
Artigo original

Alterações agudas induzidas por uma prova de triathlon longo em diferentes biomarcadores enzimáticos e da função imune

Acute changes induced by a long triathlon in different enzymatic and immune function biomarkers

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

*Faculdade de Desporto – Universidade do Porto

Resumo

Objectivo: Analisar as alterações hematológicas agudas induzidas por uma prova de triathlon longo. Avaliou-se o comportamento de diversos biomarcadores enzimáticos e da função imune em atletas portugueses masculinos de triathlon. **Material e métodos:** 10 atletas seniores 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:** Verificou-se o aumento da actividade das enzimas CK e AST ($p < 0,05$) em ambos os grupos. O aumento da actividade da enzima GGT ($p < 0,05$) ocorreu somente no grupo elite. Foi constatado, em ambos os grupos, um aumento da contagem leucocitária, fundamentalmente expressa pelo aumento da contagem de neutrófilos ($p < 0,05$). Após a prova, registou-se a diminuição da relação CD4/CD8 e aumento das concentrações dos linfócitos T CD3⁺CD8⁺, T CD4⁺reg e T CD4⁺CD69⁺ nos atletas dos grupos não-elite. **Conclusão:** Os resultados encontrados sugerem que a intensidade e a duração da prova de triathlon condicionam as respostas dos diversos biomarcadores analisados em função do nível de treino dos atletas.

Palavras-chave: triathlon, treino, actividade enzimática, sistema imune, linfócitos.

Abstract

Objective: To assess acute hematological changes induced by a long triathlon. We evaluated the behavior of various enzymatic and of immune function biomarkers in male Portuguese triathlon athletes. **Methods:** 10 male senior athletes (31.5 ± 1.2 years, 69.3 ± 1.9 kg, 177.7 ± 1.4 cm, BMI 22.0 ± 0.8 and BF 10.1 ± 2.2%) were divided into groups elite and non-elite. Samples were taken from 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:** There was increased activity of CK and AST ($p < 0.05$) in both groups. The increased activity of the enzyme GGT ($p < 0.05$) occurred only in the elite group. It was found in both groups, an increase in leukocyte count, mainly expressed as an increase in neutrophil count ($p < 0.05$). After the race, there was a decrease in the CD4/CD8 ratio and increased concentrations of T lymphocytes CD3⁺CD8⁺, CD4⁺T reg and CD4⁺CD69⁺ for athletes from non-elite groups. **Conclusion:** The results suggest that the intensity and duration of triathlon affect the responses of several biomarkers analyzed according to the level of training of athletes.

Key-words: triathlon, training, enzymatic activity, immune system, lymphocytes.

Recebido 10 de novembro de 2011; aceito 16 de novembro de 2011.

Endereço de correspondência: Faber Sérgio Bastos Martins, Instituto de Estudos Superiores de Fafe, Rua Universitária, Apartado 178, 4824-909 Medelo Portugal, E-mail: faberbastos.martins27@gmail.com

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 triathlon 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 e com intensidades superiores a 65% VO_{2max} [1,2]. Estudos têm demonstrado que atletas de esforços prolongados evidenciam um aumento da actividade de determinadas proteínas como a creatina-quinase (CK), aspartato-aminotransferase (AST), mioglobina (Mb) e a presença de fragmentos de cadeia de miosina pesada em resposta a alteração na permeabilidade da membrana celular, o que permite, ainda que indirectamente, determinar o grau de agressão imposto pelo exercício [3-5]. Adicionalmente, o aumento do volume mitocondrial, a activação lisossómica, a disrupção e vacuolização sarcoplasmática constituem importantes alterações histológicas musculares induzidas pelos esforços intensos e prolongados, principalmente aqueles nos quais se verifica uma elevada incidência de contracções excêntricas [6-8].

Actualmente, as provas de triathlon têm merecido atenção relevante no que concerne ao estudo da performance em função das alterações de diversos biomarcadores, principalmente nas provas do triathlon 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 hematólogicas [9-11]. 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 [12-14]. 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 *natural killer* (NK) [15,16]. Contudo, o comportamento dos indicadores bioquímicos 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 portugueses masculinos

de triathlon de elevado nível competitivo (elite) e praticantes regulares (não-elite), o efeito de uma prova de triathlon longo composta por 1,9 km de natação, 90 km de ciclismo e 21,1 km de corrida, na modulação da resposta aguda de diversos biomarcadores enzimáticos 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.

