

---

**ARTIGO ORIGINAL**

---

# **Modulação dos marcadores de ativação linfocitária induzida por três diferentes competições de triathlon**

## ***Modulation of lymphocyte activation markers induced by three different competitions of triathlon***

Faber Sérgio Bastos Martins, D.Sc.\*, José Augusto Rodrigues dos Santos, D.Sc.\*\*

*\*Escola Superior de Educação de Fafe – ESEF \*\*Faculdade de Desporto – Universidade do Porto*

---

### **Resumo**

**Introdução:** A ativação do sistema nervoso simpático durante o exercício físico influencia a resposta imunológica através da produção e libertação de catecolaminas e glucocorticóides, responsáveis pela redistribuição dos linfócitos, exercendo uma ação imunossupressora sobre o organismo. **Objetivo:** Analisar os efeitos de três diferentes provas de triathlon na modulação dos marcadores de ativação linfocitária. **Métodos:** Foram estudados 10 atletas masculinos (31,5 ± 1,2 anos; 69,3 ± 1,9 kg; 177,7 ± 1,4 cm; 22,0 ± 0,8 de IMC e 10,1 ± 2,2 % GC) divididos em grupos elite e não-elite. Foram recolhidas amostras de sangue venoso periférico antes e imediatamente após as provas. Utilizou-se estatística descritiva, testes não-paramétricos de Wilcoxon e Mann-Whitney e coeficiente de correlação de Spearman. **Resultados:** Foram observados, após o TL, aumentos da contagem

linfocitária do fenótipo TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (reguladoras) nos grupos elite (151,1%, p = 0,015) e não-elite (83,8%, p = 0,000). O biomarcador CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69 registou um comportamento conflitual após o TL, tendo aumentado 87,5% (p = 0,009) no grupo elite e diminuído 124,5% (p = 0,023) nos não-elite. O fenótipo citotóxico CD8<sup>+</sup>CD127 sofreu reduções em todas as provas, somente no grupo elite. Após o TO observou-se um incremento da contagem das células que expressam o marcador CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> em ambos os grupos (p < 0,05). **Conclusão:** Os resultados encontrados sugerem que a intensidade e a duração das provas de triathlon modulam o comportamento dos biomarcadores de ativação linfocitária em função do nível do treino dos triatletas.

**Palavras-chave:** leucocitose, linfopenia, cortisol, catecolaminas, interleucinas.

Recebido em 17 de janeiro de 2014; aceito em 16 de abril de 2014.

**Endereço de correspondência:** Faber Sérgio Bastos Martins, Instituto de Estudos Superiores de Fafe, Rua Universitária, Apartado 178, 4824-909 Medelo Portugal, E-mail: fabermartins27@iesfafe.pt, José Augusto Rodrigues dos Santos, jaugusto@fade.up.pt

---

## Abstract

**Introduction:** Activation of the sympathetic nervous system during exercise influences the immune response through the production and release of catecholamines and glucocorticoids, responsible for the redistribution of lymphocytes, exerting an immunosuppressive action on the organism. **Objective:** To analyze the effects of three different events of triathlon in the modulation of lymphocyte activation markers. **Methods:** We studied 10 male athletes ( $31.5 \pm 1.2$  years,  $69.3 \pm 1.9$  kg,  $177.7 \pm 1.4$  cm, BMI  $22.0 \pm 0.8$  and  $10.1 \pm 2.2\%$  bf) divided into groups elite and non-elite. We collected samples of peripheral venous blood before and immediately after the events. We used descriptive statistics, nonparametric tests of Wilcoxon and Mann-Whitney and Spearman correlation coefficient. **Results:** We

observed after LT, count increases lymphocyte phenotype TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (regulatory) in elite groups (151.1%,  $p = 0.015$ ) and non-elite (83.8%,  $p = 0.000$ ). The biomarker CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69 showed a conflictual behavior after LT, rising 87.5% ( $p = 0.009$ ) in elite and decreased 124.5% ( $p = 0.023$ ) in the non-elite. The cytotoxic phenotype CD8<sup>+</sup>CD127 was reduced in all the tests, only in the elite group. After OT we observed an increase in the count of cells expressing the marker CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells in both groups ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The results suggest that the intensity and duration of triathlon events modulate the behavior of biomarkers of lymphocyte activation as a function of the level of training of triathletes.

