

Luciele Guerra Minuzzi

## Desporto e Envelhecimento Ativo: Efeitos do treino físico realizado ao longo da vida sobre a imunosenescência em atletas master

Tese de Doutoramento em Ciências do Desporto, ramo de Atividade Física e Saúde,  
orientada pela Professora Doutora Ana Maria Miranda Botelho Teixeira e pelo Doutor Artur Paiva  
apresentada à Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra.

Janeiro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



**Luciele Guerra Minuzzi**

**DESPORTO E ENVELHECIMENTO ATIVO: EFEITOS DO TREINO FÍSICO  
REALIZADO AO LONGO DA VIDA SOBRE A IMUNOSENESCÊNCIA EM  
ATLETAS *MASTER***

Tese de Doutoramento em Ciências do Desporto, ramo de Atividade Física e Saúde, orientada pela Professora Doutora Ana Maria Miranda Botelho Teixeira e pelo Doutor Artur Paiva apresentada à Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra

Junho de 2017



**Fonte da Imagem de Capa:**

R. Dourmashkin

Retirada de: <http://www.cellimagelibrary.org>. Acesso em 28 de dezembro de 2016.

Esta tese foi desenvolvida com apoio financeiro da:



Bolsa de doutoramento atribuída a Luciele Guerra Minuzzi: BEX/1417/13-4



FCDEF FACULDADE DE CIÊNCIAS DO  
DESPORTO E EDUCAÇÃO FÍSICA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA





## **AGRADECIMENTOS**

A finalização deste trabalho é a concretização de um projeto profissional, a realização de um grande sonho, que ultrapassa a obtenção de um título ou a aventura de cruzar o oceano...

Difícilmente serei justa ou capaz de mencionar a todos a quem devo agradecer, porque inevitavelmente foram incontáveis as contribuições e o apoio de pessoas que tornaram possível terminar este trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte desta tese, que fazem parte da minha vida e que compartilharam comigo experiências, virtudes e amor.

### **Meus agradecimentos pessoais**

Ao meu pai e à minha mãe por terem-me proporcionado condições afetivas (e financeiras) durante a minha formação e principalmente por terem suportado a distância. Obrigada por entenderem minhas escolhas, por tolerarem minhas diferenças, mas principalmente por serem os melhores com as pouquíssimas condições que tiveram. Eu tenho em mim todo o amor, afeto e admiração por vocês.

Ao meu pai, a quem devo meu carácter. Obrigada pelos valores, por ter sido forte por todos nós, pelo carinho e por todo o amor que jamais deixou de demonstrar. Obrigada por seu colo, por sua incansável maneira de lutar honestamente e por nos passar os melhores princípios de ética e honestidade. À minha mãe, pela dedicação à família e por ter abdicado de muita coisa para o nosso bem. Obrigada por me ensinar generosidade, por mostrar nunca devemos desistir e que nunca é tarde para aprendermos ou sermos felizes. E principalmente, que precisamos de muito pouco para que isso aconteça.

Ao meu irmão, por cuidar de mim, do que ficou no Brasil e principalmente pela distância termos finalmente nos tornado amigos fiéis. Eu tenho a vida inteira para retribuir todo o carinho e preocupação que sempre tiveste comigo.

Aos demais familiares, em especial, aos meus avós que foram para o céu enquanto eu estava fora de casa, obrigada por perdoarem minha ausência da despedida.

Aos amigos do Brasil, por me darem alegria sem fim, pelos abraços apertados (mesmo a distância eu os sentia), por todo o amor e por serem meu porto-seguro.

Aos amigos de Coimbra, aos que fizeram parte e companhia das minhas saudosas viagens, dos convívios por todo o lado e em especial as amizades verdadeiras: obrigada por terem sido tão gentis em apresentar Coimbra e seus encantos, pelo suporte de moradia, amizade e companhia nos mais longos dias de dissabor ou plenitude. A todos da república WhiteHouse, uma experiência académica e de amizade para toda a vida. Ao Crossfit Coimbra, minha modalidade desportiva de eleição e paixão, por terem me deixado mais forte, saudável e feliz. Aos amigos portugueses, pela oportunidade de sua companhia, de conhecer (e jamais esquecer!) os sabores de Portugal, saibam que eu terei para sempre vocês em meu coração. Meu amor por todos vocês é para sempre!

Aos colegas de doutoramento da Universidade de Coimbra pela alegria, disponibilidade e ajuda permanentes.

Obrigada de coração, por me mostrarem o que é realmente importante e aquilo que não é importante, pela capacidade de ofuscarem problemas e de banir a tristeza com o melhor de cada um de vocês. Que as diferenças sejam celebradas, a amizade mantida e a vida cheia de amor e de agradáveis surpresas!

## **Profissionais**

Em primeiro lugar, a minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Miranda Botelho Teixeira pelo estímulo, orientação, disponibilidade e confiança durante todo o percurso deste trabalho. Pelo exemplo como pesquisadora, seu brilhantismo e inspiração profissional.

Ao meu coorientador Dr. Artur Paiva, pela disponibilidade de seu laboratório, do ambiente apropriado de pesquisa e pela inegável atitude de fazer o melhor. E em seu nome, a todos os técnicos, estudantes e para sempre amigos do Centro de Histocompatibilidade do Centro pela ajuda, paciência e longas horas de boas recordações.

Ao Dr. António Martinho, pela sua simpatia, tempo e conhecimento. A todos os demais funcionários, técnicos e pesquisadores do IPST por terem tornado o vosso laboratório minha doce casa de estudos e aprendizado, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Luis Rama, por sua infinita gentileza, pelas longas horas de discussões científicas, pela confiança e simpatia durante todos os dias da FCDEF. Em seu nome, estendo os meus mais sinceros agradecimentos ao grupo do Laboratório de Biocinética da FCDEF e à Dra. Fátima Rosado pelo apoio e ajuda incondicionais durante todo o processo de recolha de dados.

Ao Prof. Dr. António Figueiredo pelo seu acolhimento tão simpático e sua competência na direção da FCDEF e em seu nome a todos os docentes, técnicos e estudantes da Faculdade de Educação Física e Desportos da UC. Eu tenho por este local a maior gratidão.

Ao Prof. Dr. Humberto Carvalho pelas grandes contribuições académicas, pelos conselhos e pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisadores.

Ao Prof. João Valente dos Santos pelo seu tempo, apoio, suporte e compreensão. És admirável enquanto pesquisador e professor.

A Profa. Dra. Claudia Cavaglieiri, pelas contribuições académicas, pela ajuda na prorrogação da bolsa de estudos e pela sua felicidade que cativa a todos.

Ao Prof. Dr. Michel Saad, pelo incentivo, confiança e amizade.

To all members of International Society of Immunology Exercise. Thank you for the support and excellent scientific meetings.

Um agradecimento muito especial a todos os atletas *master* que voluntariamente participaram neste estudo, pelo seu comprometimento, atenção, disponibilidade e carinho. Da mesma forma, a todos os voluntários dos grupos de controlo desta tese. Sem vocês este trabalho não teria sido possível!



*"Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena."*

*(do poema "Mar Português")  
Fernando Pessoa*



Esta tese inclui as seguintes publicações e artigos submetidos:

- Minuzzi LG, Teixeira AM, Ferreira JPL (2015) Exercício e mobilização de linfócitos T senescentes: Uma meta-análise. *Motricidade* 11:174–186. doi: 10.6063/motricidade.3385
- Minuzzi LG, Carvalho HM, Brunelli D, et al (2016) Acute Hematological and Inflammatory Responses to High-intensity Exercise Tests: Impact of Duration and Mode of Exercise. *Int J Sport Med* 37:1–9. doi: 10.1055/s-0042-117723
- Minuzzi LG, Rama L, Bishop NC, et al (2017) Lifelong training improves anti-inflammatory environment and maintains the number of regulatory T cells in masters athletes. *Eur J Appl Physiol* 117:1131–1140. doi: 10.1007/s00421-017-3600-6
- Minuzzi LG, Chupel, MU, Rama L, et al (2017) Inflammatory Balance of Cytokines: Response to Exercise in *Master Athletes*. (submitted).
- Minuzzi LG, Chupel, MU, Rama L, et al (2017) Effects of regular training on physiological, haematological and salivary markers in masters athletes. (submitted).



---

# ÍNDICE GERAL



<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>Índice Geral .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>XIX</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>XXIX</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>33</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>33</b>
<b>Palavras-chave.....</b>	<b>39</b>
<b>Keywords .....</b>	<b>39</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>41</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1.2 Estudos .....</b>	<b>46</b>
<b>Estado da arte.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>49</b>
<b>2.1 Aspectos gerais do sistema imunitário e exercício.....</b>	<b>51</b>
2.1.1 Exercício agudo e função imune .....	56
2.1.2 Exercício crónico e função imune .....	60
<b>2.2 Células T REGULADORAS e exercício.....</b>	<b>64</b>
<b>2.3 Citocinas.....</b>	<b>70</b>
2.3.1 Membros da família IL-1.....	70
2.3.2 Interleucina-6.....	72
2.3.2 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	74
2.3.4 Interleucina-10.....	76
2.3.5 Citocinas e exercício.....	78
2.3.6 Balanço de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias .....	79
<b>2.4 Imunosenescência e exercício físico .....</b>	<b>81</b>
2.4.1 KLRG1 – The killer cell lectin–like receptor G1 .....	86
<b>2.5 Imunidade das mucosas.....</b>	<b>88</b>
2.5.1 Imunoglobulina A.....	89

2.5.2 Cortisol .....	89
2.5.3 Testosterona.....	90
2.5.4 Rácio testosterona/cortisol.....	91
<b>2.6 Atletas <i>master</i> .....</b>	<b>92</b>
<b>Metodologia .....</b>	<b>99</b>
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>99</b>
<b>3.1 População em estudo.....</b>	<b>101</b>
<b>3.2 Protocolo de Teste .....</b>	<b>102</b>
3.2.1 Histórico desportivo .....	102
3.2.2 Desenho experimental .....	103
3.2.3 Composição corporal.....	104
3.2.4 Determinação do VO <sub>2max</sub> .....	104
3.2.5 Recolha sanguínea e hemograma .....	106
<b>3.3 Determinação da concentração de citocinas plasmáticas .....</b>	<b>106</b>
<b>3.4 Citometria de fluxo.....</b>	<b>107</b>
3.4.1 Procedimento de separação celular.....	110
<b>3.5 Expressão génica dos mediadores da resposta imune.....</b>	<b>110</b>
3.5.1 Extração de mRNA das células purificadas .....	110
<b>3.6 Determinação da IgA, cortisol e testosterona salivares .....</b>	<b>113</b>
3.6.1 Procedimentos adotados na recolha e processamento para análise laboratorial da saliva.....	113
<b>3.7 Análise estatística .....</b>	<b>114</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>117</b>
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>117</b>
<b>4. Estudo 1: Treino ao longo da vida em atletas <i>master</i>: aptidão funcional, variáveis hematológicas e balanço inflamatório de citocinas. ....</b>	<b>119</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>120</b>
<b>4.2 Delineamento do estudo .....</b>	<b>122</b>
4.2.1 Sujeitos .....	122
4.2.5 Análise estatística .....	123
<b>4.4 Resultados .....</b>	<b>124</b>
4.4.1 Variáveis hematológicas.....	124

4.4.2 Citocinas .....	131
<b>4.5 Conclusão .....</b>	<b>137</b>
<b>5. Estudo 2: A influência do treino ao longo da vida sobre a ativação, senescência e produção de citocinas pelas células T reguladoras. ....</b>	<b>138</b>
<b>5.1 Introdução.....</b>	<b>139</b>
<b>5.2 Delineamento do estudo.....</b>	<b>141</b>
5.2.1 Sujeitos .....	141
5.2.2 Desenho experimental .....	142
5.2.3 Parâmetros hematológicos e citocinas analisadas .....	142
5.2.4 Citometria de fluxo.....	142
5.2.5 Purificação celular e análise do mRNA em células Treg purificadas .....	143
5.2.6 Análise estatística .....	144
<b>5.3 Resultados .....</b>	<b>144</b>
<b>5.3 Discussão dos resultados.....</b>	<b>149</b>
<b>5.4 Conclusão .....</b>	<b>153</b>
<b>6. Estudo 3: A influência do treino ao longo da vida sobre a mobilização de linfócitos T senescentes em resposta ao exercício agudo máximo.....</b>	<b>154</b>
<b>6.1 Introdução.....</b>	<b>155</b>
<b>6.2 Materiais e Métodos.....</b>	<b>156</b>
6.2.1 Participantes.....	156
6.2.2 Protocolo experimental e recolhas de sangue.....	157
6.2.3 Citometria de fluxo.....	157
6.2.4 Purificação celular e análise do mRNA em células purificadas.....	159
6.2.5 Análise estatística .....	159
<b>6.3 Resultados .....</b>	<b>161</b>
<b>6.4 Discussão .....</b>	<b>175</b>
<b>6.5 Conclusão .....</b>	<b>179</b>
<b>7. Estudo 4: Respostas de marcadores fisiológicos, hematológicos e salivares durante uma época desportiva em atletas <i>master</i>. ....</b>	<b>181</b>
<b>7.1 Introdução.....</b>	<b>182</b>
<b>7.2 Materiais e Métodos.....</b>	<b>183</b>
<b>7.3 Resultados .....</b>	<b>185</b>
<b>7.4 Discussão dos resultados.....</b>	<b>189</b>

<b>7.5 Conclusão .....</b>	<b>194</b>
<b>Discussão geral .....</b>	<b>195</b>
<b>Capítulo 5.....</b>	<b>195</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>207</b>
<b>Capítulo 6.....</b>	<b>207</b>
<b>9.1 Limitações .....</b>	<b>209</b>
<b>9.2 Sugestões para estudos futuros .....</b>	<b>210</b>

---

# ÍNDICE DE TABELAS



Tabela 2.1. Efeitos do exercício intenso sobre o sistema imune. ....	57
Tabela 3.1. Características dos participantes .....	102
Tabela 3.2. Valores correspondentes ao limite mínimo de detecção e o coeficiente de variação médio para análise em duplicado das citocinas IL-1ra, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α medidos no plasma. ....	107
Tabela 3.3: Programa de incubação PCR no LightCycler® 480 (Roche). ....	111
Tabela 4.1 Características dos sujeitos. ....	122
Tabela 4.2. Níveis de atividade física dos sujeitos. ....	125
Tabela 4.3. Variáveis hematológicas e contagem de leucócitos. ....	126
Tabela 5.1. Características dos participantes. ....	141
Tabela 5.3. Frequência (nos linfócitos totais ou dentro das células T CD4 <sup>+</sup> ) e contagens absolutas (x10 <sup>3</sup> /mL) de Tregs CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>dim</sup> , em resposta ao exercício agudo. ....	145
Tabela 5.4. Número de casos detetados para expressão do mRNA Foxp3, TGF-β e IL-10...146	
Tabela 6.1. Caracterização da amostra. ....	157
Tabela 6.2. Modelo de regressão multinível para a %Total Ly; %Total LyT, %LyT, %Total CD4 <sup>+</sup> , %CD4 <sup>+</sup> , %Total CD8 <sup>+</sup> e %CD8 <sup>+</sup> .....	161
Tabela 6.3. Modelos de regressão multinível para as subpopulações de células T CD4 <sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efetoras-terminais (EMRA).....	164
Tabela 6.4. Modelos de regressão multinível para as subpopulações de células T CD8 <sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efetoras-terminais (EMRA).....	165
Tabela 6.5. Valores percentuais de células T, células T CD4 <sup>+</sup> e células T CD8 <sup>+</sup> e a percentagem destas células a expressar KLRG1 antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo. ....	166

Tabela 6.6. Modelos de regressão multinível para %LyT/KLRG1+, %CD4+/KLRG1+, %CD4+/naïve/KLRG1+, %CD4+/CM/KLRG1+, %CD4+/EM/KLRG1+, %CD4+/EMRA/KLRG1+.	168
Tabela 6.7. Modelos de regressão multinível para %CD8 <sup>+</sup> /KLRG1 <sup>+</sup> , %CD8 <sup>+</sup> /naïve/KLRG1 <sup>+</sup> , %CD8 <sup>+</sup> /SLEC/KLRG1 <sup>+</sup> , %CD8 <sup>+</sup> /CM/KLRG1 <sup>+</sup> , %CD8 <sup>+</sup> /EM/KLRG1 <sup>+</sup> , %CD8 <sup>+</sup> /EMRA/KLRG1.	172
Tabela 7.1. Caracterização da amostra.	184
Tabela 7.2. Valores médios individuais e valores médios totais referentes a horas por semana de treino, intensidade e número de competições para uma época de treino de 09 atletas <i>master</i> .	185
Tabela 7.3. Parâmetros fisiológicos em resposta ao protocolo de esforço máximo.	186
Tabela 7.4. Contagem de células totais do sangue antes (Pre), em 10 minutos (Post) e 1 hora (1h) após o final do teste de esforço. Os valores apresentados são referentes ao total de participantes para o início (M1) e o final de uma época desportiva (M2).	186

---

# ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 2.1: A formação de células sanguíneas a partir de células estaminais dentro da medula óssea. ....	52
Figura 2.2. Expressão de marcadores clássicos de diferenciação das células T. ....	54
Figura 2.3: Modelo de curva em forma de "J" da relação entre diferentes quantidades de exercício e o risco de ITRS.....	55
Figura 2.4: A teoria “janela aberta” é uma possível explicação para porque o exercício de alta intensidade aumenta o risco de infecção. ....	56
Figura 2.5. As hipóteses da " janela aberta". ....	61
Figura 2.6: Os potenciais mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios de exercício.....	63
Figura 2.7. Ilustração de um modelo de duas etapas para o desenvolvimento de Tregs a partir do timo. ....	65
Figura 2.8: Mecanismos moleculares ligando a especificidade do TCR a expressão do FoxP3. ....	66
Figura 2.9. Mudanças relacionadas com a idade na homeostasia das Tregs. ....	67
Figura 2.10. Ativação e sinalização do recetor da IL-1. ....	71
Figura 2.11. Sinalização do recetor da IL-6.....	73
Figura 2.12. Propriedades pro- e anti-inflamatórias da IL-6. ....	74
Figura 2.13: Vias de sinalização de células ativadas por TNF. ....	75
Figura 2.14. A expressão de interleucina-10 no sistema imunitário.....	77
Figura 2.15: Expansão de clones de células T. ....	83
Figura 2.16. O exercício agudo promove mobilização preferencial de células T senescentes altamente diferenciadas e vírus-específicas dos tecidos periféricos no compartimento de sangue (linfocitose) sob a influência de catecolaminas.....	85
Figura 2.17: Expansão populacional associada à idade das células T CD28- terminalmente diferenciadas.....	87

Figura 2.18: Fatores e mecanismos fisiológicos que contribuem para a redução no desempenho do exercício de endurance com o avançar da idade em adultos saudáveis. ....	94
Figura 3.1. Desenho experimental. ....	104
Figura 3.2. Modelo esquemático da estratégia utilizada para definir as diferentes populações de células estudadas.....	109
Figure 3.3: Modelo genérico dos resultados do <i>plot</i> qRT-PCR.....	112
Figura 4.1 Desenho experimental. ....	123
Figura 4.2: Valores médios do consumo máximo de oxigênio relativo. ....	125
Figura 4.3: Níveis das citocinas IL-1ra e IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 e TNF-α no plasma em resposta ao protocolo de exercício máximo no cicloergómetro. ....	131
Figura 4.4: Níveis séricos de proteína C-reativa em resposta ao protocolo de exercício máximo em cicloergómetro. ....	132
Figura 4.5: Rácio TNF-α/IL-10 em resposta ao protocolo de exercício máximo em cicloergómetro.....	134
Figura 5.1: Identificação de Tregs via citometria de fluxo.....	143
Figura 5.1. Efeito do exercício agudo sobre expressão dos genes FoxP3, TGF-β e IL-10 em Tregs CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> CD127 <sup>dim</sup> purificadas. ....	145
Figura 5.2. Efeitos agudos do exercício sobre os níveis de IL-10 no plasma.....	147
Figura 5.3. Percentagem de Tregs KLRG1 <sup>+</sup> . ....	147
Figura 5.4. Proporções de Tregs naïve e de memória em função da idade.....	148
Figura 5.5. Números absolutos de Tregs naïve e memória.....	149
Figura 6.1. Estratégia de análise utilizada para definir as diferentes populações de células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> e para a % das células que expressam o marcador KLRG1.....	158
Figura 6.2: Intensidade média de fluorescência (MIF) de KLRG1 nas células T CD4 <sup>+</sup> /naïve/KLRG1 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /CM/KLRG1 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> /EM/KLRG1 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> /EMRA/KLRG1 <sup>+</sup> ,	

e dentro destas nas CD127 <sup>+</sup> e CD127 <sup>-</sup> , antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controlo e atletas <i>master</i> .....	169
Figura 6.3: Resultados para a percentagem de células T CD4 <sup>+</sup> , naïve, memória-central, memória-efetora e efectoras-terminais que expressam o marcador de senescência KLRG1, antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controlo e atletas <i>master</i> . ....	170
Figura 6.4: Intensidade média de fluorescência (MIF) de KLRG1 nas células T CD8 <sup>+</sup> /naïve/KLRG1 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> /CM/KLRG1 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> /EM/KLRG1 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> /EMRA/KLRG1 <sup>+</sup> , e dentro destas nas CD127 <sup>+</sup> e CD127 <sup>-</sup> , antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controlo e atletas <i>master</i> .....	173
Figura 6.5: Resultados para a % de células T CD8 <sup>+</sup> , naïve, SLEC, memória-central, memória-efetora e efectoras-terminais que expressam o marcador de senescência KLRG1, antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controlo e atletas <i>master</i> ...174	
Figura 6.6. Efeito do exercício agudo sobre expressão dos genes CCR7 em células T CD8 <sup>+</sup> naïve (CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> ) e FASL em T CD8 <sup>+</sup> EMRA (CD8 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> ) purificadas. ....	175
Figura 7.2. Valores médios para IgA (µg/mL) em atletas <i>master</i> (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2). ....	186
Figura 7.3. Valores médios para as concentrações de cortisol (µg/dL) em atletas <i>master</i> (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2). ....	188
Figura 7.4: Valores médios para as concentrações de testosterona (pg/mL) em atletas <i>master</i> (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2). ....	189
Figura 7.5: Rácio testosterona/cortisol (T/C) em atletas <i>master</i> (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2). ....	189



---

# ABREVIATURAS



<b>A</b>	
A	Grupo Controlo - Adultos
AJ	Grupo Controlo - Adultos-jovens
AM	Atletas <i>master</i>
APC	Alofococianina
APC-H7	Alofococianina- hilite 7
APCs	Células apresentadoras de antígenos
<b>B</b>	
Blimp-1	Proteína indutora da maturação de linfócitos B 1
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>C</b>	
CD	Cluster of differentiation (divisão de grupos)
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CM	Células de memória-central
CMV	Citomegalovírus
CCR	Receptor de quimiocina C C
CRP	Proteína C-reativa
CT	Limiar de ciclo
CTLA-4	Antígeno associado dos linfócitos T citotóxico 4
CYC-1	Citocromo C-1
<b>D</b>	
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCs	Células dendríticas
<b>E</b>	
ECG	Eletrocardiograma
EM	Células de memória-efetora
EMRA	Células efetoras-terminais
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>F</b>	
Fas	Recetores de morte da superfície celular
FasL	FasLigando
FC <sub>max</sub>	Frequência Cardíaca
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FoxP3	Fator de transcrição Foxp3
<b>G</b>	
G-CSF	Fator estimulador de colónias granulocitárias
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
gp130	Glicoproteína 130
<b>H</b>	
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HPA	Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal
Ht	Hematócrito
<b>I</b>	
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- $\gamma$	Interferão- $\gamma$
IgA	Imunoglobulina A
IKKB	Ikb cinase- $\beta$
IL	Interleucina
IL-1ra	Recetor antagonista de IL-1
IL-1R2	Recetor solúvel do tipo 2 da IL-1
IL-6R	Recetor de IL-6
IMC	Índice de Massa Corporal
IRP	Perfil de risco imune
ITIM	Recetor imunitário à base de tirosina
iTregs	Tregs induzidas
ITRS	Infeções do trato respiratório superior
<b>K</b>	
KLRG1	<i>The killer cell lectin-like receptor G1</i>
KO	Krome orange
<b>J</b>	
JNK	C-Jun quinase N-terminal
<b>L</b>	
LPS	Lipopolissacarídeo

<b>M</b>		<b>R</b>	
mAB	Anticorpos monoclonais	RBC	Eritrócitos
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos	RNA	Ácido ribonucleico
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1	ROS	Espécies reativas de oxigênio
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos-1	RPE	Percepção Subjetiva de Esforço
MIF	Intensidade média de fluorescência	RST4	Recetor do tipo Toll 4
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II		
MLG	Massa livre de gordura	<b>S</b>	
MLKL	Proteína do domínio semelhante a cinase de linhagem mista	SAA	Proteína amilóide A
MPV	Volume médio de plaquetas	SF3A1	Subunidade 1 do fator de <i>splicing</i> 3a
		SLEC	<i>Short-lived effector cell</i>
<b>N</b>		STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
NFKB	Fator nuclear-kb	<b>T</b>	
NGE	Expressão génica normalizada	TAK1	Quinase tgfp-ativada 1
NK	Natural-killer	TCR	Recetor de célula T
nTregs	Tregs naturais	TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
<b>P</b>		TLRs	Recetores Toll-like
p38	Proteína ativada por mitogénio	TMB	Tetrametilbezidina
MAPK	p38 cinase	TNF-R	Recetores do fator de necrose tumoral
Pb	<i>Pacific blue</i>	TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico	TRADD	Proteína adaptadora associada ao domínio de morte de TNFR1
PCR	Reação em cadeia com polimerase	TRAF2	Fator associado-TNFR 2
PE	Ficoeritrina	TREC:	Círculos de excisão do recetor das células T
PECy5	Ficoeritrina-cianina 5	Tregs	Células T reguladoras
PECy7	Ficoeritrina-cianina 7		
Post	Pós-exercício	<b>V</b>	
Pre	Pre-exercício	VCM	Volume corpuscular médio
		VO <sub>2max</sub>	Consumo Máximo de Oxigênio
		<b>W</b>	
		WBC	Leucócitos

---

**RESUMO**

**ABSTRACT**



## Resumo:

O objetivo principal deste trabalho reside no estudo das consequências do envolvimento no treino ao longo da vida de atletas *master*, com idade acima de 40 anos, na condição física e saúde, nomeadamente na imunosenescência e inflamação crónica. Foram ainda examinadas as relações entre as respostas imunológicas e as cargas de treino e competição destes atletas ao longo de uma época desportiva. O estudo utilizou um grupo de 20 atletas *master* ( $53.1 \pm 8.8$  anos) envolvidos nos desportos de atletismo, judo e natação residentes na cidade de Coimbra, Portugal. Foram utilizados dois grupos controlo, um para avaliar os efeitos do treino ao longo da vida e um segundo grupo para avaliar as interações entre treino e envelhecimento. Do primeiro grupo fizeram parte 10 pessoas ( $54.2 \pm 5.9$  anos) que nunca praticaram treino físico regular. O segundo grupo teve na sua constituição 9 adultos-jovens ( $31.7 \pm 3.00$  anos). Esta tese está organizada em 4 estudos:

O primeiro estudo, investigou os efeitos do envelhecimento e do treino ao longo da vida no  $VO_{2max}$ , parâmetros hematológicos básicos e balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias e sua resposta a uma sessão de exercício agudo. Os nossos dados mostraram que as adaptações ao exercício mais relevantes encontradas nos atletas *master* foi a manutenção da sua capacidade aeróbica e um estado anti-inflamatório semelhante ao observado nos adultos-jovens saudáveis. O envelhecimento teve os efeitos mais pronunciados nos níveis da IL-10 e no rácio TNF- $\alpha$ /IL-10.

No segundo estudo, objetivámos quantificar e caracterizar funcionalmente células T reguladoras do sangue periférico, bem como a expressão de um marcador de senescência (KLRG1), de atletas *master* em repouso e após um teste de exercício exaustivo. Nossos resultados mostraram que os atletas *master* tem níveis elevados da citocina imunorreguladora IL-10 em repouso e em resposta a um teste de esforço máximo em comparação com o grupo controlo da mesma idade. O número das Tregs foi semelhantes para os atletas *master* e o grupo controlo, sugerindo que o treino ao longo da vida não interfere na perda ou aumento no número destas células. Parecem, no entanto, existir indícios de que as Tregs estão mais ativadas no grupo de atletas masters.

O terceiro estudo avaliou os efeitos do treino ao longo da vida sobre a senescência e mobilização de linfócitos T em resposta ao exercício agudo máximo. Nossos resultados mostram que os atletas *master* apresentam menor % das células T CD4<sup>+</sup> naïve e de memória central e das células T CD8<sup>+</sup> naïve, memória-central e memória-efetora, senescentes. As diferenças não foram significativas para as subpopulações das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras

senescentes. Quanto ao marcador de apoptose, a expressão do gene FasL foi similar entre os atletas *master* e controlos. As populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> senescentes e as suas subpopulações são mobilizadas em resposta ao exercício agudo. O treino ao longo da vida levaria ao aumento do espaço imune, porém, uma sessão aguda de exercício físico não parece ser suficiente para provocar esse efeito.

No quarto estudo objetivámos investigar os efeitos de uma época de treino sobre mudanças hematológicas e de marcadores salivares em atletas *masters*. Os resultados do presente estudo sugerem que a manutenção do treino regular ao longo de uma época desportiva é capaz de provocar mudanças benéficas na composição corporal, e efeitos positivos sobre variáveis funcionais, nomeadamente no decréscimo da FC<sub>max</sub> e Lac<sub>max</sub> necessários para atingir o mesmo patamar num teste de esforço máximo. Os atletas apresentam, no entanto, pequenos sinais de fadiga acumulada ao longo de uma época de treino e competição, tais como a diminuição dos níveis de testosterona salivar e a redução do rácio T/C.

Os resultados deste trabalho permitiram evidenciar que atletas *master* são um modelo de envelhecimento bem-sucedido. De fato, o treino ao longo da vida não parece ter efeitos deletérios no equilíbrio das citocinas pró e anti-inflamatórias e foi capaz de reverter parcialmente os efeitos pró-inflamatórios do envelhecimento. Atletas *master* mantém o número e função das células T reguladoras como resposta adaptativa ao exercício. A manutenção de altos níveis de aptidão aeróbica durante o curso natural do envelhecimento mostrou prevenir o acumular de células T senescentes e, ao mesmo tempo, manter um número suficiente de células T naïve capazes de reconhecer e responder a novos antigénios.

## **Abstract:**

The main objective of this study was to investigate the consequences of the involvement in long-term training of master athletes, aged over 40 years, in the physical condition and health, namely in immunosenescence and chronic inflammation, as well as to examine the responses training loads and competition in these athletes throughout a sporting season. The study used a sample of 20 masters (53.1 ± 8.8 years old) engaged in running, judo and swimming training, in the city of Coimbra, Portugal. Two control groups were used, one to evaluate the effects of lifelong training (n=10 adults, 54.2 ± 5.9 years old) and a second group to evaluate the interactions between training and aging (n=8 young adults; 31.8 ± 3.00 years old).

This thesis is organized in 4 studies:

The first study investigated the effects of aging and lifelong training on  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , baseline haematological parameters and balance of pro and anti-inflammatory cytokines and their response to acute exercise. Our data showed that the most relevant adaptations to exercise found in master athletes were the maintenance of their aerobic capacity and an anti-inflammatory state like that observed in healthy young adults. Aging had the most pronounced effects on levels of IL-10 and the TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio.

In the second study, we aimed to quantify and functionally characterize peripheral blood regulatory T cells, as well as the expression of a senescence marker (KLRG1), in master athletes at rest and after an exhaustive exercise test. Our results showed that master athletes have elevated levels of the immunoregulatory cytokine IL-10 at rest and in response to a maximal effort test. The number of Tregs cells were the same in masters and in the control group, suggesting that lifelong training did not interfere with the loss or increase in the number of regulatory T cells. Suggestions that regulatory T cells are more activated in the master athletes were also found.

