas antioxidantes na geração de diferentes espécies reactivas de oxigénio. Em convergência, Senturk et al. (2005) reiteram a importância do estado de treino na prevenção dos danos oxidativos induzidos pelos esforços físicos prolongados, uma vez que indivíduos treinados apresentam uma maior população de eritrócitos jovens, os quais se mostram mais resistentes ao stresse oxidativo, reduzindo a incidência de hemólise. De acordo com Ji (2007b), o treino aeróbio constitui um importante factor de activação do sistema enzimático antioxidante. De facto, as espécies reactivas produzidas durante o estímulo da contracção muscular, desempenham um papel preponderante no processo da adaptação muscular ao stresse oxidativo, através da activação da transdução de sinais para a síntese de enzimas antioxidantes sensíveis ao estado redox (Allen e Tresini, 2000). De salientar que, as enzimas antioxidantes, na sua grande maioria, contêm uma sequência de genes reguladores sensíveis à alteração do estado redox que interagem com factores de transcrição, possibilitando a regulação da sua expressão genética (Finkel e Holbrook, 2000). Assim, o aumento da actividade da SOD eritrocitária, observado nas provas de triatlo longo e triatlo *sprint*, nos respectivos grupos Elite, poderá ser justificado pela acção da actividade contráctil no processo de sinalização intracelular, condicionada pelas ERON, conduzindo à expressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas antioxidantes (Ji, 2007). Relativamente ao comportamento da enzima SOD exibido pelos triatletas do grupo não-Elite na prova de triatlo olímpico, caracterizado pela saliente diminuição ( $p < 0.01$ ) da respectiva actividade eritrocitária, pensamos que possa estar relacionado com balanço inicial da actividade enzimática antioxidante e o

estado nutricional pré-prova apresentados pelos triatletas em estudo. Neste sentido, Ortenblad et al. (1997) sugerem que o stresse oxidativo gerado nos eritrócitos pode ser influenciado pelo tipo, intensidade e duração dos programas de treino, assim como pelo *status* antioxidante total (TAS), onde uma maior actividade do sistema antioxidante não enzimático parece exercer um importante papel protector contra o stresse oxidativo, sem haver a necessidade de um maior aumento das actividade enzimáticas. De facto, uma análise dos resultados obtidos na prova de triatlo olímpico, presentes na tabela 34, permiti-nos verificar que embora a actividade da SOD eritrocitária estivesse diminuída em ambos os grupos avaliados, em particular no grupo não-Elite, foram evidenciados quer no grupo Elite quer no não-Elite, aumentos significativos no TAS (23% e 21,4%, respectivamente), o que pode indiciar um mecanismo compensatório do sistema de defesa antioxidante em resposta a intensidade do esforço realizado. Estudos anteriores demonstraram que a realização de uma prova de meia-maratona em corredores treinados (Child et al., 1998) e protocolos de esforços exaustivos também induziram um aumento da capacidade antioxidante total plasmática (Ashton et al., 1998; Vider et al., 2001). Considerando que o *status* antioxidante total avalia a capacidade antioxidante do compartimento aquoso do sangue, no qual estão presentes, proteínas (10-28%), ácido úrico (7-58%) e ácido ascórbico (3-27%) (Kohen et al., 2000), pensamos que o aumento significativo do TAS, evidenciado na prova, possa reflectir ou, em parte, ser influenciado pelo aumento significativo da concentração de ácido úrico observado em ambos os grupos. Esta hipótese é suportada pela observação de correlações significativas entre o valores referentes ao TAS e os níveis de ácido úrico pós-esforço encontradas nos grupos Elite ( $r=0.97$ ;  $p<0.01$ ) e não-Elite ( $r=0.90$ ;  $p<0.05$ ) na prova de triatlo olímpico do presente estudo. Neste sentido, tem sido referido na literatura, que os baixos níveis séricos de ácido úrico apresentados por determinados atletas, possam explicar os reduzidos valores referentes ao TAS, comparativamente aos indivíduos sedentários (Watson et al., 2005; Gougoura et al., 2007). De facto, as propriedades antioxidantes não enzimáticas do ácido úrico conferem efeitos *scavenger* sobre os radicais livres *in vivo*, atenuando o stresse oxidativo induzido pelo exercício físico intenso (Waring et al., 2003; Tauler et al., 2005), podendo também quelar iões metálicos (ferro e cobre) prevenindo a

formação de radical hidroxilo via reacção de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 1999). Esta elevação das concentrações plasmáticas de ácido úrico em resposta a realização de esforços intensos e prolongados é consistente com a literatura (Mastaloudis et al., 2001; Mastaloudis et al., 2004) e pode ser justificada pelo aumento na activação do sistema de degradação das purinas (Selamuglo et al., 2000; Mastaloudis et al., 2001; Chevion et al., 2003; Mastaloudis et al., 2004; Aguilo et al., 2005; Schneider et al., 2007). Outra explicação possível para o referido aumento do TAS observado nos respectivos grupos de triatletas na prova de triatlo olímpico, inclui a contribuição das concentrações plasmáticas de determinadas moléculas antioxidantes não mensuradas no presente estudo como o ácido ascórbico, a glutatona e a bilirrubina, as quais juntamente com o aumento das actividades enzimáticas antioxidantes, atenuam os danos induzidos pelo stresse oxidativo

Relativamente a enzima glutatona-peroxidase (GPx), foi verificada em ambos os grupos, uma ligeira diminuição da actividade eritrocitária após a prova de triatlo longo, corroborando os resultados obtidos por Schneider et al. (2007) e Neubauer et al. (2008) com atletas treinados de provas triatlo longo e triatlo ironman, respectivamente. No entanto, este resultado se mostrou divergente nas provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint*, onde nos respectivos grupos não-Elite, foram observados aumentos das referidas concentrações eritrocitárias, reforçando os dados obtidos por Hellstein et al., (2001); Inal et al., (2001) e Palazzetti et al. (2003). Todavia, cabe ressaltar que, embora sem relevância estatística, o grupo Elite apresentou, em todas as três provas realizadas, valores basais da enzima GPx mais elevados comparativamente ao grupo não-Elite, o que de acordo com a literatura, indicia uma importante adaptação do sistema antioxidante enzimático aos elevados volumes de treino aeróbio realizados pelos atletas de nível mais elevado, conferindo-lhes um efeito protector contra a acção do  $H_2O_2$  e consequentemente, do radical  $OH^{\bullet}$  nas proteínas, ácidos nucleicos e lípidos membranares (Leeuwenburgh et al., 1994; Powers et al., 1994; Margaritis et al., 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). Neste sentido, está bem documentado na literatura, que o treino aeróbio, se suficientemente longo e intenso, induz um aumento da actividade enzimática antioxidante capaz de reduzir o estado basal de stresse oxidativo, reforçando a capacidade antioxidante do organismo para a realização de esforços físicos

subsequentes (Marzático et al., 1997; Finaud et al., 2006). De facto, Margaritis et al. (1997) verificaram que os elevados valores basais da enzima GPx presentes nos eritrócitos de triatletas profissionais comparativamente aos triatletas amadores estavam significativamente correlacionados com o volume de treino semanal ( $r=0.78$ ;  $p<0.05$ ),  $VO_{2max}$  ( $r=0.75$ ;  $p<0.05$ ) e performance do atleta ( $r=0.79$ ;  $p<0.05$ ), permitindo concluir, que a elevada capacidade de consumo de oxigénio e consequente produção de ERO evidenciados por estes triatletas são acompanhados por uma maior actividade da enzima GPx e por uma concentração aumentada de glutathiona reduzida (GSH), as quais assumem uma função protectora do organismo contra a lipoperoxidação e danos na membrana celular. Estes resultados são reforçados pelo presente estudo, onde foram verificadas correlações significativas entre os valores de partida da GPx eritrocitária e o tempo total de prova no triatlo longo ( $r=0.90$ ,  $p<0.05$ ) e triatlo olímpico ( $r=0.89$ ,  $p<0.05$ ), sendo também observado que nestas respectivas provas, a actividade da enzima GPx eritrocitária estava inversamente correlacionada com os valores de TBARS pós-esforço ( $r=-0.91$ ;  $p<0.05$  e  $r=-0.90$ ;  $p<0.05$ , respectivamente), sendo esta correlação negativa também verificada na prova de triatlo *sprint* ( $r=-0.82$ ;  $p<0.05$ ). Embora por vezes controverso, o papel do treino aeróbio na manutenção da homeostasia redox, traduzido no aumento da actividade/concentração de determinadas moléculas antioxidantes, é corroborado por diversos autores (Myiazaki et al., 2001; Mastaloudis et al., 2001; Evelson et al., 2002; Adhietty et al., 2003; Lekhi et al., 2007) sugerindo desta forma, a ocorrência de alterações compensatórias positivas no sistema antioxidante dos atletas, as quais constituem importantes mecanismos de protecção do organismo contra a instalação do stresse oxidativo e consequente lipoperoxidação.

No que respeita a actividade plasmática da enzima GR, os resultados obtidos neste estudo se mostram conflituais, tendo sido verificado na prova de triatlo longo, incrementos significativos ( $p<0.05$ ) de 8,2% e 21,7% nos grupos Elite e não-Elite, respectivamente, enquanto na prova de triatlo olímpico, o grupo Elite evidenciou uma diminuição de 25,9% na referida concentração, divergindo do resultado observado no grupo não-Elite, caracterizado por um aumento de 10,4% em relação ao valor médio de partida. Curiosamente, na prova de triatlo *sprint*, a actividade plasmática da enzima GR mostrou-se inalterada no grupo

Elite, contrastando com o aumento de 18,3% apresentado pelo grupo não-Elite. A enzima GR actua na detoxificação das ERO, mais especificamente no controlo dos níveis de  $H_2O_2$  celular, sendo fundamental para o normal funcionamento da enzima antioxidante GPx (Powers e Sen, 2000). De facto, a interacção das enzimas GPx e GR sobre o equilíbrio redox celular GSH/GSSG condiciona os níveis intracelulares de GSH (Powers et al., 1999). Relativamente a diminuição na actividade da enzima GR observada no grupo Elite, na prova de *triatlo olímpico*, pensamos estar associada a diminuição da concentração de NADPH, um importante substrato que actua como co-factor e agente redutor fundamental na reacção de redução da glutathiona oxidada (GSSG) à glutathiona reduzida (GSH), catalisada pela enzima GR. No tecido muscular esquelético, a elevada oxidação da glutathiona resulta no aumento da razão GSSG/GSH, favorecendo a ocorrência de stresse oxidativo (Sen, 2000; Barreiro et al., 2006; Jackson, 2007). Nessa condição, o fígado promove o aumento da libertação de glutathiona para a circulação sanguínea, elevando a captação e a capacidade antioxidante do tecido muscular esquelético durante o processo de contracção (Gohil et al., 1988). A glutathiona é predominantemente regenerada no músculo esquelético e no fígado, a partir do NADPH, um importante produto da via das pentoses, utilizado como substrato pela enzima GR (Leeuwenburgh e Ji, 1996). Contudo, este processo de regeneração da glutathiona é regulado pelas concentrações de glucose-6-fosfato (G6-P), um intermediário da via glicolítica, cuja concentração é mantida a partir da degradação do glicogénio (Newsholme e Leech, 1983). Assim, em resposta a realização de esforços físicos prolongados como as provas de triatlo, a depleção das concentrações endógenas de glicogénio muscular e hepático reduziria a actividade da via glicolítica, diminuindo a disponibilidade de G6-P como substrato, favorecendo a alteração do estado redox intracelular para um estado mais oxidado, podendo desta forma, conduzir ao aumento na oxidação dos grupos tióis de proteínas com funções sinalizadores importantes durante a actividade muscular (Sen, 2000; Jackson, 2007). Neste sentido, estudos demonstram que actividades de elevada intensidade, que induzem aumentos significativos dos níveis de lactato, podem causar diminuição nas concentrações de NADPH (Tauler et al., 1999; Zoppi et al., 2003). De referir, a diferença significativa ( $p < 0.05$ ) observada na Tabela 33, relativamente aos

valores basais da enzima GR inter-grupos presente na prova de triatlo longo. Como referido anteriormente, a literatura é razoavelmente concordante no que diz respeito aos efeitos benéficos do treino aeróbio na prevenção do stresse oxidativo, por influência positiva nas defesas antioxidantes, em particular, no sistema enzimático. Esta maior adaptação do sistema de defesa antioxidante enzimático ao exercício físico regular, traduzida pela maior actividade plasmática da enzima GR, apresentada pelos triatletas do grupo Elite, é confirmada através da análise de estudos anteriores, nos quais foram observados similares aumentos da referida actividade enzimática (Somani et al., 1995; Venditti e Di Meo, 1996; Ramires e Ji, 2001), assim como do incremento do conteúdo citosólico de GSH (Somani et al., 1995) e da actividade da glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), enzima fundamental do ciclo das pentoses, uma das principais fontes celulares de NADPH (Lew e Quintanilha, 1991). Adicionalmente, evidências demonstram que a intensidade do treino aeróbio e a duração das sessões parecem exercer uma influência significativa na capacidade de adaptação do sistema antioxidante. (Ji, 2007b).