**Key-words:** leukocytosis, lymphopenia, cortisol, catecholamines, interleukins.

## Introdução

O exercício físico, enquanto modelo indutor de stress, promove a alteração do estado de homeostasia orgânica, conduzindo a reorganização da resposta de diferentes sistemas, entre os quais, o sistema imunológico [1]. A ativação do sistema nervoso simpático durante o exercício físico influencia a resposta imunológica através da produção e liberação de catecolaminas e glucocorticóides, responsáveis pela redistribuição dos linfócitos, exercendo uma ação imunossupressora sobre o organismo [2]. O recrutamento de neutrófilos e linfócitos para o compartimento vascular durante o exercício parece ser mediado pela ação das catecolaminas, principalmente pela adrenalina, e em menor grau, pela noradrenalina [3].

A concentração sanguínea desses mediadores aumenta de forma linear com a duração do esforço e exponencialmente com a intensidade [4]. No entanto, a ativação 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 [5]. Observaram-se, em alguns estudos, aumentos temporários nas concentrações dos linfócitos (linfocitose) 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 subpopulação CD45RO<sup>+</sup> [6]. É consensual na literatura a observação de uma linfocitose pós-esforço, sendo o seu aumento menos pronunciado quando comparado a aumento dos neutrófilos [2,6,7]. A realização de esforços muito intensos pode provocar uma redução da concentração dos linfócitos (linfopenia) 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 [4]. Neste sentido, o objetivo do presente estudo converge para a compreensão da modulação dos biomarcadores de ativação linfocitária em resposta as diferentes exigências impostas por diferentes competições de triathlon.

## Material e métodos

### Amostragem

A amostra foi constituída por 10 atletas masculinos da Federação Portuguesa de Triathlon, com idade média de  $31,5 \pm 1,2$  anos; massa corporal de  $69,3 \pm 1,9$  kg; estatura corporal de  $177,7 \pm 1,4$  cm; índice de massa corporal de  $22,0 \pm 0,8$  kg/m<sup>2</sup> e percentagem de gordura corporal  $10,1 \pm$

2,2; divididos em 2 grupos (Elite e não-Elite) de acordo com as respectivas posições no ranking nacional das provas de triathlon longo (TL), triathlon olímpico (TO) e triathlon *sprint* (TS).

## Procedimentos

- *Determinação antropométrica:* Para a avaliação da estatura corporal dos atletas foi utilizado o estadiômetro (marca Rudolf Martin) e para a determinação da massa corporal (kg) e percentagem de gordura corporal (%GC) dos atletas foi realizada a pesagem em balança digital de bioimpedância (marca Tanita TBF 305).
- *Determinação hematológica:* No que concerne a colheita de sangue e preparação, todos os atletas integrantes da amostra foram submetidos a duas colheitas sanguíneas, a primeira nos instantes precedentes a cada uma das provas e a segunda, imediatamente após o seu término, sendo estas realizadas através da punção venosa na região cutânea antecubital anterior, com álcool a 95%, totalizando 60 amostras. Todas as amostras foram colhidas em tubos ETDA-K<sub>3</sub> de 4,5ml (BD Vacutainer) para a determinação dos biomarcadores imunológicos. 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.
- *Determinações imunológicas:* Relativamente a imunomarcção, os tubos de ensaio de polipropileno de 5 ml 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 I.

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.

*Determinação das subpopulações linfocitárias:* As amostras contendo  $1 \times 10^6$  células mononucleares em solução FCS-RPMI-1640 foram tratadas com 10µl 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).

- *Procedimentos estatísticos:* Foi utilizado o teste de Wilcoxon para medidas repetidas, e o 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 analisados nos programas Excel™versao 2010 e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS™. Versão 16.0).