The third study evaluated the effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to maximal acute exercise. Our results show that the master athletes have a lower percentage of the senescent  $\text{CD4}^+$  naïve and central memory and the  $\text{CD8}^+$  naïve, central memory and memory-effector T cells. The differences were not significant for the senescent  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  effector T cells. We tested whether senescent effector cells could then show differences in apoptosis markers, but FasL gene expression was similar between master athletes and controls. The senescent  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells and their subpopulations are mobilized in response to acute exercise. Lifelong training does seem to increase immune

space; however, an acute session of physical exercise does not seem to be sufficient to induce this effect.

In the fourth study, we aimed to investigate the effects of a training period on haematological changes and salivary markers in master athletes. The results of the study suggest that maintenance of regular training throughout a sporting season can bring beneficial changes in body composition, and positive effects on functional variables, namely in decreasing  $HR_{max}$  and  $Lac_{max}$  needed to reach the same level in a maximum effort test. Athletes, however, exhibit small signs of accumulated fatigue over a period of training and competition, such as decreased salivary testosterone levels and reduced T/C ratio.

The results of this thesis showed that master athletes are a successful aging model. Indeed, lifelong training does not appear to have deleterious effects on the balance of pro and anti-inflammatory cytokines and could partially reverse the pro-inflammatory effects of aging. Master athletes maintain the number and function of regulatory T cells as an adaptive response to exercise. Maintaining high levels of aerobic fitness during the natural course of aging has shown to prevent the accumulation of senescent T cells while at the same time maintaining sufficient numbers of naïve T cells capable of recognizing and responding to new antigens.

---

## Palavras-chave

VO<sub>2max</sub>; citocinas; balanço inflamatório; células T; células T reguladoras; células T senescentes; espaço imune; Imunoglobulina A; atletas *master*.

## Keywords

VO<sub>2max</sub>; Cytokines; Inflammatory balance; T cells; Regulatory T cells; Senescent T cells; Immune space; Immunoglobulin A; Master athletes.



# Introdução

---

## Capítulo 1



O interesse sobre o efeito do exercício no sistema imunitário intensificou-se em 1989, a partir do trabalho de David Nieman, que mostrou que os indivíduos praticantes regulares de exercício físico de intensidade moderada apresentavam menos sintomas associados às infecções do trato respiratório superior (IRTS) em comparação com os seus pares sedentários. Inversamente, pessoas envolvidas em treino de alto-volume pareciam ter um risco maior de infecção (Nieman, Johanssen & Lee, 1989).

No decorrer de mais de 25 anos de investigação, os estudos sobre os efeitos do exercício no sistema imunitário têm-se concentrado no impacto de sessões agudas assim como nos efeitos crónicos do treino. Enquanto os atletas têm sido o foco de muitos desses estudos que buscam determinar a extensão do declínio imunitário devido ao treino físico excessivo, há também um grande interesse em identificar os fatores responsáveis por melhorar a função imune em idosos e em imunocomprometidos em decorrência da prática regular de exercício físico moderado (Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015).

Os idosos tendem a ter reduzida função imune, resultando num aumento da incidência e severidade de infeções, desenvolvimento de doenças autoimunes e cancro e reduzida resposta a vacinas (Simpson, Lowder, Spielmann, *et al.*, 2012). Embora a inflamação transitória seja necessária para a recuperação de lesões e infeções, foi levantada a hipótese de que a inflamação excessiva no envelhecimento pode ser causada por uma resposta de fase aguda exagerada, que pode ser a causa ou a consequência de um atraso na recuperação de uma agressão/ataque que promove a inflamação. Sob certas condições, os idosos são capazes de montar uma resposta imune adequada, mas não são capazes de terminar completamente a resposta num período de tempo normal. Esta incapacidade de resolver completamente uma resposta imune pode contribuir para o estado crónico de inflamação de baixo grau associado ao envelhecimento.

Além disso, a inflamação crónica de baixo grau, também pode servir para preparar o corpo para montar uma resposta exagerada a agressões futuras que seriam normalmente menos intensas se o sistema imunitário não estivesse previamente ativado. Assim, existe um ciclo vicioso em que a resolução incompleta das respostas imunes anteriores é responsável pela promoção de futuras respostas imunes exageradas (Woods, Wilund, Martin, *et al.*, 2012). Além disso, a reativação de infeções crónicas ocorre com uma frequência maior nos idosos. Infeções virais persistentes provocam a expansão de clones de linfócitos senescentes, ocupando uma grande proporção do espaço imune que, em condições de baixa exposição a patógenos e

reativações virais menos latentes, seria ocupado principalmente por linfócitos T *naïve*. O acumular supérfluo de células T experientes em antígeno podem reduzir a saída de células T *naïve*, diminuindo o número e percentagem de células capazes de montar respostas imunitárias a novos agentes patogénicos. Nesta situação, estas células T resistentes à apoptose e altamente diferenciadas sobrecarregam o espaço imune, resultando numa vigilância imunológica reduzida e num risco aumentado de infeção (Simpson, 2011b).

Não é claro o quanto essas mudanças relacionadas com a idade no sistema imunitário são evitáveis e/ou modificáveis devido ao exercício regular. Entretanto, um interessante estudo publicado em 2011, por RJ Simpson propôs um modelo teórico para explicar como séries frequentes de exercício agudo poderiam criar um espaço imune através da remoção do excesso de clones de células T antígeno-específicas terminalmente diferenciadas e, potencialmente limitar os efeitos negativos do envelhecimento e infeções virais persistentes sobre a imunidade mediada por células T. Uma sessão aguda de exercício aumenta a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), glucocorticoides, e citocinas pró-inflamatórias, expondo assim as células T senescentes a um meio com estímulos pró-apoptóticos. Recetores de morte na superfície celular (Fas / FasLigando (FasL)) são positivamente ativados em células T senescentes, que também estão sujeitas a danos oxidativos leves no DNA. Estas células suscetíveis à apoptose, juntamente com células *naïve* e células T de memória, deixam o compartimento sanguíneo durante a fase de recuperação do exercício (linfocitopénia) e migram para tecidos periféricos específicos. Uma parcela destas células T senescentes subsequentemente sofre apoptose nos tecidos periféricos, assim criando um espaço vago. Por conseguinte, o baixo número de células T conduz a um ciclo de *feedback* positivo, aumentando a produção de células T *naïve* a partir do timo ou de locais de desenvolvimento de células T extra-timo (i.e., fígado, intestinos). Estas células T recentemente geradas preenchem o espaço vago e contribuem para a expansão do repertório de células T *naïve* (Simpson, 2011b). O autor sugeriu que repetições deste processo em resposta ao exercício habitual reduziriam a percentagem de células T senescentes ao longo do tempo, diminuindo o risco de infeção e aumentando a longevidade saudável (Simpson, 2011b).

Na busca de um modelo onde pudéssemos investigar as respostas a estímulos do treino e adaptações a longo-prazo, bem como ao envelhecimento *per sé*, recorreremos a uma população de atletas *master*. Atletas *master* geralmente mantêm seu treino físico ao longo da vida e, interessantemente, apresentam menor incidência de doenças crónicas quando comparados com

indivíduos saudáveis da mesma idade (Kettunen, Kujala, Kaprio, *et al.*, 2006). Estes indivíduos representariam assim um modelo de “envelhecimento bem-sucedido” (Kusy & Zieliński, 2015; Tanaka & Seals, 2008; Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013) sugerindo que, uma prática regular e sistemática de exercício ao longo da vida (desporto organizado) tem efeito benéfico sobre o processo de envelhecimento.

Sendo assim, o “modelo de atletas *master*” providenciaria uma oportunidade única de estudar a capacidade (ou falta dela) para manter o desempenho físico de pico e a função fisiológica com o envelhecimento humano (Tanaka & Seals, 2008), bem como para determinar se o exercício pode realmente criar espaço imune e contribuir para a restauração da função imune e longevidade saudável na presença de infecções virais persistentes.

## 1.1 OBJETIVOS

A participação de atletas *master* no desporto competitivo é um fenómeno crescente. As informações são limitadas, e não se sabe ao certo quais são os potenciais benefícios ou os riscos para a saúde da participação de atletas em competições ao longo da vida e na condição de *master*. São numerosos os estudos que avaliaram os efeitos de uma série aguda de exercício sobre as respostas imunes. No entanto, a resposta de um determinado parâmetro imune a uma série aguda de exercício não pode ser preditiva de como o mesmo parâmetro imunológico responde ao exercício a longo prazo. Outros estudos têm utilizado programas de exercício, com avaliação da função imune, antes ou após a intervenção. Estudos de intervenção com programas de exercício têm sido realizados em adultos mais velhos que vão desde várias semanas até dois anos. Uma variedade de tipos de exercício tem sido testada incluindo calisténicos e de treino de força, ainda que a maioria dos estudos utilizem o exercício cardiovascular em intensidade moderada. Geralmente, as intervenções a longo prazo têm observado melhorias na função imune. Em geral, parece que as intervenções a longo prazo (~ 1 ano) têm mais possibilidades de demonstrar um impacto significativo sobre a função imunitária. No entanto, mais estudos são necessários para determinar claramente o quanto a prática continuada de um exercício ou desporto refletem nos parâmetros imunitários, dando informações sobre se as alterações induzidas pelo exercício ao longo da vida resultam em benefícios clínicos (menos infeções ou menos grave) e claros.

Baseado no exposto acima, o **objetivo principal** desta tese reside no estudo das consequências do envolvimento no treino ao longo da vida de atletas *master*, com idade acima de 40 anos, na condição física e saúde, nomeadamente na imunosenescência e inflamação crónica, bem como examinar as respostas imunológicas às cargas de treino e competição desses atletas ao longo de uma época desportiva.

A fim de alcançar este objetivo, foram definidos os seguintes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar o perfil antropométrico, funcional e hematológico de atletas *master* submetidos ao treino ao longo da vida em desporto competitivo e comparar os resultados com indivíduos de idade cronológica semelhante que nunca foram submetidos a treino físico organizado, denominados grupo controlo;
2. Determinar a influência do treino ao longo da vida e do envelhecimento *per sé* sobre a ativação, senescência e produção de citocinas por células T reguladoras;
3. Verificar a influência do treino sobre a redistribuição de linfócitos T senescentes e em resposta a uma sessão máxima de exercício;
4. Analisar o comportamento da contagem de células do sangue periférico e marcadores da imunidade das mucosas em função das cargas de treino e ao longo de uma época desportiva.
5. Analisar a resposta de parâmetros imunitários e seu comportamento em resposta a um protocolo de esforço máximo para explicar que porção da variação depende da idade e/ou da aptidão funcional em atletas *masters* e no grupo controlo;

## 1.2 ESTUDOS

Nesta tese a resposta adaptativa ao treino ao longo da vida e ao envelhecimento, sustenta-se num conjunto alargado de variáveis, que justificam, em nosso entender, a sua organização em 4 estudos (seção 1.2).

Os estudos foram divididos tendo em conta o comportamento de variáveis com afinidade biológica e em ordem sequencial de complexidade mediante o assunto e as técnicas utilizadas.

- Estudo 1: Treino ao longo da vida em atletas *master*: aptidão funcional, variáveis hematológicas e balanço inflamatório de citocinas.
- Estudo 2: A influência do treino ao longo da vida sobre a ativação, senescência e produção de citocinas pelas células T reguladoras.
- Estudo 3: A influência do treino ao longo da vida sobre a mobilização de linfócitos T senescentes em resposta ao exercício agudo máximo.
- Estudo 4: Respostas de marcadores fisiológicos, hematológicos e salivares durante uma época desportiva em atletas *master*.



# Estado da arte

---

## Capítulo 2

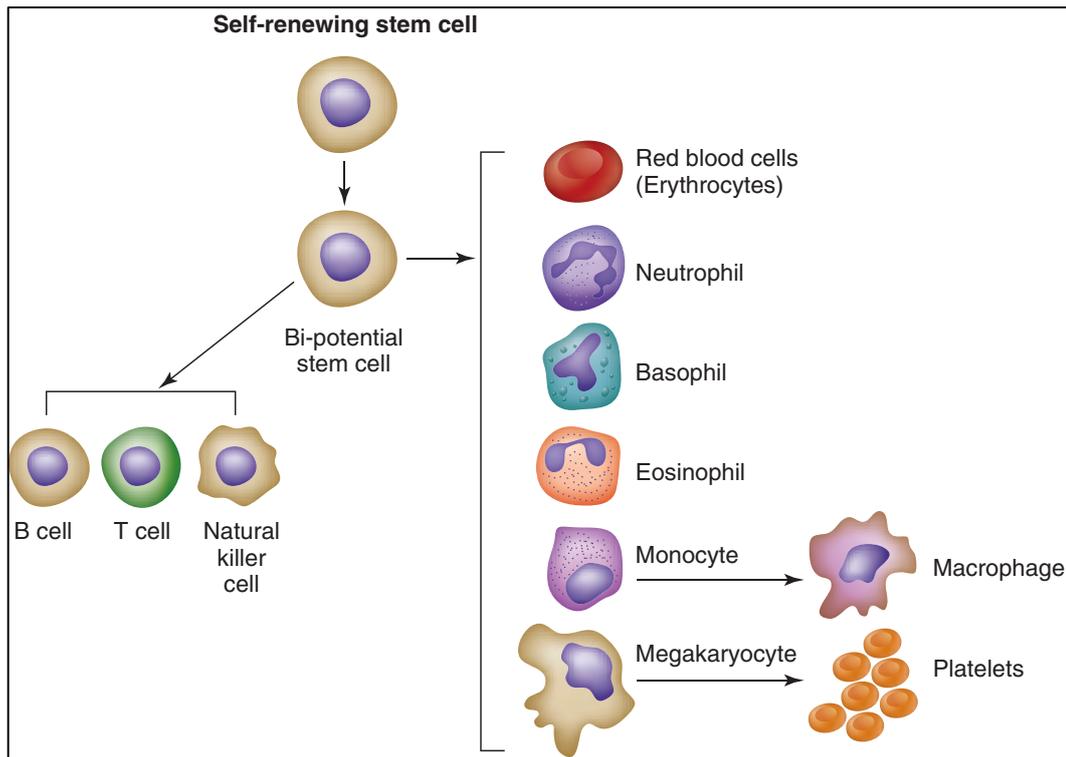


## 2.1 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO

O corpo humano está constantemente sob ataque de agentes invasores (ex., bactérias, vírus e fungos) que promovem infecção. Ao reconhecer, atacar e destruir esses agentes invasores no organismo, o sistema imunitário protege o corpo contra infecção e tem um importante papel na manutenção da homeostasia corporal (Brolinson & Elliott, 2007). Portanto, o sistema imunitário é um sistema homeostático crucial no reconhecimento do próprio e remoção do não-próprio. O sistema imunitário é uma rede complexa de células e moléculas que funcionam para proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores, prevenir doenças e facilitar a cicatrização de feridas. Embora o sistema imunitário seja geralmente dividido em dois grandes ramos, inato (não específico) e adaptativo (específico), é importante notar que ambos os braços do sistema imunitário funcionam sinergicamente a resposta imune em geral (Brolinson & Elliott, 2007; Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015).

Brevemente, o sistema imune inato fornece a primeira linha de defesa, não específica contra agentes invasores e é composto de três componentes principais: (1) as barreiras físicas, tais como a pele e as membranas das mucosas que revestem os tratos respiratório, digestivo e gênito-urinário; (2) células especializadas (por exemplo, fagócitos e células *natural killer*) designadas à destruir invasores, e (3) um grupo de proteínas chamado de sistema do complemento. O sistema imune adquirido adapta-se para proteger o organismo contra quase qualquer tipo de agente patogénico invasor. O objetivo primário da imunidade adquirida é fornecer proteção contra vírus que o sistema imune inato não pode fornecer. As células B e T são as principais células deste sistema. As células B produzem anticorpos, enquanto que as células T são especializadas em reconhecer e remover antigénios do corpo (Brolinson & Elliott, 2007).

A imunidade inata e a adquirida são mediadas pelos leucócitos, células que se originam na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas e que se diferenciam numa variedade de células especializadas (Figura 2.1). Os leucócitos são um grupo heterogéneo de células que circulam continuamente entre vários tecidos linfoides e órgãos, sangue e linfa (Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014). Os leucócitos podem ser divididos em duas categorias: os fagócitos (granulócitos – neutrófilos, basófilos, eosinófilos – monócitos e macrófagos) e os linfócitos (Brolinson & Elliott, 2007) (figura 2.1).



**Figura 2.1: A formação de células sanguíneas a partir de células estaminais dentro da medula óssea.**

Adaptado de (Brolinson & Elliott, 2007).

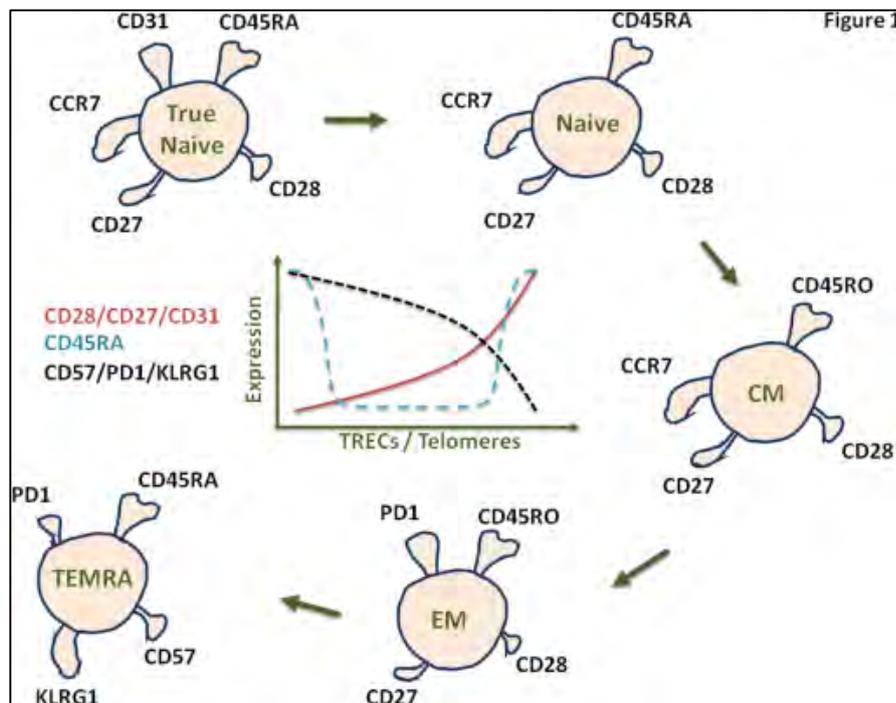
O braço inato do sistema imune inclui os fatores solúveis e as células. Os fatores solúveis incluem proteínas de complemento responsáveis pela fagocitose, controlo da inflamação e interação com os anticorpos, a citocina interferão  $\alpha / \beta$  que limita a infeção viral, e peptídeos antimicrobianos como as defensinas que limitam o crescimento bacteriano. As células principais do sistema imune inato incluem os neutrófilos que são os primeiros da linha defensora contra infeções bacterianas, as células dendríticas (DCs) que servem para organizar respostas imunes, os macrófagos que executam importantes funções fagocitárias, reguladoras e de apresentação de antígeno, e as células NK que reconhecem células hospedeiras alteradas (por exemplo, células infetadas com vírus ou transformadas) (Brolinson & Elliott, 2007).

A imunidade adquirida (também conhecida como imunidade adaptativa ou específica) é delineada para combater infeções, impedindo a colonização de agentes patogénicos e para destruir microrganismos invasores. Os linfócitos T são os protagonistas da imunidade celular adaptativa. Os linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  reconhecem antígenos na forma de peptídeos ligados, respetivamente, às moléculas de classe I e II do Complexo de Histocompatibilidade

Principal (MHC) ou Antígeno Leucocitário Humano (HLA), presentes na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. As células T CD4<sup>+</sup> podem ser divididas em dois fenótipos principais, células T CD4<sup>+</sup> do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), de acordo com as citocinas que elas produzem. As células Th1 desempenham um papel importante na defesa contra agentes patogênicos intracelulares, p.ex. vírus, a produção das citocinas interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina (IL) 2, que estimulam a ativação das células T e a proliferação de clones de células efetoras. As células T de memória também são geradas, permitindo uma rápida resposta secundária após uma exposição subsequente ao mesmo antígeno. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e parecem estar envolvidas na proteção contra os parasitas extracelulares e na estimulação da imunidade humoral (a produção de anticorpos e de outros fatores solúveis que circulam no sangue e outros fluidos corporais). Portanto, citocinas produzidas pelas células Th2 podem ativar linfócitos B, levando à proliferação e diferenciação em células de memória (embora alguns antígenos também possam ativar as células B, independentemente das células CD4<sup>+</sup>). As células B são capazes de secretar grandes quantidades de imunoglobulina (Ig) ou um anticorpo específico para o antígeno que iniciou a resposta. A ligação de Ig para o seu antígeno alvo forma um complexo anticorpo-antígeno e ambos Ig livre e o complexo anticorpo-antígeno circulam nos fluidos corporais. Um outro conjunto de células T, as células T reguladoras (Tregs) de ocorrência natural, expressa o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> e pode suprimir a atividade funcional dos linfócitos por mecanismos que provavelmente envolvem a produção de citocinas, incluindo IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). (A função destas células será descrita em maiores detalhes na seção 2.3).

As células T de memória e naïve apresentam diferenças entre si quanto à expressão de moléculas de superfície. O antígeno leucocitário comum CD45 é uma tirosina fosfatase envolvida na transmissão de sinais entre as células T e B e expressa duas isoformas diferentes na superfície dos linfócitos T durante o processo de diferenciação celular: CD45RA típico das células naïve e CD45RO associado aos linfócitos de memória (Pike & Tremblay, 2013). Além do CD45, duas outras moléculas de superfície são também capazes de distinguir linfócitos naïve e de memória: CD62L e CCR7. O CD62L é uma selectina responsável pela interação dos linfócitos e outros leucócitos com o endotélio das vénulas endoteliais superiores. O CCR7 é o recetor das quimiocinas CCL19 e CCL21 expressas nos locais de entrada dos linfócitos para os linfonodos. As células T naïve apresentam altos níveis de ambas as moléculas, enquanto os linfócitos T de memória perdem a expressão do CD62L e/ou do CCR7 (Sallusto, Lenig, Förster,

*et al.*, 1999). Outros marcadores fenotípicos já foram identificados. Dentre estas moléculas podemos ressaltar a cadeia  $\alpha$  do recetor da interleucina 7 (IL-7R), o CD127 e as moléculas coestimulatórias CD27 e CD28 (Koch, Larbi, Derhovanessian, *et al.*, 2008). Os marcadores de superfície tipicamente utilizados para definir as quatro principais subpopulações de células T podem ser resumidos como se segue: naïve ( $CCR7^+$ ,  $CD27^{++}$ ,  $CD28^{++}$ ,  $CD45RA^+$ ), memória-central ( $CCR7^+$ ,  $CD27^{+++}$ ,  $CD28^{+++}$ ,  $CD45RA^-$ ), memória-efetora ( $CCR7^-$ ,  $CD27^{+/-}$ ,  $CD28^{+/-}$ ,  $CD45RA^-$ ) e efetoras-terminais ( $CCR7^-$ ,  $CD27^-$ ,  $CD28^-$ ,  $CD45RA^+$ ). Não só a presença de coreceptores difere entre estas subpopulações mas também o nível de expressão do marcador é variável (Larbi & Fulop, 2014). Os marcadores clássicos das células T  $CD4^+$  e das células T  $CD8^+$ , e uma proposta simplificada de diferenciação está apresentada na Figura 2.2.

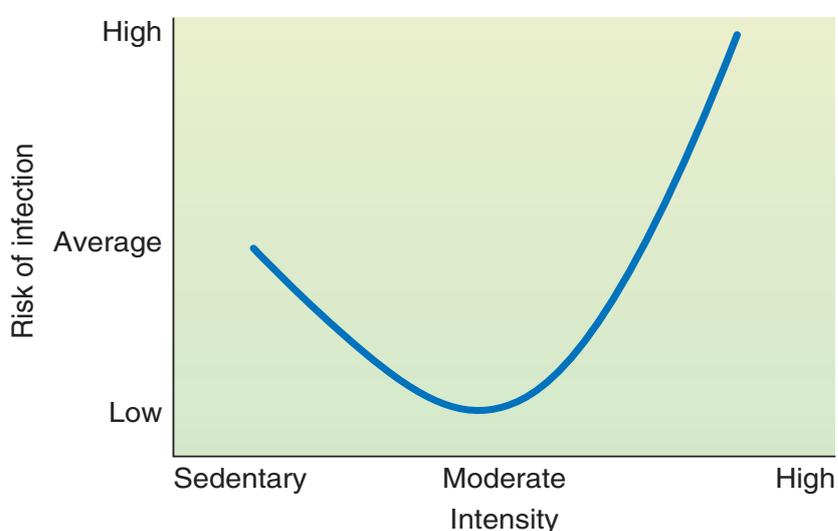


**Figura 2.2. Expressão de marcadores clássicos de diferenciação das células T.**

Além de  $CD28/CD27/CD45RA/CCR7$ , as células T emigrantes tóxicas recentes (denominadas "truly naïve") também expressam o CD31. O perfil de expressão das células de memória-central (CM), memória-efetora (EM) e células T de memória-efetora que voltam a expressar o CD45RA (TEMRA) também é representada. A relação entre a expressão de marcadores de superfície e TRECs/telómeros é representada. CCR7: receptor de quimiocina 7; PD1: recetor de morte programada 1; KLRG1: killer cell lectin-like receptor; TREC: Círculos de excisão do recetor das células T. Adaptado de Larbi & Fulop (2014).

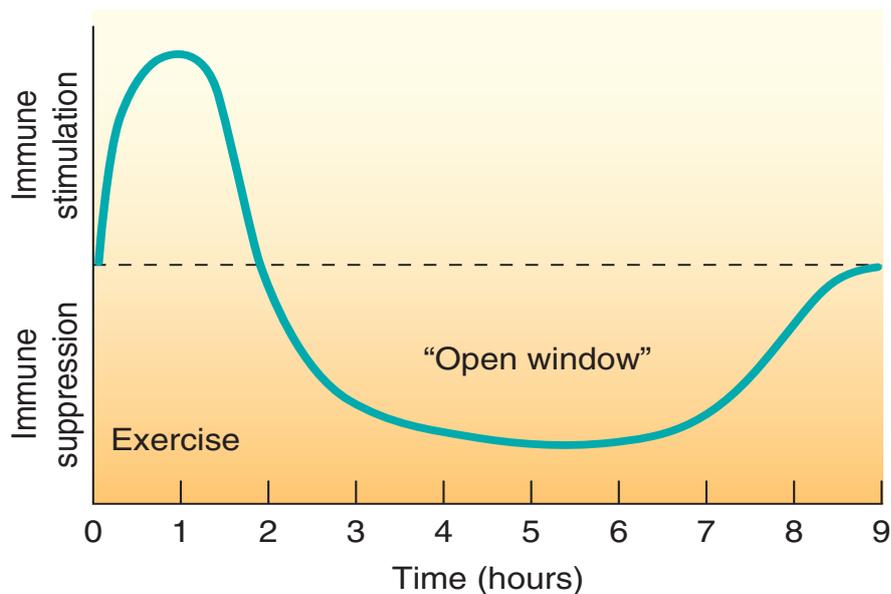
O exercício físico tem um profundo efeito no funcionamento normal do sistema imune. É geralmente aceito que períodos prolongados de treino intenso podem deprimir a imunidade, enquanto o exercício de intensidade moderada é benéfico (Gleeson, 2007).

O conceito que o exercício pode ter efeitos positivos e negativos no risco de infecção foi introduzido pelo Dr. David Nieman quando descreveu a relação entre intensidade/volume de exercício e o risco de ITRS pela curva “J” (Nieman, 1994). Neste modelo, o risco de infecção muda em função da intensidade e quantidade de exercício que foi executada (Figura 2.3). Por este modelo, parece que o exercício físico moderado apresenta efeitos protetores contra ITRS, por “estimular” o sistema imune, através dos aumentos encontrados em células *natural killer* (NK), neutrófilos e anticorpos após uma sessão aguda de exercício. Por outro lado, o exercício prolongado (>90 minutos) e intenso tem um efeito depressivo no sistema imune, caracterizado por uma “janela aberta” durante a qual vírus e bactérias podem crescer, resultando em infecção (Figura 2.4).



**Figura 2.3: Modelo de curva em forma de "J" da relação entre diferentes quantidades de exercício e o risco de ITRS.**

Este modelo propõe que o exercício aeróbico moderado reduz o risco de infecção, ao passo que o exercício de alta intensidade / longa duração pode aumentar o risco de infecção. Adaptada de (Brolinson & Elliott, 2007).



**Figura 2.4: A teoria “janela aberta” é uma possível explicação dos motivos pelos quais o exercício de alta intensidade aumenta o risco de infecção.**

Em resumo, o exercício prolongado (por exemplo, maratona) leva à disfunção imunológica que aumenta a probabilidade de infecções oportunistas do trato respiratório superior. Por exemplo, depois de uma maratona, as seguintes grandes mudanças ocorrem na função imunológica: Diminuição dos níveis sanguíneos de células B, células T e células citotóxicas, diminuição da atividade das células NK e função das células T, as diminuições na fagocitose de neutrófilos, diminuição nos níveis de Imunoglobulina A salivar e aumentos de citocinas pró e anti-inflamatórias. Adaptada de (Brolinson & Elliott, 2007).

### 2.1.1 Exercício agudo e função imune

Há muitos fatores que podem afetar a resposta imune ao exercício agudo, incluindo treino, sessões repetidas de exercício e ambientes extremos, mas os fatores que são particularmente proeminentes são: intensidade e duração da sessão de exercício, idade, estado nutricional e história de infecção. Respostas de subpopulações de leucócitos para um episódio de exercício agudo são altamente conservadoras (Tabela 2.1, adaptada de (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000)). Em geral, mudanças no número de linfócitos no sangue durante e após o exercício são principalmente dependentes da intensidade do exercício, ao passo que a duração do exercício tem uma influência mais forte sobre os neutrófilos e a contagem de leucócitos totais.

### 2.1.1.1 Respostas da Imunidade Inata ao Exercício Agudo

A leucocitose é a alteração hematológica mais consistente observada em resposta ao exercício exaustivo prolongado, e a magnitude da alteração do número de leucócitos na circulação é proporcional à intensidade e duração do exercício (Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014). Atletas costumam ter uma supressão transitória da função imunológica após um exercício intenso, que pode ser devido ao comprometimento da função dos neutrófilos e linfócitos (Santos, Levada-Pires, Alves, *et al.*, 2013).

Tabela 2.1. Efeitos do exercício intenso sobre o sistema imune.