#### 5.2.6 Comportamento das TBARS nas diferentes provas de triatlo

Face aos resultados obtidos nas diferentes provas de triatlo do presente estudo, relativamente a este indicador de stresse oxidativo relacionado com a agressão às estruturas lipídicas, podemos observar que ambos os grupos, Elite e não-Elite, não apresentaram após o término das respectivas provas, aumentos dos valores de TBARS. Embora não sendo significativos ( $p > 0.05$ ), os discretos acréscimos registados pelos triatletas nas provas analisadas no presente protocolo experimental corroboram estudos anteriores respeitantes a esforços similares (Margaritis et al., 1997; Schneider et al., 2007; Neubauer et al., 2008). Este aumento do *status* pró-oxidante plasmático tem sido igualmente referido em diversos estudos realizados com atletas de diferentes desportos (Marzático et al., 1997; Child et al., 1998; Child et al., 2000; Thompson et al., 2001; Chang et al., 2002; Ilhan et al., 2004; Ramel et al., 2004; Knez et al., 2007), e pode reflectir o efluxo de peróxidos dos tecidos, especialmente do músculo activo para o plasma, subsequente a acção das diferentes espécies reactivas aos ácidos gordos polinsaturados presentes nas membranas

celulares. No entanto, uma análise inter-grupos das provas de triatlo olímpico e triatlo *sprint* (Tabelas 35 e 37, respectivamente), permiti-nos verificar que os triatletas do grupo Elite apresentaram valores basais de TBARS mais elevados, comparativamente aos triatletas não-Elite. Estas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ) eram espectáveis, uma vez que diversos estudos demonstram que atletas de Elite apresentam níveis basais aumentados de lipoperoxidação comparativamente a indivíduos menos treinados, dado perfil habitual das cargas de treino, sugerindo a possibilidade do stresse oxidativo imposto pelo intenso programa de treino poder exceder a elevada capacidade de detoxificação das ERO presente nos indivíduos treinados (Balakrishnan e Anuradha, 1998; Santos-Silva et al., 2001; Rodrigues dos Santos, et al., 2004; Lekhi et al., 2007; Gougoura et al., 2007). Tem sido sugerida a hipótese da lipoperoxidação promover um aumento da permeabilidade da membrana, resultando no efluxo de enzimas miocelulares, como a CK, para o plasma. Todavia, nossos resultados não corroboram esta hipótese postulada por Kanter et al. (1988), não tendo sido encontrada na prova de triatlo longo, nenhuma correlação significativa entre os níveis de CK pós-prova e a concentração plasmática de TBARS pós-esforço. De acordo com estes autores, esforços que promovam uma subida plasmática, dilatada no tempo, das enzimas musculares, promovem uma subida correlativa dos indicadores de stresse oxidativo. De facto, a prova de triatlo longo induziu, em ambos os grupos de triatletas, Elite e não-Elite, os aumentos mais pronunciados da actividade da enzima CK pós-esforço, 109,3% e 307,6%, respectivamente. Será de admitir que, dado o facto das correlações encontradas entre as respectivas variáveis (CK e TBARS) não se mostrarem estatisticamente relevantes no nosso estudo, justifica-se a significativa elevação da actividade da enzima CK pela maior contribuição dos factores mecânicos, provavelmente induzidos pelo segmento de corrida da prova de triatlo longo, e não resultantes da lipoperoxidação, na ocorrência de danos musculares, corroborando desta forma, os resultados de Child et al., 1998; Baker et al., 2004; Wozniak et al., 2005).



## 7. CONCLUSÕES

A análise e interpretação dos resultados obtidos neste estudo, permitem-nos extrair as seguintes conclusões:

### 1) Biomarcadores enzimáticos

1.a) O aumento significativo da actividade das enzimas CK e AST, evidenciado por ambos os grupos experimentais, se mostrou proporcional à duração da prova, sendo mais pronunciado na prova de triatlo longo, sugerindo a duração do esforço como factor determinante na resposta destas proteínas musculares ao exercício físico.

1.b) O aumento da actividade da enzima GGT, verificado somente nos triatletas dos grupos Elite, em todas as provas realizadas, se mostrou inversamente proporcional à duração da prova, sendo mais acentuado na prova de triatlo *sprint*. Perante este facto, e constatada a diferença significativa na performance dos grupos experimentais nas respectivas provas, pode suspeitar-se que a intensidade do esforço possa condicionar o seu comportamento durante o exercício aeróbio prolongado.

1.c) Triatletas de Elite da prova de triatlo *sprint* apresentaram valores basais mais elevados da actividade da enzima CK. Tendo por base as características da prova, expressa numa menor duração e conseqüentemente, uma maior intensidade, há fortes suspeitas que esta diferença ocorra em virtude das alterações induzidas pelas cargas de treino mais intensas, provocando adaptações crónicas expressas por valores basais de CK mais elevados.

1.d) Triatletas dos grupos não-Elite evidenciaram, em todas as provas realizadas, uma maior responsividade da actividade das enzimas CK e AST, sugerindo a influência determinante do nível de treino do atleta no grau de resposta da actividade enzimática ao esforço.

### 2) Biomarcadores Hematológicos

2.a) Não foram constatadas evidências de sintomas de anemias microcíticas ou macrocíticas, assim como quadros sugestivos de hipocromia ou talassemia nos triatletas dos respectivos grupos experimentais analisados.

2.b) O stresse físico imposto pela prova de triatlo longo alterou o perfil hematológico dos triatletas do grupo Elite. Esta evidência se traduziu no aumento significativo dos valores relativos a CGR, Hb, HGM e CHGM e pela diminuição do VGM. O comportamento destas variáveis indicia, não somente a ocorrência de uma hemoconcentração em resposta a uma desidratação severa imposta pelo esforço prolongado, mas também, sugere a presença de policitemia, provavelmente em resposta à contração esplénica com a finalidade de aumentar a capacidade de transporte de oxigénio para os tecidos activos.

2.c) Triatletas de Elite da prova de triatlo olímpico evidenciaram valores basais de CGR, Hb e RDW significativamente inferiores aos valores registados pelos triatletas não-Elite. Estas diferenças sugerem a ocorrência de adaptações crónicas moduladas pelo treino aeróbio intenso nos triatletas de nível mais elevado, expressas na diminuição da viscosidade do sangue e maior homogeneidade de distribuição dos eritrócitos.

### 3) Biomarcadores da Função Imune

3.a) O perfil do comportamento das diferentes populações leucocitárias nas provas de triatlo analisadas foi similar, em ambos os grupos experimentais, sendo evidenciada uma leucocitose significativa imediatamente após a realização do esforço.

3.b) A magnitude da leucocitose induzida pelas provas realizadas se mostrou proporcional a duração do esforço, sendo mais acentuada, em ambos os grupos de triatletas, na prova de triatlo longo.

3.c) O aumento do número de leucócitos totais circulantes se mostrou correlacionado com o aumento da actividade da enzima CK, sendo contudo, mais pronunciado nos triatletas não-Elite. Tal comportamento sugere o nível competitivo do atleta como factor condicionante da expressão do tráfego de leucócitos em resposta ao exercício físico.

3.d) O aumento da concentração dos linfócitos TCD3<sup>+</sup> em resposta as provas de triatlo analisadas se mostrou inversamente proporcional a duração das provas, sendo mais acentuado, em ambos os grupos, na prova *sprint* e mais pronunciado nos triatletas dos grupos Elite.

3.d) Após a prova de triatlo longo, somente os triatletas não-Elite evidenciaram um decréscimo da relação CD4/CD8. Esta diminuição, caracterizada pelo

incremento da concentração das células TCD8<sup>+</sup> imediatamente após o esforço, parece implicar uma maior responsividade destes atletas à elevação das concentrações de catecolaminas e cortisol.

3.e) Triatletas de Elite apresentaram um aumento menos acentuado das células TCD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> comparativamente aos triatletas não-Elite nas diferentes provas analisadas.

3.f) Em ambos os grupos experimentais, imediatamente após a realização da prova de triatlo olímpico, observaram-se aumentos significativos das células TCD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>, sendo estes mais acentuados nos triatletas de Elite. Este comportamento sugere uma resposta imune positiva, expressa numa maior capacidade de adesão e sinalização destas células, prevenindo uma subsequente imunossupressão pós-esforço.

3.g) Os diferentes perfis de comportamento do marcador de activação linfocitário T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> apresentados pelos grupos experimentais da prova de triatlo longo, sugerem que, diferentes níveis de prestação competitiva, parecem implicar em respostas distintas relativas a activação e proliferação deste fenótipo linfocitário.

3.h) Nos triatletas de Elite a proliferação das células TCD4<sup>+</sup>reg e TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> se mostrou condicionada pela duração da prova, sendo constatado um aumento das respectivas concentrações somente na prova de triatlo longo.

#### 4) Biomarcadores de stresse oxidativo

4.a) Foram constatadas evidências de stresse oxidativo nas provas de triatlo longo e triatlo *sprint*, somente nos triatletas dos grupos Elite. Esta resposta, traduzida em valores acrescidos da actividade da enzima SOD eritrocitária, reforça a alteração sistémica pró-oxidante induzida pelos esforços que requerem elevado consumo de oxigénio.

4.b) Não foram verificadas evidências de lesão oxidativa, expressa em valores aumentados de TBARS, nas respectivas provas de triatlo analisadas. No entanto, observou-se uma diferença inter-grupos significativa relativa aos valores basais deste biomarcador na prova de triatlo *sprint*. Este comportamento reflecte, provavelmente, um efeito das intensas cargas de treino presentes na preparação dos triatletas de nível mais elevado.

4.c) Triatletas de Elite da prova de triatlo longo apresentaram valores basais da enzima antioxidante GR superiores aos registados pelos triatletas de nível competitivo inferior.

4.d) Ambos os grupos experimentais de triatletas evidenciaram aumentos significativos do TAS na prova de triatlo olímpico. Estando o ácido úrico contemplado no *status* antioxidante total, há evidências que a não constatação de stresse oxidativo nos respectivos grupos possa estar relacionada as suas propriedades antioxidantes não-enzimáticas, as quais lhe conferem importantes efeitos *scavengers* sobre os radicais livres do oxigénio.

Em linha de convergência com as conclusões obtidas neste estudo, verificamos que a intensidade e a duração das provas de triatlo condicionam as respostas dos biomarcadores em função do nível competitivo dos triatletas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhihetty, P.J.; Irrcher, I.; Joseph, A.M.; Ljubicic, V; Hood, D.A. (2003). Plascity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol*, 88(1):99 – 107.

Adhihetty, P.J.; O`Leary, M.F.; Chabi, B.; Hood, D.A. (2008). Mitochondria in skeletal muscle: Adatable rheostats of apoptotic susceptibility. *Exerc Spots Sci Rev*, 36(3):116 – 121.

Adhihetty, P.J.; O`Leary, M.F.; Chabi, B.; Wicks, K.L.; Hood, D.A. (2007b). Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102(3):1143 – 1151.

Afzali, B.; Goldsmith, D.J. (2004). Intravenous iron therapy in renal failure: friend or foe? *J Nephrol*, 17: 487 – 495.

Agostinelli, E., Arancia, G., Vedova, L.; Belli, F., Marra, M.; Salvi, M.; Toninello, A. (2004). The biological functions of polyamine oxidation products by amine oxidases:perspectives of clinical applications. *Amino Acids*, 27:347 – 358.

Aguilo, A.; Tauler, P.; Fuentespina, E. et al. (2005). Antioxidant response to oxidative induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*, 84(1):1 – 7.

Allen, R.G.; Tresini, M. (2000). Oxidative stresse and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, 28: 463 – 499.

Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stresse. *Med Sci Sports Exerc*, 25, 218– 224.

Almekinders, L.C; Almekinders, S.V. (1992). Immune function in exercise-induced injuries. *Exercise and Disease*, 149 – 158.

Altmann, S.; Grumberg, R; Raae, A.; Nilges, M.; Horber, J. (2002). Pathways and intermediates in forced unfolding of spectrin repeats. *Structure*, 10: 1085 – 1096.

Amelink, G.J.; Kamp, H.H.; Bar, P.R. (1988). Creatine kinase isenzimes profiles after exercise in rat: sex-linked differences in leakage of CK-MM. *Eur J Appl Physiol*, 412: 417 – 421.

Amelink, G.J.; Koot, R.W.; Erich, W.B.; Bar, P.R. (1990). Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation. *Acta Physiol Scand*, 138: 115 – 124.

Angelopoulos, T.J. (2001). Beta-endorphin immunoreactivity during high-intensity exercise with and without opiate blockade. *Eur J Appl Physiol*, 86 (1): 92 – 96.

- Antunes-Neto, J.M.; Toyama, M.H.; Carneiro, E.M.; Macedo, D.V. (2006). Circulating leukocyte heat shock protein 70 (HSP70) and oxidative stress markers in rats after a bout of exhaustive exercise. *Stresse*, 9 (2): 107 – 115.
- Antunes-Neto, J.M.; Pilatti, L.; Filho, J.P.; Magalhães, N.P. (2007). Kinetic of oxidative and physiological stress markers in exhaustive running condition. *Rev Bras Educ Fis, Esp e Lazer*, 2 (2): 56 – 68.
- Armstrong, R.; Warren, G.L.; Warren, J.A. (1991). Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med*, 12: 184 – 207.
- Aruoma, O.I. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Ásia Pac J Clin Nutr*, 8(1): 53 – 63.
- Ascensão, A.; Magalhães, J.; Soares, J.; Oliveira, J.; Duarte, J. (2003). Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol*, 22(5): 651 – 678.
- Ashton, T.; Young, I.S.; Peters, J.R., et al. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol*, 87 (6): 2032 – 2036.
- Aslan, D., Gumruk, F.; Gurgey, A.; Altay, C. (2002). Importance of RDW value in differential diagnosis of anemias. *Am J Hematol*, 69(1): 31 – 33.
- Asmus, K.; Bonifacic, M.; (2000). Free radicals chemistry – Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Elsevier Science B.V, 3 – 54.
- Asselin, P., Benquet, K., Krzystynlak, P., Brousseau, R., & Fournier, M. (1996). In vivo indomethacin reverse exercise-induced immunosuppression in rats. *Int J Immuno Pharmacol*. 18: 491 – 497.
- Atanackovic, D.; Kroger, H.; Serke, S.; Deter, H.C. (2004). Immune parameters in patients with anxiety or depression during psychotherapy. *J Affect Disord*, 81 (3): 201 – 209.
- Azevedo, R.B.; Costa Rosa, L.F.; Lacava, Z.G.; Curi, R. (1997). Effects of sexual steroidal hormones on lymphocytes and macrophages metabolism. *Cell Biochem Funct*, 15: 293 – 298.
- Bacurau, R.; Belmonte, M.; Seelaender, M.; Costa Rosa, L. (2000). Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochem Funct*, 18(4): 249 – 258.
- Bagby, G.J., Crouch, L.D., & Shepherd, R.E. (1996). Exercise and cytokines: Spontaneous and elicited responses. In: exercise and immune function. L. Hoffman-Goetz, ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 55 – 77.