**Tabela I** - Identificação dos anticorpos monoclonais utilizados na determinação da imunomarcção.

		Caracterização dos linfócitos T				
		FL1-FITC	FL2-PE	FL3-ECD	FL4-PC5	FL5-PC7
<b>Tubos/</b>	CD8 (IOT;	CD 69 (IOT;	CD45RO (IOT;	CD28 (IOT;	CD3	
<b>Anticorpos</b>	B9.11)	TP1.55.3)	UCHL1 )	CD28,2)	(IOT;UCHT1)	
<b>monoclonais</b>	HLA-DR	CD 127 (IOT;	CD4 (IOT; SFCL-	CD25		
	(IOT; Immu-357)	R34.34)	12T4D11)	(IOT;B1,49,9)		

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

**Resultados**

Ambos os grupos evidenciaram aumentos nas concentrações dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores-CD25<sup>+</sup> (importantes na homeostase da tolerância periférica), sendo mais pronunciado no grupo não-Elite. O comportamento do marcador de ativação CD69<sup>+</sup> se revelou conflitual, uma vez que no grupo Elite, verificou-se uma diminuição de 87,5%, em termos absolutos (p = 0.009), enquanto nos triatletas não-Elite foi registrado um aumento de 124,5% (p = 0.023).

Relativamente aos marcadores de ativação dos linfócitos citotóxicos T CD8<sup>+</sup>, constata-se uma diminuição nos respectivos grupos, referente ao fenótipo CD127<sup>-</sup>, enquanto no fenótipo CD45RO<sup>+</sup> foi observado um incremento do valor

médio pós-prova, sendo este mais pronunciado no grupo Elite (p = 0,004).

O fenótipo T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (regulador) registrou, nos atletas de Elite, uma redução de 27,8% no valor médio pós-esforço, enquanto no grupo não-Elite observou-se um aumento de 57,9% (p = 0,044) no fenótipo CD45RO<sup>+</sup>.

Constata-se a diminuição de 157,4% (p = 0,039) na concentração dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> somente no grupo Elite, quando expressa em termos absolutos, enquanto relativamente ao grupo não-Elite, apenas foi observada uma diminuição percentual de 12,8% (p = 0,025). De salientar ainda, a diminuição de 167,8% (p = 0,018) verificada no fenótipo CD45RO<sup>+</sup> dos triatletas não-Elite.

**Tabela II - Efeito da prova de triathlon longo nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup>.**

Linfócitos T CD 4+	Triatletas Elite (n = 5)			Triatletas não-Elite (n = 5)		
	± Dp		p	± Dp		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD4+ reg (%)	7,8 ± 4,6	15,0 ± 6,7*	0,012	6,2 ± 1,7	15,6 ± 3,6**	0,005
TCD4+reg (103/μL)	33,6 ± 13,2	84,4 ± 27,5*	0,015	31,6 ± 20,2	57,0 ± 23,0**	0,000
CD 45 RO+ (%)	55,0 ± 14,8	60,0 ± 14,5	0,049	71,0 ± 12,6	76,0 ± 14,9	0,102
CD 45RO+(103/μL)	217,4 ± 81,7	309,8±69,7*	0,024	285,4 ± 80,7	334,8 ± 117	0,080
CD 69+ (%)	2,6 ± 2,0	1,4 ± 1,1	0,548	2,6 ± 2,0	4,0 ± 1,5	0,174
CD 69+ (103/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 (± Dp). \* p < 0,05, vs Pré-Prova, \*\* p < 0,01, vs. Pré-Prova.

**Tabela III - Efeito da prova de triathlon longo nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8<sup>+</sup>.**

Linfócitos T CD 8+	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	± Dp		p	± Dp		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD 127- (%)	34,8 ± 15,8	18,2 ± 8,5*	0,043	52,8 ± 17,3	31,6 ± 10,2*	0,025
TCD 127- (103/μL)	99,2 ± 38,1	30,0 ± 4,4*	0,039	154,8 ± 97,2	59,4 ± 19,4*	0,043
CD 45 RO+ (%)	25,2 ± 13,2	50,0 ± 18,7*	0,026	39,2 ± 13,5	47,4 ± 17,6*	0,040
CD 45RO+(103/μL)	53,4 ± 31,7	117,6± 68,6*	0,043	82,8 ± 40,7	123,4 ± 23,9*	0,028

\* p < 0,05, vs Pré-prova, \*\*p < 0,01, vs Pré-prova

**Tabela IV - Efeito da prova de triathlon olímpico nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4<sup>+</sup>.**