	Durante o exercício	Após o exercício
Neutrófilos	↑	↑ ↑
Monócitos	↑	↑
Células T CD4 <sup>+</sup>	↑	↓
Células T CD8 <sup>+</sup>	↑	↓
Células B CD19 <sup>+</sup>	↑	↓
Células NK	↑	↓
Apoptose de linfócitos	↑	↑
Resposta proliferativa à mitogénios	↓	↓
Responsividade a anticorpos in vitro	↓	↓
IgA salivar	↓	↓
Resposta de hipersensibilidade do tipo atrasada	↓	↓
Atividade de células NK	↓	↓
Célula matadora ativada por linfocina	↑	↓
Proteína C-reativa	↓	↑
Neopterina	↓	↑
Concentração plasmática de TNF- $\alpha$	↑	↑
Concentração plasmática de IL-1	↑	↑
Concentração plasmática de IL-6	↑ ↑	↑
Concentração plasmática de IL-1ra	↑ ↑	↑
Concentração plasmática de IL-10	↑	↑
Concentração plasmática de TNF-R	↑	↑
Concentração plasmática de MIP-1, IL-8	↑	↑

↑, aumento. ↓, diminui. ↑ ↑ aumento acentuado. TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral; TNF-R, recetores do fator de necrose tumoral; IL, interleucina; MIP, proteína inflamatória de macrófagos. Adaptada de (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Após uma sessão aguda de exercício, observa-se uma rápida e profunda neutrofilia seguida por um novo aumento “tardio” na contagem de neutrófilos no sangue algumas horas

mais tarde (Peake & Suzuki, 2004). O aumento inicial é provavelmente devido a demarginação causada pelo stresse e pelas catecolaminas, ao passo que, o segundo aumento pode ser devido à libertação, induzida pelo cortisol, de neutrófilos a partir da medula óssea (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011; McCarthy, Macdonald, Grant, *et al.*, 1992). O consenso publicado em 2011 por Walsh e colaboradores diz, em relação a neutrófilos: o exercício agudo de intensidade moderada aumenta a quimiotaxia de neutrófilos, mas não modifica sua capacidade de aderir ao endotélio. A adesão endotelial dos neutrófilos é o primeiro passo na migração destas células para os locais de lesão ou infeção. Ao serem atraídas ao local de infeção, os neutrófilos, como outras células do sistema inato, ingerem e destroem micróbios por fagocitose. Os micróbios são atacados e digeridos dentro de vacúolos intracelulares por enzimas granulares líticas (desgranulação) e espécies reativas de oxigénio (ROS) (*burst* oxidativo/respiratório). A desgranulação espontânea dos neutrófilos pode aumentar após o exercício agudo, mas a desgranulação de neutrófilos em resposta a estimulação bacteriana parece ser prejudicada. Isto indica que, embora o exercício possa mobilizar neutrófilos altamente funcionais para a circulação, durante a recuperação, a sua capacidade de responder a estímulos exógenos pode estar diminuída. Ademais, o consenso menciona que o *burst* oxidativo de neutrófilos é muito influenciado pela intensidade e duração da sessão de exercício. Além disso, durante a recuperação do exercício, o *burst* oxidativo de neutrófilos continua a ser aumentado após o exercício de intensidade moderada, mas é prejudicado/diminuído após o exercício exaustivo ou prolongado (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). Em relação à atividade fagocitária das células imunitárias inatas, a posição dos especialistas (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011) diz que a fagocitose de neutrófilos é reforçada imediatamente após uma única sessão de exercício, enquanto a fagocitose de monócitos pode aumentar após exercício submáximo prolongado, mas não após exercício exaustivo. Em monócitos, células da defesa inata potentes em produzir muitas proteínas pró-inflamatórias, o exercício agudo provoca monocitose. Esta elevação na contagem dos monócitos parece ser transitória (2 horas) e resultado de um deslocamento das células do *pool* dos tecidos periféricos para a corrente sanguínea (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011).

Relativamente aos outros leucócitos do sangue, as células NK são rapidamente mobilizadas para a circulação em resposta ao exercício agudo, provavelmente por um aumento da tensão de cisalhamento (*shear stresse*) e da depressão induzida por catecolaminas da expressão de moléculas de adesão (Timmons, Tarnopolsky, Snider, *et al.*, 2006). Sobre as células NK, o consenso de Walsh e colaboradores (2011) relatou que, parece haver um

diferencial de mobilização em que as células NK CD56<sup>bright</sup> são menos sensíveis do que as CD56<sup>dim</sup>. Isto pode indicar uma reduzida capacidade de defesa contra agentes patogénicos durante o exercício agudo, uma vez que as células CD56<sup>bright</sup> são mais citotóxicas. Embora uma única sessão de exercício provoque um aumento na citotoxicidade de células NK que é seguida rapidamente por uma supressão retardada durante a recuperação de exercício, tornou-se evidente que as alterações na proporção de células NK entre as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) são largamente responsáveis pela resposta bifásica na função das células NK. De facto, alterações na função de células NK com exercício refletem as alterações no número de células NK, resultando muitas vezes no facto de o número de células alvo mortas por células NK permanecer inalterado (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011).

#### 2.1.1.2 Respostas da Imunidade Adquirida ao Exercício Agudo

Estudos longitudinais em que os sujeitos, previamente sedentários, comprometem semanas ou meses de treino físico não mostram qualquer alteração evidente nas funções de células T e B, desde que as amostras de sangue sejam colhidas, pelo menos, 24 horas após a sua última sessão de exercícios. Pelo contrário, as funções das células T e B parecem ser sensíveis a aumentos na carga de treino em atletas bem treinados que realizam um período de treino intensificado, com decréscimos no número de células Th1, redução da resposta proliferativa das células T e queda na síntese de Ig estimulada pelas células B. Isto sugere que atletas envolvidos em longos períodos de treino intenso podem apresentar diminuições na funcionalidade das células T. A causa desta depressão na imunidade adquirida parece estar relacionada com hormonas de stresse elevados, em particular o cortisol, e alterações no balanço de citocinas pro/anti-inflamatórias em resposta ao exercício. Isto parece resultar numa inibição temporária da produção de citocinas pelas células Th1, com um amortecimento relativo da resposta do tipo 1 (mediada por células) (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011).

A proliferação de células T diminui, tanto durante como após o exercício. Este parece ser um efeito consistente sempre que mitógenos são utilizados para ativar células T, independentemente da modalidade de exercício, intensidade ou duração. Além disso, as reduções nas propriedades migratórias e *homing* de células T foram também relatados durante a fase de recuperação de exercícios prolongados (Krüger & Mooren, 2007). Os linfócitos

também apresentam uma resposta bifásica transitória ao exercício. Normalmente, uma linfocitose é observada durante e imediatamente após o exercício, seguida de uma linfopenia, onde o número de células fica abaixo dos níveis pré-exercício durante as fases iniciais de recuperação, antes de voltar gradualmente aos valores de repouso (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). A capacidade proliferativa de linfócitos é um evento chave na resposta imunitária, e a capacidade do hospedeiro para responder a um patógeno pode ser comprometida de forma significativa se a proliferação de linfócitos não é adequada. Isto pode resultar num risco aumentado de doenças infecciosas e doenças autoimunes (Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014).

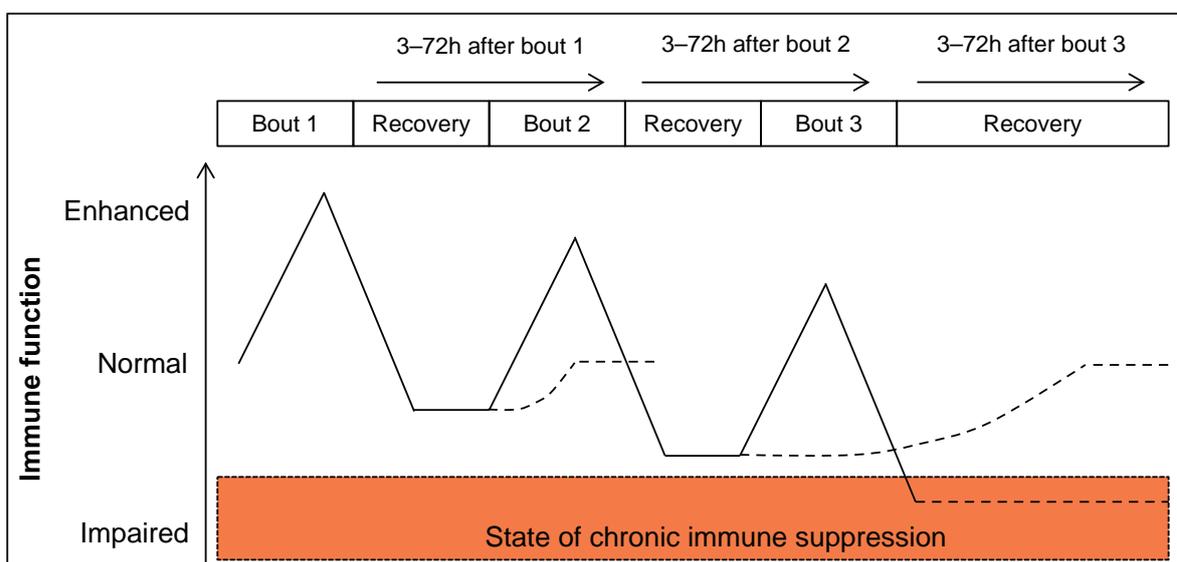
Por isso, o exercício extenuante é geralmente associado com um aumento dos sintomas de ITRS em atletas (Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014), sugerindo que o exercício de alto volume pode ter um efeito imunossupressor (Gleeson, 2007). Os mecanismos imunológicos que fundamentam este aparente aumento da suscetibilidade à infecção em atletas são, provavelmente, multifatoriais e incluem perturbações do compartimento de células T (Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014). A diminuição no número de células T após o exercício é em grande parte devido a uma diminuição de células Th1, uma vez que a atividade física intensa diminui a percentagem de células Th1, mas tem pouco efeito sobre a percentagem das células T tipo 2 (Steensberg, Toft, Bruunsgaard, *et al.*, 2001). Não está claro se essas alterações são decorrentes da apoptose ou, como parece mais provável, de uma redistribuição de células para outros compartimentos.

Em resumo, as células T desempenham um papel fundamental na organização e regulação da resposta imunitária mediada por células a agentes patogénicos. Uma consequência importante de um defeito na função das células T é um aumento da incidência de infeções virais. Com isto em mente, tem-se especulado que o aumento da suscetibilidade aparente de homens e mulheres desportistas a infeções do trato respiratório pode ser devido a uma diminuição na função das células T, induzida pelo exercício.

### **2.1.2 Exercício crónico e função imune**

Na seção anterior, relatou-se que o exercício agudo intenso provoca uma depressão de

vários aspetos da função imunológica adquirida. Esta depressão é transitória e o número e função celulares geralmente retornam aos valores pré-exercício no prazo de 24h. Entretanto, se a recuperação entre as sessões de exercício é insuficiente, como durante períodos prolongados de treino intensificado em atletas de elite, esta diminuição temporária na função das células pode tornar-se uma depressão crónica da imunidade adquirida. Embora esta deficiência imune não seja de carácter clínico, é possível que os efeitos combinados de pequenas alterações em vários aspetos da defesa do hospedeiro possam comprometer a resistência a doenças menores, tais como infeções respiratórias (ver figura 2.5).



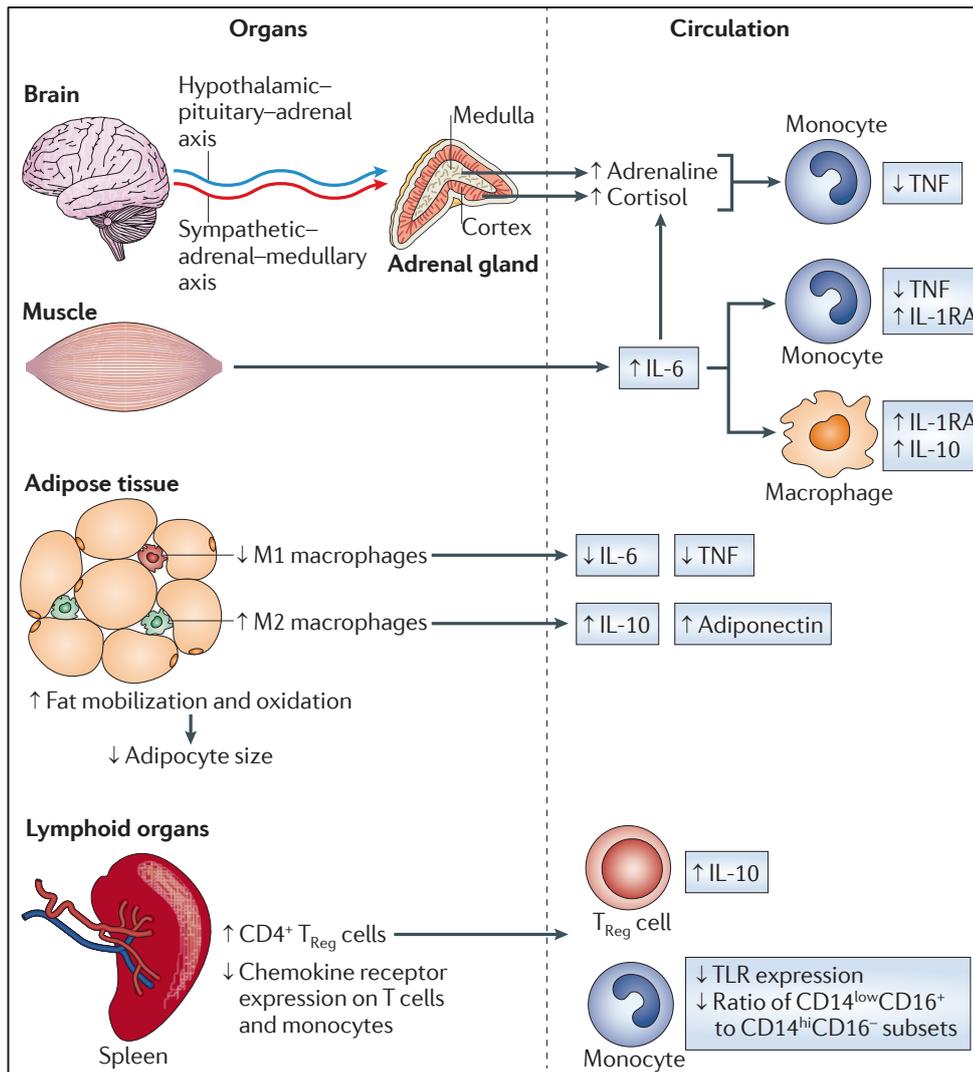
**Figura 2.5. As hipóteses da "janela aberta".**

Uma única sessão de exercício está associada com um aumento inicial na função imunológica, que é rapidamente seguido por um período transitório de imunodepressão (a "janela aberta") que pode durar 3-72 h após a sessão inicial de exercício (na maioria dos casos, a função imunológica é restaurada para níveis normais no prazo de 24h). Acredita-se que esta "janela aberta" deixa o hospedeiro suscetível a infeções oportunistas. Se, um segundo turno de exercício é realizado durante a janela (isto é, sem adequada recuperação), então o aumento induzido pelo exercício na imunidade é atenuado e a depressão imune pós-exercício é mais severa e prolongada (isto é, a janela é aberta de forma mais larga e durante mais tempo), tornando o atleta mais suscetível à infeção. A resposta é agravada com séries de exercícios subsequentes que, se concluídas novamente sem a recuperação adequada, podem resultar num estado de supressão imune crónica. Adaptado de (Simpson, Kunz, Agha, et al., 2015).

A resistência reduzida a infecções pode ser o resultado de um sistema imunitário enfraquecido induzido pelo exercício crônico intenso. Isto pode afetar não só a imunidade mediada por células e inflamação – pela diminuição de macrófagos e a produção de citocinas pelas células Th1 (Gleeson, 2007) – mas também as funções imunitárias inatas, como a atividade de células NK e o *burst* oxidativo dos neutrófilos (Nieman, Nehlsen-Cannarella, Fagoaga, *et al.*, 1998).

#### 2.1.2.1 Treino de intensidade moderada e efeitos anti-inflamatórios

O efeito protetor de um estilo de vida fisicamente ativo contra doenças (p.ex. associadas à inflamação crônica) podem ser atribuídos a um efeito anti-inflamatório do exercício, que pode ser mediado não só através de uma redução da massa de gordura visceral (com uma subsequente diminuição na produção e liberação de adipocinas pró-inflamatórias), mas também através da indução de um ambiente anti-inflamatório, em cada série de exercício (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011) (figura 2.6). Gleeson numa importante revisão publicada em 2011 apresentou três possíveis mecanismos dos efeitos anti-inflamatórios do exercício: a redução da massa de gordura visceral; aumento da produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias pela contração muscular (miocinas); redução na expressão dos recetores *Toll-like* (TLRs) em monócitos e macrófagos (com subsequente inibição de respostas *downstream*, tais como a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de MHC e moléculas coestimuladoras). Além disso, os estudos com ratos revelaram que os efeitos anti-inflamatórios do exercício também dependem de outros mecanismos, tais como a inibição de monócitos e infiltração de macrófagos no tecido adiposo e a mudança fenotípica dos macrófagos dentro do tecido adiposo. A análise do sangue periférico humano seguindo o exercício revelou uma redução no número circulante de monócitos pró-inflamatórios e um aumento no número de Tregs (Figura 2.6) (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). A redução da massa gorda pode prevenir a inflamação crônica de baixo grau inibindo as vias inflamatórias (Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015; Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). Além disso, as reduções induzidas pelo exercício no conteúdo de colesterol das membranas celulares que acompanham a perda de gordura podem melhorar a sinalização do recetor de células T e a translação das moléculas de MHC para apresentação de antigénio (Shaikh & Edidin, 2006).



**Figura 2.6: Os potenciais mecanismos que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios do exercício.**

A ativação do eixo hipotálamo-pituitário-supra-renal e do sistema nervoso simpático (SNS) conduz à libertação de cortisol e adrenalina do córtex e da medula adrenal, respetivamente. Estas hormonas inibem a libertação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por monócitos. A IL-6 produzida pela contração do músculo esquelético também regula negativamente a produção de TNF por monócitos e pode estimular a libertação de cortisol. Elevações agudas nos níveis de IL-6 estimulam a libertação do recetor antagonista de IL-1 (IL-1ra) a partir de monócitos e macrófagos, aumentando assim as concentrações circulantes desta citocina anti-inflamatória. O exercício físico mobiliza Tregs (que são uma importante fonte da citocina anti-inflamatória IL-10) e diminui a proporção de monócitos inflamatórios (CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>) para monócitos clássicos (CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>). A seguir ao exercício, monócitos CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup> expressam menos recetor do tipo Toll 4 (RST4), e assim reduzem a resposta inflamatória (redução de citocinas pró-inflamatórias e da infiltração no tecido adiposo). O exercício também aumenta as concentrações plasmáticas de quimiocinas inflamatórias-chave das células

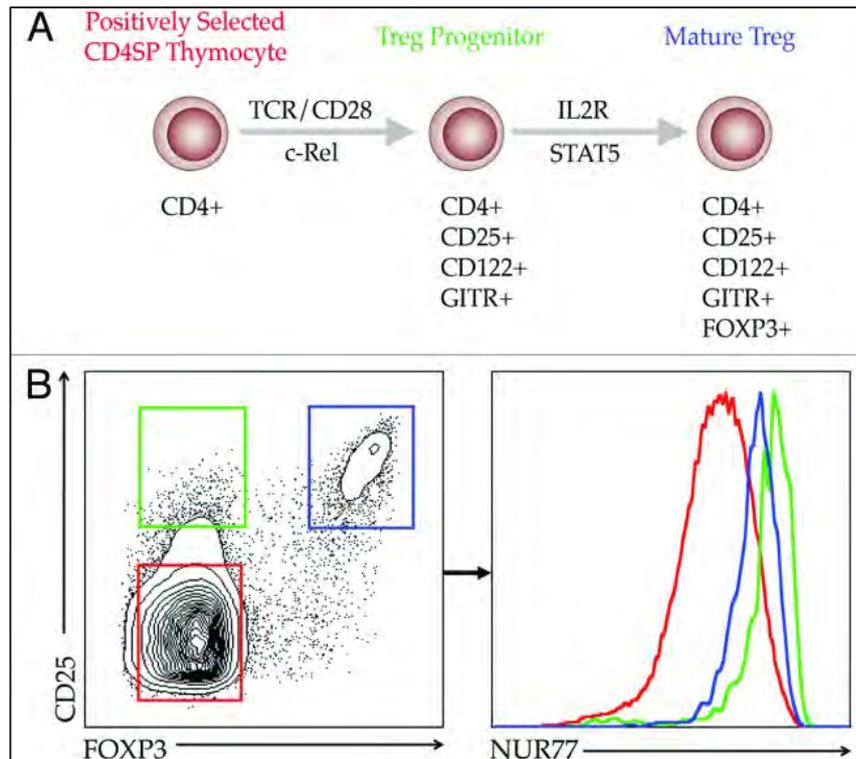
imunológicas; elevações repetidas de tais quimiocinas pode levar a uma regulação negativa dos seus recetores celulares, resultando na reduzida infiltração no tecido. Uma redução no tamanho do tecido adiposo e adipócitos, juntamente com a redução da infiltração de macrófagos e a troca do fenótipo M1 para um de macrófagos M2, pode contribuir para uma diminuição na libertação de citocinas pró-inflamatórias (tais como IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e um aumento da libertação de citocinas anti-inflamatórias (tais como adiponectina e IL-10) a partir de tecido adiposo. Adaptado de Gleeson et al. (2011).

## **Implicações**

Os mecanismos subjacentes aos efeitos anti-inflamatórios do treino são complexos e ainda não elucidados completamente. Existem dados muito limitados de ensaios clínicos para concluir definitivamente que o treino a longo prazo reduz a inflamação crónica (Beavers, Brinkley & Nicklas, 2010).

## **2.2 CÉLULAS T REGULADORAS E EXERCÍCIO**

As Tregs são cruciais na manutenção da tolerância imunológica e no controlo negativo de respostas imunes patológicas. Tregs podem suprimir a ativação, proliferação e as funções efetoras de uma vasta gama de células imunitárias, incluindo células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, células NK, células B e células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas células podem suprimir as células T efetoras por mecanismos que incluem a competição direta com ligantes estimuladores das APCs (p.ex. CD86, CD80) ou através da redução dos níveis de fatores de crescimento essenciais, tais como a IL-2. Além disso, as Tregs produzem IL-10 e TGF- $\beta$  como mecanismos adicionais para suprimir a atividade de células-alvo. Tregs expressam o recetor de cadeia  $\alpha$  da IL-2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 (*forkhead Box P3*), um gene de controlo que é a chave para o seu desenvolvimento e função (de Moura Braz, de Melo, da Glória Aureliano de Melo Cavalca, *et al.*, 2014) (figura 2.7).

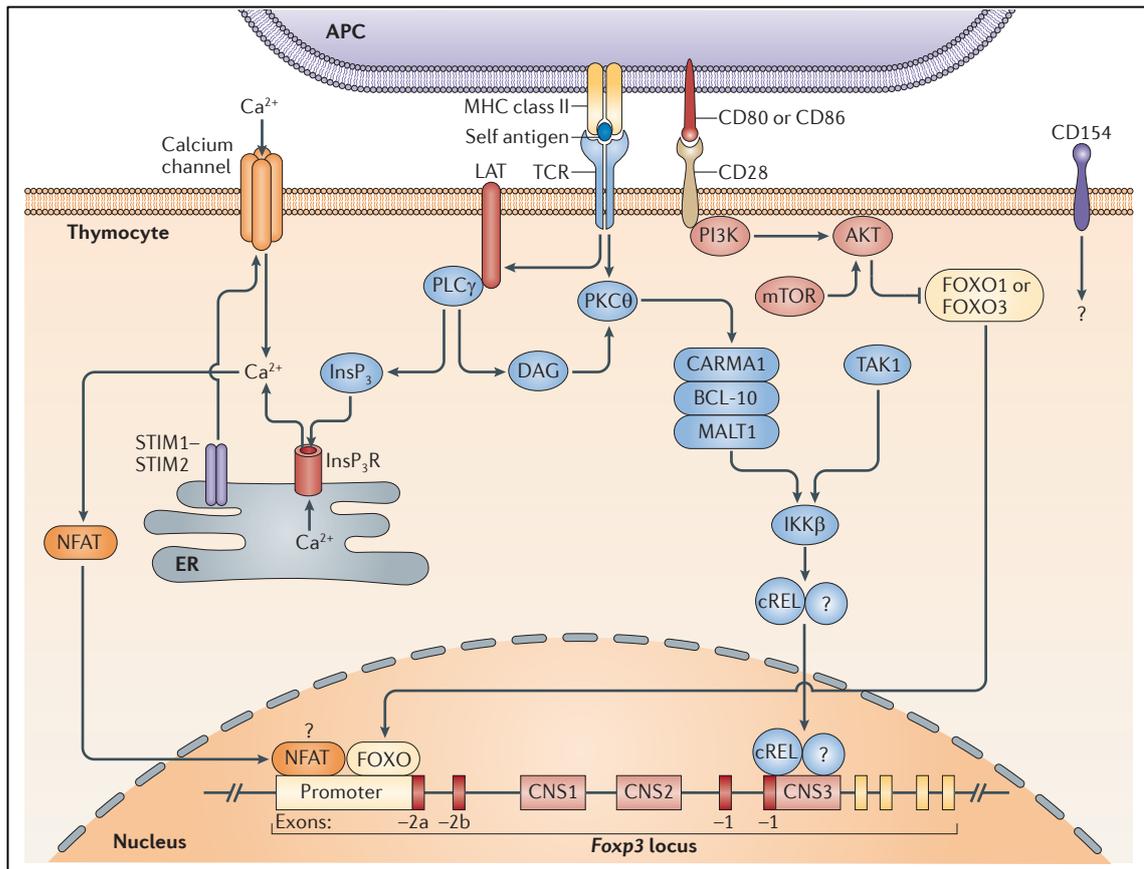


**Figura 2.7. Ilustração de um modelo de duas etapas para o desenvolvimento de Tregs a partir do timo.**

(A) Timócitos CD4SP (do inglês single-positive) recebem sinais de alta afinidade / avides vindos do TCR / CD28 que são primeiramente programados pela via NFkB para expressar IL2R $\alpha$  e IL2R $\beta$ , tornando-os altamente responsivos a IL-2. Um segundo passo, que é independente de TCR, mas citocina-dependente, é completado quando progenitores recebem sinais da IL-2 transmitida via STAT5 para conduzir posteriormente a expressão de Foxp3. Esta segunda etapa amadurece e torna as Tregs FOXP3<sup>+</sup> totalmente funcionais. (B) CD4SP timócitos plotados com base na expressão de CD25 e FOXP3 podem ser classificados em (1) células convencionais ou não-Tregs que são CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> (gated em vermelho), (2) progenitores de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>, que também são CD122<sup>hi</sup> e GITR<sup>hi</sup> (gated em verde) e (3) Tregs maduras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (gated em azul). A representativa intensidade do sinal do TCR de cada uma dessas populações relacionadas através da expressão de NUR77-GFP, é mostrado no histograma no lado direito (adaptado de Mahmud et al. 2013).

O primeiro mecanismo para a indução de FoxP3 nas Tregs desenvolvidas no timo parece ser dependente da ativação da via do fator nuclear-KB (NFkB), através do complexo CARMA1-BCL-10-MALT1. IKK cinase- $\beta$  (IKK $\beta$ ) é ativada por este complexo e por quinase TGFp-ativada 1 (TAK1) e, em seguida fosforila o inibidor do NFkB (IKB), conduzindo à dissociação de IKB do NFkB e a subsequente degradação de IKB. Uma vez libertado, o fator

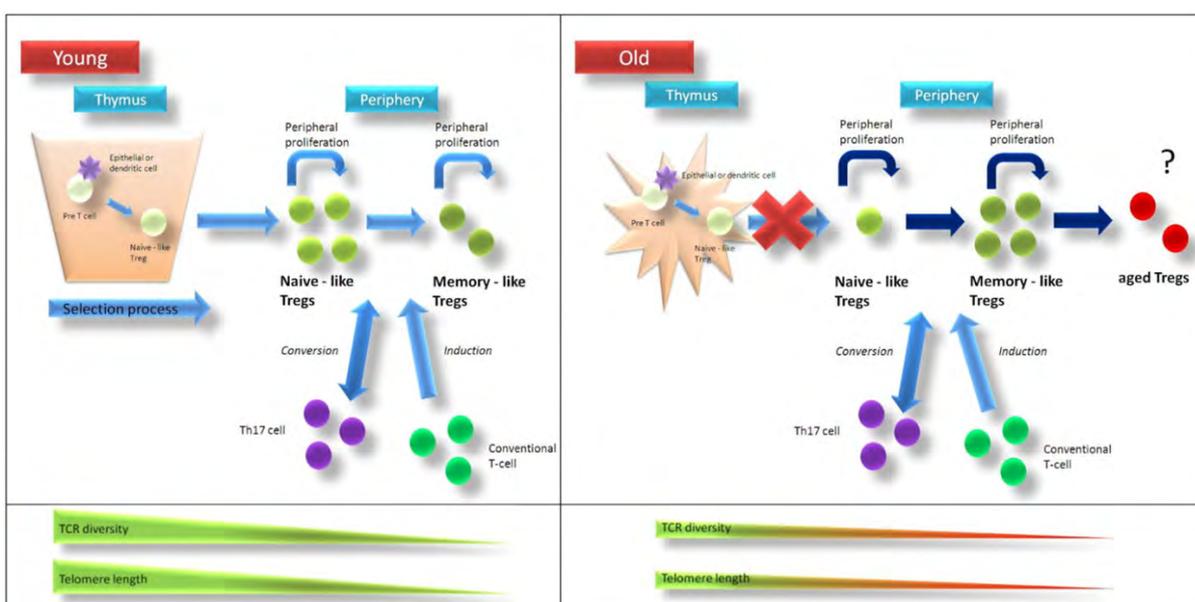
de transcrição da família NF $\kappa$ B–cREL, transloca-se para o núcleo e liga-se a região CNS3 do *locus* FoxP3. Ainda que menos bem caracterizada, o fator nuclear das células T ativadas (NFAT), que é ativado a jusante da sinalização do Ca<sup>2+</sup>, também pode ter um papel positivo na indução de FoxP3 (Figura 2.8).



**Figura 2.8: Mecanismos moleculares ligando a especificidade do TCR a expressão do FoxP3.** Adaptado de (Hsieh et al., 2012).

Curiosamente, a via AKT-mTOR (alvo mamário de rapamicina) pode ser um regulador negativo da indução de FoxP3 através da fosforilação e inibição de fatores de transcrição FOXO, que facilitam a expressão de FoxP3, embora ainda não esclarecido (Hsieh, Lee & Lio, 2012) (figura 2.8). TGF- $\beta$  também desencadeia a expressão de precursores do FoxP3 e em conjunto com a IL-2, é um regulador chave das vias de sinalização que mantêm a expressão de FoxP3 e função supressora nas Tregs (Perry, Pick, Bdolach, *et al.*, 2013; Fu, Zhang, Yopp, *et al.*, 2004). Dado os mecanismos de desenvolvimento das Tregs e seu papel central na

homeostasia imune, qualquer perda relacionada com a idade da função das Tregs seria previsto contribuir para a atividade imune sobre-ativa encontrada em humanos idosos como a síndrome de inflamação crónica e o aumento relacionado com a idade no risco de desordens autoimunes (Lages, Suffia, Velilla, *et al.*, 2008; Hampras, Nesline, Wallace, *et al.*, 2012). Por outro lado, o aumento relacionado com a idade no número de Tregs poderia resultar em respostas imunes comprometidas, aumentando o risco de infeções e doenças malignas entre os idosos. Esta expansão da população de Tregs só pode ser considerada fisiologicamente relevante se a função supressora das Tregs acumuladas no envelhecimento permanece intacta. Com efeito, a produção de IL-10 e a expressão do FoxP3 pelas Tregs tem sido mostrada ser conservada com o envelhecimento (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014) (Figura 2.9 para detalhes).



**Figura 2.9. Mudanças relacionadas com a idade na homeostasia das Tregs.**

Em indivíduos jovens as Tregs são geradas no timo e são libertadas como "naïve" na circulação. Depois do contato com o antígeno, Tregs evoluem para um fenótipo de memória. A homeostasia das Tregs é suportada pela proliferação homeostática de Tregs "naïve" e "memória" bem como a conversão de células T não-reguladoras em Tregs. O comprimento dos telómeros e a diversidade dos recetores de células T é maior em Tregs-naïve em comparação com as Tregs-memória. Após a puberdade a função do timo é progressivamente perdida e em indivíduos mais velhos a proliferação homeostática das Tregs existentes bem como a conversão de células T não reguladoras em Tregs compensa a falha do timo em manter o pool de Tregs. A replicação homeostática contínua dos telómeros e a diversidade do recetor de células T das Tregs está reduzida em idosos em comparação com a de indivíduos jovens. A estimulação recorrente de Tregs pode, então, levar a um estado de "diferenciação terminal" com função e fenótipos alterados destas células. (adaptado de Fessler *et al.* 2013).