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 $22,0 \pm 0,8$ e percentagem de gordura corporal $10,1 \pm 2,2$, participantes das provas nacionais e internacionais na referida distância. Os atletas foram divididos em 2 grupos (elite e não-elite) de acordo com as respectivas posições no ranking nacional e categoria de inscrição em competições internacionais pela International Triathlon Union (ITU).

Procedimentos

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). 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_3 de 4,5ml (BD Vacutainer) para a determinação dos parâmetros bioquímicos e imunológicos.

Análise bioquímica: Para análise dos parâmetros bioquímicos efectuados no soro, foi utilizada a centrifugação a 3000 rpm (centrífuga JOUAN CR3). Foram analisados através do método turbidimétrico a 340 nm, as actividades séricas das enzimas creatina-quinase (CK), aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e gama-glutamyl-transferase (GGT).

Análise imunológica: 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 μ L) para os respectivos tubos, em conformidade com o apresentado na Tabela I

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

	Caracterização dos Linfócitos T				
	FL1-FITC	FL2-PE	FL3-ECD	FL4-PC5	FL5-PC7
Tubos/	CD8	CD 69	CD45RO	CD28	CD3 (IOT;UCHT1)
Anticorpos	(IOT; B9.11)	(IOT; TP1.55.3)	(IOT; UCHL1)	(IOT; CD28,2)	
monoclonais	HLA-DR	CD 127	CD4	CD25	
	(IOT; Immu-357)	(IOT;R34.34)	(IOT; SFC112T4D11)	(IOT;B1,49,9)	

FITC - 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). Em seguida, os tubos foram colocados no frigorífico durante 15 minutos, procedendo-se, logo após, à aquisição das amostras no citómetro de fluxo (Cytomics FC500 da Beckman Coulter), 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 FACScomp software (Immunocytometry system). Do sangue venoso periférico heparinizado, 3 ml 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 (10 ml), sendo posteriormente suspensas em solução FCS-RPMI-1640. As amostras contendo 1×10^6 células mononucleares em solução FCS-RPMI-1640 foram tratadas com 10µl de anticorpos mo-

noclonais 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. 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™2000 e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS™, Versão 16.0).

Resultados

De acordo com os dados expostos na Tabela II, constata-se, nos atletas de elite, o aumento das actividades das enzimas CK (109,3%, $p = 0,011$), AST (21,1%, $p = 0,016$) e GGT (17,3%, $p = 0,014$). Este comportamento, embora mais pronunciado nos atletas do grupo não-elite, foi somente verificado na actividade das enzimas CK (307,6%, $p = 0,043$) e AST (55,7%, $p = 0,014$).

Tabela II - Efeito da prova de triathlon longo nas diferentes actividades enzimáticas dos triatletas.

Enzimas	Triatletas elite (n = 5)		Triatletas não-elite (n = 5)	
	Pré-Prova	Pós-Prova	Pré-Prova	Pós-Prova
CK (U.L ⁻¹)	268,6 ± 135,4	562,4 ± 194,7*	190,4 ± 30,0	776,2 ± 458,7*
AST (U.L ⁻¹)	39,8 ± 9,1	48,2 ± 11,0*	26,2 ± 2,1	40,8 ± 8,8*
ALT (U.L ⁻¹)	25,4 ± 7,3	27,2 ± 7,8	17,4 ± 5,5	20,6 ± 6,1
GGT (U.L ⁻¹)	18,4 ± 2,1	21,6 ± 1,2*	21,0 ± 6,0	23,6 ± 7,2

Nota: Valores expressos pela média ± desvio-padrão. * $p < 0,05$, vs Pré-Prova.

Tabela III - Efeito da prova de triathlon longo nas diferentes subpopulações leucocitárias dos triatletas.