Linfócitos T CD4+	Triatletas Elite (n = 5)			Triatletas não-Elite (n = 5)		
	± Dp		p	± Dp		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD4+ reg (%)	9,4 ± 2,0	11,8 ± 4,7	0,118	10,0 ± 1,5	12,2 ± 3,5	0,180
TCD4+reg (103/μL)	68,0 ± 16,2	52,8 ± 19,6*	0,043	64,4 ± 21,4	55,2 ± 24,7	0,097
CD 45 RO+ (%)	46,6 ± 12,5	48,2 ± 13,8	0,412	48,2 ± 11,9	51,0 ± 12,7	0,065
CD 45RO+(103/μL)	215,4 ± 82,0	344,2 ± 75,9*	0,044	216,7 ± 90,5	319,0±93,3*	0,043

\* p < 0,05, vs Pré-Prova; \*\*p < 0,01, vs Pré-Prova

**Tabela V** - Efeito da prova de triathlon olímpico nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8\*.

Linfócitos T CD8+	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	± Dp		p	± Dp		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD 127- (%)	30,4 ± 15,1	18,6 ± 7,6	0,060	36,8 ± 9,4	24,0 ± 13,2*	0,025
TCD 127- (103/μL)	121,0 ± 67,0	47,0 ± 26,6*	0,039	141,2 ± 79,3	53,5 ± 22,6	0,082
CD 45 RO+ (%)	38,6 ± 17,1	26,6 ± 10,1*	0,026	38,8 ± 10,3	24,7 ± 13,6*	0,020
CD 45RO+(103/μL)	143,2 ± 76,0	52,0 ± 21,5	0,052	139,8 ± 40,7	52,2 ± 13,0*	0,018

\* p &lt; 0,05, vs. Pré-Prova

**Tabela VI** - Efeito da prova de triathlon sprint nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD4\*.

Linfócitos T CD4+	Triatletas Elite (n = 5)			Triatletas não-Elite (n = 5)		
	± Dp		p	± Dp		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD4+ reg (%)	18,2 ± 8,8	9,5 ± 1,7	0,068	15,5 ± 7,5	10,2 ± 2,2	0,238
TCD4+reg(103/μL)	126,7 ± 44,4	66,7 ± 24,4*	0,030	116,0 ± 38,0	67,2 ± 27,3*	0,038
CD 45 RO+ (%)	41,0 ± 5,4	43,2 ± 2,2	0,340	45,7 ± 3,7	50,5 ± 3,3**	0,002
CD 45RO+(103/μL)	279,0 ± 46,8	382,7 ± 70,8	0,182	303,0 ± 64,6	388,7 ± 67,3	0,221

\* p &lt; 0,05, vs. Pré-Prova

**Tabela VII** - Efeito da prova de triathlon sprint nos marcadores de activação do fenótipo linfocitário TCD8\*.

Linfócitos T CD 8+	Triatletas Elite (n=5)			Triatletas não-Elite (n=5)		
	± Dp		p	± Dp		p
	Pré-Prova	Pós-Prova		Pré-Prova	Pós-Prova	
T CD 127- (%)	61,2 ± 18,3	14,0 ± 2,8*	0,022	56,0 ± 13,2	17,0 ± 4,2*	0,018
TCD 127- (103/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 (103/μL)	22,0 ± 11,0	15,0 ± 9,0	0,704	36,0 ± 13,4	14,2 ± 8,0*	0,045
CD 45 RO+ (%)	20,7 ± 5,6	28,2 ± 5,7	0,080	25,5 ± 6,4	31,7 ± 9,5	0,157
CD 45RO+(103/μL)	73,2 ± 25,3	126 ± 56,0	0,111	84,2 ± 46,9	131,5 ± 39,8*	0,049

\* p&lt;0.05, vs Pré-Prova

Uma leitura do comportamento dos marcadores de activação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> denuncia as reduções 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.

Verifica-se, em ambos os grupos de triatletas, um decréscimo dos valores absolutos pós-prova, relativos ao marcador de activação CD127<sup>-</sup> (p < 0,01). Relativamente a activação das células memória CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> é de salientar o aumento de 56,1% (p = 0,049) registrado pelos triatletas não-Elite.