Como vimos, FoxP3 é o principal regulador da função das Tregs e sua expressão está sob o controle de vários promotores epigeneticamente instáveis e potenciadores. A desmetilação de locais de CpG dentro destas regiões está associada com a expressão aumentada de FoxP3 e o desenvolvimento de um fenótipo supressor das Tregs. Nesse sentido, Garg e colegas examinaram diferenças na expressão de Foxp3 entre ratinhos jovens (3-4 meses) e envelhecidos (18-20 meses) da linhagem C57BL/6. O DNA das células T CD4<sup>+</sup> era hipometilado em ratinhos envelhecidos, os quais também exibiam um aumento do número de Tregs e da expressão de FoxP3. Além disso, nos ratinhos envelhecidos, as Tregs tinham maior capacidade de suprimir a proliferação de células T efectoras *in vitro* comparado com Tregs dos ratinhos jovens, produziam níveis mais elevados de IL-10 e eram capazes de suprimir a expressão de CD86 em DCs mais fortemente do que as Tregs de ratinhos jovens, sugerindo a diminuição da atividade das células T. Tomados em conjunto, estes resultados revelam um mecanismo potencial do aumento da atividade mediada por Tregs que pode contribuir para um aumento da supressão imune com a idade (Garg, Delaney, Toubai, *et al.*, 2014).

Os estudos em humanos avaliando sangue periférico de indivíduos mais velhos contra indivíduos jovens parecem estar de acordo que a percentagem de Tregs CD4<sup>+</sup> é maior em indivíduos mais velhos (Gregg, Smith, Clark, *et al.*, 2005; Gottenberg, Lavie, Abbed, *et al.*, 2005; Lages, Suffia, Velilla, *et al.*, 2008). Tregs CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> de indivíduos mais velhos mostram aumento da expressão de FoxP3 em comparação com Tregs de indivíduos jovens, ao passo que o restante do seu fenótipo típico (GITR, CTLA-4 e CD127<sup>low</sup>) é inalterado (Gregg, Smith, Clark, *et al.*, 2005; Lages, Suffia, Velilla, *et al.*, 2008). Hwang e colegas realizaram um estudo com humanos focado no efeito inibidor direto das Tregs em células T CD4<sup>+</sup> convencionais na ausência de APCs desde que as últimas células podem afetar a função das células T. Os resultados do estudo enaltecem que a frequência, características fenotípicas e função anti-proliferativa das Tregs CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foram comparáveis nos jovens (idade < 40 anos) e idosos (idade > 65 anos). No entanto, quando células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> foram estimuladas na presença do mesmo número de Tregs (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), a produção de IL-10 a partir das Tregs foi suprimida de forma mais potente nos idosos do que nos jovens. Estes achados sugerem que o envelhecimento pode afetar a capacidade das Tregs (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) na regulação da produção de IL-10 a partir de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> em humanos (Hwang, Kim & Kang, 2009). Isto pode ter importantes implicações no desenvolvimento de patologias inflamatórias em idosos, considerando esta possível desregulação inflamatória decorrente da diminuição da IL-10.

No entanto, uma vez que o número de subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> reduz nos idosos, não é claro se este aumento relativo das Tregs é devido a uma perda de células T CD4<sup>+</sup> naïve ou uma expansão real do número absoluto das Tregs (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014). Os resultados de estudos em ratinhos (Chiu, Stolberg, Zhang, *et al.*, 2007; Sharma, Dominguez & Lustgarten, 2006) e humanos sugerem que o aumento das Tregs medido em indivíduos mais velhos não é simplesmente um aumento relativo devido a uma diminuição em outras subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>, mas reflete um aumento em números absolutos de Tregs (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014).

Enquanto o aumento do número de Tregs parece estar amparado por vários estudos, devemos levar em consideração um aspeto em particular. Enquanto as Tregs CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> são derivadas do timo, células com um fenótipo semelhante podem ser induzidas a partir de células T convencionais (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>-</sup>) pelo TGF-β (Feuerer, Hill, Mathis, *et al.*, 2009). Estas Tregs induzidas (iTregs) exibem a mesma função imunossupressora como as Tregs naturais (nTregs). Mas, enquanto as nTregs aumentam com a idade, dados sugerem que indivíduos mais velhos são menos capazes de gerar iTregs quando necessário, provocando seu declínio ao longo do tempo (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014). Evidências também sugerem que o número de Tregs circulantes aumenta na sequência de uma sessão aguda de exercício máximo em humanos (Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013). Além disso, há suporte científico para uma associação entre a carga de treino elevada e o aumento da produção de IL-10 estimulada por antigénio *in vitro* e um maior número de Tregs na corrente sanguínea, apoiando a hipótese de que Tregs são mediadoras dos efeitos inibitórios através de aumentos da produção de IL-10 em indivíduos altamente ativos, e isso pode desempenhar um papel importante na modificação do risco de infeção respiratória (Gleeson & Walsh, 2012; Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013). Neste caso o aumento da produção de IL-10 pelas Tregs seria um dos mecanismos anti-inflamatórios do exercício no modelo proposto por Gleeson e colegas (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011), portanto, benéfico aos indivíduos.

## **Implicações**

Num estudo que utilizou um modelo de corrida para ratos, as respostas de Tregs circulantes para o treino físico moderado ou de alta intensidade mostrou que apenas o exercício de alta intensidade resultou no aumento do número de Tregs, e também foi associado com

reduzida expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento na expressão de citocinas anti-inflamatórias (Wang, Song, Tang, *et al.*, 2012). Curiosamente, estes resultados implicam que o treino de alta intensidade pode ser mais benéfico do que o treino de intensidade moderada na redução do risco de doenças crónicas cardiovasculares e metabólicas, como um resultado dos seus efeitos anti-inflamatórios (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). Esses resultados aguçam a nossa curiosidade científica em saber o comportamento e possível manutenção da integridade e função destas células em atletas *master* considerando que estudos sobre esta matéria não estão disponíveis.

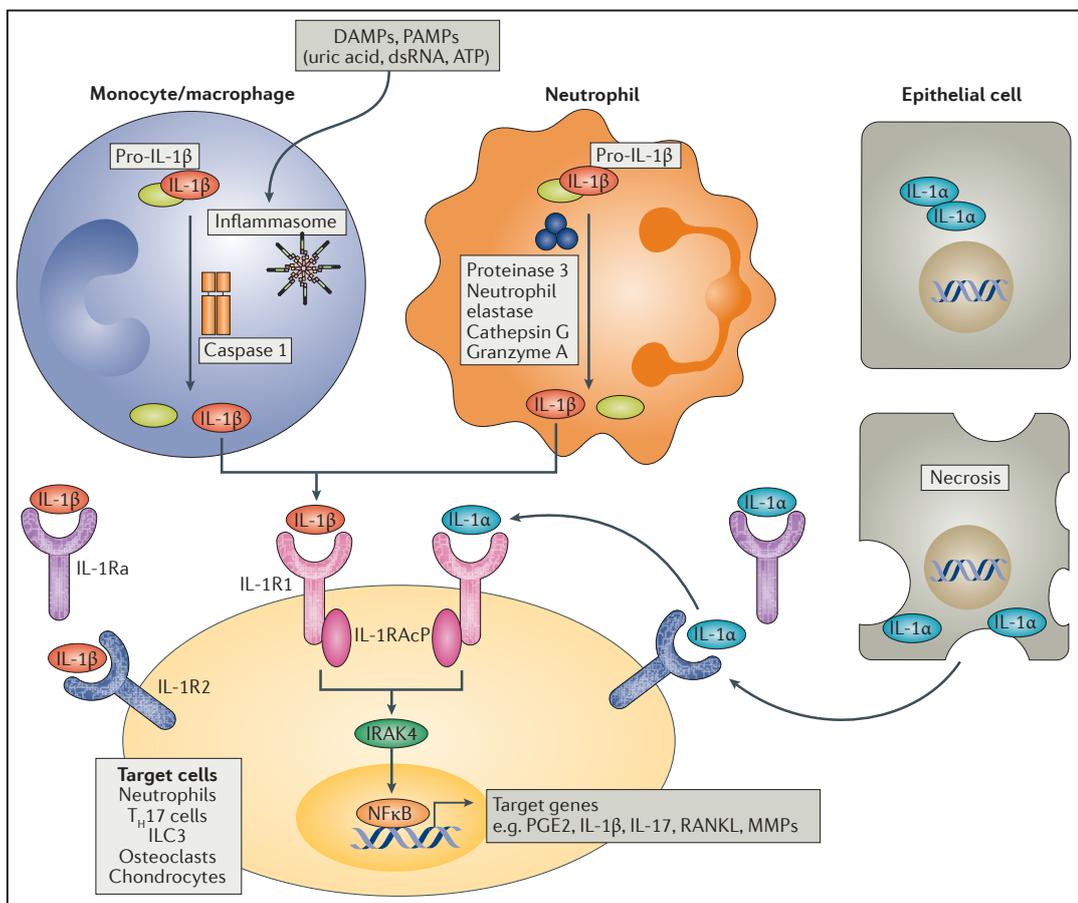
## 2.3 CITOCINAS

O sistema imune se baseia em respostas imunitárias efectoras adaptadas para erradicar agentes patogénicos específicos, bem como circuitos de regulação por *feedback* fornecidos por Tregs e também por citocinas supressoras. As citocinas são um grande grupo de polipeptídeos ou proteínas de baixo peso molecular. São mensageiros intercelulares envolvidos nas interações entre células, onde sendo que, independente da origem, músculo esquelético ou produzida por outras células (p.ex. leucócitos), a principal função das citocinas é regular a função imune. No entanto, os seus efeitos de maior magnitude sobre a proliferação celular, diferenciação, migração, sobrevivência e a apoptose permitem que elas desempenhem um papel no controlo homeostático de vários tecidos, órgãos e sistemas. Por exemplo, em conjunto com hormonas e neuropeptídeos, as citocinas são mediadoras das interações entre os sistemas nervoso, endócrino e imunitário. Portanto, as citocinas são importantes mediadores de vários aspetos de saúde de doença. Elas participam na regulação do apetite, no metabolismo glicémico e lipídico, controlam a temperatura do corpo, fadiga, interferem na sensibilidade a insulina e atuam tanto nos mecanismos de hipertrofia e atrofia muscular (Peake, Della Gatta, Suzuki, *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Membros da família IL-1

A família da IL-1 está associada com a inflamação aguda e crónica, e desempenha um

papel essencial na resposta inata não específica para a infecção. As propriedades biológicas da família da IL-1 são tipicamente pró-inflamatórias (van de Veerdonk & Netea, 2013). A família da IL-1 tem 11 membros, incluindo as proteínas pró-inflamatórias IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como a IL-1ra que tem propriedades anti-inflamatórias. IL-1 $\beta$  é uma citocina altamente inflamatória (Dinarello, 2011), principalmente produzida por monócitos, macrófagos, DCs, e por linfócitos B e células NK. A caspase-1, uma protease de cisteína intracelular, é responsável pela conversão do precursor inativo da IL-1 $\beta$  para a citocina ativa (Figura 2.10) (Schett, Dayer & Manger, 2015).



**Figura 2.10. Ativação e sinalização do recetor da IL-1.**

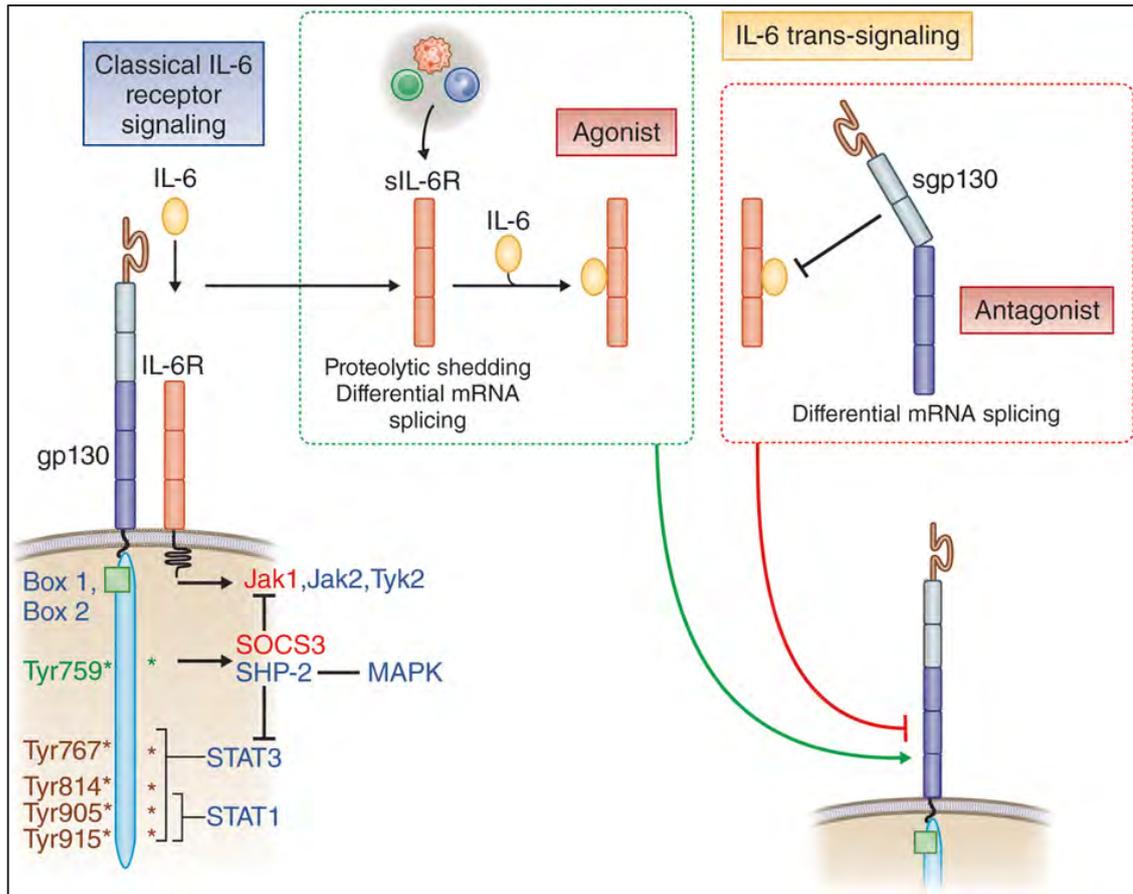
A libertação de IL-1 $\beta$  de monócitos / macrófagos e neutrófilos exige transformação enzimática da sua proteína precursora intracelular (pro-IL-1 $\beta$ ). Este passo pode ocorrer por duas vias diferentes. O precursor de IL-1 $\beta$ , ou seja, pró-IL-1 $\beta$ , pode ser processado por caspase-1 ativa, que é parte do inflamassoma (complexo de proteína intracelular). Em adição, as proteases, predominantemente derivadas de neutrófilos, podem clivar a pró-IL-1 $\beta$  extracelular. IL-1ra e o recetor solúvel do tipo 2 da IL-1 (IL-1R2) são reguladores negativos da via da IL-1 (adaptado de Schett et al. 2015).

A família da IL-1 inclui dois recetores antagonistas, IL-1ra e IL-36Ra (Dinarello, Arend, Sims, *et al.*, 2010). IL-1ra está presente no soro em concentrações muito mais elevadas do que a IL-1 $\beta$ , mas a sua ligação ao recetor da IL-1 não induz a sinalização ou ativação celular (van de Veerdonk & Netea, 2013). Além da IL-1ra, existem duas isoformas intracelulares que são consideradas um reservatório de IL-1ra, para ser libertado após a morte da célula, o que limita a ação pró-inflamatória dos danos nos tecidos (Garlanda, Dinarello & Mantovani, 2013).

### 2.3.2 Interleucina-6

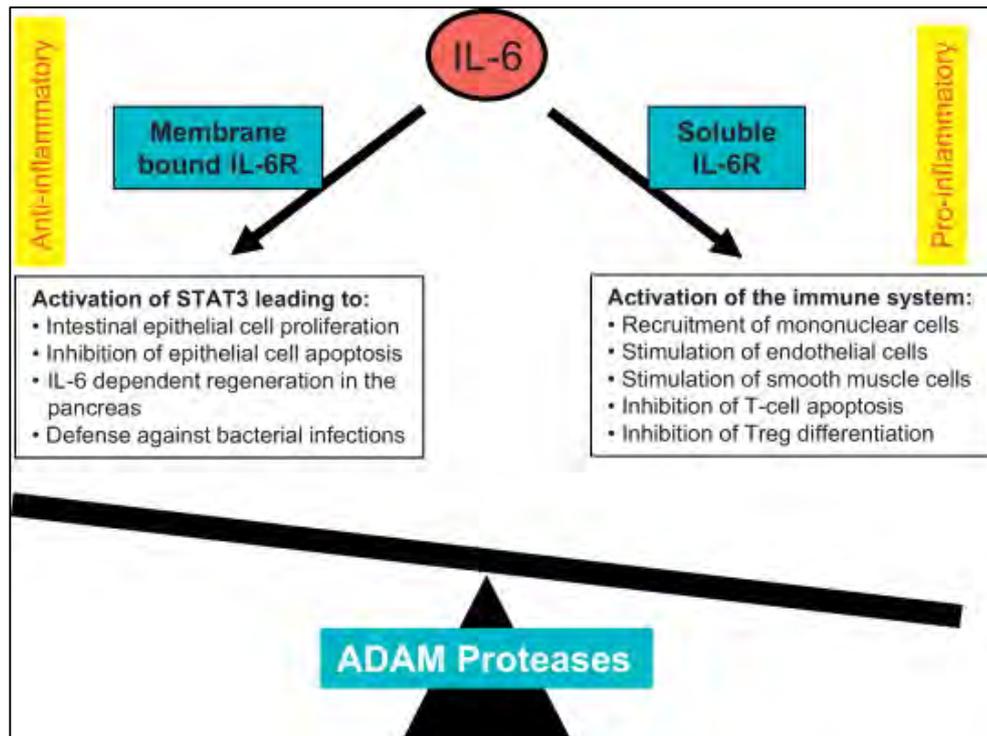
A IL-6 é uma citocina multifuncional que exerce os seus efeitos moduladores sobre as células que expressam recetores de IL-6 (IL-6R) acoplados a membrana. No entanto, a IL-6 em complexo com IL-6R solúvel pode ligar-se a qualquer célula que expresse a glicoproteína 130 (gp130). Assim, todos os tipos de células podem responder as propriedades pró ou anti-inflamatórias da IL-6 (Reihmane & Dela, 2014). Em resumo, na sinalização clássica, a IL-6 liga-se ao seu recetor ligado à membrana (IL-6R) e através da ativação de Janus quinase exerce propriedades anti-inflamatórias. Na trans-sinalização, a IL-6 liga-se a forma solúvel do recetor de IL-6 (sIL6-R) e forma um complexo binário que pode ligar-se a qualquer célula que expresse gp130 na sua superfície. Com a trans-sinalização, a IL-6 exerce as suas propriedades pró-inflamatórias, por exemplo, recrutamento de células mononucleares e de inibição da apoptose das células T (Reihmane & Dela, 2014) (ver figura 2.11 para detalhes).

A IL-6 está envolvida não só na ativação do sistema imunitário, mas também em processos de regeneração, bem como na regulação do metabolismo, na manutenção da homeostasia dos ossos, e em muitas funções neurais. Descobriu-se que, em todos os casos testados, funções pró-inflamatórias da IL-6 podem ser inibidas por sgp130Fc (*chimeric designer cytokine receptor*), o qual não afeta as respostas IL-6 através do MBIL-6R (*membrane-bound non-signaling  $\alpha$ -receptor IL-6R*). As funções de IL-6, tais como o controlo metabólico no fígado e regeneração do epitélio do intestino parecem ser mediados através da MBIL-6R. De um ponto de vista clínico, há consequências importantes no bloqueio terapêutico de IL-6 como um tratamento de doenças inflamatórias crónicas (Figura 2.12) (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, *et al.*, 2011).



**Figura 2.11. Sinalização do recetor da IL-6.**

A sinalização clássica do recetor de IL-6 ocorre em células que expressam IL-6R (CD126) e gp130 (CD130). IL-6R é um recetor que liga-se a IL-6, mas não tem propriedades de sinalização. A subunidade gp130 é o recetor de transdução de sinal para IL-6 e seus familiares relacionados. Uma forma solúvel de IL-6R é libertada a partir da superfície da célula por proteólise e splicing do mRNA do IL6R, e pode ligar-se a IL-6 para formar um complexo agonista que sinaliza através de gp130. Este mecanismo de trans-sinalização permite que a IL-6 atue sobre as células que carecem de IL-6R. O pleno funcionamento do complexo receptor-IL-6 consiste numa estrutura hexamérica em que a IL-6, IL-6R e gp130 existem numa estequiometria 2: 2: 2. Ambos os modos de sinalização do recetor de IL-6 levam à ativação gp130 de Jak1, Jak2 e Tyk2, que liga-se aos locais 1 e 2 dentro da sequência gp130 e uma série de resíduos de tirosina proximais (inferior esquerdo) dentro da sequência carboxi-terminal intracelular que ativa STAT1 e STAT3 e a cascata de proteína-quinase ativada por mitogénio (MAPK). Os resíduos de tirosina incluídos referem-se a funções biológicas definidas (números de posição são para a sequência de gp130 humano). Tyr759 é crucial para o encaixe da tirosina fosfatase SHP-2 e o inibidor da sinalização do recetor de citocina SOCS3. Ambos os fatores atuam como reguladores negativos de sinalização gp130-STAT. No contexto da infeção, trauma e ferimentos, o sIL-6R é libertado a partir de neutrófilos, monócitos e células T infiltrados, mas a trans-sinalização da IL-6 é antagonizada por sgp130 (adaptado de (Hunter & Jones, 2015).

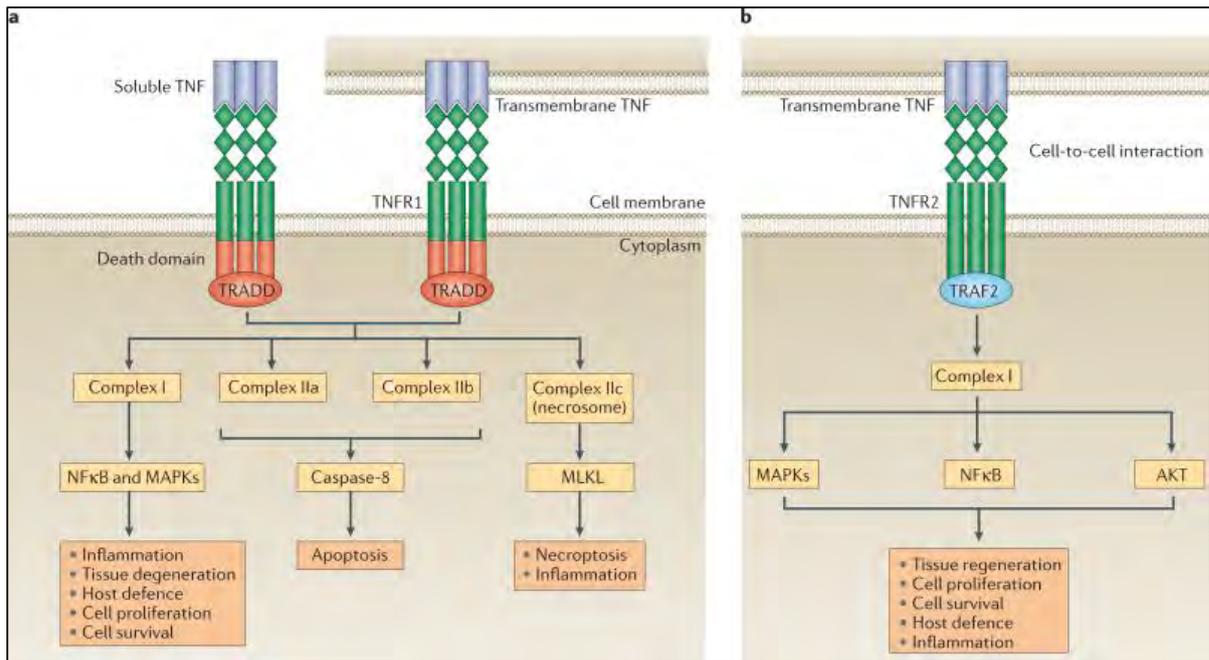


**Figura 2.12. Propriedades pro- e anti-inflamatórias da IL-6.**

A sinalização clássica da IL-6 é essencial para a ativação das vias de sinalização mediadas por STAT3 que induzem a regeneração das células epiteliais do intestino. Ao contrário, a trans-sinalização conduz à ativação do sistema imunitário, através do recrutamento de monócitos para a área inflamada. A trans-sinalização nas células T conduz à inibição da apoptose, a inibição da diferenciação das Tregs e a diferenciação de células Th17 (Scheller, Garbers & Rose-John, 2014; Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, et al., 2011).

### 2.3.2 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pleiotrópica com funções importantes na homeostasia e patogenia de doenças (Kallioliás & Ivashkiv, 2016). A superfamília do TNF, é composta de 19 ligantes e 29 recetores, e desempenha funções muito diversificadas no corpo. TNF- $\alpha$  é conhecido por interagir com 2 recetores distintos, o recetor de TNF 1 (TNFR1) e TNFR2, e induz, pelo menos, 5 tipos diferentes de sinais, que incluem a ativação de NFKB, vias de apoptose, cinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína ativada por mitógeno p38 cinase (p38MAPK), e c-Jun quinase N-terminal (JNK) (Figura 2.13) (Aggarwal, Gupta, Kim, et al., 2012; Kallioliás & Ivashkiv, 2016).



**Figura 2.13: Vias de sinalização de células ativadas por TNF.**

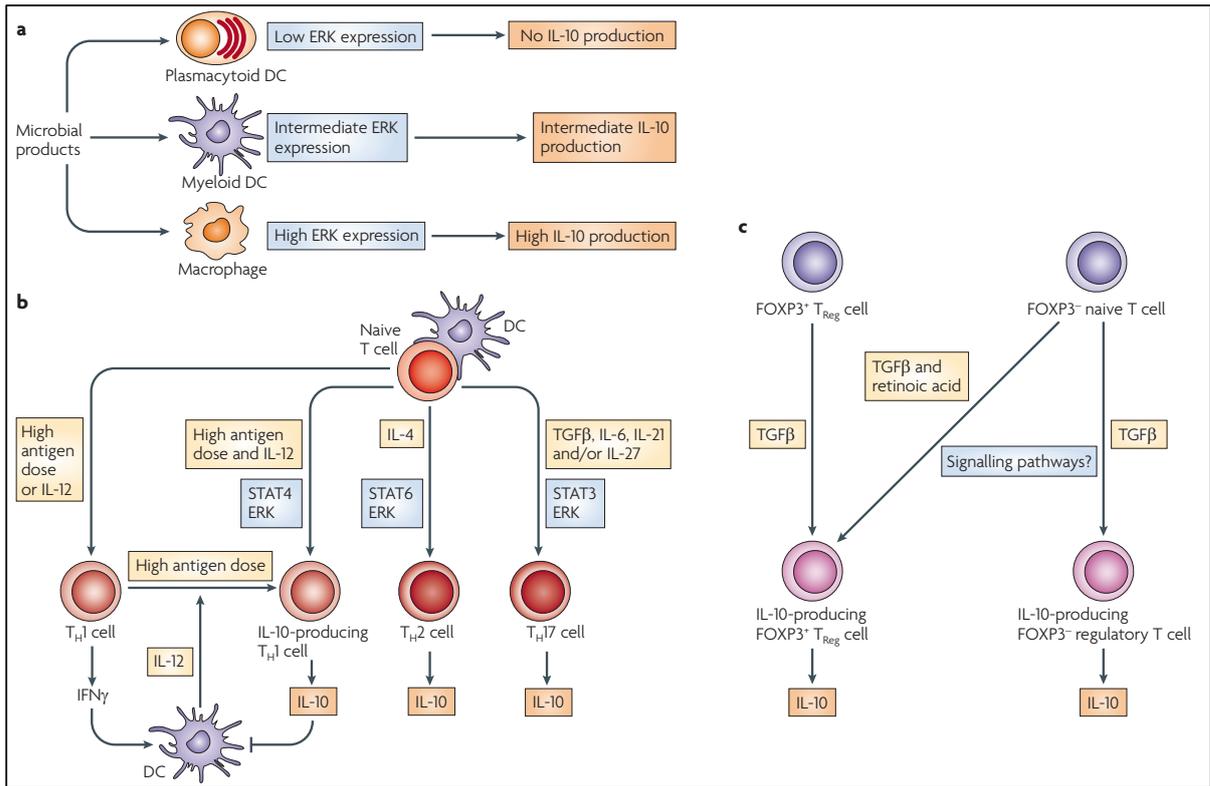
a) TNFR1 é ativado por ambos TNF solúvel e transmembrana. TNFR1 carrega um domínio de morte que recruta a proteína adaptadora associada ao domínio de morte de TNFR1 (TRADD). A ligação de TNFR1 por TNF solúvel ou TNF transmembrana leva inicialmente ao complexo I, que ativa o NFκB e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A sinalização TNFR1-I complexo induz inflamação, degeneração dos tecidos, sobrevivência e proliferação celular, e organiza a defesa imunológica contra agentes patogénicos. Tipos de sinalização alternativos, associados com a morte celular programada, também podem ser ativados *downstream* ao TNFR1. A formação dos complexos IIa e IIb (também conhecido como ripoptosoma) resulta em apoptose, enquanto que complexo IIc (necrosoma) induz necroptose e inflamação. b) TNFR2 é proposto para ser inteiramente ativado principalmente pela TNF transmembrana, no contexto das interações célula-a-célula. TNFR2 recruta o fator associado-TNFR 2 (TRAF2) via o seu domínio TRAF, provocando a formação de complexo I e a ativação downstream de NFκB, MAPKs e AKT. TNFR2 medeia principalmente bioatividades homeostáticas incluindo a regeneração de tecidos, a proliferação celular e a sobrevivência celular. Esta via também pode iniciar efeitos inflamatórios e hospedar defesa contra agentes patogénicos. MLKL, proteína do domínio semelhante a cinase de linhagem mista. Adaptada de (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

A ativação do recetor TNFR1 conduz ao recrutamento de proteínas adaptadoras intracelulares (TRADD, FADD, TRAF e RIP), que ativam múltiplos caminhos de transdução de sinal. TNFR sequencialmente recruta TRADD, TRAF2, RIP, TAK1, e IKK, que conduz à ativação do NFκB31; e o recrutamento de TRADD, FADD e caspase-8, conduz à ativação da

caspace-3, que por sua vez induz apoptose. JNK é ativada através do recrutamento sequencial de TRAF2, RIP, MEKK1 e MKK7. A ativação de ERK e de p38MAPK é via TRADD, TRAF2, RIP, TAK1 e MKK3/6.80. A exposição de células para TNF- $\alpha$  na maioria dos casos resulta na geração de espécies reativas de oxigênio, conduzindo à ativação de MKK7 e JNK (Aggarwal, Gupta, Kim, *et al.*, 2012). Junto com a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  faz parte das duas primeiras citocinas na cascata inflamatória. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam a produção de IL-6. Altos níveis de TNF- $\alpha$  estão associados com mortalidade, demência, fragilidade, doença de *Alzheimer* e aterosclerose em idosos. Por essas razões o TNF- $\alpha$  poder ser um bom biomarcador do envelhecimento (de Gonzalo-Calvo, Neitzert, Fernández, *et al.*, 2010).