- Balnavese, C.D.; Thompson, M.W. (1993). Effect of training on eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol*, 75: 1545 – 1551.
- Banerjee, A.K. (2003). Oxidant, antioxidant e physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, 253: 307 – 312.
- Barreiro, E.; Galdiz, J.; Marinan, M.; Hussain, S. & Gea, J. (2006). Respiratory loading intensity and diaphragm oxidative stress: N-acetyl-cysteine effects. *J Appl Physiol*, 100: 555 – 563.
- Baum, M.; Ennepfer, J. (1994). Leucocytes, lymphocytes, Activation parameters and cell adhesion molecules in middle-distance runners under different training conditions. *Int J Sports Med*, 15 :S122 – S126.
- Baum, M.; Klopping-Menke, K., M.; Liesen, H. & Kirchner, H. (1999). Increased concentrations of interleukin-1 beta in whole blood cultures supernatants after 12 weeks moderate exercise. *Eur J Appl Physiol*, 79(6): 500 -503.
- Beere, H.M.; Wolf, B.B.; Cain, K.; Mosser, D.D.; Green, D.R et al. (2000). Heat-shock protein HSP70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2(8): 469-475.
- Bejma, J. (1999). Acute and chronic exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 87: 465 – 470.
- Bejma, J.; Ramirez, P.; Ji, L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand*, 169(4):343– 351.
- Belkaid, Y.; Piccirillo, C.A.; Mendez, S.; Shevach, E.; Sacks, D. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control and immunity. *Nature*, 420: 502 – 507.
- Benard, G.; Rossignol, R. (2008a). Ultrastructure of the mitochondria and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8):1313 – 1342.
- Benoni, G.; Bellavite, P.; Adami, A.; Lippi, G.; Brocco, G. (1995). Effect of acute exercise on some haematological parameters and neutrophil functions in active and inactive subjects. *Eur. J Appl Physiol*, 70: 187 – 191.
- Bentley, D.J.; McNughton, L.R. (2003). Comparison of  $W_{peak}$ ,  $VO_{2peak}$  and Ventilation Threshold From Two Different Incremental Exercise Tests: Relationship to Endurance Performance. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 6(4), 422-435.
- Besarab, A.; Frinak, S.; Yee, J. (1999). An Indistinct Balance: the safety and efficacy of parenteral iron therapy. *J Am Soc Nephrol*, 10: 2029 – 2043.
- Bessman, J.; Ridgway, G.; Gardner, F. (1983). Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am J Clin Pathol*, 80(2):322 – 326.

- Bieger, W.P.; Weiss, M.; Michel, G et al. (1980). Exercise-induced monocytosis and modulation of monocyte function. *Int J Sports Med*, 1: 30 – 36.
- Bielavsky, M; Burger, M.; Barbosa, F. (2008). Liver overload in brazilian triathletes after triathlon competition is related muscle fatigue. *Annals of Hepatol*, 7(3):245-248.
- Blalock, J.E. (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*, 15 (11): 504 – 511.
- Blannin, A.K.; Chatwin, L.J.; Cave, R., Gleeson, M. (1996). Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil phagocyt activity in middle-aged men. *Brit J Sports Med*, 30: 125 – 129.
- Blannin, A.K.; Robson, P.J.; Walsh, N.P.; Gleeson, M. (1998). The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion, 19 (8): 547 – 552.
- Booth, F.W.; Thomason, D.B. (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiological Rev*, 71: 541 – 545.
- Boscolo, P.; Di Gioacchino, M.; Qiao, N.; Sabbioni, E. (2004). Work, environment, immune system and human health. *Int J Immunophatol Pharmacol*, 17 (suppl.2): 1- 2.
- Bouchama, A.; Knochel, J.P. (2002). Heatstroke. *N Engl J Med*, 346: 1978 – 1988.
- Brancaccio, P.; Limongelli, F.; Maffulli, N. (2006). Monitoring of serum enzymes in sports. *Br J Sports Med*, 40: 96 – 97.
- Brantley, R.E.; Smerdon, S.J.; wilkinsosn, A.J. et al. (1993). The machanism of autoxidation of myoglobin. *J. Biol Chem*, 268(10): 6995 – 7010.
- Brenner, I.K; Shek, P.N.; Shephard, R.J. (1994). Infection in athletes. *Sports Med*, 17: 86 – 107.
- Brenner, I.K; Shek, P.N.; Zamecnik, J.; Shephard, R. (1998). Stresse hormones and immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med*, 19: 130 – 143.
- Brooks, G.A.; Faey, T.; White, T. (1995). *Exercise Physiology: Human Bioenergetic and ilt's Applications*. 2ª Ed., Mayfield Publishing Company, Montain View, California.
- Brown, S.J.; Child, S.H., Donnelly, A.E. (1997). Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptations following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci*, 15: 215 – 222.



- Brown, G.C.; Borutaite, V. (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*, 33(11): 1440 – 1450.
- Buchman, A.L.; Keen, C.; Comisso, J.; Killip, D.; Dunn, J.K. (1998). The effect of a marathon run on plasma and urine mineral and metal concentrations. *J American College Nutrition*, 17 (2): 124 – 127.
- Budgett, R.; Newsholme, E.; Lehmann, M. (2000). Redefining the overtraining syndrome as the unexplained underperformance syndrome. *British J Sports Med*, 34(1): 67 – 68.
- Bury, T.; Radermaker, M.; Pirnay, F. (1996). Blood mononuclear cells mobilization and cytokine secretion during prolonged exercise. *Int J Sports Med*, 17: 156 -170.
- Cabot, R.C.; Blake, J.B.; Hubbard, J.C. (1901). Studies of the blood in its relation to surgical diagnosis. *Annals of Surgery*, 34: 361 – 374.
- Cadenas, E. (2004). Mitochondrial free radical production and cell signalling. *Mol Aspects Med*, 25: 17 – 26.
- Camus, G.; Pincemail, J.; Ledent, M. (1992). Plasma levels of polymorphonuclear elastase and myeloperoxidase after uphill walking and downhill running at similar energy cost. *Int J Sports Med*, 13: 443 – 446.
- Camus, G.; Poortmans, J.; Nys, M.; Deby, C. et al. (1997). Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clin Sci*, 92: 415 – 422.
- Cannon, J. G. (1993). Exercise and resistance to infection. *J Appl Physiol*, 74:973-981.
- Cannon, J.G.; Fielding, R.A.; Fiatarone, M.A.; Orencole, S.F.; Dinarello, C.A.; & Ewnas, W.J. (1989). Increased interleukin 1-beta in human skeletal muscle after exercise. *Am J Physiol*, 257: R451 – R455.
- Carraro, U.; Francheschi, C. (1997). Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging Clin Exp Res*, 9: 19 – 34.
- Caruso, A.S.; Licenziati, M. & Corulli, M. (1997). Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*, 27: 71 – 76.
- Cavaglieri, C.; Nishiyama, A.; Fernandes, L.; Curi, L. (2003). Differential effects of short-chain fatty acid on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sciences*, 73: 1683 -1690.
- Cerrottini, J.C.; & Brunner, K.T. (1974). Cell mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv.Immunol.*18: 67 – 132.

- Cerwenka, A.; Laniter, L.L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews in Immunology*, 1 (1): 41 – 49.
- Chatard, J. C.; Mujika, I.; Guy, C.; Lacour, J.R. (1999). Anemia and iron deficiency in athletes-practical recommendations for treatment. *Sports Med*, 27: 229 – 240.
- Chevion, S. (2003). Plasma antioxidant status and cellinjury after severe physical exercise. *Biochemistry*, 100(9): 5119 -5123.
- Child, R; Brown, S.; Day, S.; Donnelly, A.; Roper, H.; Saxton, J. (1999). Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci (Lond)*, 96 (1): 105 – 115.
- Clarkson, P.M (1995). Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35: 131 – 141.
- Clarkson, P.M; Hubal, M. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Rehabil*, 81 (11): S52 – S69.
- Clarkson, P.M.; Newham, D.J. (1995). Association between muscle soreness damage and fatigue. *Adv Exp Med Biol*, 384: 457 – 489.
- Clarkson, P.M.; Thompson, H.S. (2000). Antioxdants: What role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*, 72 (suppl) : 637S – 646S.
- Clarys, J.P. (1978). Human morphology and hydrodynamics. In: J. Teraud and Bendingfield, E (eds). *Med Sports Sci*, 26: 200 – 223.
- Ceddia, M.A.; Woods, J.A. (1998). Exhaustive exercise decreases macrophage antigen presentation to T-lymphocytes. *Med Sci Sports Exerc*, 30: S5 – S19.
- Chapman, D.; Newton, M.; Sacco, P.; Nosaka, K. (2006). Greater muscle damage induced by fast versus slow velocity eccentric exercise. *Int J Sports Med*, 27:591 – 598.
- Chinda, D.; Nakaji, S.; Umeda, T. (2003). A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence*, 18: 324 -329.
- Cohen, J.J.; Claman, H.N.; & Duke, R.C. (1992). *Immunology course book*. Denver: University of Colorado Health Sciences Center, 155.
- Comporti, M.; Signori, C.; Buonocore, G.; Ciccoli, L. (2002). Iron release, oxidative stresse and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med*, 32: 568 – 776.
- Cooper, G.M.; Hausman, R.E. (2007). *The cell: A molecular approach*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC.

- Cooper, C.E.; Vollaard, N.B.; Choeiri, T.; Wilson, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 30(2): 280 – 285.
- Córdova, A.; Mon-Alvarez, M. (1995). Behaviour of zinc in physical exercise: a special reference to immunity and fatigue. *Neurosci Biobehav Rev*, 19: 439 – 445.
- Cormak, D.H. (1987). Blood cells. In: Ham's histology (9<sup>th</sup> ed). Saint Louis: J.B. Lippincott Company, 188 – 213.
- Cosendey, A.; Fernandez, C.; Moraes, M. (2004). Dilutional pseudoanemia and the Olympic athletes. *RBAC*, 36(4): 197 – 200.
- Costa Rosa, L.F.; Safi, D.A.; Curi, R. (1995). Effect of hypo and hyperthyroidism on macrophages function and metabolism in rats. *Cell Biochem Funct*, 13: 141 – 147.
- Costa Rosa, L.F.; Vaisberg, M.W. (2002). Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte*, 8 (4): 167 – 172.
- Crivellato, E.; Vacca, A.; Ribatti, D. (2004). "Setting the stage: an anatomist's view of immune system". *Trends in Immunology*, 25: 210 – 217.
- Curi, R.; Newsholme, P.; Pithon-Curi, T.C.; Pires-de-Melo, M.; Guimarães, A. (1999). Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res*, 32: 15 – 21.
- Da Costa, L; Ribeiro, L, S. (2003). Anemia relacionada ao exercício físico intenso. *Rev Med HSPV*, 15(3): 25 – 32.
- Davidson, R.L.; Robertson, J.D.; Galea, G.; Maughan, R.J. (1987). Hematological changes associated with marathon running. *Int J Sports Sci*, 8: 19 – 25.
- Davies, K.J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 61:1 – 31
- Davis, J.M.; Kohut, M.L.; Hertler-Colbert, M.; Mayer, E.P. (1997). Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol*, 83: 1461 – 1466.
- Dawson, B.; Henry, GJ; Goodman, C., et al. (2002). Effects of vitamin C and E supplementation on biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after 21 km run. *Int J Sports Med*, 23: 10 – 15.
- De Castro, C.; Manhães-de-Castro, R.; Queirós, A.; Brandt, C. (1999). Estresse: Interações neuroendócrinas e imunológicas. *Anais Facul de Med CCS-UFPE*, 44(2): 132- 137.

- De Zwart, L.L.; Meerman, J.H.; Commandeur, J.N. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*, 26 (1,2): 202 – 226.
- Di Meo, S.; Venditti, P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, 10: 125 – 140.
- Dohi, K.; Kraemer, W.J.; Mastro, A.M. (2003). Exercise increases prolactin-receptor expression on human lymphocytes. *J Appl Physiol*, 94 (2): 518 – 524.
- Donnelly, A.; Clarkson, P.; Maughan, R. (1992). Exercise-induced muscle damage: effects of light exercise on damaged muscle. *Eur J appl Physiol*, 64: 350 – 353.
- Droge, W. (1994). Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J*, 8: 1131 – 1138.
- Duarte, J.A. (1993). Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico. Dissertação apresentada às provas de Doutorado em Ciências do Desporto na área de Especialização de Biologia do Desporto. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física. Universidade do Porto.
- Duarte, J.A.; Appell, H.J.; Carvalho, F.; Bastos, M.L.; Soares, J.M. (1993). Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med*, 14: 440 – 443.
- Duarte, J.A.; Carvalho, F.; Bastos, M.L. (1994). Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *Eur J of Appl Physiol*, 68: 48 – 53.
- Duarte, J.A.; Magalhães, J.F.; Monteiro, L.; Almeida-Dias, A.; Soares, J.M. (1999). Exercise-induced signs of muscle overuse in children. *J. Sports Med*, 20: 103 – 108.
- Duarte, J.A.; Carvalho, F.; Fernandes, E.; Remião, F.; Bastos, M.L.; Magalhães, J.; Appell, H. (2004). D-Amphetamine-induced hydrogen peroxide production in skeletal muscle is modulated by aminoamine oxidase inhibition. *Int J Sports Med*, 25:446 – 449.
- DuBose, D.A.; Wenger, C.B.; Flinn, S.A. (2003). Distribution and mitogen response of peripheral blood lymphocytes after exertional heat injury. *J Appl Physiol*, 95: 2381 – 2389.
- Dufaux, B.; Heine, O.; Kothe, A.; Prinz, U.; Rost, R. (1997). Blood glutathione status following distance running. *Int J Sports Med*, 18 (2): 89 – 93.

Dufour, D.R.; Lott, J.A.; Seeff, L.B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem*, 46(12):2027 – 2049.

Dufour, D.R.; Lott, J.A.; Seeff, L.B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis and monitoring. *Clin Chem*, 46(12):2050 – 2068.

Dusse, L.; Stubbert, R.; Lages, G. (2008). Red blood cell Distribution Width (RDW): differentiation of microcytic and hypochromic anemias. *Rev Bras Hematol*, 30(2):120-123.

Ebbeling, C.B.; Clarkson, P.M. (1989). Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med*, 7: 207 – 234.

Eichner, E.R. (1996). The Anemia of athlete. *Sports Med*, 14 (9):122 -130.

Eliakim, A.; Wolach, B.; Kodesh, E.; Yarom, Y & Falk B. (1997). Cellular and immune response to exercise among gymnasts and untrained girls. *Int J Sports Med*, 18: 208 -212.

Elosua, R.; Molina, L.; Fito, M.; Arquer, A.; Ordonez-Llanos, J., Marrugat, J. (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 167: 327 – 334.

El-Sayed, M.S.; Ali, N.; Ali, Z.; El-Sayed. (2005). Haematology in exercise and training. *Sports Med*, 35 (8): 649 – 670.

Enk, A.H. (2006). DCs and cytokines cooperate for the induction of Tregs. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 56: 97 – 106.