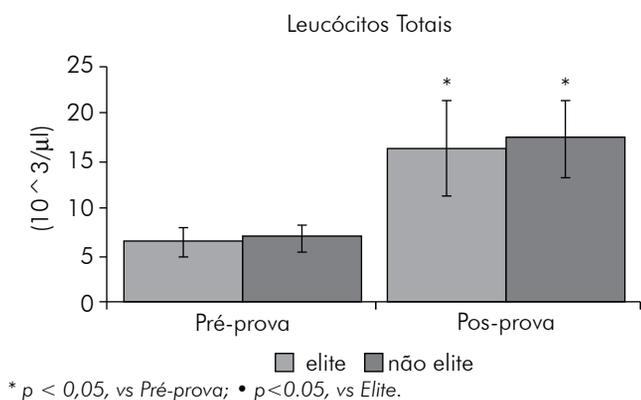
Parâmetros Imunológicos	Triatletas Elite (n = 5)		Triatletas não-Elite (n = 5)	
	Pré-Prova	Pós-Prova	Pré-Prova	Pós-Prova
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2*	0,6 ± 0,4	0,8 ± 0,4*
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	2,2 ± 1,0	1,2 ± 0,6*	2,3 ± 1,0	1,3 ± 0,5*
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	3,4 ± 1,7	14,4 ± 4,7*	4,0 ± 1,0	15,0 ± 3,6*
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,3 ± 1,5	16,3 ± 5,0*	6,7 ± 1,4	17,5 ± 4,1*

Valores expressos pela média ± desvio-padrão. * $p < 0,05$, vs Pré-Prova.

O comportamento dos indicadores da função imune após a prova pode ser observado na Tabela III. Uma análise dos dados permite-nos verificar um aumento significativo dos leucócitos totais, em ambos os grupos de atletas, sendo observado acréscimos de 158,7% ($p = 0,003$) e 161% ($p = 0,001$) nos grupos elite e não-elite, respectivamente. Esta leucocitose reflecte principalmente um aumento dos neutrófilos (neutrofilia) pós-esforço, sendo este mais acentuado nos atletas do grupo elite (323,5%, $p = 0,002$) comparativamente ao grupo não-elite (275%, $p = 0,003$).

De forma a analisar o efeito crónico das sucessivas cargas de treino na resposta imune dos atletas presentes neste estudo, foram comparadas as concentrações leucocitárias intergrupos nos momentos pré e pós-prova, conforme apresentado na Figura 1, não tendo sido constatadas diferenças significativas. Contudo, importa reter que os atletas do grupo não elite, apresentaram valores basais de leucócitos totais ligeiramente mais elevados quando comparados com atletas de elite ($6,7 \pm 1,4$ vs $6,3 \pm 1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, $p = 0,834$).

Figura 1 - Análise comparativa dos grupos experimentais de triatletas relativamente a concentração dos leucócitos totais nos momentos pré e pós-prova de triathlon longo.

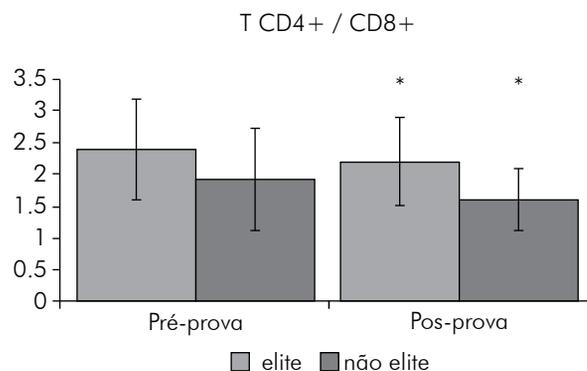


A relação dos linfócitos T CD4⁺/CD8⁺, utilizada como indicador de imunossupressão, foi alterada ao término da prova, sendo a diminuição observada ($1,9 \pm 0,8$ vs $1,6 \pm 0,5$; $p = 0,042$) somente no grupo dos atletas não-elite, de acordo com o exposto na Figura 2.

Foi encontrada uma diferença intergrupos de 26,3% referente aos valores basais ($2,4 \pm 0,8$ vs $1,9 \pm 0,8$; $p = 0,036$) da relação, sendo também constatada uma diferença de 37,5% nos valores pós-prova dos grupos de atletas analisados ($2,2 \pm 0,7$ vs $1,6 \pm 0,5$; $p = 0,018$).

Ambos os grupos de atletas evidenciaram alterações nos indicadores de activação do fenótipo linfocitário T CD4⁺ (Tabela IV), em particular nas células T CD4⁺ reguladoras, as quais assumem relevante importância na homeostase da tolerância periférica.

Figura 2 - Análise comparativa dos grupos de triatletas relativamente ao efeito da prova de triathlon longo na relação dos linfócitos T CD4⁺/ T CD8⁺.



* $p < 0,05$, vs Pré-prova; • $p < 0,05$, vs elite.