### 2.3.4 Interleucina-10

Inicialmente a IL-10 foi descrita como uma citocina produzida pelas células Th2 que inibia a função das células Th1 (Moore, Vieira, Fiorentino, *et al.*, 1990). Sabe-se agora que a produção de IL-10 não é específica, sendo produzida por praticamente todas as células do sistema imune: Tregs, células Th17, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Margarida, Anne, Saraiva, *et al.*, 2010; Fujio, Okamura & Yamamoto, 2010). A IL-10 atua em vários estágios da resposta imune de forma coordenada, e eficientemente restringe o processo inflamatório, independente da fonte celular (Banchereau, Pascual, O'Garra, *et al.*, 2012; Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011; Fujio, Okamura & Yamamoto, 2010). IL-10 afeta muitas funções importantes dos monócitos, macrófagos e DCs, desde a fagocitose, a produção de citocinas para a expressão de coestimuladores e o processamento e apresentação de antígenos. Também inibe a expressão de moléculas de MHC, da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) e das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 em células apresentadoras de antígenos, e tem também sido mostrada capaz de promover a diferenciação de DCs que expressam baixos níveis de MHC classe II, CD80 e CD86. Além disso, ativa uma via pro-tolerogénica em DCs por meio da regulação positiva do recetor da IL-1, IL-1ra, TGF- $\beta$ , e moléculas do MHC classe II tais como a HLA-G (Gregori, Tomasoni, Pacciani, *et al.*, 2010). Que por sua vez podem contribuir para a indução de IL-10, proporcionando um *loop* autócrino para reforço de imunorregulação. Em resposta a IL-10, as DCs podem induzir a produção de IL-10 a partir de subpopulações de células T, o que reforça ainda mais imunotolerância e / ou imunorregulação (Banchereau et al. 2012).



**Figura 2.14. A expressão de interleucina-10 no sistema imunitário.**

a) IL-10 é expressa por macrófagos e DCs mielóides, mas não por DCs plasmocitóides, em resposta a produtos microbianos. A quinase extracelular regulada por sinal 1 (ERK1) e ERK2 é uma das cascatas de sinalização que é ativada nestas células, resultando na expressão de IL-10. b) Em células Th, a expressão de IL-10 é acompanhada pela expressão de citocinas para cada subconjunto, com a exceção das Tregs, que normalmente perdem a capacidade de expressar outras citocinas. Embora a diferenciação de células Th a partir das células T CD4<sup>+</sup> naïve requiera o recetor de células T e a ativação de distintas vias de transdução de sinal e ativadores de transcrição (STAT), a ativação da via ERK é um requisito comum para a expressão de IL-10 por estas células. Altas doses de antígeno apresentado pelas DCs para células T naïve ou IL-12 favorece o desenvolvimento de células Th1 que produzem IFN- $\gamma$ . As células Th1 produtoras de IL-10 requerem uma dose elevada de antígeno e IL-12 e sinalização STAT4 para a expressão de níveis máximos de IL-10 seguindo a re-estimulação. Em células Th2, IL-4 e vias de sinalização STAT6 são necessárias para a expressão de IL-10. A indução de IL-10 pelas células Th17 não é bem compreendida, mas o TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21 e / ou IL-27 e sinalização STAT3 são suscetíveis de estar envolvidas. c) TGF- $\beta$  pode induzir a produção de IL-10 por células T FoxP3<sup>+</sup> e esta citocina pode também promover o desenvolvimento de células T FoxP3<sup>-</sup> produtoras de IL-10 a partir de células T naïve. Por outro lado, células T FOXP3<sup>+</sup> produtoras de IL-10 podem diferenciar de células T naïve in vitro, na presença de TGF- $\beta$  e ácido retinóico. Adaptado de (Margarida, Anne, Saraiva, *et al.*, 2010).

Além disso, IL-10 interfere ou completamente inibe a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e de outros mediadores solúveis, desse modo comprometendo ainda mais a capacidade das células T efetoras em sustentar respostas inflamatórias (Fujio, Okamura & Yamamoto, 2010). Assim, a IL-10 é um potente promotor de um estado anti-inflamatório (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011).

### 2.3.5 Citocinas e exercício

Existe uma variabilidade individual considerável na magnitude das mudanças nas citocinas plasmáticas após o exercício (Peake, Della Gatta, Suzuki, *et al.*, 2015). Como as células imunes, as respostas das citocinas ao exercício são geralmente dependentes da combinação do tipo, intensidade e da duração do esforço. O exercício estimula aumentos de maior magnitude nas concentrações de várias citocinas na circulação, a destacar a IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra, fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF), e provoca aumentos mais modestos no TNF- $\alpha$ , proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), IL-1 $\beta$ , fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), IL-12p35/p40 e IL-15 (Peake, Della Gatta, Suzuki, *et al.*, 2015).

No caso da IL-6, a corrida prolongada produz o maior aumento da sua concentração no plasma (Pedersen & Febbraio, 2008). Na verdade, os níveis circulantes de IL-6 podem aumentar até 120 vezes após o exercício aeróbico (endurance). IL-1ra (até 90 vezes), IL-10 (até 80 vezes), IL-8 (15 vezes) e MCP-1 (até 3 vezes) também aumentam de forma consistente na circulação após o exercício (para maiores detalhes Peake *et al.* 2015). O aumento transitório na IL-6 na circulação durante o exercício parece ser responsável por um aumento subsequente nos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1ra. Parece que a liberação de cortisol pelas glândulas adrenais e a supressão do níveis de TNF- $\alpha$  estimulada por endotoxina são os mecanismos clássicos dessa relação (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011).

As citocinas também são produzidas por leucócitos, porém os glóbulos brancos são provavelmente apenas uma fonte menor de citocinas após o exercício (Peake, Della Gatta, Suzuki, *et al.*, 2015). A expressão de mRNA das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-8 e IL-10 nos leucócitos aumenta após o exercício, enquanto que a expressão de mRNA da IL-6 permanece inalterada (Tabela 5.4). Em relação às mudanças na expressão das citocinas ou na sua secreção pelos linfócitos T após o exercício, observou-se que secreção de citocinas Th1 (IL-2 e TNF- $\alpha$ )

e de citocinas Th2 (IL-6, IL-10) após estimulação com fito-hemaglutinina aumentava após o exercício (Kakanis, Peake, Brenu, *et al.*, 2014). Parece também que a produção de citocinas durante o exercício está condicionada a mudanças no número de certos subconjuntos de células T (LaVoy, Bosch, Lowder, *et al.*, 2013).

### **2.3.6 Balanço de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias**

O papel da inflamação no processo de envelhecimento e doenças relacionadas com a idade tem sido claramente estabelecido em diversos estudos epidemiológicos sobre adultos mais velhos. Embora a inflamação aguda seja normalmente controlada e é uma parte do processo de cura, a elevação de baixo grau de marcadores inflamatórios observada em adultos mais velhos tem sido associada a um número de doenças crônicas, tais como doença cardiovascular, diabetes, deficiência física e declínio cognitivo em idosos. Uma série de marcadores inflamatórios, especialmente IL-6, TNF- $\alpha$  e proteína C-reativa (CRP) têm as associações mais consistentes com doenças crônicas e deficiências relacionadas com a idade. A CRP é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado, em resposta a aumentos na expressão de IL-6 (Singh & Newman, 2011).

Muitos mecanismos provavelmente contribuem para a inflamação associada à idade. Assim como em todos os outros sistemas fisiológicos, há significativo declínio na função imunológica com a idade que promove inflamação, o estado inflamatório de baixo grau no envelhecimento é também uma consequência clara das doenças crônicas relacionadas com a idade (Chung, Cesari, Anton, *et al.*, 2009). Elevações de 2 a 4 vezes nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  e proteínas de fase aguda como a CRP e proteína amilóide A (SAA – do inglês *Serum amyloid A*), são típicas do envelhecimento quando comparadas com indivíduos jovens, mesmo na ausência de doenças crônicas (Bruunsgaard & Pedersen, 2003).

A inflamação sistêmica de baixo grau está envolvida na etiologia de muitos estados de doença crônica e o exercício regular pode reduzir o risco de doença devido aos seus efeitos anti-inflamatórios. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar os meios pelos quais o exercício reduz a inflamação sistêmica de baixo grau associada à obesidade e ao comportamento sedentário (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). O exercício regular reduz a

massa de gordura visceral, que quando acumulada resulta em elevada produção de adipocinas pró-inflamatórias (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). A liberação de citocinas anti-inflamatórias na sequência de uma sessão aguda de exercício pode também contribuir para a redução da inflamação sistêmica. A IL-6 libertada a partir do músculo esquelético durante o exercício resulta num aumento subsequente da IL-10 e da IL-1ra, ambos considerados anti-inflamatórios (Steensberg, Fischer, Keller, *et al.*, 2003). Além disso, as hormonas libertadas durante o exercício têm propriedades anti-inflamatórias: cortisol atua como um mediador anti-inflamatório e a adrenalina regula negativamente a produção das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . O exercício também regula negativamente a expressão dos recetores de superfície TLRs em monócitos e macrófagos, e por sua vez reduz a sua cascata inflamatória. O exercício também pode promover a comutação de macrófagos inflamatórios M1 em macrófagos anti-inflamatórios do tipo M2 e reduzir a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, resultando numa redução na produção de citocinas inflamatórias (Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015; Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011).

## **Implicações**

As consequências do treino ao longo da vida no envelhecimento não são claras, em grande parte devido à dificuldade em dissociar os efeitos do envelhecimento normal daqueles provocados pela prática de exercícios físicos regulares durante a vida. Além disso, os dados sobre o papel das citocinas no envelhecimento são conflitantes (de Gonzalo-Calvo, Neitzert, Fernández, *et al.*, 2010; Della Gatta, Garnham, Peake, *et al.*, 2014). Alguns sugerem que a resposta inflamatória ao exercício casual aumenta com a idade, enquanto que o treino físico regular pode ajudar a normalizar essa resposta inflamatória (Della Gatta, Garnham, Peake, *et al.*, 2014).

## 2.4 IMUNOSENESCÊNCIA E EXERCÍCIO FÍSICO

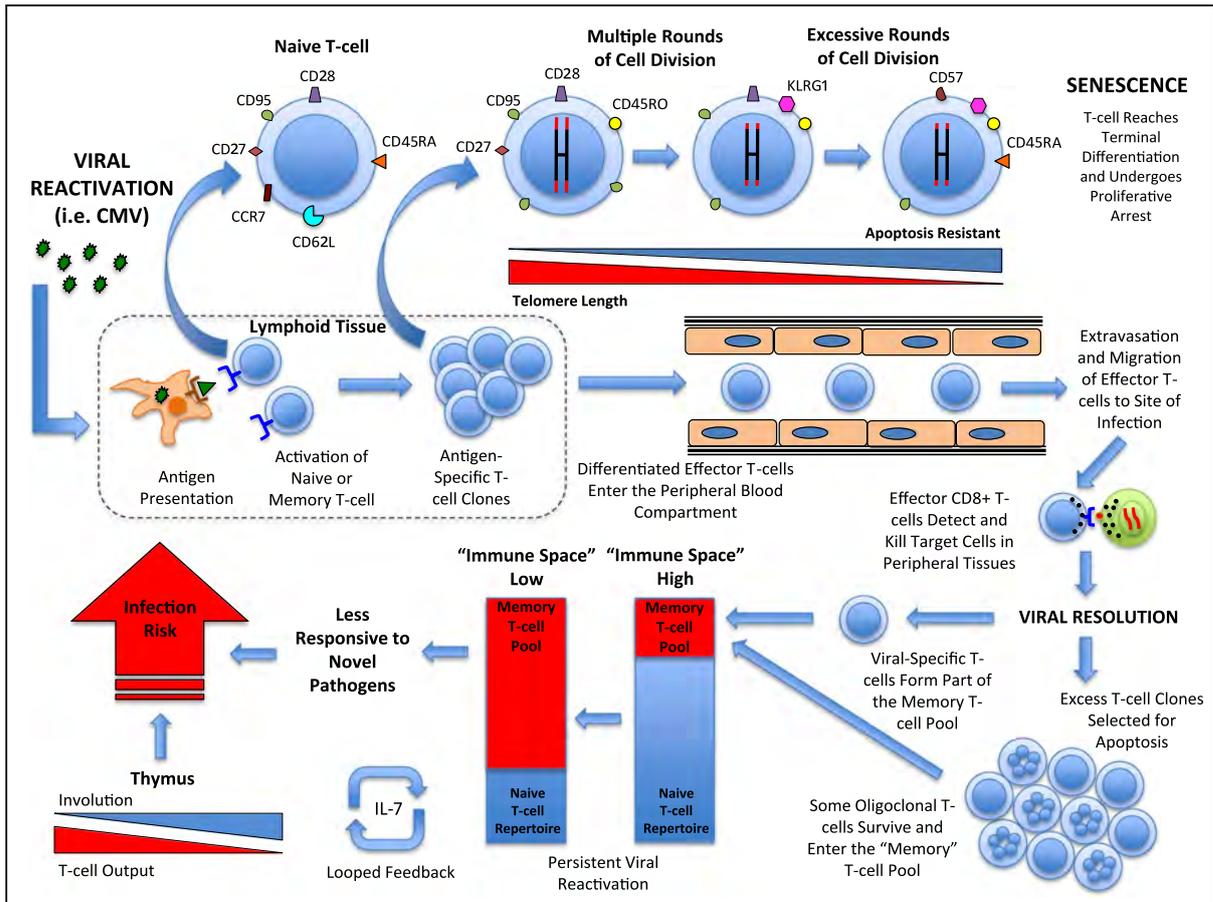
A resistência de um organismo à doença e à infecção é comprometida com a idade devido ao aparecimento de declínios inevitáveis no funcionamento normal do sistema imune (Simpson, Lowder, Spielmann, *et al.*, 2012). A deficiência nas funções de macrófagos em idosos pode prolongar o processo de infecção, levando ao aumento da vida útil do agente patogénico e maior potencial de danos ao hospedeiro. Além disso, é possível que idosos que tenham predisposição para cancro ou doenças autoimunes / inflamatórias, apresentem níveis basais de inflamação mais elevados, os quais podem dificultar a resolução de respostas imunes a agentes infecciosos. O decréscimo no número, na função das células B (a produção de anticorpos) e na proliferação poderia traduzir numa resposta imune adaptativa mais fraca ao agente patogénico, conduzindo ao aumento da gravidade e do tempo de infecção. A depleção do *pool* de células T naïve associada ao envelhecimento pode resultar em menos células naïve capazes de responder a novos antigénios; na verdade, o *pool* alargado de células de memória pode realmente impedir que as populações de células naïve sejam capazes de proliferar e expandir em número suficiente (Senchina & Kohut, 2007).

O braço adaptativo do sistema imunitário (isto é, células T, células B e seus produtos) parece ser o mais afetado com o aumento da idade, nomeadamente as alterações no interior do compartimento das células T (isto é, o rácio CD4/CD8 invertido, baixas respostas proliferativas, o aumento do número de células de memória e baixa produção de IL-2) são características marcantes do perfil de risco imune (IRP) - uma mistura de biomarcadores imunes que foram utilizados para prever morbidade e mortalidade em idosos (Pawelec, 2006). Muitos biomarcadores associados ao IRP são positivamente exibidos em idosos fisicamente ativos em comparação com os seus idosos sedentários (Simpson & Guy, 2010). Uma relação CD4:CD8 invertida está associada com o envelhecimento devido a um acumular de células T CD8<sup>+</sup> oligoclonais, em resposta a estimulação antigénica persistente e / ou devido a aumentos associados à idade das células T CD8<sup>+</sup> resistentes à apoptose. Por conseguinte, uma relação CD4:CD8 invertida <1.0 é geralmente indicativa de um repertório reduzido de células T naïve e uma capacidade diminuída para responder a novos agentes patogénicos. Embora uma relação CD4:CD8 invertida em idosos faça parte do IRP, o exercício regular parece não ter efeito sobre as relações CD4:CD8 no sangue de adultos mais velhos, quando posteriormente avaliados em repouso. A maioria dos estudos transversais relataram aumento da proliferação de células T em adultos mais velhos fisicamente ativos em comparação com os seus homólogos sedentários. Por

outro lado, os estudos longitudinais não relataram alteração na proliferação de células T em resposta a intervenções de exercício aeróbico ou de força. A ativação e proliferação dos linfócitos T durante o reconhecimento do antígeno é dependente da secreção de IL-2 e a expressão de seus recetores. A síntese da IL-2 e a expressão do recetor de alta afinidade IL-2RS é prejudicada com a idade e associada com o IRP em idosos.

A involução do timo e a redução no repertório de linfócitos T naíve, pode explicar a frequência reduzida de células T que podem produzir e responder a IL-2 com o avanço da idade. A interpretação de dados disponíveis de estudos transversais é de que a IL-2 é maior em idosos que praticam exercício habitualmente, em comparação com os seus homólogos sedentários (Simpson & Guy, 2010). Mulheres atletas *master* tinham mais do que o dobro do número de células T CD8<sup>+</sup> que expressam IL-2 intracelular seguindo estimulação por mitogénio, em comparação com não-atletas da mesma idade (Beshgetoor, Arrues & McGuire, 2004). Curiosamente, o exercício não teve efeito sobre os números de células T CD4<sup>+</sup> que expressam IL-2 intracelular (Beshgetoor, Arrues & McGuire, 2004). Shinkai e colegas verificaram maiores concentrações de IL-2 no sobrenadante de culturas de PBMCs estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) em idosos corredores habituais em comparação com sedentários controlos pareados por idade. Este aumento na secreção de IL-2 pode explicar a maior proliferação de células T observada nos corredores mais velhos (Shinkai, Kohno, Kimura, *et al.*, 1995).

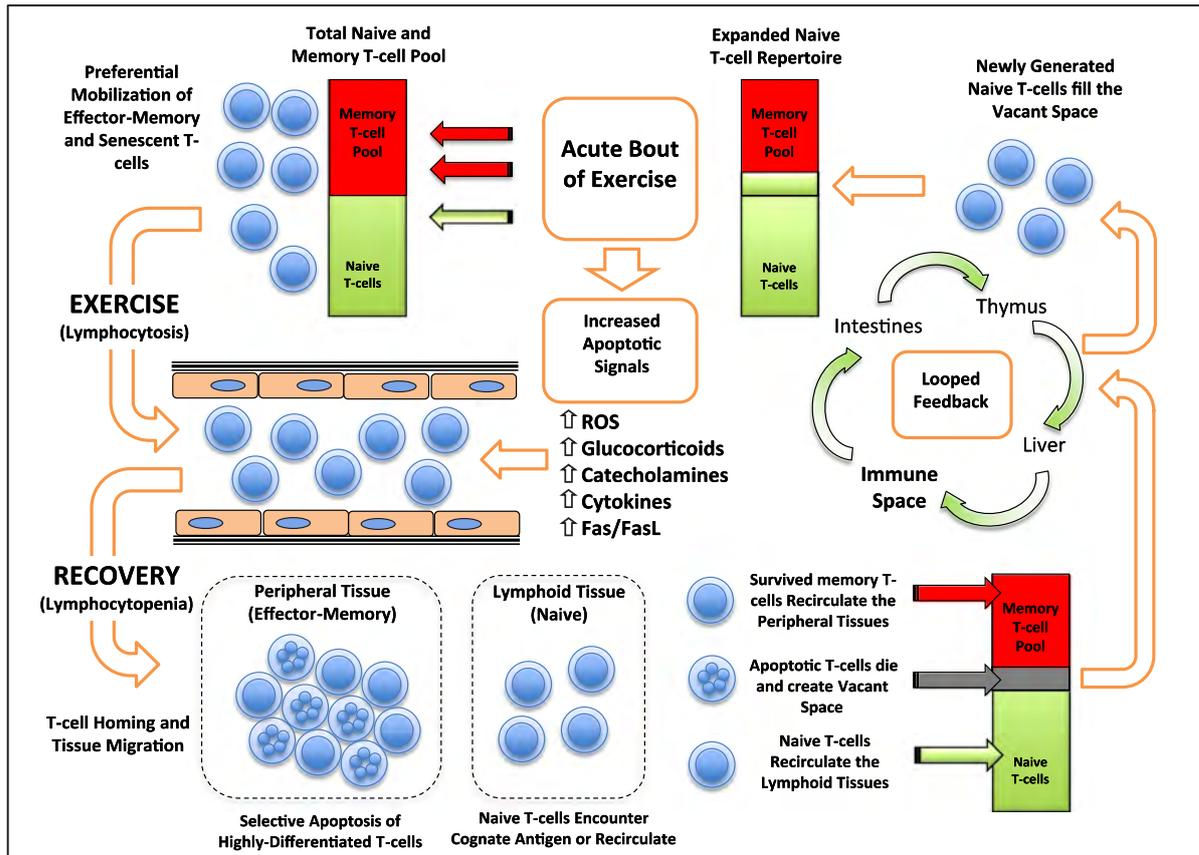
A expansão clonal de células T, em resposta a um estímulo antigénico é um processo fundamental da imunidade adaptativa, permitindo a formação de antigénios específicos de células T efectoras para combater agentes patogénicos invasores. No entanto, esta expansão clonal não é infinita, e após ciclos repetidos e excessivos de divisão celular, as células T sofrem paragem (*arrest*) do ciclo celular e tornam-se senescentes. Neste estado, as células T não serão mais clonalmente expandidas sob futura estimulação antigénica, mas ainda mantêm as propriedades de células efectoras (por exemplo, reconhecer e matar as células infetadas por vírus) e ainda são capazes de produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  (Spielmann, McFarlin, O'Connor, *et al.*, 2011; Simpson & Guy, 2010) (ver detalhes na Figura 2.15).



**Figura 2.15: Expansão de clones de células T.**

A estimulação antigénica faz com que células T proliferem (expansão clonal via divisão celular) e diferenciem-se em células T efetoras que desempenham funções especializadas, tais como a secreção de citocinas, reconhecimento e morte de células alvo, e a ativação de macrófagos e células. A exposição antigénica repetida (isto é, durante todo o tempo de vida), aumenta a frequência de células T senescentes no sangue e nos tecidos. O aparecimento de células T senescentes ocorre devido ao excesso de expansões clonais que ocorre como parte de uma resposta imune normal aos agentes patogénicos que invadem ou reativam infeções no organismo ao longo da vida. Isso, juntamente com a redução do número células T naïve recém-funcionais em decorrência do timo atrofiado, contribui para a diminuição do repertório de células T naïve (isto é, reduzido espaço imunitário). Assim, a exposição repetida a estímulos antigénicos ao longo da vida (ou seja, a reativação de infeções virais latentes) leva a maiores rondas de divisão celular e a senescência prematura. À medida que essas células T senescentes ainda preservam funções de células efetoras (ou seja, morte de células infetadas por vírus) e são altamente pró-inflamatórias, o seu acumular no sangue e nos tecidos também pode contribuir para um certo número de patologias associadas com a inflamação (Adaptado de Simpson & Guy, 2010).

Os efeitos benéficos do exercício podem vir tanto de perspectivas de prevenção e / ou rejuvenescimento (Simpson & Guy 2010). A partir de um ponto de vista da prevenção, o exercício pode provocar efeitos secundários sobre o sistema imune, devido as suas bem conhecidas propriedades redutoras de stresse, limitando assim o potencial de reativação viral latente induzida por stresse e erosão dos telómeros. A partir de um ponto de vista do tratamento/rejuvenescimento, o exercício regular pode levar à destruição do excesso de clones virais específicos de células T por meio de apoptose, liberando o "espaço imune" que pode ser ocupado pelas células T naïve e expandindo o repertório antigênico de células T (Simpson, 2011a). Para que este processo aconteça, Simpson e Guy 2010 propuseram três fases distintas que devem ocorrer: 1) uma mobilização seletiva de células T senescentes dos tecidos periféricos para o compartimento do sangue durante o exercício; 2) extravasamento de células T senescentes da circulação e sua posterior apoptose nos tecidos periféricos durante a recuperação do exercício; 3) geração subsequente de células T naïve para substituir as células senescentes deletadas. Detalhadamente, o exercício agudo provoca a mobilização preferencial de células T altamente diferenciadas e senescentes dos tecidos periféricos para o compartimento do sangue (linfocitose), sob a influência de catecolaminas. O exercício, por sua vez, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (DelaRosa, Pawelec, Peralbo, *et al.*, 2006), glucocorticoides, e citocinas pró-inflamatórias, expondo assim as células T senescentes a um meio de estímulos pró-apoptóticos. Recetores de superfície celular de morte (Fas / FasL) são *up*-regulados em células T senescentes, que também estão sujeitos a danos oxidativos de DNA no sangue. Estas células suscetíveis a apoptose, juntamente com células T naïve e de memória danificadas, saem do compartimento sanguíneo durante a fase de recuperação do exercício (linfocitopenia) e migram para tecidos específicos. Uma parte destas células T senescentes subsequentemente sofrem apoptose nos tecidos periféricos, assim criando um espaço vago. Por conseguinte, o reduzido número de células T conduz a um feedback positivo, aumentando a saída de células T naïve do timo ou de locais de desenvolvimento de células T extra-timo (isto é, fígado, intestinos). Estas células T recém-geradas preenchem o espaço vago e contribuem para um repertório expandido de células T naïve. Repetições deste processo em resposta ao exercício habitual reduzem a frequência de células T senescentes ao longo do tempo, diminuindo o risco de infecção e aumentando a longevidade saudável (para maiores detalhes, ver Figura 2.16).



**Figura 2.16. O exercício agudo promove mobilização preferencial de células T senescentes altamente diferenciadas e vírus-específicas dos tecidos periféricos no compartimento de sangue (linfocitose) sob a influência de catecolaminas.**

O exercício, por sua vez, aumenta a produção de ROS, glucocorticoides, e citocinas pró-inflamatórias, expondo assim as células T senescentes a um meio de estímulos pró-apoptóticos. Recetores de morte da superfície celular (Fas / Fas-Ligando (FasL)) são regulados positivamente em células T senescentes, que também estão sujeitos a danos oxidativos leves do DNA no sangue. Estas células suscetíveis a apoptose, juntamente com células naïve intactas e células T de memória, deixam o compartimento sanguíneo durante a fase de recuperação de exercício (linfocitopénia) e migram para os tecidos específicos. Uma parcela destas células T senescentes subsequentemente sofrem apoptose nos tecidos periféricos, assim criando espaço vago. Por conseguinte, o baixo número de células T conduz um ciclo de feedback positivo, aumentando a produção de células T naïve a partir do timo ou locais de desenvolvimento de células T extra-timo (i.e., fígado, intestinos). Estas células T recentemente geradas preenchem o espaço vago e contribuem para a expansão do reportório de células T naïve (adaptado de Simpson, 2011).

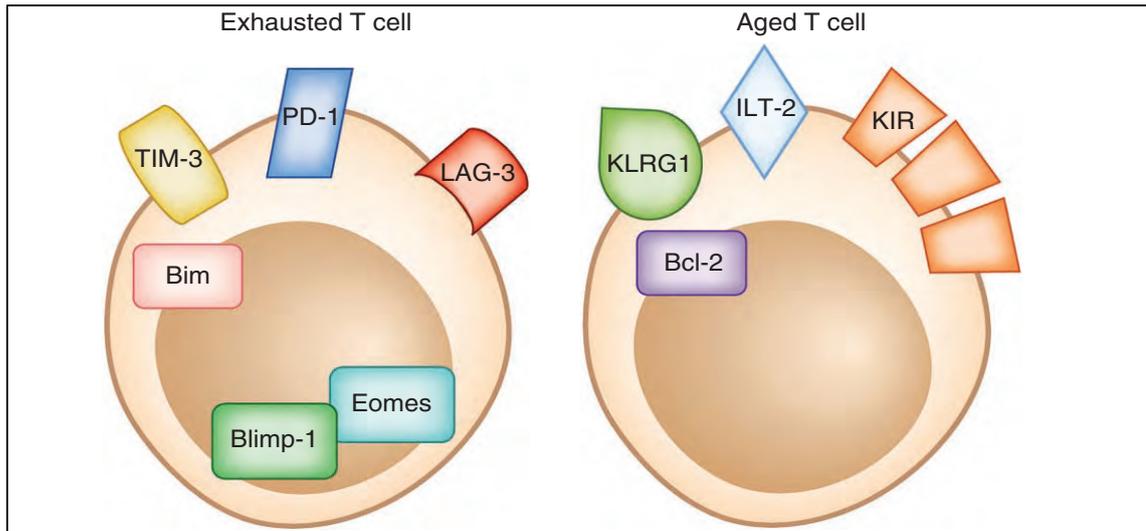
Spielmann et al. (2011) demonstraram que as proporções de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> senescentes aumentaram com a idade avançada, a uma taxa correspondente de 10% e 10,2% por década, respetivamente. Isto foi acompanhado por uma redução por década nas proporções

de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> naïve (10% e 9,9%, respetivamente). Interessantemente, os autores descobriram que indivíduos que tinham valores de VO<sub>2max</sub> acima da média tinham menos células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> senescentes e mais células T CD8<sup>+</sup> naïve do que aqueles com valores mais baixos de VO<sub>2max</sub>, mesmo após ajuste para idade, índice de massa corporal e percentual de gordura corporal. Surpreendentemente, os autores verificaram que a associação bem aceita entre idade e células T senescentes já não existia quando a idade foi ajustada para VO<sub>2max</sub>, indicando que a aptidão aeróbica pode ser um forte determinante de mudanças fenotípicas de células T e com maior impacto do que a idade cronológica. Este efeito foi limitado às células senescentes, sendo que o VO<sub>2max</sub> não foi associado com o aumento das células de memória após o ajuste para a idade. Os autores consideraram que seu estudo foi o primeiro a mostrar que a aptidão aeróbica está associada a uma moderação do acumular natural relacionado com a idade de células T senescentes no sangue periférico, com destaque para os efeitos benéficos da manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo sobre o envelhecimento do sistema imunitário.

#### **2.4.1 KLRG1 – The killer cell lectin–like receptor G1**

Embora o CD45RA e o CCR7 sejam marcadores eficientes de diferenciação das células T, a identificação de células T CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> como células terminalmente diferenciadas (ex: senescentes) é controversa, devido ao facto destas células ainda demonstrarem níveis eficazes de proliferação após ativação do recetor de célula T (TCR). A expressão combinada de KLRG1 e CD57, ou a expressão de KLRG1 na ausência de CD28 parece ser uma combinação de marcadores de senescência das células T mais aceitável, pois as células com este fenótipo são incapazes de sofrer futuras divisões, não expressam o CD27 e o CCR7, e têm uma baixa expressão do CD127 (Simpson & Guy, 2010; Simpson, 2011).

A expressão KLRG1 na superfície celular identifica uma população de linfócitos T incapazes de sofrerem expansão clonal após estimulação por mitogénio, sugerindo que linfócitos T que expressam KLRG1 estão num estado de senescência e em fase avançada de envelhecimento biológico (Simpson, Florida-James, Cosgrove, *et al.*, 2007) (Figura 2.17).



**Figura 2.17: Expansão populacional associada à idade das células T CD28<sup>-</sup> terminalmente diferenciadas.**

Com o aumento da idade, as populações oligoclonais de células T efetoras terminalmente diferenciadas acumulam; estas células são frequentemente específicas para vírus latentes, em particular CMV (citomegalovírus). Elas são diferentes em relação ao fenótipo, função e sobrevivência das células T exaustas que se desenvolvem em resposta a vírus altamente replicantes. Blimp-1 e Eomes, fatores de transcrição; Bcl-2, molécula anti-apoptótica. (Adaptado de (Goronzy & Weyand, 2013).

As células T KLRG1<sup>+</sup>/CD57<sup>-</sup> são células efetoras destinadas a tornarem-se células de memória de longa duração, devido à sua expressão do recetor de IL-7, CD127. Por outro lado, células KLRG1<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup> ainda são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e têm grânulos citolíticos (isto é perforina e granzima B), mas não expressam CD127, CCR7 ou as moléculas coestimuladoras CD27 e CD28, indicando que estas são células T efetoras terminalmente diferenciadas que não são capazes de proliferar, mas ainda mantêm as propriedades de células efetoras imediatas (Simpson, Cosgrove, Chee, *et al.*, 2010).