Essig, D.A.; Nosek, T.M. (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol*, 22: 409 – 428.

Evans, W.J. (2000). Vitamine E, vitamine C and exercise. *Am J Clin Nutrition*, 72 (suppl), 647S – 652S.

Evans, W.J.; Cannon, J.G. (1991). The metabolic effect of exercise-induced muscle damage. *Exerc Sports Sci Rev*, 19: 99 – 125.

Fallon, K. E.; Sivyer, G.; Sivyer, K.; Dare, A. (1999). The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med*, 33: 264 – 269.

Fallon, K. E.; Bishop. (2002). Changes in erythropoiesis assessed by reticulocyte parameters during ultralong distance running. *J Sports Med*, 12: 172 – 178.

Farthing, J.P.; Chilibeck, P.D. (2003). The effects of eccentric and concentric training at different velocities. *Eur J Appl Physiol*, 89: 578 – 586.

- Falvo, M.J.; Bloomer, R.J. (2006). Review of exercise-induced muscle injury: relevance for athletic populations. *Research in Sport Medicine*, 14:65 – 82.
- Faure, M.; Gapin, L.; Viret, C. (2004). Stresseing the virtues of the immune system. *Microbes Infect.* 6 (10): 960 – 964.
- Fehrenbach, E.; Passek, F.; Nieves, A.M.; Northoff, H. (2000). HSP expression in human leucocytes is modulated by endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 32(3): 592 – 600.
- Fehrenbach, E.; Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis and heat shock proteins . *Exerc Immunol Rev*, 7: 66 – 89.
- Feige, U.; Polla, B. (1994).Heat shock proteins: the HSP70 family. *Experientia*, 50:979-984.
- Felten, D.L.; Felten, S.Y.; Bellinger, D.L.; Carlson, S.L. & Livinat, S. (1997). Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol review* 100: 225 – 260.
- Field, C.J.; Gougeon, R.; Marliss, E.B. (1991). Circulating mononuclear cell number and function during intense exercise and recovery. *J Appl Physiol*, 71: 1089 – 1097.
- Finaud, J.; Lac, G.; Filaire, E. (2006). Oxidative stress-Relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4): 327 – 358.
- Fisher, C.P. (2006). Vitamin E isoform-specific inhibition of the exercise induced heat shock protein 72 expression in human. *J Appl Physiol*, 100: 1679 – 1687.
- Fleisher, G.A., Wakin, K.G. (1968). The role of small intestine in the disposal enzymes. *Enzym Biol Clin*, 9: 81 – 96.
- Fogelholm, M. (1999). Micronutrients: Interaction between physical activity, intakes and requirements. *Public Health Nutr*, 2: 349 – 356.
- Fornai, F.; Lenzi, P.; Frenzilli, G.; Nigro; Rugieri, S.; Paparelli, A. (2004). DNA damage and ubiquitinated neuronal inclusions in the substantia nigra and striatum of mice following MDMA (ecstasy) *Psychopharmacol*, 173:353 – 363.
- Foschini, D.; Prestes, J.; Charro, M. (2007). Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. *Rev Brás de Cineantropom Desempenho Hum*, 9(1): 107 – 112.
- Foyer, C.; Lopez-Delgado, H.; Dat, J.; Scott, I. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione- associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant*, 100: 241 – 254.

- Fredericks, W.M.; Bosch, K.S. (1995). The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histo Histopathol*, 10: 111 – 116.
- Fredericks, S.; Murray, J.F.; Carter, N.D. (2002). Cardiac troponin T and creatine kinase MB content in skeletal muscle of the uremic rat. *Clin Chem*, 48: 859 – 868.
- Friden, J.; Lieber, R. (1992). Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*, 24: 521 – 530.
- Frubeck, G.; Gómez-Ambrose, J.; Muruzabal, F.; Burell, M. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol*, 280: E827 – E847.
- Fu, S.C.; Qin, L.; Leung, C.K.; Chan, B.P.; Chan, K.M. (2003). Regular moderate exercise training prevents decrease of CD4+ T-lymphocytes induced by a single bout of strenuous exercise in mice. *Can J Appl Physiol*, 28(3): 370 – 381.
- Gabriel, H.; Kindermann, W. (1998). Adhesion molecules during immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol*, 76: 512 – 523.
- Gabriel, H.; Urhausen, A.; Kinderman, W. (1991). Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion. *Eur J Appl Physiol*, 63: 449 – 457.
- Gabriel, H.; Schwarz, L.; Steffens, G. (1992a). Immunoregulatory hormones, circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sports Med*, 13: 359 – 366.
- Gabriel, H.; Urhausen, A.; Kinderman, W. (1992b). Mobilisation of circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations during and after short anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*, 65: 164 – 170.
- Gaetke, L.M.; Chow, C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189: 147 – 163.
- Gaillard, R.C. (1994). Neuroendocrine-immune system interactions-the immune hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endoc Metabol (TEM)*, 7 (5): 303 – 309.
- Galea, G.; Davidson, R. (1985). Hemorrheology of marathon running. *Int J Sports Med*, 6: 136-138.
- Galy, O.; Hue, O.; Boussana, A.; Mercier, J.; Préfaut, C. (2005). Blood rheological responses to running and cycling: A potential effect on the arterial hypoxemia of highly trained athletes?. *Int J Sports Med*, 26: 9 – 15.

- Gannon, G.A.; Rhid, S.; Shek, P.N.; Shephard, R.J. (2002). Naïve and memory T cell subsets are differentially mobilized during physical stress. *Int J Sports Med*, 23: 223 – 229.
- Gastmann, U.; Dimeo, F.; Huonker, M.; Lehmann, M. (1998). Ultra triathlon related blood chemical and endocrinological responses in nine athletes. *J Sports Med Phys fitness*, 38: 18 – 23.
- Gibala, M.J.; MacDougall, J.D.; Stauber, W.T. (1995). Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *J Appl Physiol*, 78: 702 – 708
- Gibala, M.J.; Lozej, M.; McLean, C.; Graham, T. (1999). Low glycogen and branched-chain amino acid ingestion do not impair anaplerosis during exercise in humans. *J Appl Physiol*, 87(5): 1662 – 1667.
- Giercksky, T.; Boberg, K.M.; Farstad, I.N.; Halvorsen, S.; Schruppf, E. (1999). Severe liver failure in exertional heat stroke. *Scand J Gastroenterol*, 34: 824 – 827.
- Gincel, D.; Zaid, H.; Shoshan, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage –dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J*, 358: 147 – 155.
- Giulivi, C.; Cadenas, E. (1998). Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Rad Biol Med*, 24(2): 269 – 279.
- Gleeson, M. (2005). Biochemical and immunological markers of overtraining. *J Sports Sci Med*, 2: 31 – 41.
- Gleeson, M. (2005). Immune function and exercise. *Eur J Sports Sci*, 4(3): 52–65.
- Gleeson, M. (2006). *Immune function in sport and exercise*. 1<sup>st</sup> Ed, Elsevier, Philadelphia.
- Gleeson, M.; McDonald, W.A.; Cripps, A.W. (1995). The effect of immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol*, 102: 210–215.
- Gleeson, M.; McDonald, W.A.; Pyne, D.B. (1999). Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 31: 67 – 73.
- Gleeson, M.; Bishop, N.C. (1999). Immunology In: Maughan R J (ed) *Basic and applied sciences for sports medicine*. Butterworth-Heinemann, Oxford, 199-236.
- Gleeson, M.; McDonald, D.B.; Pyne, A.W.; Clancy, R.L. (1999). Salivary IgA levels and infections risk in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 31: 67 – 73.
- Gleeson, M.; McDonald, D.B.; Pyne, A.W. (2000). Immune status and respiratory illnesses for elite swimmers during a 12-week training cycle. *Int J Sports Med*, 21: 302 – 37.



Gleeson, M.; Pyne, A.W. (2000). Exercise effect on mucosal immunity. *Immunol Cell Biol*, 78: 536 – 544.

Gohil, K.; Vigui, C.; Stanley, W.; Brooks, C. & Packer, L. (1988). Blood glutathione oxidation during human exercise. *J Appl Physiol*, 64: 115 – 119.

Green, K.J.; Rowbottom, D.G.; Mackinnon, L.T. (2002). Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *J Appl Physiol*, 92 (6): 2390 – 2395.

Green, K.J.; Rowbottom, D.G. (2003). Exercise-induced changes to in vitro T-lymphocyte mitogen responses using CFSE. *J Appl Physiol*, 95: 57 – 63.

Guglielmini, C.; Casoni, L.; Patracchini, M.; Manfredini, F.; Ferrari, M. (1989). Reduction of Hb levels during the racing season in non sideropenic professional cyclists. *Int J Sports Med*, 10: 352 – 356.

Gunderson, H.N.; Parlman, J.A.; Parker, J.A.; Bell, G. (1983). Membrane permeability changes as a fatigue factor in marathon runners. *Biochemistry of exercise, Inc. Champaign*.

Gunter, M.R.; Sampath, V.; Caughey, W.S.; Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, 26(11-12):1238 – 1395

Haas, J.D.; Brownlie, T. (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutrition*, 131: 676 – 690.

Hack, V.; Strobel, G.; Rau, J.; Weicker, H. (1992). The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. *Eur J Appl Physiol*, 65: 520 – 524.

Hall, G.; Steensberg, A.; Massimo, S.; Keller, C.; Schjerling, P. (2003). Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(7): 305 – 310.

Halliwell, B. (1999). Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidant: the biomarker concept. *Nutr Rev*, 104 – 113.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3th Ed. Oxford University Press.

Hamilton, K.L.; Staib, J.L.; Phillips, T. et al. (2003). Exercise, antioxidants and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 34(7): 800 – 809.

Harper's Biochemistry. (2006). 26<sup>a</sup> ed. McGrawHill, Companies, Inc.

- Hartmann, U. (2000). Training and overtraining markers in selected sports events. *Med Sci Sports Exerc*, 32: 209 – 215.
- Hartmann, A.; Niess, A. (2000). Oxidative DNA damage in exercise. In C.K. Sen; L.Parker; O.Hanninen (Eds). *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. (195-217), Basel: elsevier Science B.V.
- Hassanein, J.; Razak, A.; Gavalier, J.; Van Thiel. (1992). Heatstroke: its clinical and pathological presentation with particular attention to the liver. *Am J Gastroenterol*, 87:1382 – 1338.
- Hauswirth, C.; Lehénaff, D. (2001). Physiological demands of running during long distance runs and triathlons. *Sports Med*, 31 (9): 679 – 689.
- Heath, G. W.; Ford, E. S.; Craven, T.; Macera, C. A.; Jackson, K.L.; Pate, R.R. (1991). Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Med Sci Sports Exerc*, 23: 152 -157.
- Heijnen, B.; Van Veen, S.; Straatsburg, I.; Gulik, T. (2001). Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. *J Appl Physiol*, 91: 265 – 268.
- Heijnen, B.; Yasser, E.; Straatsburg, I.; Gulik, T. (2002). Influence of acidosis and hypoxia on liver ischemia and reperfusion injury in an vivo rat model. *J Appl Physiol*, 93: 319 – 323.
- Hellman, N.E.; Gitlin, J.D. (2002). Ceruplasmin metabolism and function. *Ann Rev Nutr*, 22: 439 – 458.
- Hellsten, Y.; Richter, E.; Kiens, B.; Bamgsbo, J. (1999). AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J Physiol*, 520Pt3:909-920
- Hellsten, Y. (2000). The role of xanthine oxidase in exercise. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Basel: Elsevier Science B.V, 153 – 176.
- Hellstrand, K.; Hermodsson, S.; Stranngard, O. (1985). Evidence for beta-adrenoreceptor-mediated of human natural killer cells. *Immunopharmacology*, 134: 4095 – 4099.
- Herbert, T.; Cohen, S. (1993). Stresse and immunity-a metanalytic rewiw. *Psychol Med*, 55: 364 – 379.
- Hinton, P.S.; Giordano, C.; Brownlie, T.; Haas, J.D. (2000). Iron supplementation improves endurance after training in iron-depleted nonanemic athletes. *J Appl Physiol*, 88 (3): 1103 – 1111.
- Hirokawa, K & Makinodan, T. (1975). Thymic involution: effect on T cells diferentiation. *Immunol*, 114: 1659 – 1664.

- Hoffman, J.R.; Kang, J.; Ratamess, N.A. (2005). Biochemical and hormonal responses during an intercollegiate football season. *Med Sci Sports Exerc*, 37(7): 1237 – 1241.
- Hong, S; Johnson, T.; Farag, N.; Guy, H.; Mills, P. (2005). Attenuation of T lymphocyte demargination and adhesion molecule expression in response to moderate exercise in physically fit individuals. *J appl Physiol*, 98: 1057 – 1063.
- Hooper, S.; Mackinnon, L.T. Hanrahan, S. (1997). Mood states as an indication of staleness and recovery. *Int J Sports Psychol*, 28: 1 – 12.
- Hooper, D.C.; Scott, G.; Zborek, A. (2000). Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J*, 14:691 – 698.
- Horn, F.; Henze, C.; Heidrich, K. (2000). Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiol*, 202: 151 – 167.
- Hornestein, M.S.; Vander Heide, R.S.; L`Ecuyer, T.J. (2000). Molecular basis of antracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab*, 71: 436 – 444.
- Houmard, J.A.; Johns, R.A. (1994). Effects of taper on swim performance: pratical implications. *Sports Med*, 17:224 – 232.
- Hue, Olivier (2003). Prediction of Drafted-Triathlon Race Time From Submaximal Laboratory Testing in Elite Triathletes. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 28(4), 547-560.
- Hunter, J.B.; Critz, J.B. (1981). Effect of training on plasma enzyme levels in man. *J Appl Physiol*, 31:20 – 23.
- Ideo, G.; DeFrachis, R.; Bellabuono, A. Serum cytosolic microsomal enzyme ratio:a tool for estimation of severity of acute hepatitis. *Biochem*, 10(2): 74 – 76.
- Jankord, R; Jemiolo, B (2004). Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc*, 36: 960 – 964.
- Jackson, M.; McArdle, A.; McArdle, F. (1998). Antioxidant micronutrients and gene expression. *Proc Nutr Soc*, 57: 301 – 305.
- Jackson, M.; Pye, D.; Palomero, J. (2007). The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102: 1664 – 1170.
- Janssen, G.M.; Kuipers, H.; Willems, G.M.; Geurten, P. (1989). Plasma activity of muscle enzymes:quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables. *Int J Sports Med*, 10: S160 – S168.
- Jayarane, S.; Sthaneshwar, P. (2006). Serum soluble transferrin receptor in hypochromic microcytic anaemia. *Singapore Med J*, 47(2): 138 – 142.