Discussão

O exercício físico intenso e prolongado provoca múltiplas alterações bioquímicas cuja interpretação pode, por vezes, conduzir a resultados conflitantes, 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 [5,17]. Os indicadores bioquímicos CK e AST utilizados no presente estudo constituem marcadores de lesão muscular, dado o facto de serem proteínas que, quando libertadas para o espaço extracelular, em resposta ao exercício físico, permitem determinar, ainda que de forma indirecta, a existência de lesões [3,5]. As enzimas ALT e GGT encontram-se em maior concentração no fígado e epitélios dos ductos biliares e renais, respectivamente [18], o que pode sugerir a possibilidade de lesão hepática, quando observado um aumento significativo dos níveis séricos destas enzimas em resposta ao exercício físico [19].

A elevada variabilidade inter-individual pós-prova observada no comportamento da enzima CK, expressa pelos acentuados desvios-padrão, corrobora estudos anteriores realizados com diferentes atletas de provas de resistência [4,17,20,21]. Esta variabilidade pode ser, em parte, justificada pelo nível de treino do atleta, 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 [4,22,23]. Neste contexto, a atenuação da expressão da actividade da enzima CK pós-prova, evidenciada pelos atletas de elite, reforça o denominado efeito protector da carga repetida [24], promovendo nestes atletas importantes adaptações metabólicas ao esforço prolongado exaustivo, reduzindo o nível de agressão muscular induzida pelo exercício. Esta resposta da actividade enzimática menos pronunciada por parte dos atletas de elite lhes confere a classificação de *low CK responders* [17], na

qual se observa uma curva individual dos valores absolutos pouco acentuada e que pode, de acordo com alguns autores, ser justificada por diferentes mecanismos, dentre os quais, 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 [25]. Relativamente aos elevados valores da actividade da enzima CK apresentados pelos atletas do grupo não-elite, uma justificativa plausível parece convergir para o efeito modulador da duração do esforço, facto que corrobora estudos anteriores com atletas de ultra-maratonas e triatlons longos, onde a dilatação do tempo de esforço é sugerida como factor determinante na libertação desta proteína para a circulação [3,26,27]. A semelhança do observado na actividade da CK, o aumento da actividade da enzima AST, apresentada por ambos os grupos de atletas, consubstancia no diagnóstico da ocorrência de lesão no tecido muscular esquelético [21,28]. Contudo, a sua menor expressão pós-prova pode ser justificada pelas suas elevadas dimensões moleculares, o que resulta numa dificuldade acrescida da sua remoção, via sistema linfático [3,27,29]. O aumento significativo da actividade da enzima GGT, constatada nos atletas de elite, constitui um indicador sensível de distúrbios hepáticos [30], possuindo também um importante papel modulador na velocidade das vias glicolítica e oxidativa [31]. Este aumento da actividade parece estar relacionado, segundo alguns autores, com a redistribuição do fluxo sanguíneo e o aumento da temperatura corporal induzidos pelo exercício físico intenso e prolongado, facto que poderia resultar em danos hepatocelulares provocados por uma isquemia [32,33].

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 de esforço realizado [14,34,35]. Esta leucocitose pós-esforço é normalmente expressa pelo aumento de neutrófilos [12-14,36,37], e se mostra mais pronunciada em esforços prolongados [36,38]. O aumento do número de leucócitos, evidenciada por ambos os grupos, após a realização da prova corrobora os resultados de estudos anteriores, e terá resultado da desmarginação dos neutrófilos, a partir das paredes do endotélio, induzida pelo aumento do débito cardíaco e alterações dos níveis de cortisol e catecolaminas [31,39,40]. Efectivamente, níveis elevados de adrenalina, induzidos pelo exercício físico, reduzem a afinidade dos neutrófilos pela parede do endotélio, potenciando um fluxo aumentado destas células para a circulação sanguínea [41]. Adicionalmente, o aumento transitório do número monócitos pós-prova, embora menos acentuado, está relacionado ao processo inicial da activação dos macrófagos no mecanismo de resposta inflamatória [42]. Relativamente a activação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, Pizza *et al.* [43] referem que o tipo de exercício parece exercer uma influência significativa na magnitude do comportamento dos parâmetros da imunidade celular e humoral. A diminuição significativa da relação dos linfócitos T