Além disso, os marcadores de senescência sobre as subpopulações de linfócitos T são agora considerados também eficientes marcadores do envelhecimento biológico sistêmico (Simpson, Cosgrove, Ingram, *et al.*, 2008). A sinalização através do KLRG1 poderia resultar em mudança da função das células T (Tauro, Nguyen, Li, *et al.*, 2013). KLRG1 possui um motivo de inibição do recetor imunitário à base de tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático, sugerindo que pode desempenhar um papel funcional no sistema imunitário, além de seu uso extensivo como marcador de senescência. Foi sugerida uma associação da expressão de KLRG1 em Tregs, com indicação de função alterada (Tauro, Nguyen, Li, *et al.*,

2013). As Tregs KLRG1<sup>+</sup> seriam portanto, um grupo de células um pouco mais potente do que as Tregs KLRG1<sup>-</sup> na supressão da proliferação de células T naïve *in vitro* (Beyersdorf, Ding, Tietze, *et al.*, 2007). Tauro et al. (2013) mostraram uma elevação acentuada de Tregs KLRG1<sup>+</sup> infiltradas no SNC com encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal de esclerose múltipla. As Tregs KLRG1<sup>+</sup> mostraram um aumento da expressão de marcadores de ativação CD25 e FoxP3, quando comparado com as células KLRG1<sup>-</sup>. Além disso, quando as Tregs KLRG1<sup>-</sup> foram convertidas em células KLRG1<sup>+</sup> isto foi associado com o aumento da inflamação autoimune tecidual. Além disso, as Tregs KLRG1<sup>+</sup>, mas não as Tregs KLRG1<sup>-</sup> mostraram sinais de diferenciação terminal. Finalmente, as Tregs KLRG1<sup>+</sup> também produziram mais IL-10 e tinham alterado a produção de citocinas efetoras em comparação com suas homólogas KLRG1<sup>-</sup>.

## **Implicações**

A ideia de que a atividade física regular pode exercer propriedades preventivas e/ou de rejuvenescência do sistema imunológico por amenizar o acumular relacionado com a idade de células T senescentes e prevenir a transição para a categoria IRP ao longo da vida (Simpson & Guy 2010) e que a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbica durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir o acumular de células T senescentes, que têm especificidade antigênica limitada, ao mesmo tempo, mantendo um número suficiente de células T naïve capazes de reconhecer e responder a novos agentes patogênicos (Spielmann, McFarlin, O'Connor, *et al.*, 2011),

## **2.5 IMUNIDADE DAS MUCOSAS**

O sistema imunitário das mucosas é responsável pela proteção das superfícies das mucosas do trato respiratório, passagens nasais e os intestinos. O sistema imune das mucosas é uma das principais barreiras da colonização de agentes patogênicos e tem um papel particularmente importante em reduzir a incidência de ITRS. O efeito do exercício agudo sobre a imunidade das mucosas tem sido amplamente estudado, com a maioria dos estudos direcionados para a investigação de mudanças na secreção de Imunoglobulina A (IgA), determinada na saliva. A vantagem do uso da saliva para determinação de hormonas e outros

marcadores, como a IgA, é que ela pode ser recolhida rapidamente, com frequência e sem o stress induzido pela punção venosa. Além disso, a colheita da saliva requer formação médica mínima e pode ser realizada fora do ambiente de laboratório (Hayes, 2015).

### **2.5.1 Imunoglobulina A**

O anticorpo principal presente nos fluidos das mucosas é a imunoglobulina A, que é produzida localmente por células plasmáticas que residem na submucosa e é secretada por transporte através das células epiteliais pelo recetor polimérico de Ig (Allgrove, Gomes, Hough, *et al.*, 2008). A IgA parece desempenhar um papel múltiplo de defesa, a considerar: evita que micróbios e antigénios adiram e penetrem no epitélio; interrompe a replicação de agentes patogénicos intracelulares na transcrição entre as células epiteliais; liga-se aos antigénios facilitando a sua excreção através do epitélio para o lúmen (Lamm, 1998). Reduções na concentração ou na taxa de secreção da IgA salivar refletem reduzida proteção imune das mucosas das vias respiratórias, levando a um aumento na incidência de ITRS (Gleeson, Bishop, Oliveira, *et al.*, 2012; Gleeson & Walsh, 2012). Embora o envelhecimento diminua as concentrações de IgA, indivíduos idosos submetidos a exercício aeróbico regular (16 e 32 semanas) foram protegidos contra essa deterioração, indicando que o exercício pode ser eficiente em promover imunidade via IgA (Gomes, Teixeira, Teixeira, *et al.*, 2008; Martins, Cunha, Neves, *et al.*, 2009; Akimoto, Kumai, Akama, *et al.*, 2003).

### **2.5.2 Cortisol**

O cortisol (hidrocortisona, Composto F) é a principal hormona glucocorticoide produzida no córtex adrenal. O cortisol desempenha um papel central na resposta fisiológica e comportamental a um estímulo stressante físico ou psicológico pela ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), que por sua vez, estimula a libertação da hormona pelo córtex supra-renal (Tsai, Ko, Chang, *et al.*, 2011). No sangue apenas 1 a 15% do cortisol está na sua forma não ligada ou biologicamente ativa. O cortisol restante está ligado às proteínas séricas (Vining, McGinley & Symons, 1983). O cortisol sérico não-ligado entra na saliva através de mecanismos intracelulares, e na saliva a maioria dos cortisol permanece não ligado

à proteína (Vining & McGinley, 1987). O cortisol salivar, usado como um marcador representante do cortisol livre na circulação, tem sido recomendado como um índice de stresse de treino e também tem sido utilizado, porque evita o stresse causado pela punção venosa (Gatti & De Palo, 2011).

O cortisol é considerado a principal hormona responsável por processos catabólicos, uma vez que reduz a síntese de proteínas e aumenta a degradação de proteínas (Hayes, Grace, Baker, *et al.*, 2015). Por outro lado, o cortisol é conhecido por ter potentes efeitos anti-inflamatórios, e de atuar sobre as catecolaminas que regulam a produção de citocinas – induzida por LPS – pelas células do sistema imunológico (incluindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) (Allgrove, Gomes, Hough, *et al.*, 2008). Esta hormona tem sido utilizada no campo de treino, como um dos marcadores preferenciais do stresse induzido pela carga de treino. Sugeriu-se que os níveis de cortisol aumentam em proporção em intensidade do exercício, mas o limite da atividade secretora é também dependente da duração do exercício. Uma "intensidade limiar" de  $\geq 60\%$  do  $VO_{2max}$  em exercícios que duram pelo menos 20-30 min foi sugerida e, acima desta intensidade relativa, grandes elevações nos níveis de cortisol no sangue podem ocorrer (Hill, Zack, Battaglini, *et al.*, 2008). Períodos de tempo superiores a 1 hora foram apontados como necessários para produzir incrementos assinaláveis na concentração de cortisol plasmático (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

### 2.5.3 Testosterona

A testosterona é a hormona esteroide mais importante dentro da família dos andrógenos e sua secreção é regulada pelo eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Ela é sintetizada e secretada pelas células de *Leydig* dos testículos nos homens e, em menores quantidades, nos ovários nas mulheres, com pequenas quantidades produzidas pela glândulas adrenais (Labrie, 2005). A testosterona exerce ações anabólicas sobre o tecido muscular, uma vez que contribui para o crescimento da musculatura, aumentando a síntese de proteínas e diminuindo a degradação de proteínas, melhorando assim o desempenho desportivo inclusive em atletas *master* (Hayes, Grace, Sculthorpe, *et al.*, 2013). Ações anabolizantes indiretas da testosterona relacionadas com a força muscular incluem a estimulação da secreção de outras hormonas anabólicas tais como a hormona de crescimento. A maior parte da testosterona circulante está

ligada à albumina e globulinas (~95-98%), enquanto uma pequena quantidade (~2-5%) permanece livre na circulação (Papacosta & Nassis, 2011). A testosterona livre entra na saliva através de mecanismos intracelulares, e na saliva a maioria de testosterona não está, portanto, ligada a proteínas (Vining & McGinley, 1987). As medidas salivares de testosterona podem fornecer um indicador confiável das concentrações de testosterona no soro ou plasma (Papacosta & Nassis, 2011). Embora, informações mais recentes questionem a relação existente entre as concentrações de testosterona salivar com medidas de testosterona bio disponível (Hayes, Sculthorpe, Young, *et al.*, 2014), a testosterona salivar é amplamente utilizada nos estudos com atletas jovens (Kilian, Engel, Wahl, *et al.*, 2016), atletas de judo (Papacosta, Nassis & Gleeson, 2016), futebol (Arruda, Aoki, Freitas, *et al.*, 2015), rugby (Gaviglio, Osborne, Kelly, *et al.*, 2015) e indivíduos idosos treinados ou não (Hayes, Sculthorpe, Herbert, *et al.*, 2015).

#### **2.5.4 Rácio testosterona/cortisol**

O rácio testosterona/cortisol (T/C) é um dos indicadores mais utilizados na monitorização da resposta hormonal ao treino regular, sendo sugerido como indicador do estado anabólico/catabólico do organismo. Foi ainda, apontado como um possível indicador de “sobretreino” (Urhausen, Gabriel & Kindermann, 1995) e a diminuição do rácio T/C foi relacionada com a recuperação incompleta do exercício realizado (Banfi, Marinelli, Roi, *et al.*, 1993). Decréscimos do rácio T/C de cerca de 30% em relação ao valor basal são indicativos de recuperação incompleta mas não de sobretreino (Banfi, Marinelli, Roi, *et al.*, 1993; Vervoorn, Vermulst, Boelens-Quist, *et al.*, 1992). Em remadores olímpicos, períodos de treino mais duro decresceram o rácio T/C entre 5 e 50%, enquanto o contrário acontecia nos períodos de menor intensidade do treino (Vervoorn, Quist, Vermulst, *et al.*, 1991).

#### **Implicações**

Esta breve revisão de literatura mostra perspectivas promissoras na utilização dos marcadores salivares e sua pertinência na monitorização da adaptação dos atletas ao treino. A falta de estudos em atletas veteranos justifica, em nosso entender, a exploração do comportamento deste conjunto de parâmetros numa época desportiva.

## 2.6 ATLETAS *MASTER*

Atletas *master* são indivíduos que sistematicamente treinam e competem em formas organizadas de desporto, algumas delas especialmente elaboradas para adultos mais velhos. Cada organização desportiva, nacional ou internacional, determina a idade que define um atleta *master*. Em geral, a idade que inicia-se uma categoria *master* é determinada pela idade em que o recorde mundial para a elite do desporto atingiu o limite máximo. Enquanto atletas *master* tem geralmente 35 anos de idade ou mais, a competição para atletas *master* na natação começa aos 25 anos de idade, no atletismo aos 35 anos e no golf aos 50 anos (Reaburn & Dascombe, 2008; Hecht, 2001). Os atletas *master* participam no desporto organizado e competitivo por um número alargado de razões. Atletas *master* participam por divertimento, competição, aptidão física, sociabilidade, viagens, alívio do stresse, desafio pessoal e desenvolvimento de habilidades. Entretanto, os fatores de divertimento, benefícios para a saúde e aptidão física, socialização e competição parecem ser as razões condutoras para o envolvimento no desporto (Reaburn & Dascombe, 2008; Shaw, Ostrow & Beckstead, 2005). A preparação e participação na competição de atletas *master* aparentemente foi associada com perspectivas favoráveis em termos de qualidade de vida e a incidência de novos casos de doença isquémica do coração, hipertensão e diabetes, pelo menos em 750 atletas entrevistados sobre um período de 7 anos (Shephard, Kavanagh, Mertens, *et al.*, 1995). Os níveis de atividade adotadas pelos competidores foram substancialmente elevados, e os autores deste estudo realizado há mais de 20 anos, já levantaram a questão do quão longe a experiência de saúde favorável é atribuível aos altos níveis de condicionamento físico. Afigurou-se que os indivíduos mais velhos podem sustentar tais níveis de atividade sem uma influência negativa sobre a sua resistência à doenças infecciosas (Shephard, Kavanagh, Mertens, *et al.*, 1995).

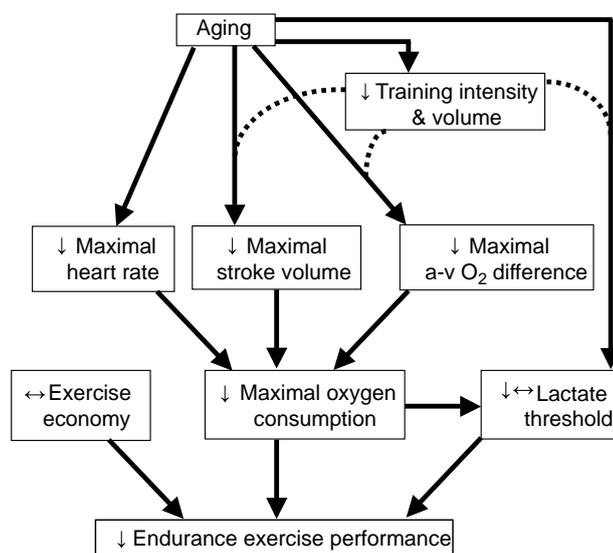
A determinação dos efeitos do envelhecimento biológico por si só sobre a capacidade funcional fisiológica em seres humanos é difícil, porque a interpretação é confundida por reduções nos níveis de atividade física (descondicionamento), alterações correspondentes na composição corporal (ou seja, o aumento da gordura corporal e redução da massa livre de gordura), e o desenvolvimento de doenças clínicas, os quais reduzem a capacidade funcional independente dos processos intrínsecos do envelhecimento. Devido a essas limitações, uma nova abordagem para determinar os efeitos do envelhecimento sobre a capacidade funcional em seres humanos é determinar mudanças no desempenho do exercício de pico com a idade em

atletas altamente treinados e competitivos (Brown, Ryan & Brown, 2007; Pollock, Carter, Velloso, *et al.*, 2015; Kusy & Zieliński, 2015; Rittweger, di Prampero, Maffulli, *et al.*, 2009; Mueller, Knechtle, Knechtle, *et al.*, 2014; Aagaard, Suetta, Caserotti, *et al.*, 2010). A teoria é que esses atletas representam um modelo experimental eficaz porque as mudanças observadas com o avançar da idade são pensadas em refletir principalmente os resultados da primeira fase de envelhecimento (fisiológica). Além disso, 1) os desempenhos de pico desses atletas são estabelecidos em condições padronizadas e rigorosas, especialmente em eventos de nível de campeonato; e 2) auto motivação, uma determinante crítica da capacidade de determinar com precisão o desempenho de pico, é assumida como sendo igual ou quase máxima sob estas condições (Tanaka & Seals, 2003).

A diminuição, relacionada com a idade, no desempenho aeróbico de atletas *master* de elite aparece curvilínea da idade de 35 anos até aproximadamente a idade de 60-70 anos e exponencial depois disso. Especificamente, o desempenho aeróbico aparece mantido até cerca de 35 anos de idade, reduz modestamente até 50 anos de idade, seguido por uma diminuição progressiva (Tanaka & Seals, 2003; Reaburn & Dascombe, 2008). A redução no desempenho aeróbico com a idade pode ser devida à diminuição do volume e intensidade do treino, por motivos pessoais e comportamentais (aumento das responsabilidades familiares e profissionais, redução da motivação para treinar, por exemplo). Para além destes fatores psicossociais, estudos anteriores mostraram que as reduções relacionadas com a idade no  $VO_{2max}$ , e mudanças no limiar de lactato e economia de corrida em atletas *master* também podem afetar o desempenho aeróbico (Reaburn & Dascombe, 2008).

A alta geração de energia durante o exercício prolongado é providenciada pelo metabolismo aeróbio, que em grande parte depende da capacidade dos sistemas pulmonar, cardiovascular, hematológico e celular para o transporte de oxigénio da atmosfera para os músculos e a capacidade dos tecidos de utilizar o oxigénio para metabolizar os nutrientes (Armstrong, Casa, Millard-Stafford, *et al.*, 2007). Potência aeróbica máxima ou  $VO_{2max}$  refere-se à taxa máxima de consumo de oxigénio durante o exercício com grandes grupos musculares de intensidade progressiva até a exaustão. A capacidade do indivíduo para realização do exercício aeróbico é limitada pelo  $VO_{2max}$ , sendo este denominador amplamente aceito como o melhor indicador da aptidão cardiorrespiratória.  $VO_{2max}$  está relacionado com a capacidade aeróbica e a redução do  $VO_{2max}$  é a principal razão para o declínio da resistência funcional com o envelhecimento (Rittweger, di Prampero, Maffulli, *et al.*, 2009). Embora outros fatores e

mecanismos fisiológicos contribuem para a redução do desempenho desportivo com a idade avançada (Figura 2.18; Tanaka & Seals, 2008).



**Figura 2.18: Fatores e mecanismos fisiológicos que contribuem para a redução no desempenho do exercício de endurance com o avançar da idade em adultos saudáveis.**

Adaptado de (Tanaka & Seals, 2008).

Estima-se que o  $VO_{2max}$  diminua cerca de 10% por década após a idade de 25 anos em indivíduos idosos sedentários e saudáveis (Buskirk & Hodgson, 1987). Há uma diminuição relacionada com a idade para ambos os géneros no  $VO_{2max}$  que contribui para a diminuição da performance de endurance. No entanto, a diminuição  $VO_{2max}$  também é dependente do grau em que os atletas mantêm o volume e intensidade do treino, da idade dos indivíduos, ou da heterogeneidade do grupo (Reaburn & Dascombe, 2008).

De acordo com a equação de *Fick* modificada, o  $VO_{2max}$  é produto da frequência cardíaca máxima e do volume sistólico máximo (fatores centrais), e da máxima diferença arteriovenosa de oxigénio (fatores periféricos). A diferença arteriovenosa oxigénio é ainda influenciada por uma variedade de fatores, incluindo a massa muscular, a capacidade do sangue para transportar e entregar oxigénio (volume de sangue, hemoglobina), e a capacidade dos tecidos ativos para obter e utilizar oxigénio (capilarização, tipo de fibra muscular, atividade aeróbica das enzimas) (Reaburn & Dascombe, 2008).

Foi sugerido que a diminuição da  $FC_{max}$  é o principal contribuinte para a diminuição do  $VO_{2max}$  observada em atletas *master* – endurance (Tanaka, Monahan & Seals, 2001), mas que

uma diminuição no volume de ejeção máximo também pode contribuir para o declínio relacionado com a idade do  $VO_{2max}$ . No entanto, os declínios relacionados com a idade no desempenho aeróbico parecem um pouco menores do que o declínio relacionado com a idade no  $VO_{2max}$  (Tanaka & Seals, 2003). Isso sugere que pode haver declínios em outros fatores principais que influenciam o desempenho aeróbico, tais como o limiar de lactato ou a economia do exercício (Figura 2.17). Quando expresso como uma percentagem do  $VO_{2max}$ , o limiar de lactato aumenta (Wiswell, Jaque, Marcell, *et al.*, 2000), sugerindo que esta diminuição da intensidade do exercício no limiar de lactato com a idade pode ser secundária a uma diminuição relacionada com a idade no  $VO_{2max}$  (Reaburn & Dascombe, 2008). Há uma redução relacionada com a idade na fase estável máxima do lactato que também contribui para uma redução no desempenho de atletas *master* (Mattern, Gutilla, Bright, *et al.*, 2003).

O sucesso de um atleta de elite num desporto particular depende da habilidade, força e poder, e em algumas atividades, a eficiência, com a qual vários grupos musculares são recrutados para executar os movimentos corporais exigidos do desporto (Faulkner, Davis, Mendias, *et al.*, 2008). A diminuição do desempenho dos atletas de elite com a idade também pode ser explicada pela sarcopenia, perda nas unidades motoras das fibras tipo 2 com posterior atrofia muscular e perda da força muscular (Aagaard, Suetta, Caserotti, *et al.*, 2010; Faulkner, Davis, Mendias, *et al.*, 2008). Apesar das inevitáveis mudanças que ocorrem na estrutura e função do músculo com o envelhecimento, o atleta de elite idoso altamente treinado e altamente qualificado ainda é capaz de competir em seus oitenta anos numa ampla variedade de atividades desportivas a nível inatingível pelos jovens menos dotados ou bem treinados (Faulkner, Davis, Mendias, *et al.*, 2008), ou mesmo completar uma maratona aos 90 anos de idade (Mueller, Knechtle, Knechtle, *et al.*, 2014).

Em relação ao sistema imunológico, não está claro o quanto das mudanças relacionadas à idade, abordadas nas seções anteriores, são evitáveis e/ou mutáveis devido ao exercício regular. Além disso, há muitos fatores, tais como a alta quantidade de atividade física durante muitos anos, magreza, uma qualidade favorável da dieta, melhor perfil psicológico e herança biológica excepcional para explicar porque pessoas altamente condicionadas têm imunidade superior do que seus colegas sedentários (Buyukyazi, 2004). Nomeadamente, os efeitos benéficos do exercício físico regular sobre a imunidade tem sido documentados em adultos mais velhos, embora os mecanismos que sustentam a melhora da imunidade com o exercício regular não sejam bem compreendidos (Simpson & Guy, 2010).

Quando atletas idosos que realizaram exercício físico padronizado ao longo da vida ou pessoas fisicamente muito ativas são comparadas com seus homólogos sedentários, eles mostraram ter níveis basais mais elevados de células NK ou funções de linfócitos T (Shinkai, Kohno, Kimura, *et al.*, 1995). Em outro estudo, o treino habitual e moderado em idosos aumentou a concentração de células NK (Buyukyazi, 2004). Nesse estudo, os autores investigaram a associação entre o treino a longo-prazo realizado por mais de 16 anos e parâmetros imunes celulares e humorais de repouso em atletas idosos. Neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e subséries de linfócitos tais como células T, células B, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup> dos atletas idosos não foram estatisticamente diferentes quando comparadas aos resultados obtidos dos indivíduos sedentários. No entanto, os atletas idosos tinham maior potência aeróbica, menor percentagem de gordura, e elevadas percentagens de células NK e níveis séricos de IgM e IgA, demonstrando efeitos positivos do exercício regular realizado a longo prazo sobre o envelhecimento (Buyukyazi, 2004).

Em roedores, o treino físico quando iniciado antes de um limiar fisiológico crítico em roedores jovens, foi benéfico para músculos e ossos de animais mais velhos, mas o efeito não foi observado em animais idosos treinados a curto-prazo (Marina, Carmeli, Ljubuncic, *et al.*, 2008). Um outro estudo realizado no Brasil investigou um grande painel de biomarcadores geriátricos emergentes, em idosos que treinavam por longos períodos de tempo ( $49 \pm 8$  anos de treino). Os autores encontraram que o treino a longo-prazo foi associado com baixos níveis de contagem de células sanguíneas brancas, contagem de neutrófilos, IL-6, IL-10, IL-1ra e TNFR1, associados a melhora do perfil de saúde em idosos (de Gonzalo-Calvo, Fernández-García, de Luxán-Delgado, *et al.*, 2012). O exercício de resistência realizado ao longo da vida ( $28 \pm 2$  anos) foi relacionado com abrandamento da redução do volume muscular e diminuição de alguns marcadores inflamatórios (CRP e IL-6), características que geralmente estão aumentadas com o envelhecimento. Isto sugere que o exercício físico regular pode ser importante na redução da inflamação sistêmica e manutenção da massa muscular com a idade (Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013). Mais recentemente, uma pesquisa realizada com atletas *master* brasileiros (65 -85 anos), que tinham hábitos regulares de treino intenso e moderado apresentaram menor proporção de células T terminalmente diferenciadas (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Embora ambos tipos de treino tenham sido incapazes de modificar a proporção de células TCD8<sup>+</sup> senescentes (CD28<sup>-</sup>), foi detetado um comprimento maior dos telômeros nestes grupos em comparação ao grupo controlo da pesquisa. Esta bem conduzida pesquisa, mostrou também que o grupo envolvido em treino intenso apresentou

redução na apoptose de células T, avaliada pela expressão de Bcl-2 e caspase-3 (Silva, de Araújo, Fernandes, *et al.*, 2016). Isto sugere e em conformidade com outros estudos (Simpson, Florida-James, Cosgrove, *et al.*, 2007; Spielmann, McFarlin, O'Connor, *et al.*, 2011) que intensidades mais altas de treino são necessárias para que as respostas imunes sejam mais pronunciadas. Os resultados apresentados pelos estudos anteriores ajudariam a responder ao paradoxo existente quando do entendimento das respostas imunológicas em atletas *master*, uma vez que, esses indivíduos são submetidos a um treino físico, que geralmente inclui altas cargas, no entanto, longo tempo de duração. Neste caso, o exercício agudo de alta intensidade traria efeitos indesejáveis enquanto o exercício de longa duração produziria resultados satisfatórios.

Neste contexto, atletas *master* com uma prática regular de treino ao longo da vida são um grupo interessante que pode ser utilizado como um modelo para estudar o envelhecimento no contexto do comportamento otimizado em relação a um envelhecimento saudável e ativo (Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013; Tanaka & Seals, 2008). Embora o foco da literatura sobre atletas *master* e os efeitos benéficos do exercício sobre o envelhecimento esteja em crescimento exponencial (Faulkner, Davis, Mendias, *et al.*, 2008; de Gonzalo-Calvo, Fernández-García, de Luxán-Delgado, *et al.*, 2012; Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013; Pollock, Carter, Velloso, *et al.*, 2015; Silva, de Araújo, Fernandes, *et al.*, 2016), as consequências do treino ao longo da vida sobre o envelhecimento não são claras, em grande parte devido à dificuldade de dissociar os efeitos do envelhecimento normal daqueles provocados por uma prática exercício físico regular ao longo da vida.

## **Implicações**

Atletas *master* representam um subgrupo demográfico muito interessante, porque muitos deles expressam um fenótipo fisiológico ímpar que poderia ser chamado de "envelhecimento excepcionalmente bem-sucedido" (Tanaka & Seals, 2008). Assim, o estudo de atletas *master* oferece uma oportunidade única para investigar os efeitos do treino a longo-prazo sobre o envelhecimento do sistema imunológico em si, e também a influência das adaptações ao treino ao longo da vida sobre as respostas ao exercício agudo.



# Metodologia

---

## Capítulo 3



### 3.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

A amostra utilizada neste estudo foi composta por atletas *master* de nível nacional e internacional de três modalidades desportivas: atletismo, natação e judo.

Para a proposta desta tese, os atletas *master* foram definidos como indivíduos acima dos 40 anos, que participaram de desporto competitivo e mantiveram-se condicionados por mais de 20 anos de treino ao longo da vida. Não foram incluídos atletas que esporadicamente treinam ou competem, ou competidores mais velhos que tenham recomeçado seu treino físico após longos períodos de inatividade física.

Foram, portanto, avaliados 20 atletas *master* (homens, N = 17; mulheres, N = 3) engajados nos desportos de atletismo, judo e natação residentes na cidade de Coimbra, Portugal. Um histórico desportivo através de um inquérito auto-reportado foi feito para cada participante informativo em relação à história dos atletas ao longo da vida relativamente a treinos, a frequência e a duração aproximada das sessões, a modalidade praticada por cada atleta e também garantiu o principal critério de inclusão no estudo, mais de 20 anos de treino ao longo da vida.

Foram utilizados dois grupos controlo, incluindo participantes que nunca tenham participado de treino físico regular e competitivo ao longo da vida ou pelo menos nos últimos 20 anos. Do primeiro grupo fizeram parte 10 pessoas (homens, N = 6; mulheres, N = 4) que nunca praticaram treino físico regular. O segundo grupo tem na sua constituição 8 adultos-jovens (homens, N = 5; mulheres, N = 3) (Tabela 3.1). A inclusão dos indivíduos no grupo controlo obedeceu os requisitos de género, nível socioeconómico e morada de habitação similares ao grupo de atletas. Além disso os participantes não podiam apresentar doença inflamatória crónica ou doença incapacitante, investigada por questionário próprio. Os participantes foram informados inteiramente sobre a participação no estudo e os procedimentos envolvidos, antes de fornecer consentimento informado por escrito conforme aprovação no Comité de Ética da Faculdade de Ciências do Desporto da Universidade de Coimbra.

Tabela 3.1. Características dos participantes

	<b>Adultos-jovens (N=8)</b>	<b>Adultos (N=10)</b>	<b>Atletas <i>master</i> (N=20)</b>
Idade (anos)	31.8 ± 3.00*	54.2 ± 5.9	53.1 ± 8.8
Estatura (cm)	173.4 ± 9.16	168.6 ± 8.5	170.7 ± 5.3
Peso corporal (kg)	65.2 ± 11.2	70.5 ± 12.9	74.9 ± 15.1
IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	21.8 ± 2.0	24.3 ± 3.2	25.1 ± 4.6
VO <sub>2max</sub> (L.min <sup>-1</sup> )	3142.8 ± 732.8	2076.0 ± 355.5*	2916.5 ± 661.1
VO <sub>2max</sub> (ml.kg.min <sup>-1</sup> )	46.82 ± 6.05	29.29 ± 4.14*	40.33 ± 11.15

Valores são Média ± Desvio Padrão (SD). Distribuição de género e tamanho da amostra = Adultos-Jovens (N= 3 mulheres, 6 homens); Adultos (N = 4 mulheres, 6 homens); Atletas *master* (N = 3 mulheres, 17 homens). Abreviaturas: IMC = Índice de Massa Corporal; VO<sub>2max</sub> = Consumo Máximo de Oxigénio.

### 3.2 PROTOCOLO DE TESTE

Como o objetivo desta tese está centrado na repercussão do treino ao longo da vida sobre a imunosenescência e inflamação em atletas *master*, iniciamos a descrição dos protocolos de teste pela abordagem da metodologia relativa ao histórico desportivo dos atletas ao longo da vida. Em seguida, apresentamos os testes protocolares utilizados para a análise das variáveis fisiológicas. A utilização deste procedimento também permitiu a obtenção dos espécimes orgânicos utilizados para os procedimentos bioquímicos, hormonais e imunológicos. Serão igualmente apresentados os principais procedimentos adotados em análise laboratorial dos parâmetros bioquímicos, hormonais e imunológicos, referindo os procedimentos adequados à recolha e manipulação do material biológico, bem como a especificação do equipamento utilizado.

#### 3.2.1 Histórico desportivo

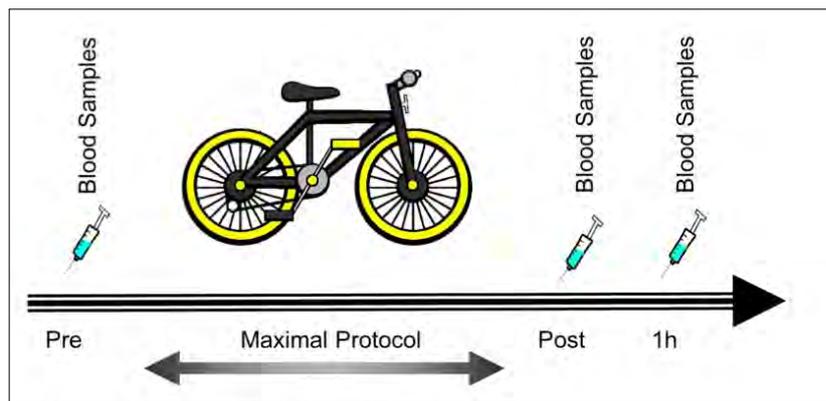
Todos os participantes preencheram um questionário de triagem de saúde e responderam a uma entrevista semiestruturada que incluía perguntas relacionadas com os critérios de inclusão / exclusão no estudo (Anexo 1).

Os atletas *master* responderam a um questionário sobre o histórico desportivo ao longo da vida. O questionário é um relato auto-reportado relativamente ao início da vida atlética, das modalidades praticadas e a duração dedicada para cada categoria, inclusivamente o ano de início e término, as horas por semana e os meses por ano no desporto mencionado e ainda os episódios de lesão (Anexo 2).

Um segundo questionário em relação ao planeamento da época de treino, incluindo o desenvolvimento das atividades, nomeadamente: tipo de atividade, categoria, horas/semana, a classificação da intensidade do esforço (fácil, moderado, intenso ou muito intenso), as competições pelas quais o atleta participou e os resultados obtidos nestas provas foi também aplicado (Anexo 2).