- Jehn, M.; Clark, M. Guallar, E. (2004). Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care*, 27: 2422 – 2428.
- Jenkins, M.K; Khoruts, A.; Ingulli, E. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annual Review of Immunology* 19, 23.
- Jenkins, R.R.; Goldfarb, A. (1993). Introduction: oxidative stress, aging and exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 25 (2): 210 – 212.
- Ji, L.L. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc*, 25 (2): 210 – 212.
- Ji, L.L. (1995). Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*, 18: 1079 – 1086.
- Ji, L.L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222: 283 – 292.
- Ji, L.L. (2002). Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann N Y Acad Sci*, 959: 82 – 92.
- Ji-Guo, Y.; Christer, M.; Lars-Eric, T. (2002). Eccentric contractions leading to damage do not cause loss of desmin nor fibre necrosis in human muscle. *Histochem Cell Biol*, 118: 29 – 34.
- Ji, L.L. (2007a). Antioxidant signalling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol*, 42(7): 582 – 593.
- Ji, L.L. (2007b). Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signalling. *Free Radic Biol Med*, 44: 142 – 152.
- Joffre, O.; Gorse, N.; Romagnoli, P.; Hudrisier, D. & Van Meerwijk, J.P. (2004). Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood*, 103 (11): 4216 – 4221.
- Jonsdottir, I, H.; Hoffman, P; Thoren, P. (1997). Physical exercise, endogenous opioids and immune function. *Acta Physiol Scand*, 640: 47 – 50.
- Kanter, M.M.; Kaminsky, L.A.; Laham-Saeger, J. (1988). Serum enzyme levels and lipid peroxidation in ultramarathon runners. *Med Sci Sports Exerc*, 17: 245.
- Kapazi, Z.F.; Ouslander, J.G.; Schnelle, J.F.; Kutner, M. & Fahey, J.L. (2003). Effects of an exercise intervention on immunologic parameters in frail elderly nursing home residents. *J Gerontologic –biological Sci Med Sci*, 58(7):413-420.
- Kassaf, M et al. (2003). Effect of vitamin C supplements on antioxidant defense and stress protein in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol*, 549: 645 – 652.

- Katerina, P.; Yiannakouris, N.; Matalas, A. (2006). Exertional rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc*, 38(6): 1054 – 1057.
- Kayashima, S.; Ohno, H.; Fujioka, T.; Taniguchi, N.; Nagata, N. (1995). Leucocytosis as a marker of damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 70(5): 413 – 420.
- Kean, R.B.; Spitsin, S.V.; Mikheeva, T. et al. (2000). The peroxynitrite scavenger uric acid inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J Immunol*, 165:6511 – 6518.
- Keast, D. (1988). Exercise and immune response. *Sports Med*, 5:248 – 267.
- Keast, D.; & Morton, A.R. (1992). Long-term exercise and immune function. In: exercise and disease. R.R. eds Boca raton, F.L:CRC press, 89 – 120
- Kedderis, G.L. (1996). Biochemical basis of hepatocellular injury. *Toxicologic Pathology*, 24(1): 77 – 83.
- Keen, P.; McCarthy, D.A.; Passfield, L.; Shaker, H.A.; Wade, A.J. (1995). Leukocyte and erythrocyte counts during a multi-stage cycling race. *Brit J Sports Med*, 29: 61 – 65.
- Keller, C; Sttensberg, A.; Pilegaard, H.; Saltin, B.; Pedersen, B.; et al. (2001). Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J*, 15: 2748 – 2750.
- Kelman, D.J.; DeGray, J.A.; Mason, R.P. (1994). Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical with oxidizes substrates. *J Biol Chem*, 269(10):7458 – 7463.
- Kiefer, C.R.; Snyder, L.M. (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol*, 7:113 – 116.
- Kihlstrom, M. (1990). Protection effect of endurance training against reoxygenation-induced injuries in rat heart. *J Appl Physiol*, 68: 1672 – 1678.
- King, J.; Shames, D.; Woodhouse, L (2000). Zinc homeostasis in humans. *J Nutr*, 130: 1360-6S
- Kingsbury, k.J.; Kay, L.; Hjelm, M. (1998). Contrasting plasma amino acid patterns in Elite athletes: association with fatigue and infection. *British J Sports Med*, 32: 25 – 33.
- Klentrou, P.; Cieslak, T.; MacNeila, M. (2002). Effects of moderate exercise on salivary immunoglobulin A and infection risk in humans. *Eur J Appl Physiol*, 87: 153 – 158.

- Knez, W.L.; Jenkins, D.G.; Coombes, J.S. (2007). Oxidative stress in half and full ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc*, 39(2): 283 – 288.
- Koury, J.; Oliveira, C.; Donangelo, C. (2007). Associação da concentração plasmática de cobre com metaloproteínas cobre-dependentes em atletas de Elite. *Rev Bras Med Esporte*, 13(4):364-8.
- Kostka, T.; Lacour, J.; Bonnefoy, M. (2000). The symptomatology of upper respiratory tract infections and exercise in elderly people. *Med Sci Sports Exerc*, 32: 46 – 51.
- Koutedakis, Y.; Sharp, N.C. (1998). Seasonal variations of injury and overtraining in Elite athletes. *Clin J Sports Med*, 8(1): 18 – 21.
- Koutedakis, Y.; Raafat, A.; Sharp, N.C. Robbins, S.W.(1998). Serum enzymes activities in individuals with different levels of physical fitness. *J Sports Med Phys Fitness*, 33(3): 252 – 257.
- Kuipers, H. (1994). Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med*, 15(3): 132 – 135.
- Lancaster, G. L.; Halson, S.L.; Khan, Q.; Gleeson, M. (2003) effect of exhaustive exercise and intensified training on human T-lymphocyte CD45RO expression. *J Physiol*, 548P:096.
- Lancaster, G. L.; Khan, Q.; Jenkendorf, A.E.; Gleeson, M. (2003). Effect of feeding different amounts of carbohydrate during prolonged exercise on human T-lymphocyte intracellular cytokine production. *J Physiol*, 548P:098.
- Lancaster, G.I.; Khan, Q.; Drysdale, P.T; Wallace, F.; Jeukendrup, A.E.; Gleeson, M. (2005). Effect of prolonged exercise and carbohydrate ingestion on type 1 and type 2 T lymphocyte distribution and intracellular cytokine production in humans. *J Appl Physiol*, 98: 565 -571.
- Landers, G.J.; Blanksby, B.A.; Ackland, T.R; Smith, D. (2000). Morphology and performance of world championship triathletes. *Annals of Human Biology*, 27(4): 387 – 400.
- Larrabee, R.(1902).Leukocytosis after exercise. *J Med Research*,7:76–82.
- Laursen, P.B.; Rhodes, C. (2001). Factors affecting performance in ultraendurance triathlon. *Sports Med*, 31(3): 195 – 209.
- Lawlor, D.A.; Sattar, N.; Smith, G.D.; Ebrahim, S. (2005). The associations of physical activities and adiposity with alanine aminotransferase and gamma glutamyl transpeptidase. *American J Epidemiol*, 161(11): 1081 – 1088.
- Leaf, D.A.; Kleinman, M.T.; Hamilton, M.; Barstow, T.J. (1997). The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med Sci Sports Exerc*, 29: 1036 – 1039.

- Lee, J.; Koo, N.; Min, D.B (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compre Rev Food Sci Food Safety*, 3:21 – 23.
- Leewenburgh, C.; Hansen, P.A.; Holloszy, J.O.; et al. (1999). Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Rad Biol Med*, 27(1-2):186 – 192.
- Leeuwenburgh, C.; Heineck, J. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise *Curr Med Chem*, 8: 829 – 838.
- Leeuwenburgh, C.; Hollander, J.; Ji, L.L. (1997). Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol*, 272: R363 – 369.
- Leeuwenburgh, C; Ji, L.L. (1995). Glutathione depletion in rested and exercised mice : biochemical consequence and adaptation . *archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 316, 941 – 949..
- Leeuwenburgh, C; Ji, L.L. (1996). Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed refed rats. *J Nutr*, 126: 1833 – 1843.
- Lehmann, M; Mann, M.; Gastmann, U.; Keul, J.; Vetter, D.; Haussinger, D. (1996). Unaccustomed high-mileage vs intensity training related change in performance and serum amino acid levels. *Int J Sports Med*, 17: 18 – 192.
- Lehmann, M.; Wieland, H.; Gastmann, U. (1997). Influence of an unaccustomed increase in training volume vs intensity on performance, hematological and blood-chemical parameters in distance runners. *J Sports Med Phys Fitness*, 37: 110-116.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochem Biophys Acta*, 1366(1-2): 53-67.
- Leichtweis, S.B.; Ji, L.L. (1997). Rigorous swimming training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiol Scand – Stockholm*, v.160, 139 – 148.
- Lekhi, C.; Gupta, P.H.; Shing, B. (2007). Influence of exercise on oxidant stress products in Elite Indian cyclist. *Br J Sports Med*.
- Lichtman, A.; Ding, H.; Henault, G.; Vachino, R., Camphausen, D.; Luscinkas. (1997). CD45RA-RO-(memory) but not CD45RA-RO-(naive) T cells roll efficiently on E- and P- selectin and vascular cell adhesion molecule-1 under flow. *J Immunol* 158: 3640 – 3650.
- Lieber, R.L.; Schmitz, M.C.; Mishra, D.K.; Friden, J. (1994). Contractile and cellular remodeling in rabbit skeletal muscle after cyclic eccentric contractions. *J Appl Physiol*, 77: 1926 – 1934.

- Lieber, R.L.; Friden, J. (1999). Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction. *J Sci Med Sports*, 2: 253 – 265.
- Lieber, R.L.; Shah, S.; Fridén, J. (2002). Cytoskeletal disruption after eccentric contraction-induced muscle injury. *Clin Orthop*, 403:S90-S99.
- Liew, F.W. (2002). Th<sub>1</sub> and Th<sub>2</sub> cells: a historical perspective. *Nature Review Immunol*, 2(1):55–60.
- Liu, J.F; Chang, W.Y; Chan, K.H; Tsai, W.Y; Lin, C.L (2005). Blood lipid peroxides and muscle damage increased following intensive resistance training of female weightlifters. *Annals New York Academy of Science*, 10:255 – 261.
- Liu, M.L.; Bergholm, R.; Makimattila, S.; Valkonen, M.; Hilden, H. (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol*, 276 (6), E 1083 – E 1091.
- Liu, J, Yeo, H.C.; Brooks, G.A.; Ames, B.N. (2000). Chronically and acutely exercise rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*, 89: 21 – 28.
- Lukaski, H.C. (2000). Magnesium, zinc and Chromium nutrition and physical activity. *Am J Clin Nutr*, 72: 585 – 593.
- Mackinnon, L.T.; Hooper, S.L. (1996). Plasma glutamine and upper respiratory tract infection during intensified training in swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 28: 285 – 290.
- Mackinnon, L.T. (1998). Future directions in exercise and immunology: regulations and integrations. *Int J Sports Med*, 19: S205 – S211.
- Mackinnon, L.T. (1999). *Advances in exercise immunology*. Human Kinetics, Champaign-IL.
- Mackinnon, L.T. (2000). Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sports Exerc*, 32 (7): S369 – S376.
- MacIntyre, D.L.; Sorichter, S.; Berg, A.; McZenzie, D.C. (2001). Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*, 84: 180 – 186.
- MacNeil, B.L.; Hoffman-Goetz, A.; Kendal, M. & Atumugan, Y. (1991). Lymphocyte proliferation responses after exercise in men: fitness, intensity and duration effects. *J Appl Physiol*, 70: 179 – 185.
- Magalhães, P. (2000). Alterações hematológicas agudas induzidas por diferentes protocolos de exercício físico exaustivo e inabitual. Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de desporto da Universidade do Porto.



- Maino, V.C.; Suni, M.A.; Rutenberg, J.J. (1995). Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*, 20: 127 – 133.
- Malczewska, J.; Raczynski, G.; Stupinic, R. (2000). Iron status in endurance athletes and in non-athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metabolism*, 10: 260 – 276.
- Malm, C.; Lenkei, R.; Sjodin, B. (1999). Effects of eccentric exercise on the immune system in men. *J Appl Physiol*, 86: 461 – 468.
- Malm, C.; Nyberg, P.; Engstrom, M.; Sjodin, B.; Lenkei, R.; Ekblom, B.; Lundberg, I. (2000). Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopses. *J Physiol*, 529: 342 – 262.
- Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr*, 130: 1455S – 1454S.
- Margaritis, I.; Tessier, F.; Richard, M.; Marconnet. (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med*, 18:186– 190.
- Mars, M.; Govender, S.; Weston, A.; Naicker, V.; Chaturggon, A. (1998). High intensity exercise: a cause the lymphocytes apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun*, 19: 366 – 370.
- Marshall, W. (2004). *Clinical Chemistry*, 5ª Ed. London: Mosby, C.V, 238 – 243.
- Marzatico, F.; Pansarasa, L.; Bertorelli, L.; Somenzini, L.; Valle, D. (1997). Blood free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and *sprint* athletes. *J Sports Med Phys fitness*, 37:235-239
- Mastaloudis, A.; Leonard, S.W.; Traber, M.G. (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med*, 31: 911 – 922.
- Mastaloudis, A.; Morrow, J.D., Hopkins, D.W.; Traber, M.G. (2004). Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med*, 36 (10): 1329 – 1341.
- Mastaloudis, A.; Traber, M.; Carstensen, K.; Widrick, J. (2006). Antioxidants did not prevent muscle damage in response to an ultramarathon run. *Med Sci Sports Exerc*, 38 (1): 72 – 80.
- Mateo, R. J. N.; Laínez, M. G. L. (2000). Anemia do atleta: incidência e conduta terapêutica. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 6 (4):155 -164.
- Mathews, P.M.; Froelich, C.J.; Sibbit, W.L.; Bankhurst, A.D. (1983). Enhancement of natural cytotoxicity by beta endorphin. *Immunopharmacology*, 130: 1658 -1662.