CD4⁺/CD8⁺ no grupo não-elite reflecte, principalmente, um acréscimo dos linfócitos T CD8⁺, o qual pode estar associado a uma situação de imunossupressão evidenciada pela realização de esforços intensos e prolongados [44,45]. Esta modulação do sistema imune, caracterizada pelo aumento dos linfócitos T CD8⁺ para o compartimento vascular, em resposta ao exercício físico agudo, parece estar relacionada com a expressão dos β -receptores presentes nestas células [46]. Contrariamente ao aumento observado no grupo não-elite, os atletas de elite evidenciaram uma diminuição do fenótipo T CD4⁺CD69⁺, que pode se prender, em parte, aos níveis aumentados de cortisol em resposta a realização de esforços prolongados e intensos [47], os quais poderiam provocar a inibição da produção de interleucina-1 (IL-1) pelos monócitos e, conseqüentemente, reduzir a estimulação dos linfócitos T CD4⁺, com menor produção de interleucina-2 (IL-2), o que resultaria na inibição da proliferação dos linfócitos T e diminuição de mediadores de inflamação e actividade citotóxica [48].

Conclusão

A análise e interpretação dos resultados obtidos neste estudo permitem-nos extrair as seguintes conclusões: a duração do esforço parece constituir o factor determinante na expressão da resposta das proteínas musculares CK e AST, enquanto a intensidade do esforço exerce um importante efeito modulador da actividade da enzima hepática GGT. De forma similar aos indicadores bioquímicos, a resposta dos biomarcadores da função imune parece estar condicionada pela duração e intensidade do esforço. Assim, verificamos que a intensidade e a duração das provas de triathlon condicionam as respostas dos diferentes biomarcadores em função do nível de treino dos atletas.

Referências

1. Laursen PB, Rhodes C. Factors affecting performance in ultra-endurance triathlon. *Sports Med* 2001;31(3):195-209.
2. Laursen, PB, Rhodes EC, Langill, RH, McKenzie DC, Taunton JE. Relationship of exercise test variable to cycling performance in an ironman triathlon. *Eur J Appl Physiol* 2002;87:392-5.
3. Skenderi P, Kavouras S, Anastasiou C, Yiannakouris N, Matalas A. Exertional rhabdomyolysis during a 246km continuous running race. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38(6):1054-7.
4. Mougios V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. *Br J Sports Med* 2007;41:674-8.
5. Brancaccio P, Limongelli F, Maffulli N. Monitoring of serum enzymes in sports. *Br J Sports Med* 2007;40:96-7.
6. Friden J, Lieber R. Eccentric exercise induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components. *Acta Physiol Scand* 2001;171:321-6.
7. Peake JM, Suzuki K, Wilson G, Coombes JS. Exercise-induced muscle damage, plasm cytokines and markers of neutrophil activation. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:737-45.
8. Liu JF, Chang WY, Chan KH, Tsai WY, Lin CL. Blood lipid peroxides and muscle damage increased following intensive resistance training of female weightlifters. *Annals New York Academy of Science* 2005;10:255-61.