### **3.2.2 Desenho experimental**

Um estudo transversal comparando os parâmetros hematológicos, inflamatórios e os níveis de citocinas foi realizado mediante as recolhas obtidas na primeira visita dos participantes ao laboratório e com os dados obtidos em repouso. Um dos objetivos essenciais deste estudo foi avaliar o efeito do treino ao longo da vida e do envelhecimento, ou a interação entre eles sobre o comportamento de diversos marcadores biológicos. Com o objetivo de eliminar efeitos residuais do treino, as recolhas foram realizadas respeitando no mínimo 72 horas de recuperação da última sessão de exercício. Os participantes chegaram no laboratório às 09:00 e descansaram durante 10 minutos. Durante esse período, os participantes foram orientados relativamente a todos os procedimentos que seriam realizados no dia do teste. Primeiramente foi efetuada uma recolha de sangue. Em seguida, foi feita a avaliação antropométrica. Após, um protocolo de esforço máximo em cicloergómetro foi realizado. Novas colheitas de sangue foram feitas após 10 minutos e 1h após o final do teste. Todos os procedimentos foram realizados no início da época desportiva dos atletas (Figura 3.1). Nove atletas foram convidados a retornar ao laboratório num segundo momento, o qual deveria corresponder ao período final da sua época de treino ou a 1 semana após a principal competição que haviam participado no final da temporada. Esses dados foram analisados para o Estudo 4 que objetivou investigar uma época de treino dos atletas.



**Figura 3.1. Desenho experimental.**

### 3.2.3 Composição corporal

A estatura e a massa corporal de cada participante foram determinadas utilizando um estadiômetro *Harpden*, modelo 98,603 (*Holtain Limited*) e uma balança digital *Seca* modelo 770 (*Seca*), respetivamente. Em seguida, os sujeitos foram avaliados no equipamento *BodPod*, o que permitiu a determinação da percentagem de gordura (%G) e da massa livre de gordura (MLG) dos participantes, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante. As medidas de peso e estatura foram posteriormente utilizadas para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC).

### 3.2.4 Determinação do $VO_{2max}$

Uma vez obtidas as medidas de repouso, os sujeitos realizaram um protocolo de esforço máximo em cicloergómetro. O objetivo deste teste foi obter as respostas agudas de marcadores bioquímicos e imunológicos e compará-las com as dos indivíduos sedentários que realizaram os mesmos procedimentos. O teste foi realizado em cicloergómetro (Lode, Groningen, Holanda), considerado como o ergómetro mais adaptável a amostra em estudo, independente da modalidade desportiva praticada. Nosso objetivo era uma padronização dos resultados e a tomada de medidas agudas sem a necessidade de que o teste fosse o mais específico possível para a modalidade desportiva praticada pelo atleta. As perdas no  $VO_{2max}$  obtido não seriam relevantes para os parâmetros que queríamos analisar.

Ao iniciar o teste, medições de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> de respiração-a-respiração foram registados continuamente (Quark TCP Cosmed, COSMED, Roma, Itália). Os sujeitos respiraram de forma contínua através de uma máscara facial. Os analisadores de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> foram calibrados com gases conhecidos, de acordo com as orientações do fabricante (5 5%CO<sub>2</sub>, 16%O<sub>2</sub>, BAL N2 UN1956, 560 litros, 2200 psig, 70°F (21°C), Cosmed, COSMED, Roma, Itália). Uma seringa de 3 litros foi usada para calibrar o sensor de volume antes do início do protocolo do teste. Os participantes começaram o teste com uma carga de 75 watts para uma fase de aquecimento, seguido por incrementos de 25 watts por estágio de 3min até que o sujeito não pudesse continuar, apesar do forte encorajamento verbal. Os sujeitos pedalarão a uma cadência constante entre 80 e 85 rpm.

Para assegurar que o VO<sub>2max</sub> fosse alcançado com a melhor precisão possível, os sujeitos tinham de cumprir, pelo menos, dois dos seguintes critérios: (1) atingir a frequência cardíaca máxima (FC<sub>max</sub>) maior do que a FC máxima para idade prevista (208 menos 0,7 \* idade), (2) uma razão de troca respiratória > 1.15 e (3) um plateau no VO<sub>2</sub>, apesar do aumento da carga imposta. Devido a razões de segurança o teste foi interrompido quando foi observado um aumento no VO<sub>2</sub>, sem aumentos da FC (McArdle, Katch & Katch, 2014; Tanaka, Monahan & Seals, 2001). Todos os participantes realizaram o teste com acompanhamento de eletrocardiograma (ECG).

Durante o teste, a frequência cardíaca foi monitorizada minuto-a-minuto por telemetria de ondas curtas (COSMED, COSMED, Roma, Itália). A frequência cardíaca máxima (FC<sub>max</sub>) foi obtida pelo maior valor assumido da FC no último patamar do teste. Imediatamente após o final do teste de esforço, foi colhida uma micro amostra sanguínea da polpa do dedo com o objetivo de avaliar a concentração de lactato (Lac<sub>max</sub>). A medição da concentração de lactato foi realizada através do analisador portátil Lactate Pro (R), conforme indicações do fabricante.

No final de cada patamar do teste, os atletas foram convidados a identificar numa tabela fixada em frente a bicicleta o esforço percebido através da utilização da escala Cr10 de Borg (Minganti, Ferragina, Demarie, *et al.*, 2011). A Percepção Subjetiva de Esforço (RPE) do teste foi adotada como o maior valor, numa escala de 0 a 10, obtido no último patamar do teste.

### 3.2.5 Recolha sanguínea e hemograma

As amostras de sangue venoso (16 ml) foram obtidas da veia antecubital por punção venosa e coletadas nos momentos pré-exercício (Pre), dentro de 10 min pós-exercício (Post) e 1 h pós-exercício (1h). O sangue foi armazenado em 3 tubos contendo EDTA e num tubo para soro. Os tubos de EDTA foram utilizados para o hemograma, separação do plasma e para os procedimentos de citometria de fluxo e *sorting* celular.

Para a realização do hemograma foi utilizado o aparelho “*Coulter counter Analyzer*”, que utiliza um método automático para determinar as quantidades e percentagens dos diferentes constituintes hematológicos (Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida). De interesse, foram determinados leucócitos (WBC), eritrócitos (glóbulos vermelhos, RBC), granulócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas, volume médio de plaquetas (MPV), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hematócrito (Ht) e hemoglobina corpuscular média (HCM). Todas as contagens de células sanguíneas foram corrigidas para as variações de volume de plasma (Dill & Costill, 1974). As mudanças no volume plasmático foram estimadas a partir de mudanças no conteúdo de hemoglobina e hematócrito das amostras de sangue total nos tubos de EDTA imediatamente após a coleta da amostra. A concentração de hemoglobina e do hematócrito do sangue total foram usadas para calcular as variações de volume plasmático em relação ao Pre (Dill & Costill, 1974). As amostras de sangue de 2 tubos de EDTA e do tubo do soro foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 2000 rpm. Após centrifugação, o plasma e o soro foram armazenados a -80°C até serem utilizados para os ensaios das concentrações de citocinas e da concentração de proteína C-reativa, respetivamente.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS PLASMÁTICAS

Os níveis plasmáticos de IL-1ra, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF-α, foram determinados por ELISA usando conjunto *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os níveis da proteína C-reativa no soro foram determinados utilizando o analisador Horiba Medical Pentra

C200 (Kyoto, Japão) seguindo as instruções do fabricante. O limite mínimo de detecção para todas as citocinas e o coeficiente de variação médio para a análise em duplicado estão descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Valores correspondentes ao limite mínimo de detecção e o coeficiente de variação médio para análise em duplicado das citocinas IL-1ra, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  medidos no plasma.

<b>Citocina</b>	<b>Limite mínimo (pg/mL)</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
IL-1ra	4.10	3.29
IL-1 $\beta$	1.33	1.71
IL-6	3.01	4.59
IL-8	1.40	5.01
IL-10	0.43	4.39
TNF- $\alpha$	4.86	2.65

### 3.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Os estudos de imunofenotipagem no sangue periférico foram realizados utilizando um conjunto de oito anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos, sendo as amostras adquiridas no citómetro FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). Em 200  $\mu$ l de sangue periférico foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais (mAB) conjugados com os fluorocromos (definidos entre parênteses): 1.5  $\mu$ l de CD3-PB (Pacific azul, clone UCHT1, Pharmingen, San Diego, CA EUA), 2.5  $\mu$ l de CD4-APC-H7 (aloficocianina-hilite 7, Clone 13B8.2, Beckman Coulter, Miami, FL, EUA), 2.5  $\mu$ l de CD8-KO (Krome Orange, Clone 5MZ.332, Beckman Coulter, Miami, FL, USA), 10  $\mu$ l de CD25-PE (ficoeritrina, clone 2A3, BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), 10  $\mu$ l de CD127-FITC (isotiocianato de fluoresceína anti-humano, clone R.34.34, Beckman Coulter), 2.5  $\mu$ l de CD27-PECy5 (ficoeritrina-cianina 5, clone R.8.01, Beckman Coulter), 2.5  $\mu$ l de CD45RA-PECy7 (ficoeritrina-cianina 7, clone L48, BD Bioscience) e 1.5  $\mu$ l de KLRG1-APC (aloficocianina, Clone 2F1 / KLRG1, BioLegend, San Diego, CA).

Após a adição dos anticorpos monoclonais procedeu-se a incubação durante 10 min à temperatura ambiente no escuro. Depois disso, 2 ml de solução de lise FACS (BD Biosciences) foi adicionada. As células foram novamente incubadas à temperatura ambiente durante mais 10 min e, em seguida, lavou-se com 2 ml de PBS. Os tubos foram então centrifugados a 540 g durante 5 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS e adquiridas imediatamente no citómetro de fluxo FACS Canto II (BD).

Procedeu-se à aquisição de cerca de 1.000.000 eventos. A população de linfócitos foi definida com base na sua baixa granularidade (*side scatter*) e seu pequeno tamanho (*forward scatter*) (Figura 3.2a). Os linfócitos T foram identificados de acordo com sua positividade para CD3 (Figura 3.2b). As células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram definidas com base na sua positividade para CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respetivamente (Figura 3.2c). Cada subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi dividida em naïve (CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), memória-central (CM; CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>), memória-efetora (EM; CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) e efetoras-terminais (EMRA; CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>). As células T CD8<sup>+</sup> ainda foram subdivididas em mais uma população, SLEC (CD27<sup>-low</sup>, CD45RA<sup>++</sup>) (Figura 3.2d). As Tregs foram definidas com base no seguinte fenótipo: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup> (Figura 3.2c). Todas essas subpopulações foram analisadas para a proporção de células senescentes com base na expressão de KLRG1<sup>+</sup>. A Figura 3.2 mostra um modelo esquemático da estratégia utilizada para definir as diferentes populações de células estudadas. As contagens absolutas das células de interesse foram calculadas utilizando uma metodologia de plataforma dupla (citometria de fluxo e analisador de células hematológicas - Beckman Coulter LH 750, Miami, EUA). A análise dos dados foi realizada no software *Infinicyt* versão 1.7 (Cytognos, Salamanca, Espanha).

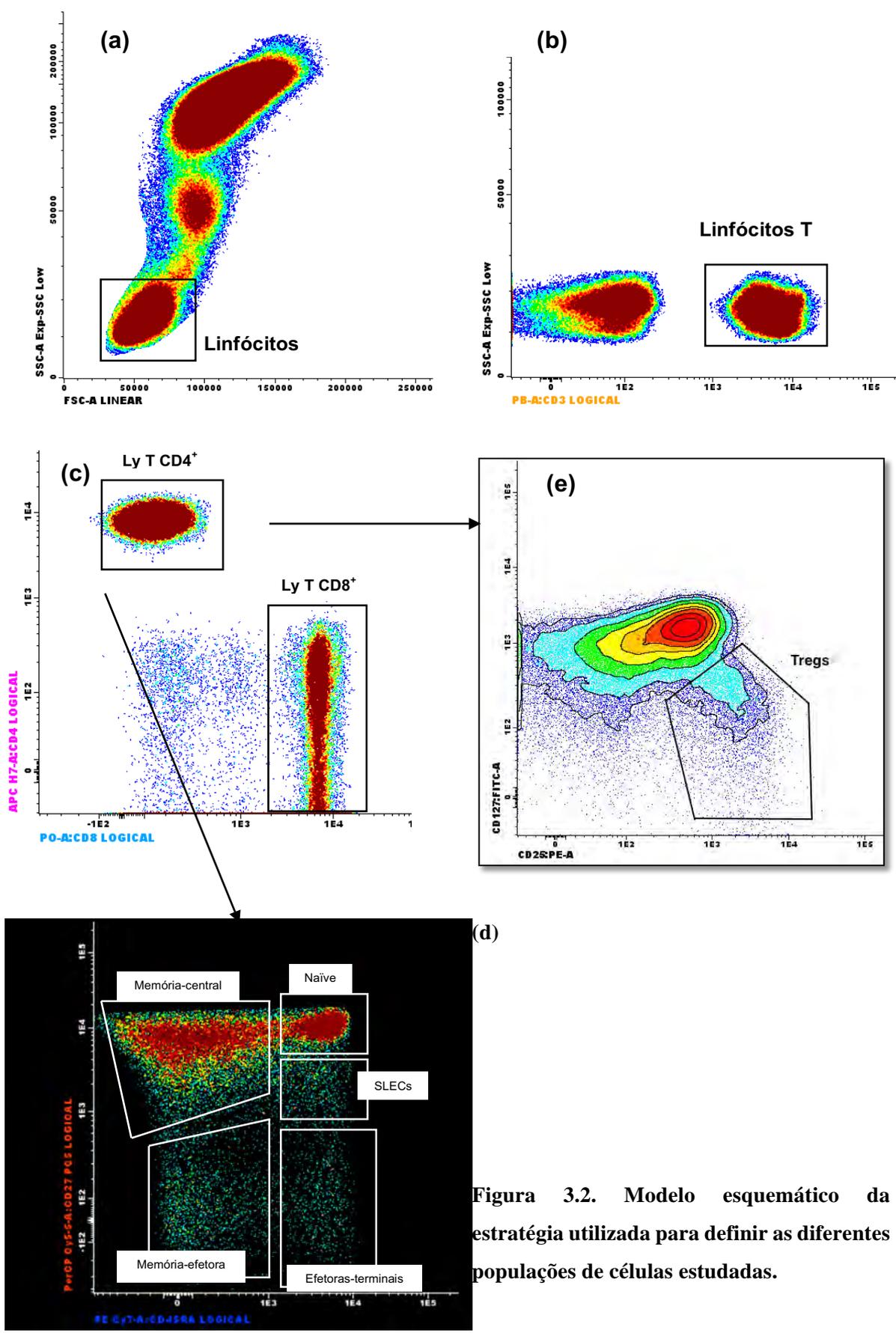


Figura 3.2. Modelo esquemático da estratégia utilizada para definir as diferentes populações de células estudadas.

### 3.4.1 Procedimento de separação celular

As populações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e Tregs foram purificados por FACS, utilizando um *cell sorter* FACSAria II (BD), de acordo com o seu fenótipo típico. Assim, uma combinação de 7 cores de mAB conjugados com os fluorocromos (descritos entre parênteses) foi utilizada: 1.5 µl de CD3-PB (Pacific azul, clone UCHT1, Pharmingen, San Diego, CA EUA), 2.5 µl de CD4-APC (aloficocianina, Clone 13B8.2, Beckman Coulter, Miami, FL, EUA), 2.5 µl de CD8-KO (Krome Orange, Clone 5MZ.332, Beckman Coulter, Miami, FL, USA), 10 µl de CD25-PE (ficoeritrina, clone 2A3, BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), 10 µl de CD127-FITC (isotiocianato de fluoresceína anti-humano, clone R.34.34, Beckman Coulter), 2.5 µl de CD27-PECy5 (ficoeritrina-cianina 5, clone R.8.01, Beckman Coulter), CD45RA-PECy7 (ficoeritrina-cianina 7, clone L48, BD Bioscience). Esta marcação permitiu a identificação de células T CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>); células T CD8<sup>+</sup> (células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) e Tregs (que são CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup>). Ainda foram purificadas as células naïve (CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), memória-central (CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>), memória-efetora (CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) e efectoras-terminais (CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) de cada população de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Nas populações de células purificadas procedeu-se a extração de mRNA.

## 3.5 EXPRESSÃO GÉNICA DOS MEDIADORES DA RESPOSTA IMUNE

### 3.5.1 Extração de mRNA das células purificadas

O conteúdo de células purificadas foi transferido para um tubo *Eppendorf* de 1,5 ml e centrifugado durante 5 min a 300 g e o sedimento foi ressuspenso em 350 µL de tampão de lise de RLT (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Anteriormente, à análise dos níveis de expressão génica do gene em estudo, o RNA necessita de ser transcrito em DNA complementar (cDNA), usando-se para tal, uma transcriptase reversa. No caso, da transcrição reversa do mRNA total (extraído das células purificadas), foi usado o kit SuperScript® III (Invitrogen™).

Para formação do cDNA foi utilizado o método qRT-PCR SYBR® verde que utiliza o fluorocromo SYBR® verde o qual liga-se ao produto de amplificação, entre as cadeias duplas de DNA, e emite fluorescência proporcional ao produto de amplificação por reação em cadeia com polimerase (PCR). Isso permite acompanhar a cinética e eficiência do processo de amplificação.

A mistura de reação contém 5 µl de 2x Quantitect™ SYBR® Verde PCR *Master Mix* (DNA polimerase HotStar®, tampão Quantitect™ SYBR® Verde PCR, mistura dNTP, SYBR® Verde I e água livre de RNase) 1 µl de 10x *primer* geNorm™ e 2 µl de água livre de RNase, por reação. A mistura de reação (8µl) foi transferida para uma placa de 96 poços e 2 µl do *template* de cDNA foi adicionado, fazendo um volume final de 10 µl. A placa foi então selada, misturada por vórtice e centrifugada a 2000xg durante 1 min antes de ser incubada no LightCycler® 480 (Roche). A incubação correu de acordo com a tabela 3.3. A quantificação relativa da expressão do gene em tempo real por PCR foi realizada no LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suíça).

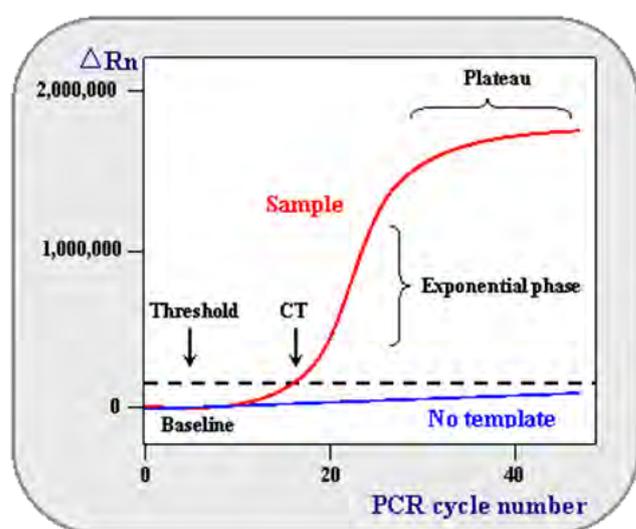
Tabela 3.3: Programa de incubação PCR no LightCycler® 480 (Roche).

	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Ativação enzimática	95	15:00	1
Amplificação e Aquisição do sinal	94	0:15	50
	55	0:30	
	72	0:30	
Curva <i>Melting</i>	95	0:15	1
	60	0:15	1
	95	Contínuo	1
Esfriamento	40	0:30	1

### 3.5.2.1 Normalização e Genes de referência

Para efetuar a análise dos resultados obtidos por PCR em tempo real foi necessário encontrar dois genes de referência, para se proceder à normalização dos valores obtidos. Sendo que, um gene de referência é definido como um gene cuja expressão não deve diferir entre amostras, geralmente genes *housekeeping*. Para escolher os dois genes de referência a usar, utilizaram-se amostras aleatórias nas reações com cada um dos 03 genes que poderia ser usado

como gene de referência: GAPDH (codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), CYC1 (codifica Citocromo C-1), SF3A1 (codifica subunidade 1 do fator de *splicing* 3a) e procedeu-se à realização das reações de PCR em tempo real de acordo com o que está descrito na seção 3.5.1. Uma vez terminadas as reações, os resultados obtidos foram analisados recorrendo ao programa geNorm (PrimerDesign), o qual fez a escolha dos dois melhores genes que se adequavam ao tipo de amostras usadas no estudo. Conhecidos os dois genes de referência para as amostras de frações celulares, realizaram-se as reações de PCR em tempo real com os respetivos genes de referência. De seguida, foi necessário proceder ao cálculo do Fator de Normalização para cada uma das amostras recorrendo, novamente, ao programa geNorm (PrimerDesign). Este valor foi, posteriormente, usado para o cálculo do valor de expressão génica normalizada (do inglês, Normalized Gene Expression, NGE). Para o estudo da expressão génica de IL-10, FoxP3 e TGF- $\beta$  nas Tregs os genes de referência foram o gene CYC1 e GAPDH. Estes genes foram selecionados pelo programa geNorm™, a partir de um pool de 5 genes sujeitos a qRT-PCR de 09 amostras de cDNA, entre os controlos e amostras de teste. Para o estudo da expressão génica de CCR7 e FASL nas células T CD8<sup>+</sup> naïve e efetoras-terminais os genes de referência foram o gene CYC1 e SF3A1. Estes genes foram selecionados pelo programa geNorm™, a partir de um pool de 5 genes sujeitos a qRT-PCR de 09 amostras de cDNA, entre os controlos e amostras de teste. Os resultados para a quantificação relativa foram obtidos usando o método Pfaffl que utiliza os valores de CT (limiar de ciclo), o ciclo correspondendo ao primeiro momento da amplificação detetado, em cada amostra (Figura 3.3).



**Figure 3.3: Modelo genérico dos resultados do *plot* qRT-PCR.**

O valor de CT, utilizado no método Pfaffl é determinado pelo ciclo de amplificação em que o sinal do produto de amplificação cruza a linha de limiar. Quanto mais cedo o valor CT, maior é a expressão génica. Se o sinal de amplificação não cruzar o limiar, a amostra é considerada negativa. ([Http://www.ncbi.nlm.gov/probe/docs/techqpcr/](http://www.ncbi.nlm.gov/probe/docs/techqpcr/))

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA IGA, CORTISOL E TESTOSTERONA SALIVARES

#### 3.6.1 Procedimentos adotados na recolha e processamento para análise laboratorial da saliva

Na primeira visita ao laboratório, ou quando necessário, por telefone ou e-mail, os elementos da amostra foram informados dos procedimentos a adotar na recolha de saliva e que cumprem o determinado pelo fabricante dos kits de análise salivares (Salimetrics, USA).

1. Não ter ingerido o pequeno-almoço 1 hora antes da recolha
2. Evitar consumir álcool nas 24 horas antes da recolha
3. Não ingerir alimentos, mastigar pastilhas elásticas ou rebuçados no período de 30 – 45 minutos que antecedem a recolha
4. Não lavar os dentes com pasta dentífrica 2 horas antes da recolha, sendo apenas permitido bochechar a boca com água 10 minutos antes da recolha
5. Cada indivíduo permaneceu sentado durante o processo de recolha da saliva. Foi recolhida toda a quantidade possível de saliva produzida passivamente em recipiente apropriado, durante 2 minutos. Esgotado o tempo de recolha o recipiente é fechado e colocado sob refrigeração.
6. Posteriormente, a quantidade de saliva é centrifugada e distribuída por dois tubos *Eppendorf* antes de ser congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para análise posterior.

##### 3.6.1.1 Procedimentos na determinação da IgA, cortisol e testosterona salivares

A determinação dos parâmetros salivares (IgA, cortisol e testosterona) foi realizada através da técnica de ELISA. O método utilizado para a determinação do cortisol e testosterona salivares foi uma ELISA competitiva (Salimetrics, USA) sendo seguidos todos os procedimentos sugeridos pelo fabricante. Resumidamente, as amostras de saliva foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas (3000rpm) antes da realização dos diferentes ensaios. Uma placa de 96 poços foi coberta com anticorpos específicos ao ligando (cortisol ou testosterona). Standards e amostras competem com a peroxidase pelas ligações ao

anticorpo. Após a incubação os componentes não ligados são lavados. O complexo ligando-peroxidase é então medido pela reação da peroxidase com o substrato tetrametilbezidina (TMB). Essa reação produz coloração azul. Após é adicionado uma solução de ácido sulfúrico, com nome de “stop” a qual interrompe qualquer futura reação, tornando a coloração amarela. A densidade óptica foi medida num espectrofotómetro leitor de ELISA a 450 nm (Tecan sunrise, Austria). O cálculo das concentrações de cortisol (ug/dL) e de testosterona (pg/mL) das amostras foi feito por interpolação dos valores das respetivas densidades óticas das amostras com a concentração conhecida dos standards de cada hormona. A concentração de IgA (mg/L) foi determinada por um imunoensaio enzimático de competição indireta (Salimetrics, USA).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita com recurso à utilização dos softwares SPSS para Mac versão 24.0 e *GraphPad Prism* para Windows versão 5.0.

As variáveis do estudo foram expressas descritivamente pela média e desvio padrão, ou pela média e o erro padrão da média quando for necessário. A análise de normalidade da distribuição foi realizada através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. Dados não distribuídos normalmente foram analisados através de instrumentos não paramétricos. Para a análise comparativa do comportamento das variáveis nos diferentes momentos realizados, utilizamos o teste ANOVA de medidas repetidas (distribuição normal) ou o teste de *Friedman* para medidas repetidas (não-paramétrico). Sempre que obtida significância estatística para os testes de ANOVA ou Friedman foram analisados adicionalmente a correção de Bonferroni o teste de Dunn para comparações múltiplas, respectivamente, para determinar os momentos de alteração significativa nos resultados das variáveis do estudo. Para comparação entre grupos recorreu-se aos testes *t de Student* (dados não-pareados) ou *Kruskal-Wallis* (não-paramétrico). Considerando o tamanho da amostra do grupo feminino de atletas (N = 3) e também pela homogeneidade dos parâmetros, o grupo de *masters* foi analisado na sua totalidade e nenhuma comparação entre géneros foi feita, inclusivamente para os grupos controlo.

A exploração de prováveis associações no comportamento entre variáveis foi realizada através do teste de *Pearson*, quando a normalidade estivesse garantida, ou através do teste de

*Spearman* (não-paramétrico), com a exigência do mesmo nível de significância. Para relatar a força da intervenção do exercício ou a magnitude do efeito da condição (*masters* vs. controlo) o tamanho do efeito de Cohen (ES) foi calculado e foi categorizada pela convenção:  $d = 0.2$  pequeno efeito;  $d = 0.5$  efeito médio;  $d = 0.8$  ou mais, grande efeito, utilizando G \* Power Versão 3.1.9.2. Em todos os testes estatísticos realizados foi exigido um grau de significância de  $P < 0.05$ .

Os resultados descritivos do modelo multinível são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão (DP). A distribuição *Gaussiana* para cada parâmetro foi avaliada por um teste de *Shapiro-Wilk*. O nível alfa foi ajustado em 0.05. Para as análises de mudança, considerando o planeamento multinível do estudo [unidades de nível 1 (intra-individual) dentro de cada unidade de nível 2 (indivíduos de diferentes grupos)], foram construídos modelos hierárquicos de efeitos aleatórios (REM) usando uma abordagem de modelagem multinível (MLwiN v2.26, Center for Multilevel Modeling, Universidade de Bristol, Bristol, Reino Unido) (Baxter-Jones, Mirwald, McKay, *et al.*, 2003).

Modelos de análise que continham variáveis medidas em diferentes níveis de uma hierarquia são conhecidos como modelos de regressão multinível. O seguinte modelo multinível polinomial aditivo foi adotado para descrever as mudanças em resposta a um protocolo de esforço máximo:

$$y_{ij} = (\alpha + \mu_j) + (\beta + \nu_j) x_{ij} + (\zeta_{1ij} + \zeta_{2ij} + \dots + \zeta_{nij}) + \varepsilon_{ij}$$

Esta equação é um exemplo de REM no qual os coeficientes de regressão de nível 1 são tratados como variáveis aleatórias no nível 2. Neste exemplo, os minutos de início (x) estão nas partes fixa e aleatória do modelo. Isto é visto claramente quando a equação 1 é rearranjada em partes fixas e aleatórias:

$$y_{ij} = (\alpha + \beta_j x_{ij}) + (\zeta_{1ij} + \zeta_{2ij} + \dots + \zeta_{nij}) + (\mu_j + \nu_j x_{ij} + \varepsilon_{ij})$$

onde  $y$  é a %Total Ly, %Total LyT, %LyT, %Total CD4<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>, %Total CD8<sup>+</sup> e %CD8<sup>+</sup>; naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efetoras-terminais (EMRA) das células T CD4<sup>+</sup> (%CD4); naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efetoras-terminais

(EMRA) das células T CD8<sup>+</sup> (%CD8); LyT/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> na ocasião da medição  $i$  no  $j^{\text{th}}$  indivíduo,  $\alpha$  é a constante para cada  $j^{\text{th}}$  indivíduo,  $\beta_j x_{ij}$  é a inclinação para os parâmetros dependentes ao longo do tempo (isto é, minuto de medida) para  $j^{\text{th}}$  indivíduo; e  $z_1$  a  $z_n$  foram os coeficientes das variáveis explicativas (por exemplo, idade, sexo, VO<sub>2max</sub> etc.) na ocasião da avaliação  $i$  no  $j^{\text{th}}$  indivíduo. Estes foram os parâmetros fixos no modelo.

Ambos  $\mu_j$ ,  $\nu_j x_{ij}$  e  $\varepsilon_{ij}$  formaram os parâmetros aleatórios no modelo. Eles foram assumidos como independentes e seguem uma distribuição normal, com médias iguais a zero e variância  $\sigma^2$ .  $\varepsilon_{ij} \sim N[0, \text{var}(\varepsilon_{ij})]$  foi o nível residual 1 (variação intra-individual) para a  $i^{\text{th}}$  avaliação de %Total Ly, %Total LyT, %LyT, %Total CD4<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>, %Total CD8<sup>+</sup> ou %CD8<sup>+</sup>; das células T CD4<sup>+</sup> (%CD4) naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) ou efectoras-terminais (EMRA); das células T CD8<sup>+</sup> (%CD8) naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) ou efectoras-terminais (EMRA); LyT/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> ou %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> no  $j^{\text{th}}$  indivíduo. Além disso,  $\mu_j \sim N[0, \text{var}(\mu)]$  foi a variância de interceptos entre indivíduos e  $\nu_j x_{ij} \sim N[0, \text{var}(\nu_j x_{ij})]$  foi a variância de *slopes* entre indivíduos; Sendo assim utilizadas como variâncias de resíduos de nível 2 (entre sujeitos) para o  $j^{\text{th}}$  indivíduo. A equação  $\mu_j \times \nu_j x_{ij} \sim N[0, \text{var}(\mu_j \times \nu_j x_{ij})]$  explicou as relações de covariância entre as interceptos e *slopes* no modelo (Jackowski, Baxter-Jones, Gruodyte-Raciene, *et al.*, 2015; Baxter-Jones, Mirwald, McKay, *et al.*, 2003).

Modelos foram construídos usando um procedimento *stepwise*, ou seja, variáveis preditoras (efeitos fixos  $z$ ) foram adicionados uma de cada vez, e as estatísticas de razão de verossimilhança foram usadas para julgar o ajuste estatístico do modelo (Baxter-Jones, Mirwald, McKay, *et al.*, 2003). As variáveis preditoras ( $z$ ) foram aceitas como significativas se o coeficiente médio estimado fosse maior do que o dobro do erro padrão da estimativa. Se o critério de retenção não fosse cumprido, a variável preditora foi descartada. Funções de potência do minuto de medida foram introduzidas nos modelos lineares para permitir a não-linearidade de mudanças nos parâmetros dependentes. As variáveis a seguir foram introduzidas como preditoras nos modelos multinível: minuto de medida, minuto de medida<sup>2</sup>, idade, estatura, massa corporal e VO<sub>2max</sub>. Foram criadas variáveis *dummy* para grupos de sexo e treino (amostra) com participantes do sexo feminino e controlos como categorias de referência, respectivamente. Um total de vinte oito independentes REMs multiníveis foram construídos.