- Mathews, C.E.; Ockene, I.S.; Freedson, P.S. (2002). Moderate to vigorous physical activity and risk of upper respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc*, 34: 1242 – 1248.
- Mayr, A.; Kuipers, H.; Falk, M.; Santer, P.; Wierer, B. (2006). Comparison of hematological data in world Elite junior speed skaters and non-athletic junior. *Int J Sports Med*, 27: 283 – 288.
- Maughan, R.; Gleeson, M.; Greenhaff, P. (2000). *Biochemistry of exercise and training*. Oxford University Press Inc, New York.
- McBride, J. M.; Kraemer, W. J. (1998). Effects of resistance exercise on free radical production. *Med and Sci Sports Exerc*, 30 (1): 67 – 72.
- McCarthy, D.A.; & Dale, M.M. (1988). The leucocytosis of exercise: a review and model. *Sports Med*. 6: 333 – 363.
- McHeyzer-Williams, M.,G. (2003). B cells as effectores. *Curr Opin Immunol*. 15(3): 354 – 361.
- McHugh, M.P. (2003). Recent advances in the understand of the repeated bout effect the protective effect gainst muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports*, 13: 88 – 97.
- McNeil, P.L.; Khakee, R. (1992). Disruptions of muscle fibre plasma membranes. role in exercise-induced damage. *Am J Pathol*, 140: 1097 – 1109.
- Millan, S.; Gonzales-Quijano, M.I.; Giordano, M.; Soto, L.; López-Calderón, A. (1996). Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. *Life Sciences* 59 (17): 171 – 179.
- Mills, P.J.; Rehman, J.; Ziegler, M.; Carter, S.; Maisel, A. (1999). Nonselective beta blockade attenuates the recruitment of CD62L(-)T lymphocytes following exercise. *Eur J Appl Physiol*, 79: 531 – 534.
- Miyazaki, H.; Oh-Ishi, S.; Ookawara, T.; Kizaki, T.; Toshinai, K.; Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduce oxidative stress following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol*, 84(1-2): 1-6.
- Moldeveanu, A.; Shephard, R.; Shek, P. (2000). Prolonged exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1b, IL-6 and TNF-a in circulation mononuclear cells. *J Appl Physiol*, 89: 1499 – 1504.
- Moldeveanu, A.; Shephard, R.; Shek, P. (2001). The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med*, 31(2): 115 – 144.
- Moreta, A.; Poggi, A.; Pende, D. (1991). CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of

different lymphoid effector cells with the exption of cytolytic T lymphocytes expressing T cells receptor alpha/beta. *J Exp Med*, 174: 1393 – 1398.

Morgan, E.L; McClurg, M.R.; Janda, J.A. (1990). Suppression of human B lymphocyte activation by beta-endorphin. *J Neuroimmunology*, 28: 209 – 217.

Morgan, W.P.; Brown, D.R.; Raglin, J.S. (1997). Psychological monitoring of overtraining and staleness. *Br J Sports Med*, 21(3): 107 -114.

Morozov, V.I.; Golberg, N.D.; Kalinski, M.I. (2006). The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trainedrats. *Eur J Appl Physiol*, 97: 716 – 722.

Morse, P.D. & Warth, J.A. (1990). Direct measurement of ithe internal viscosity of sickle erythrocytes as a function of the cell density. *Biochim Biophys Acta*, 1053: 49 – 55.

Mujica, I.; Padilla, S. (1997). Hematological responses to training and taper in competititive swimmer: relationships with performance. *Arch Physiol Biochem*, 195:379 – 385.

Mujica, I.; Padilla, S. (2003). Scientific bases for pre-competition tapering strategies. *Med Sci Sports Exerc*, 35:1182 – 1187.

Mujica, I.; Padilla, S.; Pyne, D.; Busso, T. (2004). Physiological change associated with the pre-event taper in athletes. *Sports Med*, 34 (13): 891 – 927.

Muns, G.; Rubinstein, I.; Singer, P. (1996). Neutrophil chemotactic activity is increased in nasal secretions of long distance runners. *Int J Sports Med*, 17 (1): 56 – 59.

Nagel, D.; Seiler, D.; Franz, H.; Jung, K. (1990). Ultra-long-distance running and the liver. *Int J Sports Med*, 11 (6): 441 – 445.

Nagel, D.; Seiler, D.; Franz, H. (1992). Biochemical, Haematological and endocrinological parameters during repetead intense short-term running in comparison to ultra-long-distance runing. *Int J Sports Med*, 13:337 – 343.

Nakayama, Y.; Nakajima, K.; Tagama, S.; Moldeus, P. (1995). Metabolism and citotoxicity of propylgallate in isolated rat hepatocit: Effects of a thiol reductant and an esterose inhibitor. *Molecular pharmacol*, 47: 1021 – 1037.

Natale, V.M.; Brenner, I.K; Moldoveanu, A.I. (2003). Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *São Paulo Med. Journal*,121(1): 9 – 14.

Nehlsen-Cannarella, S.L. (1998). Cellular responses to moderate and heavy exercise. *Can J Physiol Pharmacol*, 76 85): 485 – 489.

- Nehlsen-Cannarella, S.L.; Fagoaga, O.R.; Nieman, D.C.; Davis, J.M. (1997). Carbohydrate and cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol*, 82: 1662 -1667.
- Nehlsen-Cannarella, S.L.; Nieman, D.C.; Fagoaga, O.R. (2000). Saliva immunoglobulins in Elite rowers. *Eur J Appl Physiol*, 81: 222 – 228.
- Nemet, D; Rose-Gottron, C; Mills, P; Cooper, D. (2003). Effect of water-polo practice on citokines, growth mediators and leukocytes. *Med Sci Sports Exerc*, 35: 356 – 363.
- Nemoto, S.; Takeda, K.; Yu, Z.X.; Ferrans, V.J.; Finkel, T. (2000). Role of mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol*, 20: 7311 – 7318.
- Newman, I. & Wilkinson, P. (1993). Locomotor responses of human CD45 lymphocytes subsets: preferential locomotion of CD45RO-lymphocytes in response to attractants and mitogens. *Immunology* 78: 92 – 98.
- Newsholme, E.A. (1994). Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. *Int J Sports Med*, 15: S142 – S147.
- Newsholme, P.; Costa Rosa, L.F.; Curi, R. (1996). The importance of macrophage fuel metabolism to its function. *Cell Biochem Funct*, 14: 1 – 10.
- Newsholme, E.A; Leech, A.R. (1983). *Biochemistry for the medical sciences*. Toronto:Wiley, 623 – 627.
- Nicolaidis, M.G.; Protosygiellou, M.D.; Petridou, A. (2003). Hematologic and biochemical profile of juvenile and adult athletes of both sexes: implications for clinical evaluation. *Int J Sports Med*, 24: 506 – 511.
- Nicotera, P.; Bellemo, G.; Orrenius, S. (1992). Role of calcium in cell killing. *Chem Res Toxicol*, 3: 484 – 494.
- Nielsen, H.B. & Pedersen, B.K. (1996). Lymphocyte proliferation in response to exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, Berlin, 75 (5): 375 – 379.
- Nielsen, H.B.; Secher, N.H.; Kristensen, J.H.; Pedersen, B.K. (1997). Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol*, 272: R1847 – 1852.
- Nielsen, H.B.; Lyberg, T. (2004). Long-distance running modulates de expression of leucocyte and endothelial adhesion molecules. *Scand J Immunol*, 60: 356 – 362.
- Nieman, D.C. (2000). Is infection risk linked to exercise workload? *Med Sci Sports Exerc*, 32 (7): S406 – S411.

- Nieman, D.C.; Bishop, N.C. (2006). Nutritional strategies to counter stress to the immune system in athletes. *J Sports Sci*, 24 (7): 763 – 772.
- Nieman, D.C.; Brendle, D.; Henson, D.A.; Warren, B.J.; Nehlsen-Canarella, S. (1995). Immune function in athletes versus nonathletes. *Int J Sports Med*, 16 (5): 329 – 333.
- Nieman, D.C.; Dumke, C.I.; Henson, D.A.; McAnulty, S.R.; Lind, R.H. (2003). Immune and oxidative changes during and following the western states endurance run. *Int J Sports Med*, 24 (7): 541 – 547.
- Nieman, D.C.; Henson, D.A.; Austin, M.D.; Brown, V.A. (2005). Immune response to a 30-minute walk. *Med Sci Sports Exerc*, 37 (1): 57 – 62.
- Nieman, D.C.; Henson, D.A.; Fagoaga, O.R.; Utter, D.M.; Nehlsen-Canarella, S.L. (2001). Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *Int J Sports Med* (in press).
- Nieman, D.C.; Henson, D.A.; Smith, L.L.; Utter, A.C.; Vinci, D.M.; Davis, J.M. (2001). Cytokine changes after a marathon race. *J Appl Physiol*, 91:109 – 114.
- Nieman, D.C.; Miller, A.R.; Henson, D.A. (1994). Effects of high-versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Int J Sports Med*, 15: 199 – 206.
- Nieman, D.C.; Nehlsen-Canarella, S.L. (1994). The immune response to exercise. *Semin. Hematol*, 31: 166 – 179.
- Nieman, D.C.; Nehlsen-Canarella, S.L.; Fagoaga, O.R. (1998). Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *J Appl Physiol*, 84: 1252 – 1259.
- Nieman, D.C.; Nehlsen-Canarella, S.L.; Fagoaga, O.R.; Henson, D.A.; Bolton, M.R.; Thorpe, R. (2000). Immune function in female elite rowers and non-athletes. *Br J Sports Med*, 34: 181 – 187.
- Nieman, D.C. (1994). Exercise, infection and immunity. *Int J Sports Med*, 15: S131 – S141.
- Nieman, D.C. (1998). Influence of carbohydrate on the immune responses to intensive, prolonged exercise. *Exerc Immunol Rev*, 4: 64 – 76.
- Niemela, K.; Palatsi, I.; Linluoto, M. (1992). Competitive ultra-marathon: too much, even for well-trained athlete? *Scand J Sports Sci*, 6(1):7 – 10.
- Niess, A.; Simon, P. (2007). Response and adaptation of skeletal muscle to exercise—the role of reactive oxygen species. *Frontiers in Bioscience*, 12: 4826 – 4838.

- Niess, A.; Hartman, A.; Grunert-Fuchs, M.; Poch, B.; Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med*, 17 (6): 397 – 403.
- Nishikawa, Y.; Ukida, M.; Matsui, R.; Tsuji, T. (1994). Calcium influx initiates death of hepatocytes injured by activation of complement. *Liver*, 14: 200 – 2005.
- Nishizawa, J.; Nakai, A.; Matsuda, K et al. (1999). Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor in ischemic-reperfused heart. *Circulation*, 99:934–941.
- Nohl, H.; Kozlov, A.V.; Gille, L, et al. (2003). Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans*, 31(6): 1308 – 1311.
- Nollen, E.A; Brunsting, J.F.; Roelofsen, H.Weber, L.A. (1999). In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol*, 19: 2069 – 2079.
- Northoff, H.; Weinstock, C.; Berg, A. (1994). The cytokine response to strenuous exercise. *Int J sports Med*, 15: S167 – S171.
- Northoff, H.; Enkel, S.; Weinstock, C. (1985). Exercise, injury and immune function. *Exerc.Immunol.Rev*, 1: 1- 25.
- Northoff, H.; Berg, A.; Weinstock, C. (1998). Similarities and differences of the immune response to exercise and trauma: the IFN- $\gamma$  concept. *Can J Physiol Pharmacol*, 76: 497 -504.
- Nosaka, K.; Clarkson, P. (1995). Muscle damage following repeated bouts of high forces eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 27: 1263 – 1269.
- Nuviala, R.J.; Roda, L.; Lapieza, M.G.; Boned, B.; Giner, A. (1992). Serum enzymes activities at rest and after a marathon race. *J Sports Med Phys Fitness*, 32: 180 – 186.
- Ohno, H.; Yahata, K.; Yamamura, Y. (1988). Effect of physical training on immunoreactive  $\gamma$ -glutamyltransferase in human plasma. *Enzyme*, 39:110 – 114.
- Olzewsk, W.L., Engeseth, A. (1985). Studies of the lymphatic circulation of human. In:M.G. Jonhston (ed), *Experimental Biology of the lymphatic circulation*, 395 – 422. Elsevier Science.
- O’Neil, F; Hynak-Hankinson, M.; Gorman, J. (1986). Research and application of current topics in sports nutrition. *J Am Diet Assoc*, 86 (8): 1007 – 1015.
- Oppenheimer, S.J. (2001). Iron and its relation to immunity and infectious disease. *Nutr Res*, 131: 616S - 633S.

- Ortega, E.; Barriga, C.; De La Fuente, M. (1993). Study of the phagocytic function of neutrophils from sedentary men after acute moderate exercise. *Eur J Appl Physiol*, 66: 60 – 64.
- Oretga, E.; Forner, M.; Barriga, C. (1999). Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem*, 201 (1-2) 41 – 47.
- Ostrowski, K; Rhode, T.; Asp, S. (1998c). The sequential release of cytokines in strenuous exercise. *Int J Sports Med*, 19:suppl-3: S216 - S217.
- Ostrowski, K; Schjerling, P; Pedersen, B. (2000). Physical activity and plasma IL-6 in humans-effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol*, 83: 512 – 515.
- O'Toole, L.; Douglas, S.; Hiller, P. D.; Laird, R.H. (1999). Hematocrits of triathletes: is monitoring useful? *Med Sci Sports Exerc*, 31 (3): 372 – 377.
- Ottaway, C.A.; Husband, A.J. (1994). The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today*, 15: 511 – 517.
- Oztasan, N.; Taysi, S.; Gumustekin, K.; Aktas, O.; Timur, H. (2004). Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol*, 91 (5-6): 622 – 627.
- Pal Yu, B. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 74: 139 – 162.
- Palazzetti, S.; Richard, M.; Margaritis, I. (2003). Overload training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol*, 2884): 588 – 604.
- Palmer, F.M.; Nieman, D.C.; Hensons, D.A.; Swick, N.S. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol*, 89 (1): 100 – 107.
- Panen, B.;Robotham, J.(1995).The acute-phase response. *Horizons*,3:183-197.
- Parolin, M ; Uili, J. ; Castro-Alves, G. (2009). Fulminant hepatic failure by exercise-induced exertional heatstroke. *Rev Bras Med Esporte*, 15 (3) : 224 – 227.
- Pastori, G.M.; Foyer, C.H. (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of redox and abscisic acid-mediated. *Controls Plant Physiol*, 129: 460 -468.
- Pate, R.R. (1983). Sports Anemia: A review of current research literature. *Physician Sportsmed*, 11(2):115-127.
- Pawloski, J. R.; Stamler, J.S. (2002). Nitric oxide in red blood cells. *Transfusion*, 42: 1603 – 1609.