## Discussão

A activação do sistema nervoso simpático, por meio do aumento agudo dos níveis plasmáticos de catecolaminas durante os exercícios, nomea-

damente de carácter aeróbio, está associada a uma linfocitose expressiva e rápida, em resposta a libertação destas células provenientes dos órgãos linfóides periféricos [8,9]. Neste sentido, importa salientar que grau de linfocitose provocada pelo exercício físico parece variar consoante o estado de treino, sendo maior nos indivíduos não-treinados [10]. Conflituando com estes resultados, verificamos em todas as provas de triatlo analisadas no presente estudo, em ambos os grupos experimentais, uma significativa linfopenia pós-esforço, 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 [11]. Esta diminuição dos linfócitos circulantes após a realização

de esforços intensos e prolongados corrobora os resultados de estudos anteriores [12,13], e parece estar relacionada com o aumento dos níveis de cortisol, uma importante hormona de stress e potente precursor gluconeogénico, responsável por mobilizar as gorduras e proteínas no sentido da elevação da glucose sanguínea [14]. O aumento dos níveis plasmáticos de cortisol ocorre em função da intensidade do exercício físico, sendo a intensidade crítica de 60%  $VO_{2max}$  requerida para a sua libertação [11]. Adicionalmente, importa salientar o fato da ação do cortisol se mostrar retardada quando comparada ao aumento dos níveis de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), devido ao mecanismo que envolve a complexa interação receptor-ligante com os locais de ligação dos glucocorticóides no núcleo das células alvo alterando a expressão dos genes e síntese de novas proteínas [11]. 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 [15]. Embora o valor registrado após a prova de triathlon longo se mostre ligeiramente superior (1,6), verificamos que reflecte, principalmente, um acréscimo significativo dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o qual pode estar associado a uma situação de imunossupressão [4,16]. Nossos dados estão em concordância com o estudo de Natale *et al.* [17], o qual sugere que o estado de imunossupressão é principalmente evidenciado em situação de esforços intensos de duração prolongada. Contudo, 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 [18]. 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 [19]. 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 [20]. 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 triathlon 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 [21]. Este comportamento foi somente observado na prova de triathlon longo, o que sugere que a duração 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 [21].

Inerente à análise dos diferentes marcadores de activação celular em resposta as diferentes provas de triathlon 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, sendo a sua expressão considerada como um importante determinante da resposta funcional dos linfócitos T a uma diversidade de estímulos [22]. 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 atuar na transmissão de sinais co-estimulatórios que conduzem a proliferação, secreção de citocinas e citotoxicidade [22]. 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 triathlon longo registrada 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.* [23] e DuBose *et al.* [24]. Entretanto, Ronsen *et al.* [25] 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 à 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 [20]. 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 triathlon longo pode-se prender, em parte, aos níveis de cortisol aumentados durante a realização de esforços prolongados e intensos [26], os quais poderiam provocar a inibição da produção de interleucina 1 (IL-1) pelos monócitos e consequentemente, reduzir a estimulação dos linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), 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 [27].

Relativamente ao comportamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> (células memória) foi constatado na prova de triathlon olímpico, em ambos os grupos de triatletas, um aumento dos respectivos valores absolutos pós-prova, corroborando os resultados de estudos anteriores [6], nos quais o aumento na relação CD45RO<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> decorreu de uma maior mobilização da subpopulação CD45RO<sup>+</sup>. De fato, está bem documentado na literatura que comparativamente as células CD45RA<sup>+</sup> (células naive), as células CD45RO<sup>+</sup> apresentam aumentada capacidade de interacção com o endotélio ativado [28]. Adicionalmente, Van Kooten *et al.* [29] reportam o fato das células

CD45RO<sup>+</sup> serem produtoras de interleucinas (IL-1 e IL-6) sugerindo, assim, a possibilidade destas células T memória estarem envolvidas nos processos de inflamação aguda e crónica, e potencialmente, na resposta inflamatória após a realização exercício predominantemente excêntrico. Nossos dados reforçam esta suposição, dado o fato das células CD45RO<sup>+</sup> presentes nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> dos triatletas do grupo não-Elite, os quais evidenciaram uma leucocitose mais pronunciada comparativamente aos triatletas de Elite, mostrarem-se significativamente aumentados após as respectivas provas analisadas, corroborando a correlação entre leucocitose pós-esforço e ativação e/ou mobilização dos diferentes fenótipos linfocitários na resposta inflamatória tecidual induzida pelo exercício físico. Para além da comprovada interdependência entre os referidos indicadores, importa aduzir que em conformidade com o advogado por Gabriel *et al.* [30], 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 estado de ativação e, talvez, uma maturação mais pronunciada destas células.

## Conclusão

Em linha de convergência com as conclusões obtidas neste estudo, constata-se que a intensidade e a duração das provas de triathlon modulam o comportamento dos biomarcadores de ativação linfocitária em função do nível de prestação competitiva dos triatletas.