9. Palazzetti S, Richard M, Margaritis I. Overload training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003;2884:588-604.
10. Gratz G, Rudwick R, Urban W, Skrasal F. Hemodynamic and autonomic changes induced by ironman: prediction of competition time by blood pressure variability. *J Appl Physiol* 2005;99:1728-35.
11. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative stress in half and full ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39(2):283-8.
12. Nieman DC, Henson DA, Mcanulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A., Heward C. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(8):1328-35.
13. Gleeson M. Immune function and exercise. *Eur J Sports Sci* 2005;4(3):52-65.
14. Nieman DC, Henson DA, Austin MD, Brown VA. Immune response to a 30-minutes walk. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37(1):57-62.
15. Green KJ, Croaker SJ, Rowbottom DG. Carbohydrate supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. *J Appl Physiol* 2003;95(3):1216-23.
16. Peters EM, Robson PJ, Kleinvelde NC, Jogessar VD. Hematological recovery in male ultramarathon runners: the effect of variations in training load and running time. *J Sports Med Phys Fitness* 2004;44:315-21.
17. Totsuka M, Nakaji S, Suzuki K., Sato K. Break point of serum creatine kinase release endurance exercise. *J Appl Physiol* 2002;93:1280-86.
18. Fleisher GA, Wakin KG. The role of small intestine in the disposal enzymes. *Enzym Biol Clin* 1968;9:81-96.
19. Rama R, Ibanez J, Riera M, Prats MT, Pagés T, Palacios L. Hematological, electrolyte and biochemical alterations after 100 km run. *Can J Appl Physiol* 1994;19(4):411-20.
20. Warburton DE, Welsh RC, Haykowsky MJ, Taylor DA. Biochemical changes as result of prolonged strenuous exercise. *Br J Sports Med* 2002;36(4):301-3.
21. Rietjens GJ, Kuipers H, Hartjens F, Van Breda E. Physiological, biochemical and psychological markers of strenuous training-induced fatigue. *Int J Sports Med* 2005;26(1):16-26.
22. McHugh MP. Recent advances in the understanding of the repeated bout effect: the protective effect against muscle damage from a single bout of eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports* 2003;13:88-97.
23. Stromme JH, Rustad P, Steensland H. 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* 2004;64:371-84.
24. Lieber RL, Fridén J. Cytoskeletal disruption after eccentric contraction-induced muscle injury. *Clin Orthop* 2002;403:S90-S99.
25. Donnelly A, Clarkson P, Maughan R. Exercise-induced muscle damage: effects of light exercise on damage muscle. *Eur J Appl Physiol* 1992;64:350-3.
26. Fallon K, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med* 1999;33:264-9.
27. Clarkson PM, Hubal M. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Rehabil* 2002;81(11):S52-S69.
28. Margaritis I, Tessier F, Richard M, Marconnet I. No evidence of stress oxidative after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 1997;18:186-90.
29. Chevion S. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Biochemistry* 2003;100(9):5119-23.
30. Ohno H, Yahata K, Yamamura Y. Effect of physical training on immunoreactive γ -glutamyltransferase in human plasma. *Enzyme* 1988;39:110-4.
31. Kayashima S, Ohno H, Fujioka T, Taniguchi N, Nagata, N. Leucocytosis as a marker of damage induced by chronic strenuous physical exercise. *Eur J Apply Physiol Occup Physiol* 1995;70(5):413-20.
32. Hassanein J, Razak A, Gavaler, J, Van Thiel. Heatstroke: its clinical and pathological presentation with particular attention to the liver. *Am J Gastroenterol* 1992;87:1382-8.
33. Heijnen B, Van Veen S, Straatsburg I, Gulik T. Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. *J Appl Physiol* 2001;91:265-8.
34. Fu S, Qin L, Leung CK, Chan BP, Chan K.M. Regular moderate exercise training prevents decrease of CD4+ T-lymphocytes induced by a single bout of strenuous exercise in mice. *Can J Appl Physiol* 2003;28(3):370-81.
35. Gleeson M. Immune functions in sport and exercise. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2006.
36. Suzuki S, Nakaji S, Yamada M, Liu Q, Kurakake S, Okamura N. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35(2):348-55.
37. Nieman DC, Henson DA, Davis JM, McAnulty LS. Blood leukocyte mRNA expression for IL-10, IL-1ra and IL-8 but not IL-6 increases after exercise. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:668-74.
38. Chinda D, Nakaji S, Umeda T. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence* 2003;18:324-9.
39. Gabriel H, Schwarz L, Steffens G. Immunoregulatory hormones, circulating leukocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sports Med* 1992a;13:359-66.
40. Suzuki S, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K. Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1996;81(3):1213-22.
41. Nieman DC. Effects of athletic endurance training on infection rates and immunity. In: Kreider RB. *Overtraining in Sports*. Champaign: Human Kinetics; 1995. p.193-217.
42. Ortega E, Forner M, Barriga C. Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem* 1999;201(1-2):41-7.
43. Pizza FX, Mitchell JB, Davis BH, Bigelow N. Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27(3):363-70.
44. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and immune system: regulation, integration and adaptation. *Psic Rev* 2000;80(3):1055-81.
45. Natale VM, Brenner IK, Moldoveanu AI. Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *São Paulo Med J* 2003;121(1):9-14.
46. Faure M, Gapin L, Viret C. Stressing the virtues of the immune system. *Microbes Infect* 2004;6(10):960-4.
47. Tremblay MS, Chu Sy, Mureika R. Methodological and statistical considerations for exercise-related hormone evaluations. *Sports Med* 1995;20(2):90-108.
48. Reichlin S. Neuroendocrinology. In: Wilson JD, et al. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998; p.165-248.