- Peake, J.; Horden, M.; Suzuki, K.; Yamaya, k.; Nosaka, K.; Mackinnon, L.; Coombes, J.F. (2004). Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation and respiratory burst activity after moderate- and high- intensity exercise. *J Appl Physiol*, 97: 612 – 618.
- Peake, J.M; Suzuki, K; Wilson, G; Coombes, J.S. (2005). Exercise-induced muscle damage, plasm cytokines and markers of neutropil activation. *Med Sci Sports Exerc*, 37: 737 – 745.
- Pedersen, B.K; Bruunsgaard, H. (1995). How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Med*, 19: 393 – 400.
- Pedersen, B.K; Febbraio, M. (2005). Muscle-derived interleukin-6: a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver and brain. *Brain Behav Immunity*, 19: 371–376.
- Pedersen, B.K.; Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and immune system: regulation, integration and adaptation. *Psic Rev*, 80 (3): 1055 – 1081.
- Pedersen, B.K.; Klokke, M.; Kappel, M. (1997). Possible role of hyperthermia and hypoxia in exercise-induced immunomodulation. In: Pedersen, K B, editor. *Exercise Immunology*, New York. Chapman & Hall, 61 -37.
- Pedersen, B. K.; Rohde, T.; Ostrowski, K. (1998). Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand*, 162 (3): 325 – 332.
- Pedersen, B. K.; Steensberg, A.; Keller, C.; Febbraio, M. (2003). Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil*, 24: 113 – 119.
- Pedersen, B, K.; Steensberg, A.; Fischer, C; Keller, C.; Plomgaard, P. (2004). The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc*, 63: 263 – 267.
- Pedersen, B, K.; Toft, A.D. (2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*, 34: 246 – 251.
- Pedersen, B, K.; Woods, J.A.; Nieman, D.C. (2001). Exercise-induced immune changes: an influence on metabolism? *Trends Immunol*, 22: 473 – 475.
- Peters, E.M; Goetzsche, J.M.; Joseph, L.E.; Noakes, T.D. (1996). Vitamin C as effective as combinations of anti-oxidants nutrients in reducing symptoms of upper respiratory tarct infections in ultramarathon runners. *S A J Sports Med*, 11: 23 – 27.
- Pitzalis, C.; Kingsley, G.H.; Meliconi, A.; Panayi, G.S. (1991). Selective migration of human helper-inducer memory T cell subset: confirmation by in vivo cellular kinetic studies. *Eur J immunol* 21: 369 -373.



- Pizza, F.X.; Mitchell, J.B.; Davis, B.H.; Bigelow, N. (1995). Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leucocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sports Exerc.* 27 (3): 363 – 370.
- Pizza, F.X.; Koh, T.J.; Brooks, S.V. (2002). Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions. *J Appl Physiol*, 92: 11873 – 1878.
- Petibois, C. (2002). Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. *Sports Med*, 32: 867 – 878.
- Potteiger, J.; Chan, M.A.; Haff, G.G. (2001). Training status influences T-cell responses in woman following acute resistance exercise. *J Strength Cond Res*, 15: 185 – 191.
- Powers, S.; Howley, E. (2001). *Exercise Physiology: theory and application to fitness and performance*. Fourth Ed. McGraw Hill, New York.
- Powers, S.K.; Shanely, R.A. (2002). Exercise-induced changes in diaphragmatic bioenergetic and antioxidant capacity. *Exerc Sport Sci Rev*, 30(2):69 – 74.
- Powers, S.K.; Sen, C.K. (2000). Physiological antioxidants and exercise training. *Handbook of oxidants and antioxidants exercise*. Elsevier science B.V. Basel, 221 – 242.
- Powers, S.K.; Lennon, S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 58 (4): 1025 – 1033.
- Prestes, J.; Frollini, A.; Donatto, F. Leite, G. (2005). Efeito do exercício físico realizado até a exaustão, nas intensidades leve e moderada, sobre a concentração sérica da interleucina-6. IV workshop em fisiologia do exercício da UFSCAR, 43 – 46.
- Pyne, D.B. (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*, 17 (4): 245 – 258.
- Pyne, D.B.; Baker, M.S.; Smith, J.A.; Telford, R.D.; Weidemann, M.J. (1996). Exercise and neutrophil oxidative burst: biological and experimental variability. *Eur J Appl physiol Occup Physiol*, 74 (6): 564 – 571.
- Pyne, D.B.; Gleeson, M. (1998). Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *Int J Sports Med*, 19:138 – 194.
- Pyne, D.B.; Smith, J.A.; Baker, M.S.; Telford, R.D.; Weidemann, M.J. (2000). Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J Sci Sports Med*, 3 (1): 44 – 54.

- Quindry, J.C.; Stone, W.L.; King, J.; Broeder, C.E. (2003). The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, 35(7): 1139 – 1145.
- Raastad, T.; Risoy, B.A.; Banestad, H.B.; Hallén, J. (2003). Temporal relation between leukocyte accumulation in muscle and halted recovery 10-20 h after strength exercise. *J Appl Physiol*, 95: 2503 – 2509.
- Raastad, T.; Hallén, J. (2000). Recovery of skeletal muscle contractility after high and moderate strength exercise. *Eur J Appl Physiol*, 82: 206 – 214.
- Radack, Z.; Asano, K.; Inoue, M.; Oh-Ishi, S.; Suzuki, K. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup*, 72 (3): 189 – 194.
- Radi, R.; Cassina, A., Hodara, R., C; Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 33(11): 1451 – 1464.
- Rama, R.; Ibanez, J.; Riera, M.; Prats, M.T; Pagés, T.; Palacios, L. (1994). Hematological, electrolyte and biochemical alterations after 100km run. *Can J Appl Physiol*, 19 (4): 411 – 420.
- Ramires, P.R.; Ji, L.L. (2001). Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol*, 281: H679 – H688.
- Reichlin, S. (1995). Endocrine-immune interaction. In DeGroot, L.T. *Endocrinology*, Philadelphia: W.B. Saunders, 2964 – 2989.
- Reichlin, S. (1998). Neuroendocrinology. In: Wilson, J.D. et al. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 165 -248.
- Reid, M.B. (2001). Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of Applied Physiology*, 90: 724 – 731.
- Reid, S.; Speedy, D.; Thompson, J. (2004). Study of hematological and biochemical parameters in runners completing a standard marathon. *Clin J Sports Med*, 14(6):344-353
- Resina, A.; Fedi, S.; Gatteschi, L.; Giamberardino, M.; Trabassi, E. (1990). Comparison of some serum copper parameters in trained runners and control subjects. *Int J Sports Med*, 11 (1): 58 – 60.
- Rherer, N.H.; Brouns, F.; Beckers, E.J. (1992). Physiological changes and gastro-intestinal symptoms as a result of ultra-endurance running. *Eur J Appl Physiol*, 64: 1– 8.
- Rhode, T.; McClean, D.A; Pedersen, B.K. (1998). Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 78: 448 – 453.

- Rietjens, G.J.; Kuipers, H.; W. H.; Van Breda, E. (2005). Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. *Int J Sports Med*, 26 (1):16 - 26.
- Rimbach, G.; Hohler, D.; Fischer, A., et al. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr*, 52(3): 203 – 222.
- Risoy, B; Raastad, T.; Hallén, J.; Lappegard, K.; Benestad, H. (2003). Delayed leukocytosis after hard strength and endurance exercise. Aspects of regulatory mechanisms. *BMC Physiology*, 3: 14.
- Roberts, C.; Pyne, D.B.; Horn, P.L. (2004). CD94 expression and natural killer cell activity after acute exercise. *J Sci Med Sports*, 7: 237 – 247.
- Robson, P.J.; Blannin, A.K.; Walsh, N.P.; Castell, L.M.; Gleeson, M. (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *Int J. Sports Med*, 20: 128 – 135.
- Rodrigues dos Santos, J.A (2002). Efeitos dum programa severo de treino de endurance em vários parâmetros biológicos, fisiológicos, antropométricos e motores: Um estudo de caso. *Ver Port Med Desp*, 103: 155 – 166.
- Rodrigues dos Santos, J.A (2004). Alterações agudas induzidas por uma corrida de 50km em alguns parâmetros hematológicos, bioquímicos e urinários em sujeitos com diferentes níveis de treino. *Rev Port Med Desp*, 22: 11 – 22.
- Rodrigues dos Santos JA, Candeias J, Magalhães MC (2004) As alterações imunológicas induzidas por cargas repetidas de exercício muito prolongado podem ser indiciadoras de imunodepressão? Um estudo de caso. *Ludens*, 17(4): 27-33
- Ronsen, O.; Pedersen, B.K.; Oritsland, T.R.; Bahr, R.; Kjeldsen-Kragh, J. (2001). Leukocytes counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J Appl Physiol*, 91: 425 – 434.
- Ronsen, O.; Pedersen, B.K.; Haug, B.K.; Hostmark, A.T. (2004). Immuno-endocrine and metabolic responses to long distance ski racing in world-class male and female cross-country skiers. *Scand J Med and Sci Sports*, 14 (1): 39 – 48.
- Rowbottom, D.G.; Keast, D.; Morton, A.R. (2000). Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc*, 32: S396 – S405.
- Rowbottom, D.G.; Keast, D.; Garcia-Webb, P; Norton, A.R. (1997). Training adaptation and biological changes among well-trained male triathletes. *Med Sci Sports exerc*, 29(9): 1233 – 1239.
- Sachdev, S.; Davies, K.J.A. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Rad Biol & Med*, 44: 215 – 223.

Sacheck, J.M.; Blumberg, J.B. (2001). Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition*, 17 (10): 809 – 814.

Sakamoto, K., Goodyear, L.J. (2002). Exercise effects on muscle insulin signalling and action invited review: intracellular signalling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 93:369 – 383.

Sawka, M.N.; Convertino, V.A.; Eichner, E.R.; Schnieder, S.M.; Yong, A.J. (2000). Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stress and trauma/sickness. *Med Sci Sports Exerc*, 32:332–348.

Scharhag, J.; Meyer, T.; Gabriel, H.; Kindermann, W. (2005). Does prolonged cycling of moderate intensity affect cell function. *Br J Sports Med*, 39: 171 – 177.

Schmidt, W.; Bierrmann, B.; Winchenbach, P.; Boning, D. (2000). How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations? *Int J Sports Med*, 21: 133 – 138.

Schneider, C.D.; Niess, A.M.; Rozario, F.; Tschositsch, K.; Golly, I. (2003). Vitamin E supplementation does not increase the vitamin C radical concentration at rest and after exhaustive exercise in healthy male subjects. *Eur J Nutr*, 42 (4): 195 – 200.

Schneider, C. D.; Oliveira, A. R. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treino físico. *Rev Brasil Medic Esporte*, 10 (4): 308 – 313.

Schneider, C. D.; Belló-Klein, A.; Oliveira, A. R. (2007). Effect of ultra-endurance exercise on oxidative stress parameters. *Rev Bras Med Esporte*, 15(2).

Schulenburg, H.; Kurz, C.L.; Ewbank, J.J. (2004). Evolution of innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev*, 198: 36 – 58.

Schumacher, Y.; Grathwohl, D.; Wollenweber, M.; Heinrich, L. (2000). Haemoglobin, haematocrit and red blood cells indices in Elite cyclists. are the control values for blood testing valid? *Int J Sports Med*, 21:380 - 385.

Schumacher, Y. O.; Schmid, A.; Grathwohl, D.; Bultermann, D.; Berg, A. (2002). Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med Sci Sports Exerc*. 34 (5):869 - 875.

Schwane, J.A; Buckley, R.T.; Dipaolo, D.P.; Atkinsos, M.A.; Shepherd, J.R. (2000). Plasma creatine kinase responses of 18 to 30-yr-old african-american men to eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 32: 370 – 378.

Selby, G. B.; Eichner, E. R. (1986). Endurance swimming, intravascular hemolysis, anemia e iron depletion. *Am J Med*, 81: 791 – 794.

- Selby, G. B.; Eichner, E. R. (1994). Hematocrit and performance: the effect of endurance training on blood volume. *Sem. Hematol*, 31 (2): 122 – 127.
- Selamoglu, S.; Turgay, F.; Kayatekin, B.; Yslegen, C. (2000). Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of blood. *Acta Physiol Hung*, 87(3):267-273
- Sen, C.K. (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul*, 36: 1 – 30.
- Sen, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*, 33(3): 368 – 370.
- Senturk, U.K.; Gunduz, F.; Kuru, O.; Ozkaya, Y.G. (2005). Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. *J Appl Physiol*, 99 (4): 1434 – 1441.
- Sevanian, A.; Davies, K.J.; Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr*, 54:1129S – 1134S.
- Shang F, Lu M, Dudek, E et al (2003) Vitamine C and vitamine E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med*, 34(5):521-530.
- Shaskey J, Green, G A. (2000). Sports Hematology. *Sports Med*, 29(1):27–38.
- Shephard, R.; Shek, P. (1994). Potential impact of physical activity and sport on the immune system – a brief review. *Br J Sports Med*, 28: 247 – 255.
- Shepley, B.; MacDougall, J. B.; Cipriano, N. (1992). Physiological Effects of tapering in high trained athletes. *J Appl Physiol*, 72: 707 – 711.
- Shepstone, T.N; Tang, J.E.; Phillips, S.M. (2005). Short-term-high vs low-velocity isokinetic lengthening training results in greater hypertrophy of the elbow flexor in young men. *J Appl Physiol*, 98: 1768 – 1776.
- Shing, C.M.; Peake, J.M.; Ahern, S.M.; Strobel, N.A.; Coombes, J.S (2007). The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32(4):677 – 685.
- Shinkai, S.; Kurokawa Y.; Hino, S.; Watanabe, S.; Watanabe, T. (1993). Triathlon competition induced a transient immunosuppressive change in the peripheral blood of athletes. *J Spots Med Phys Fitness*, 33: 70 – 78.
- Shona,L.; Jeukendrup,A. (2004). Does overtraining exist? *Sorts Med*, 34 (1): 967 – 981.
- Siegel, A.J.; Stec, I.; Lipinka, I. (2001). Effect of marathon running on inflammatory and hemostatic markers. *Am J Cardiol*, 88: 918 – 920 A919.