## Referências

1. Pyne DB, Gleeson M. Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *Int J Sports Med* 1998;19:138-94.
2. Gleeson M. Immune function and exercise. *Eur J Sports Sci* 2005;4(3):52-65.
3. Ottaway CA, Husband AJ. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today* 1994;15:511-7.
4. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and immune system: regulation, integration and adaptation. *Psic Ver* 2000;80(3):1055-81.
5. Sothmann MS, Hart B, Horn TS. Plasma catecholamine response to acute physiological stress

- in humans: relation to aerobic fitness and exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 1991;23:860-7.
6. Lancaster GL, Halson SL, Khan Q, Gleeson M. Effect of exhaustive exercise and intensified training on human T-lymphocyte CD45RO expression. *J Physiol* 2003;548P:096.
  7. Mackinnon LT. Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32(7):S369-S376.
  8. Ronsen O, Pedersen BK, Haug B, Hostmark A. 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* 2004;14(1):39-48.
  9. Nieman DC, Dumke CI, Lind R. Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160km race. *Brai Behav Immun* 2005;19:398-403.
  10. Ortega, E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise. *Exerc Immunol Rev* 2003;9:70-93.
  11. Gleeson M. Immune functions in sport and exercise. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2006.
  12. Gabriel H, Schwarz L, Born P, Kindermann W. Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte sub-populations into the circulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 1992;65:529-34.
  13. Sharp N, Koutedakis Y. Sports and overtraining syndrome: immunological aspects. *Brit Med Bull* 1992;48(3):518-33.
  14. VanRensburg JP, Kielblock AJ, VanderLinde A. Physiological and biochemical changes during a triathlon competition. *Int J Sports Med* 1986;7:30-35.
  15. Wieggers GJ, Croiset G, Reul J, De Kloet E. Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. *Am Physiol* 1993;265:825-30.
  16. Ceddia M, Price M, Mc Auley E, Woods J. Differential leukocytosis and lymphocyte mitogenic response to acute maximal exercise on the young and old. *Med Sci Sports Exerc* 1999;31(6):829-36.
  17. Natale VM, Brenner IK, Moldoveanu AI. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *São Paulo Med Journal* 2003;121(1):9-14.
  18. Wandlann TA, Balese RM, Broder S, Krakauer RS. Disorders of suppressor immunoregulatory cells in the pathogenesis of immunodeficiency and autoimmunity. *Ann Inter Med* 1978;88:226-38.
  19. Faure M, Gapin L, Viret C. Stressing the virtues of the immune system. *Microbes Infect* 2004;6(10):960-64.
  20. Gaillard RC. Neuroendocrine-immune system interactions-the immune hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endoc Metabol (TEM)* 1994;7(5):303-9.
  21. Urhausen A. Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med* 1995;20(4):251-76.
  22. Testi R, Phillips J, Lanier L. T cell activation via CD69. *J Immunol* 1989;143:1123-8.
  23. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiol* 2001;7:263-70.
  24. DuBose DA, Wenger CB, Flinn SA. Distribution and mitogen response of peripheral blood lymphocytes after exertional heat injury. *J Appl Physiol* 2003;95:2381-89.
  25. Ronsen O, Pedersen BK, Oritsland TR, Bahr R, Kjeldsen-Kragh J. Leukocytes counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J Appl Physiol* 2001;91:425-34.
  26. Tremblay MS. Methodological and statistical considerations for exercise-related hormone evaluations. *Sports Med* 1995;20(2):90-108.
  27. Reichlin S. Neuroendocrinology. In: Wilson JD et al. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998. p.165-248.
  28. Lichtman A, Ding H, Henault G, Vachino R, Camphausen D. CD45RA-RO-(memory) but not CD45RA-RO-(naive) T cells roll efficiently on E- and P- selecting and vascular cell adhesion molecule-1 under flow. *J Immunol* 1997;158:3640-50.
  29. Van Kooten C, Rensink I, Pascual-Salcedo D, Aarden L. Monokine production by human T cells IL-1 alpha production restricted to memory T cells. *J Immunol* 1991;146:2654-8.
  30. Gabriel H, Schmitt B, Urhausen A, Kindermann W. Increased CD45RA+ CD45RO+ cells indicate active T cells after endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:1352-7.
-