Sies, H. (2000). What is oxidative stress? In: JF Keaney, ed. Oxidative stress and vascular disease, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1- 8.

Simon, T. L. (1994). Induced erythrocytemia and athletic performance. *Semin. Hematol*, 31: 128 – 134.

Simpson, R.J.; Florida-James, G.; Whyte, G.; Macrae, S.; Guy, K. (2007). High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood in human subjects. *J Appl Physiol*, 103:396 – 401.

Smith, J.A.; Gray, A.B.; Pyne, D.B.; Baker, M.S.; Weideman, M.J. (1996). Moderate exercise triggers both priming and activation and neutrophil subpopulations. *Am J Physiol Reg Integrative Com Physiol*, 270: R838 – R845.

Smith, L.L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc*, 32:317 – 331.

Smith, D.J.; Roberts, D. (1994). Effects of high volume and /or intense exercise on selected blood chemistry parameters. *Clin Biochem*, 27: 435 – 440.

Smith, J.; Garbutt, G.; Lopes, P.; Pedoe, D. (2004). Effects of prolonged strenuous exercise (marathon running) on biochemical and haematological markers used in investigation of patients in emergency department. *Br J Sports Med*, 38(3): 292 – 294.

Smolka, M.B.; Zoppi, C.C.; Alves, A.A. (2000). HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279:R1539 – R1545.

Somani, S.; Frank, S.; Rybak, L. (1995). Responses of antioxidants system to acute and trained exercise in rats heart subcellular fractions. *Pharmacol Biochem Behav*, 51: 627 – 634.

Souza, C. F.; Fernandes, L.C.; Cyrino, E.S. (2006). Production of reactive oxygen species during the aerobic and anaerobic exercise. *Rev Bras Cineant Desemp humano*, 8 (2): 102 – 109.

Speich, M.; Pineau, A.; Ballereau, F. (2001). Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clinica Chimica Acta*, 312 (1-2): 1 – 11.

Spiropoulos, k.; Trakada, G. (2003). Hematologic and biochemical laboratory parameters before and after a marathon. *Lung*.

Spodaryk, k. (1993). Haematological and iron-related parameters of male endurance and strength trained athletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 67: 66 – 70.

- Sprenger, H.; Jacobs, C.; Main, M.; Gressner, A.; Gemsa, D. (1992). Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors and neopterin after long distance running. *Clin Immunol Immunopathol*, 63: 188 – 195.
- Stadtman, E.; Levine, R.L. (2000). Protein Oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, 899:191– 208.
- Stansbie, D.; Aston, P.; Dallimore, H.; Willis, N. (1983). Effect of exercise on plasma pyruvate –kinase and creatine kinase activity. *Clin Chim Acta*, 132: 127 – 132.
- Starkie, R.; Rolland, J.; Angus, D.; Anderson, M.; Febbraio, M. (2001). Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol*, 280: C769 – 774.
- Steensberg, A. (2003). The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism. *Exerc Immunol Rev*, 9: 40 – 47.
- Steensberg, A.; Toft, A.; Schjerling, P.; Halkjaer-Kristensen, J.; Pedersen, B. (2001). Plasma interleukin-6 during strenuous exercise:role of epinephrine. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283 (3): C1001 – 1004.
- Steensberg, A.; Van Hall, G.; Saltin, B.; Pedersen, B. (2000). Production of IL-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma IL-6. *Physiol*, 529: 237 – 242.
- Stromme, J.H.; Rustad, P.; Steensland, H. (2004). Reference intervals for eight enzymes in blood of adults females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system a 37C. *Scand J Clin Lab Invest*, 64: 371 – 384.
- Subudhi, A.W.; Davis, S.L.; Kipp, R.W.; Askew, E.W. (2001). Antioxidant status and oxidative stress in Elite alpine ski racers. *Int J Sport Nutr Exerc Metabolism*, 11:32 – 41.
- Suzuki, S.; Sato, H.; Kikuchi, T.; Abe, T.; Nakaji, S.; Sugawara, K. (1996). Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol*, 81 (3): 1213 – 1222.
- Suzuki, S.; Nakaji, S.; Yamada, M.; Liu, Q.; Kurakake, S.; Okamura, N. (2003). Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc*, 35 (2): 348 – 355.
- Suzuki, K.T., Someya, A.; Komada, Y.; Ogra, Y. (2002). Roles of metallothionein in copper hemostasis: responses to Cu-efficient diets in mice. *J Inorg Biochem*, 8: 173 – 182.

- Suzuki, K.T.; Nakaji, S.; Yamada, M. (2003). Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Scie Sports Exerc*, 35: 348 – 355.
- Svensson, M; Ekblom, B.; Cotgreave, I. et al. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol Scand*, 176: 43 – 56.
- Tauler, P.; aguilo, Aguiló, P.; Jimenez, F.; Villa, G.; Tur, J.A. (2005). Pre-exercise antioxidant enzymes activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J Sports Sci*, 23(1): 5 – 13.
- Taylor, R.P., Starnes, J.W. (2003). Age, cell signalling and cardioprotection. *Acta Physiol Scand*, 178(2):107 – 116.
- Thomas, M.J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 16(7-8):716 - 718.
- Thompson, H.S.; Clarkson, P.M.; Scordilis, S.P. (2002). The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol Scand*, 174: 47 – 56.
- Thornton, D.; Farmer, J.C.; Hypothermia and hyperthermia. (2001). *Critical care Medicine: principles of diagnosis and management in the adult*. Mosby, 1525 – 1538.
- Tiidus, P.M. (2000). Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation and oxidative stress. *Can J Appl Physiol*, 25: 274 – 287.
- Tonkonogi, M.; Walsh, B.; Svensson, M.; Sahlin, K. (2000b). Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *J Physiol*, 528 pt 2 379 – 388.
- Tremblay, M.S. et al. (1995). Methodological and statistical considerations for exercise-related hormone evaluations. *Sports Med*, 20 (2): 90 – 108.
- Trent, R.J. (2006). Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin Biochem Rev*, 27(1): 27 – 38.
- Tricoli, V. (2001). Mechanisms involved in delayed onset muscle soreness etiology. *Rev Bras Cienc Mov*, 9(2): 39 – 44.
- Tuma, R.A.; Pamer, R.G. (2002). Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells. *Current Opinion in Immunology*, 14: 348 – 353.
- Tuya, I, R.; Gil, P.E.; Mariño, M.M.; Carra, R.M.; Misiego, A.S. (1996). Evaluation of the influence of physical activity on the plasma concentrations of several trace elements. *Eur J Appl Physiol*, 73: 299 – 303.



- Tvede, N.; Kappel, M.; Klarlund, K.; Galbo, h.; Pedersen, B.K. (1993). The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukine-2 production. *Int J Sports Med*, 14: 275 – 282.
- Tvede, N.; Pedersen, B.K.; Hansen, F.R.; Bendix, T.; Glabo, H.; Kristensen, J. (1989). Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulations and in vitro proliferative responses. *Scand J immunol*. 29: 383 – 389.
- Tzai-Li, L.; Ching,L.; Gleeson, M.; Willians,C. (2004). The effects of pre-exercise high carbohydrate meals with different glycemic indices on blood leukocyte redistribution, IL-6 and hormonal responses during a subsequent prolonged exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Met*,14:647-656.
- Urhausen, A. (1995). Blood hormones as markers of training stresse and overtraining. *Sports Med*, 20 (4): 251 -276.
- Van Den Bergh, P.; Rozing, J.; Nagelkerken, L. (1993). Identification of two moieties of beta-endorphin with opposing effects on rat T-cell proliferation . *Immunology*, 79: 18 – 23.
- Van Eeden, S.F.; Bicknell, S.; Walker, B.A., Hogg, J.C. (1997a). Polymorphonuclear leukocytes L-selectin expression decreases as they age in circulation. *Am J Physiol*, 272: H401- H408.
- Van Eeden, S.F.; Kitagawa, Y.; Lawrence, E.; Hogg, J.C. (1997b). Polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow preferentially sequester lung microvessels. *Microcirculation*, 4: 369 – 380.
- Van Eeden, S.F.; Granton, J.; Hards, J.M.; Moore, B.; Hogg, J.C. (1999). Expression of the adhesion molecules on leukocytes thatdemarginate during acute maximal exercise. *J Appl Physiol*, 86: 970 – 976.
- Van Hall, G.; Van Der Vusse, G.J.; Soderlund, K.; Wagenmakers, A.J. (1995). Deamination of amino acids as a source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Physiol*, 486(3): 789 – 794.
- Vasankari, T.J.; Kujala, U.M.; Vasankari, T.M. (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defenses. *Free Rad Biol Med*, 22(3): 509 – 513.
- Venditti, P.; Di Meo, S. (1996). Antioxidants, tissue damage and endurance trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys*, 331: 63 – 68.
- Venditti, P.;Masullo, P.; Di Meo, S. (1999). Effect of training on H2O2 release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*, 331(1):63 – 68.
- Verde, T.J. (1992). Short-term exercise and immune function. In : *Exercise and disease*.R.R. FL : CRC press. 71 – 88.

- Vider, J.; Lehtmaa, J.; Kullisaar, T. et al. (2001). Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiol*, 7:263 – 270.
- Viña, J.; Gomez-Cabrera, M.C.; Lioret, A.; Pallardó, F.V et al. (2000). Free radical in exhaustive physical exercise: mechanism of production and protection by antioxidants. *IUBMB life*, 50: 271 – 277.
- Viru, A. et al. (1992). Stability and variability in hormonal responses to prolonged exercise. *Int J Sports Med*, 13(3): 230 – 235.
- Vizi, E.S. (1998). Receptor-mediated local fine-tuning by noradrenergic innervation of neuroendocrine and immune systems. *Ann N.Y. Acad Sci*, 851: 388 – 396.
- Volaard, N. B.; Shearman, J.P.; Cooper, C.E. (2005). Exercise-induced oxidative stress. *Sports Med*, 35 (12): 1045 – 1062.
- Wallace, J.W.; Houtchens, R.A.; Maxwell, J.C. et al. (1982). Mechanism of autoxidation for hemoglobins and myoglobins: promotion of superoxide production by protons and anions. *J Biol Chem*, 257(9):4966 – 4977.
- Wandlann, T.A.; Balese, R.M.; Broder, S.; Krakauer, R.S. (1978). Disorders of suppressor immunoregulatory cells in the pathogenesis of immunodeficiency and autoimmunity. *Ann. Inter. Med.* 88: 226 – 238.
- Warburton, D.E.; Welsh, R.C.; Haykowsky, M.J.; Taylor, D.A. (2002). Biochemical changes as result of prolonged strenuous exercise. *Br J Sports Med*, 36(4): 301 – 303.
- Waring, W.S.; Convery, A.; Mishra, V.; Shenkin, A.; webb, D.J; Maxwell, S.R (2003). Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in health adults. *Clin Sci (Lond)*. 105 (4): 425 – 430.
- Watson, T.; Lesley, K.; MacDonald-Wicks, Garg, M. (2005). Oxidative stress and antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *Int J Sports Nutr Exerc Metab*, 15(2): 131 – 146.
- Welch, K.D.; Davis, T.Z.; Van Eden, M.E.; Aust, S.D. (2002). Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Rad Biol Med*, 32: 577 – 583.
- Wehrlin, J.; Zuest, P.; Marti, B. (2006). Live high train low for 24 days increases hemoglobin mass and red cell volume in Elite endurance athletes. *J Appl Physiol*, 100: 1938 – 1945.
- Wilkinson, J.; Martin, D.; Adams, A.; Liebman, M. (2002). Iron status in cyclists during high-intensity interval training and recovery. *Int J Sports Med (abstract)*, 544 – 548.

- Winkelstein, A. (1994). Immunossuppressive therapy: In Stites, D.B. et al., *Basics & Clinical Immunology*. Connecticut: Appleton & Lange, 765 – 780.
- Witfield, J.B.; Pounder, R.E.; Neale, G. (1972). Serum g-glutamyltranspeptidase activity in liver disease. *Gut*, 3:702.
- Woodhouse, L.R.; Sutherland, B.; Lederer, L.; Lowe, M.; King, J. (1998). The effect of zinc intake on erythrocyte fragility in humans. *FASEB J*, 12A:1270.
- Wood, R.J. (2000). Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr*, 130: 1350S – 1354S.
- Woods, J.; Lu, Q.; Ceddia, M.; Lowder, T. (2000). Special feature for the olympics: effects of exercise on the immune system – exercise-induced modulation of macrophage function. *Int J Sports Med*, 21(suppl): 24 – 30.
- Wu, A.H. (2006). *Tietz clinical guide to laboratory tests*. St Louis, Missouri, USA: Saunders, 306 – 309.
- Yagi, k. (1992). Lipid peroxidis and exercise. In: V.Sato, J. Poortmans, Y. Oshida (eds). *Integration of medical and sports science*. *Med Sports Sci*, 37: 40 – 42. Karger, Basil.
- Yamada, M.; Suzuki, K.; Kudo, S.; Totsuka, M.; Nakaji, S. (2000). Effect of exhaustive exercise on human neutrophils in athlete. *Luminescence*, 15:15 – 20.
- Yan, H.; Kuroia, A.; Tanaka, H.; Shindo, M.; Kiyonaga, A.; Nagayama, A. (2001). Effect of moderate exercise on immune senescence in men. *Eur J Appl Physiol*, 86: 105 – 111.
- Yeldandi, A.; Rao, M.; Reddy, J. (2000). Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, 448(2):159 – 177.
- Yokoyama, H.; Ohgo, H.; Hirose, H.; Moriya, S.; Hibi, T.; Saito, I. (2006). An inverse association between serum gamma glutamyl transpeptidase activity and breslow's lifestyle index: its practical application for screening of subjects with unhealthy lifestyle. *J Occupational Health*, 48: 198 – 206.
- Yusof, A.; Leithauser, R.; Roth, H.; Beneke, R. (2007). Exercise-induced hemolysis is caused by protein modification and most evident during the early phase of an ultraendurance race. *J Appl Physiol*, 102: 582 – 586.
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74: 139 – 161.
- Zoopi, C.C.; Antunes-Neto, J.; Catanho, F.O.; Goulart, L.F.; Moura, N.; Macedo, D.V (2003). Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev Paul Educ Fis*, 17: 119 – 130.