# Resultados

---

## Capítulo 4



#### **4. ESTUDO 1: TREINO AO LONGO DA VIDA EM ATLETAS *MASTER*: APTIDÃO FUNCIONAL, VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E BALANÇO INFLAMATÓRIO DE CITOCINAS.**

##### **Resumo:**

**Objetivo:** o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do envelhecimento e do treino ao longo da vida no  $VO_{2max}$ , parâmetros hematológicos básicos e balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias e na sua resposta a uma sessão de exercício agudo.

**Métodos:** os participantes ( $n = 39$ ) foram divididos em 3 grupos: adultos-jovens (AJ;  $n = 9$ ), adultos (A;  $n = 10$ ) e atletas *master* (AM;  $n = 20$ ). Os grupos AJ e A não estavam envolvidos em qualquer prática sistemática de exercício, enquanto os atletas *master* tinham um mínimo de 20 anos de envolvimento no desporto de competição. Todos os indivíduos realizaram um teste progressivo máximo em cicloergómetro. As amostras de sangue foram obtidas antes (Pre), em 10 min pós-exercício (Post) e 1 h pós-exercício (1h).

**Resultados:** os valores do consumo máximo de oxigénio ( $VO_{2max}$ ) foram semelhantes para atletas *master* e grupo AJ, ambos apresentando valores mais elevados quando comparados com o grupo A. O grupo de atletas *master* apresentou as concentrações das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 mais elevadas em todos os momentos. Os valores mais elevados da citocina anti-inflamatória IL-10 foram observados para o grupo AJ com o grupo A mostrando os valores mais baixos. A IL-1 $\beta$  aumentou após o exercício apenas no grupo AJ. No entanto, as citocinas pro-inflamatórias IL-1  $\beta$  e IL-6 diminuíram durante a recuperação (1h) no grupo de atletas *master* enquanto a IL-8 diminuiu em todos os grupos (1h). O rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 foi mais elevada em todos os pontos de tempo medidos para o grupo de adultos, quando comparado com os grupos de atletas *master* e adultos-jovens.

**Conclusão:** O treino ao longo da vida ajuda a manter o equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com níveis de IL-10 próximos aos encontrados em adultos-jovens.

**Palavras-chave:** Inflamação, treino ao longo da vida, envelhecimento, consumo máximo de oxigénio, fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-10.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A criação de um estado pró-inflamatório prolongado chamado "*inflammaging*" conduz à inflamação em vários tecidos e órgãos em idosos. A sinalização intracelular que caracteriza a inflamação é controlada por reguladores moleculares extracelulares, incluindo os membros da família de citocinas que medeiam o recrutamento das células imunes e o controlo de complexos de sinalização intracelular que caracterizam os mecanismos da inflamação (Turner, Nedjai, Hurst, *et al.*, 2014). Assim, o envelhecimento resulta numa inflamação crónica de baixo grau, que é definida por um aumento de duas a quatro vezes em mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , o IFN- $\gamma$  e aumento do número de células brancas do sangue (Woods, Wilund, Martin, *et al.*, 2012).

O exercício físico exerce um potente efeito anti-inflamatório (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011), sugerindo que o exercício, por si só pode ser uma contramedida eficiente para prevenir ou retardar o aparecimento de algumas doenças crónicas associadas a este estado inflamatório de baixo grau (Simpson, Lowder, Spielmann, *et al.*, 2012). Geralmente, uma única sessão de exercício induz uma resposta inflamatória que é semelhante à induzida por infeção ou trauma. No entanto, clássicas citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , em geral, não aumentam com o exercício (Reihmane, Jurka, Tretjakovs, *et al.*, 2013; Steensberg, Fischer, Keller, *et al.*, 2003), indicando que a cascata de citocinas induzida por exercício difere claramente da cascata de citocinas induzida por infeções. Além disso, o aumento transitório nos níveis de IL-6 na circulação durante o exercício parece ser responsável por um aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias, nomeadamente, IL-10 e IL-1ra que estimulam a libertação de cortisol e diminuem o TNF- $\alpha$  após o exercício. A IL-1ra é uma citocina anti-inflamatória que é secretada primeiramente por monócitos e macrófagos e inibe as ações pró-inflamatórias de IL-1 $\beta$ . A IL-10 está envolvida na regulação negativa da resposta imune adaptativa e na redução dos danos teciduais induzidos por inflamação. Assim, a resposta de citocinas ao exercício pode ser um de vários mecanismos anti-inflamatórios que podem ajudar o exercício a neutralizar o processo de envelhecimento (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011).

Há estudos muito limitados que mostram que o treino de longo prazo reduz a inflamação crónica (Beavers, Hsu, Isom, *et al.*, 2010). A literatura publicada sobre o treino e envelhecimento é geralmente associada a programas de exercício ou de treino de curta duração,

8-12 semanas (Della Gatta, Garnham, Peake, *et al.*, 2014; Rodriguez-Miguel, Fernandez-Gonzalo, Almar, *et al.*, 2014), 16 a 32 semanas (Beavers, Ambrosius, Nicklas, *et al.*, 2013; Martins, Neves, Coelho-Silva, *et al.*, 2010) e 1 ano (Beavers, Hsu, Isom, *et al.*, 2010).

Neste contexto, atletas *master* com uma prática ao longo da vida de treino regular são um grupo interessante que poderia ser usado como um modelo único para estudar o envelhecimento no contexto do treino otimizado sobre o envelhecimento ativo e saudável (Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013; Tanaka & Seals, 2008). Por exemplo, os atletas *master* mantêm seus valores de  $VO_{2max}$  e não seguem o declínio conhecido desta variável com a idade (Pollock, Carter, Velloso, *et al.*, 2015). O  $VO_{2max}$  está relacionado com a capacidade de resistência e a redução do  $VO_{2max}$  é a principal razão para o declínio na resistência funcional com o envelhecimento (Rittweger, di Prampero, Maffulli, *et al.*, 2009).

Embora o foco da literatura sobre atletas *master* e os efeitos benéficos do exercício sobre o envelhecimento esteja crescendo (de Gonzalo-Calvo, Fernández-García, de Luxán-Delgado, *et al.*, 2012; Faulkner, Davis, Mendias, *et al.*, 2008; Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013; Pollock, Carter, Velloso, *et al.*, 2015; Silva, de Araújo, Fernandes, *et al.*, 2016), as consequências do treino ao longo da vida sobre o envelhecimento não são claras, em grande parte devido à dificuldade em dissociar os efeitos do envelhecimento normal daqueles provocados por uma prática de exercício físico regular. Além disso, os dados sobre os papéis das citocinas no envelhecimento são contraditórios (de Gonzalo-Calvo, Neitzert, Fernández, *et al.*, 2010; Della Gatta, Garnham, Peake, *et al.*, 2014). Alguns sugerem que a resposta inflamatória ao exercício ocasional aumenta com a idade, enquanto o treino regular pode ajudar a normalizar essa resposta (de Gonzalo-Calvo *et al.* 2010). No entanto, marcadores tradicionais do estado pró-inflamatório, como a IL-6, não são associados com o envelhecimento (Della Gatta *et al.* 2014). Portanto, são necessários estudos para clarificar o papel das proteínas inflamatórias no envelhecimento, e particularmente no processo de envelhecimento dos atletas.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do envelhecimento e do treino ao longo da vida no  $VO_{2max}$ , parâmetros hematológicos básicos e balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias e na sua resposta a um exercício agudo, onde procurou-se:

- Caracterizar o perfil antropométrico e funcional de atletas *master* submetidos a treino ao longo da vida e comparar os resultados com indivíduos que nunca foram submetidos a treino físico organizado;

- Analisar o comportamento da contagem de células do sangue periférico em função de um teste progressivo máximo em cicloergómetro.
- Comparar os valores hematológicos de atletas *master* e controlos nas condições *baseline*, após e 1 hora após a realização de uma sessão aguda de exercício em cicloergómetro.
- Determinar o balanço de citocinas pró e anti-inflamatórias em função da idade, do treino e da interação idade-treino.

## 4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

### 4.2.1 Sujeitos

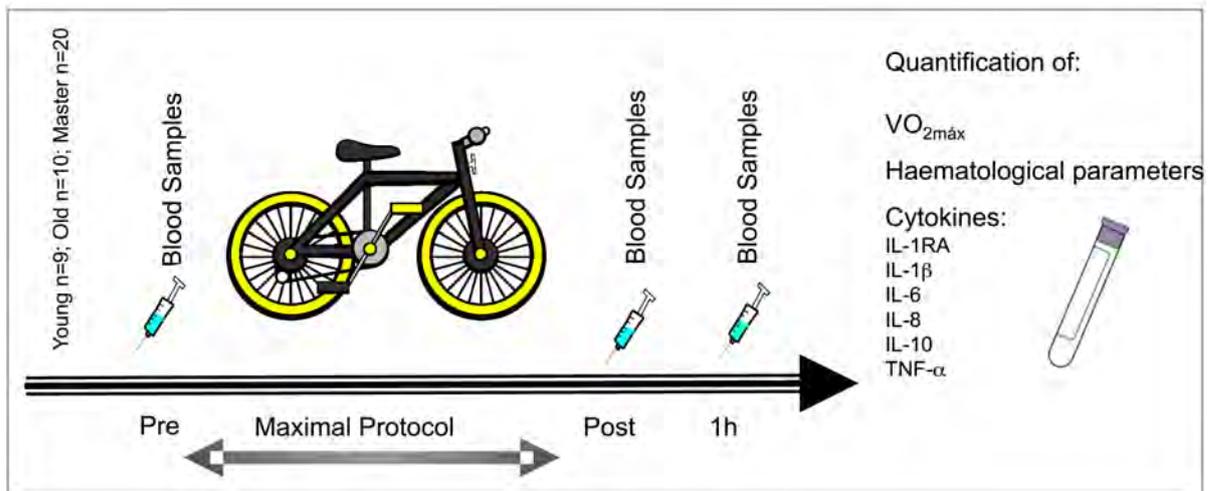
Os participantes (N = 39) foram divididos em 3 grupos: adultos-jovens (designado pela sigla AJ, N = 9), adultos (designado pela sigla A, N = 10) e atletas *master* (designado pela sigla AM, N = 20). As características antropométricas e das variáveis funcionais estão apresentadas na Tabela 4.1. Os dados correspondem ao total da amostra de cada grupo, não sendo feita a subdivisão dos conjuntos de homens e de mulheres.

Tabela 4.1 Características dos sujeitos.

	Adultos-jovens	Adultos	Atletas <i>master</i>
Idade (anos)	31.8 ± 3.00*	54.2 ± 5.9	53.1 ± 8.8
Estatura (cm)	173.4 ± 9.16	168.6 ± 8.5	170.7 ± 5.3
Peso corporal (kg)	65.2 ± 11.2	70.5 ± 12.9	74.9 ± 15.1
IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	21.8 ± 2.0	24.3 ± 3.2	25.1 ± 4.6
Tempo de teste (min)	18.2 ± 7.4	10.3 ± 3.5*	16.8 ± 5.5
Lac <sub>max</sub> (mmol.L <sup>-1</sup> )	11.2 ± 3.1	9.2 ± 2.1	9.1 ± 2.1
FC <sub>max</sub> (bpm)	187.8 ± 4.1*	166.3 ± 6.0	166.6 ± 8.7
VO <sub>2max</sub> (ml.min <sup>-1</sup> )	3142.8 ± 732.8	2076.0 ± 355.5*	2916.5 ± 661.1
VO <sub>2max</sub> (ml.kg.min <sup>-1</sup> )	46.82 ± 6.05	29.29 ± 4.14*	40.33 ± 11.15

Valores são Média ± Desvio Padrão. Adultos-jovens, N = 9; Adultos, N = 10; Atletas *master*, N = 20. Abreviaturas: IMC, Índice de Massa Corporal. FC<sub>max</sub> = frequência cardíaca máxima; Lac<sub>max</sub> = concentração máxima de lactato no sangue; VO<sub>2max</sub> = Consumo máximo de oxigênio.

A metodologia completa para este estudo está descrita no Capítulo 3. Um modelo esquemático do desenho experimental está representado na Figura 4.1.



**Figura 4.1 Desenho experimental.**

Resumidamente, os participantes chegaram no laboratório às 09:00 da manhã sem ter realizado atividade física rigorosa nas 72 horas prévias à visita ao laboratório. Um repouso de 10 minutos foi realizado por todos os indivíduos para a recolha de sangue. O sangue venoso em repouso (Pre) foi coletado por punção venosa para dentro de 2 tubos, um tubo que continha EDTA e o outro tubo para soro. Os participantes realizaram o protocolo de esforço máximo para determinações do  $VO_{2max}$  usando um teste progressivo em cicloergómetro de frenagem por fricção (Lode, Groningen, Holanda). A frequência cardíaca foi monitorada durante todo o teste por telemetria de ondas curtas (Polar RS800CX, Polar, Finlândia). Novas amostras de sangue foram obtidas a 10 min pós exercício (Post) e 1 h pós-exercício (1h). Imediatamente após a colheita de sangue foram realizadas as análises hematológicas e da concentração plasmática de citocinas (Figura 4.1).

#### 4.2.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *SPSS software* pacote estatístico versão 23 para Mac (Chicago, IL, EUA). Pressupostos de homogeneidade foram verificados. Os efeitos da idade (adultos-sénior vs. adultos-jovens), treino (*masters* vs. adultos-jovens) e a interação do treino e idade (*masters* vs. adultos-sénior) foram testadas usando ANOVA de duas vias, com testes *post hoc Bonferroni*. Os efeitos do exercício ao longo do tempo (isto é, Pre, Post e 1h) sobre parâmetros hematológicos, contagem de leucócitos e os níveis de citocinas foram testados utilizando uma ANOVA de medidas repetidas para dados distribuídos normalmente ou pelo teste de *Friedman* para dados que não tinham distribuição normal. Efeitos significativos para os testes ANOVA ou *Friedman* foram analisados ainda usando correção de *Bonferroni* ou teste de *Dunn* para comparações múltiplas para detetar

diferenças entre o Pre, Post e medidas de 1h entre grupos, respetivamente. A significância estatística foi aceita em  $P < 0.05$ . Os gráficos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). As correlações entre o tempo de teste e citocinas foi avaliada usando o coeficiente de correlação de *Spearman*.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Variáveis hematológicas

#### 4.4.1.1 Estudo transversal

Não foram observadas diferenças significativas para estatura, peso corporal e IMC entre os grupos (Tabela 4.1). O grupo de atletas *master* foi subdividido em 3 subpopulações conforme sua prática desportiva: atletismo (N = 12), judo (N = 3) e natação (N = 5). Em todas as modalidades houve uma semelhança quanto aos anos de treino realizados, meses por ano e horas por semana dedicados ao desporto. Esses valores são extremamente importantes pois demonstram a homogeneidade da amostra (Tabela 4.2). Em média, os atletas *master* treinaram  $24.6 \pm 1.83$  anos. Em cada ano a média de meses de treino no desporto foi de  $10.27 \pm 0.24$  meses, sendo que em cada mês, os atletas treinavam aproximadamente 5 horas semanais ( $5.45 \pm 0.42$  horas, Tabela 4.2). Os outros grupos (adultos-jovens e adultos) não tinham história de treino físico regular nos últimos 20 anos. O  $VO_{2max}$  foi similar nos atletas *master* e grupo de adultos-jovens e ambos os grupos apresentaram valores absolutos (Tabela 4.2) e relativos (Figura 4.2) maiores quando comparados ao grupo de adultos. Como mostra a Figura 4.2, o treino ao longo da vida parece manter os valores de  $VO_{2max}$  similares aos valores de adultos-jovens saudáveis. O declínio funcional associado à idade (observado pelos valores inferiores de  $VO_{2max}$  para os adultos) parece ser evitado com o treino. Em relação à modalidade desportiva, o grupo de nadadores apresentou valores de  $VO_{2max}$  inferiores aos judocas e corredores ( $P < 0.05$ ). Não houve diferenças para as variáveis hematológicas, leucócitos e monócitos entre os grupos. O grupo AJ apresentou valores maiores em repouso (Pre) para a contagem de

linfócitos e granulócitos (Tabela 4.3). Na mesma tendência, não foram encontradas diferenças em repouso para os índices VCM, HCM, CHCM e MPV ( $P > 0.05$ ).

Tabela 4.2. Níveis de atividade física dos sujeitos.

	Atletas <i>master</i>	Adultos	Adultos-jovens
$VO_{2max}$ ( $L \cdot min^{-1}$ )	$2916.5 \pm 147.8$	$2076.0 \pm 112.4^*$	$2996.5 \pm 229.0$
Histórico desportivo:			
Anos de treino	$24.6 \pm 1.83$		
Meses por ano no desporto	$10.27 \pm 0.24$		
Horas por semana no desporto	$5.45 \pm 0.42$		
↓			
	Atletismo	Judo	Natação
$VO_{2max}$ ( $L \cdot min^{-1}$ )	$3054.9 \pm 169.5$	$3003.0 \pm 339.1$	$2532.6 \pm 262.6^*$
$VO_{2max}$ ( $ml \cdot kg \cdot min^{-1}$ )	$44.65 \pm 3.18$	$39.60 \pm 6.19$	$30.39 \pm 1.94^*$
Anos de treino	$23.4 \pm 2.4$	$26.3 \pm 4.9$	$26.4 \pm 3.8$
Meses por ano no desporto	$10.6 \pm 0.3$	$10.1 \pm 0.6$	$9.6 \pm 0.5$
Horas por semana no desporto	$5.7 \pm 0.5$	$5.1 \pm 1.1$	$5.0 \pm 0.8$

Valores são Média  $\pm$  Desvio Padrão. Atletas *master* (N = 20), Adultos (N = 10) e Adultos-jovens (N = 8).

\*  $P < 0.005$  comparado aos *Masters* e Adultos-jovens. Abreviaturas:  $VO_{2max}$  = Consumo máximo de oxigênio.

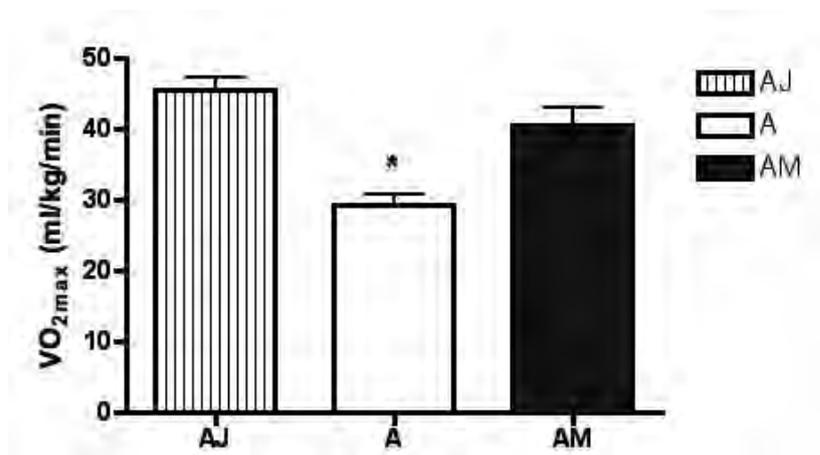


Figura 4.2: Valores médios do consumo máximo de oxigênio relativo.

Os valores são Média  $\pm$  Erro Padrão da Média. AJ (Adultos-jovens, N = 8), A (Adultos, N = 10) e AM (Atletas *master*, N = 20). \*  $P < 0.01$  quando comparado aos demais grupos. Abreviaturas:  $VO_{2max}$  = Consumo máximo de oxigênio.

#### 4.4.1.2 Estudo agudo

O tempo para completar o teste de esforço foi similar entre *masters* e adultos-jovens e maior comparado ao grupo de adultos ( $P < 0.05$ ). Diferenças significativas foram encontradas para a  $FC_{max}$ , onde o grupo de adultos-jovens mostrou valores mais elevados comparado ao grupo de adultos ( $P < 0.001$ ) e atletas *master* ( $P < 0.001$ ). Nenhuma diferença foi observada para o  $Lac_{max}$  (Tabela 4.1).

A Tabela 4.3, mostra os resultados para variáveis hematológicas (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito), leucócitos e subpopulações (linfócitos, monócitos, granulócitos) dos grupos *masters* e controles. Não houve diferenças entre os valores pré e pós-exercício para hematócrito e hemoglobina. Os valores de eritrócitos após o exercício mostraram aumentos significativos em todos os grupos ( $P < 0.01$ ). Os índices de eritrócitos (VCM, HCM, CHCM) também mudaram, mostrando diminuição dos valores em Post para todos os grupos ( $P < 0.01$ ). Todos os valores retornaram ao *baseline* 1 h após o exercício (1h) (Tabela 4.3). O exercício induziu uma leucocitose significativa em todos os grupos ( $P < 0.01$ ). Este aumento também foi observado para linfócitos para os atletas *master* e Adultos-Jovens ( $P < 0.001$ ). O exercício agudo também aumentou os monócitos para o grupo A ( $P < 0.01$ ) e granulócitos para os atletas *master* ( $P < 0.01$ ; Tabela 4.3). Plaquetas e índices relativos (MPV) aumentaram significativamente após o exercício ( $P < 0.05$ ; Tabela 4.3). Essas mudanças retornaram aos valores basais 1 h após o exercício (1h) (Tabela 4.3).

#### 4.4.1.3 Discussão

Nossos resultados mostram que os atletas *master* são capazes de manter valores de  $VO_{2max}$  similares aos de adultos-jovens saudáveis, revertendo em parte os efeitos do envelhecimento. Ao contrário, indivíduos acima de 40 anos e sedentários ( $54.2 \pm 2.11$  anos) demonstram ter um declínio funcional do  $VO_{2max}$  quando comparados com adultos-jovens estando assim relacionado com o envelhecimento.

Tabela 4.3. Variáveis hematológicas e contagem de leucócitos.

	Pré-exercício	Pós-exercício	1 hora pós-exercício
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )			

Adultos-Jovens	5.04 ± 0.39	5.46 ± 0.50*	5.00 ± 0.40
Adultos	4.90 ± 0.50	5.16 ± 0.50*	4.84 ± 0.47
<i>Masters</i>	5.16 ± 0.37	5.34 ± 0.43*	5.10 ± 0.38
Hemoglobina (g/dL)			
Adultos-Jovens	14.48 ± 1.19	12.74 ± 3.31	14.62 ± 1.47
Adultos	13.82 ± 1.51	13.30 ± 1.59	13.63 ± 1.49
<i>Masters</i>	14.87 ± 1.14	14.51 ± 1.47	15.16 ± 1.37 $\delta$
Hematócrito (%)			
Adultos-Jovens	44.78 ± 3.35	42.63 ± 5.00	45.21 ± 4.55
Adultos	43.27 ± 3.97	41.64 ± 4.35	42.98 ± 4.20
<i>Masters</i>	45.41 ± 2.57	44.10 ± 3.65	46.52 ± 3.27 $\delta$
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)			
Adultos-Jovens	6.28 ± 1.10	10.53 ± 1.46*	6.27 ± 0.83
Adultos	6.84 ± 1.22	9.12 ± 1.98*	6.57 ± 1.73
<i>Masters</i>	7.55 ± 1.90	9.73 ± 3.17*	7.36 ± 2.09
Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)			
Adultos-Jovens	3.31 ± 0.66 $\partial$	4.02 ± 0.41	2.39 ± 0.39 $\delta$
Adultos	2.31 ± 0.46	3.64 ± 0.98*	2.21 ± 0.46
<i>Masters</i>	2.35 ± 0.69	3.42 ± 1.40*	1.97 ± 0.74
Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)			
Adultos-Jovens	0.36 ± 0.17	0.51 ± 0.18	0.38 ± 0.22
Adultos	0.38 ± 0.17	0.62 ± 0.18*	0.36 ± 0.10
<i>Masters</i>	0.47 ± 0.19	0.59 ± 0.19	0.40 ± 0.18 $\delta$
Granulócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)			
Adultos-Jovens	5.93 ± 1.11 $\partial$	5.33 ± 0.51	6.82 ± 1.02 $\delta$
Adultos	4.16 ± 0.98	4.87 ± 1.20	4.01 ± 1.30 $\delta$
<i>Masters</i>	4.60 ± 1.37	5.39 ± 2.02 $\S$	4.87 ± 1.71
VCM (fL)			
Adultos-Jovens	255.7 ± 68.3	326.3 ± 79.5*	261.6 ± 62.3
Adultos	248.3 ± 97.4	317.5 ± 87.3	267.4 ± 65.2 $\delta$
<i>Masters</i>	239.8 ± 79.2	285.0 ± 85.6*	255.2 ± 84.4 $\delta$
HCM (pg)			
Adultos-Jovens	88.97 ± 2.89	77.93 ± 6.02*	90.28 ± 3.76
Adultos	88.34 ± 2.74	80.75 ± 4.20*	88.85 ± 4.82
<i>Masters</i>	88.86 ± 4.09	83.78 ± 8.18*	92.27 ± 7.44 $\delta$
CHCM (g/dL)			
Adultos-Jovens	28.74 ± 1.31	25.22 ± 2.02*	29.25 ± 1.66
Adultos	28.14 ± 0.74	25.76 ± 1.49*	28.17 ± 1.82
<i>Masters</i>	28.72 ± 1.43	27.04 ± 2.71*	29.50 ± 2.19
MPV (fL)			
Adultos-Jovens	32.32 ± 0.92	28.23 ± 2.18*	33.15 ± 2.30
Adultos	31.88 ± 0.97	29.20 ± 1.71*	31.88 ± 1.79
<i>Masters</i>	32.50 ± 0.86	30.66 ± 2.23*	33.67 ± 1.81

Valores são Média ± Erro padrão da média. Adultos-Jovens (N = 9); Adultos (N = 10); Atletas *master* (N = 20). \* P<0.05 em comparação aos valores pré-exercício e 1 hora após o exercício, § P<0.05 em comparação aos valores pré-exercício e  $\delta$  P<0.05 em comparação aos valores pós-exercício.  $\partial$  P<0.05 em comparação aos demais grupos no Pre.

Nenhum dos indivíduos apresentou valores mais elevados do que o intervalo de referência para leucócitos, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em repouso. A estabilidade consistente do hematócrito e da hemoglobina pode ser utilizada como um índice de estado geral

de saúde antes e depois de competições (Banfi, Roi, Dolci, *et al.*, 2004). Este é um ponto de interesse, pois a estabilidade dos parâmetros hematológicos é também crucial para desportistas para manter o desempenho ideal (Banfi, Del Fabbro, Mauri, *et al.*, 2006).

O treino físico pode afetar parâmetros hematológicos como o hematócrito e as concentrações de hemoglobina e eritrócitos, em função do tempo (longos períodos de treino) ou também pela competição (Banfi, Lundby, Robach, *et al.*, 2011). O exercício extremo e outros fatores de stress estão associados com diminuições nas contagens de eritrócitos (Mairböurl, 2013); mudanças na conformação da hemoglobina pelo maior consumo de oxigénio e a produção de radicais livres (Gwozdziński, Pieniazek, Brzeszczynska, *et al.*, 2013); aumento da viscosidade do sangue que pode afetar desfavoravelmente o fluxo sanguíneo capilar e a entrega de oxigénio aos tecidos (El-Sayed, Ali & El-Sayed Ali, 2005). Nossos resultados apontam para que o treino ao longo da vida não teve essas consequências a longo prazo sobre os atletas, uma vez que as comparações em repouso foram similares entre os 3 grupos. As respostas dos atletas e controlos ao teste de esforço mostraram aumento do número de eritrócitos após o esforço (Tabela 4.2).

O sangue dos atletas de resistência é mais diluído do que de não atletas, o que tem sido explicado por uma expansão do volume plasmático devido ao treino, sendo que os valores mais baixos de Ht encontrados em atletas treinados são devido a um aumento no volume plasmático (El-Sayed, Ali & El-Sayed Ali, 2005). Sugeriu-se que hipervolemia e diluição do sangue pode ser vantajosa para a dissipação de calor e maior volume de ejeção cardíaca e batimentos cardíacos mais baixos durante o exercício (Brun, 2002). Em nosso estudo, não existiram diferenças entre o Ht dos atletas *master* e dos grupos controlo em repouso após correção do volume plasmático. Um estudo do nosso laboratório que também avaliou atletas, entretanto de mais jovens ( $22 \pm 4.2$  anos), também não encontrou diferenças entre os valores do Ht dos atletas ( $47.13 \pm 2.29\%$ ) e com os valores dos controlos ( $49.98 \pm 2.20\%$ ) (Borges, Rama, Pedreiro, *et al.*, 2012).

Leucocitose é a alteração hematológica mais consistente observada em resposta ao exercício exaustivo prolongado, e a magnitude da alteração do número de leucócitos circulantes é proporcional à intensidade e duração do exercício (Banfi, Del Fabbro, Mauri, *et al.*, 2006; Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014). Neste estudo o protocolo de esforço foi máximo para os 3 grupos e em todos se encontraram incrementos significativos de leucócitos após o

esforço (Tabela 4.3). Mudanças na contagem de leucócitos devem ser interpretadas com cautela, uma vez que podem refletir apenas a redistribuição de leucócitos dos tecidos para a circulação, possivelmente, para aumentar a vigilância imunológica ou devido ao trauma tecidual / lesão associada ao exercício extenuante prolongado (Scheer & Murray, 2011; Kratz, Wood, Siegel, *et al.*, 2006) e não necessariamente uma perturbação imunológica negativa (Krüger & Mooren, 2007). Há evidências bem sustentadas que o esforço máximo pode ter efeitos profundos sobre o número de leucócitos totais, talvez pelo aumento de catecolaminas decorrente do mesmo esforço (McCarthy, Macdonald, Grant, *et al.*, 1992). Este é o primeiro mecanismo que induz o recrutamento de leucócitos marginados e provavelmente o que explica seu aumento imediatamente pós-exercício.

Acompanhando o aumento dos leucócitos, pode-se também observar um aumento dos linfócitos no período Pós-Exercício para os grupos de atletas *master* e adultos ( $P < 0.05$ ). A resposta de linfócitos ao exercício intenso e de curta duração é bifásica. A mobilização inicial após o exercício (linfocitose) é seguida por uma redução do número de linfócitos circulantes (linfopenia) durante o período de recuperação do exercício. O aumento inicial de linfócitos do sangue é suposto refletir tanto a mobilização de células a partir do “*pool*” marginal quanto dos órgãos linfoides. No entanto, os mecanismos de linfopenia são incertos (Krüger & Mooren, 2014; Mooren, Lechtermann & Völker, 2004; Levada-Pires, Cury-Boaventura, Gorjão, *et al.*, 2009). Num estudo com adultos-jovens realizado em nosso laboratório que teve por objetivo mostrar a cinética das variáveis hematológicas e das citocinas em diferentes modos de exercício, todos de intensidade máxima (Minuzzi, Carvalho, Brunelli, *et al.*, 2016), a linfopenia foi observada 2 horas após o esforço. É provável que 1 hora após o exercício seja um tempo insuficiente para que a linfopenia seja observada em esforços de menor duração. A morte de linfócitos induzida pelo exercício é dependente da intensidade e provavelmente da duração do exercício envolvendo diferentes mecanismos em atletas (Levada-Pires, Cury-Boaventura, Gorjão, *et al.*, 2009). A sensibilidade dos linfócitos à apoptose parece estar relacionada com o estado de treino. Percentagens mais baixas de células apoptóticas em atletas altamente treinados foram encontradas quando comparadas com atletas treinados de um menor nível de aptidão (Mooren, Lechtermann & Völker, 2004). Por outro lado, a redistribuição substancial de células-T dentro de linfonodos e órgãos não linfoides, também explica a redução dos linfócitos após o exercício. Maiores detalhes sobre a mobilização dos linfócitos serão foco do Estudo 3.

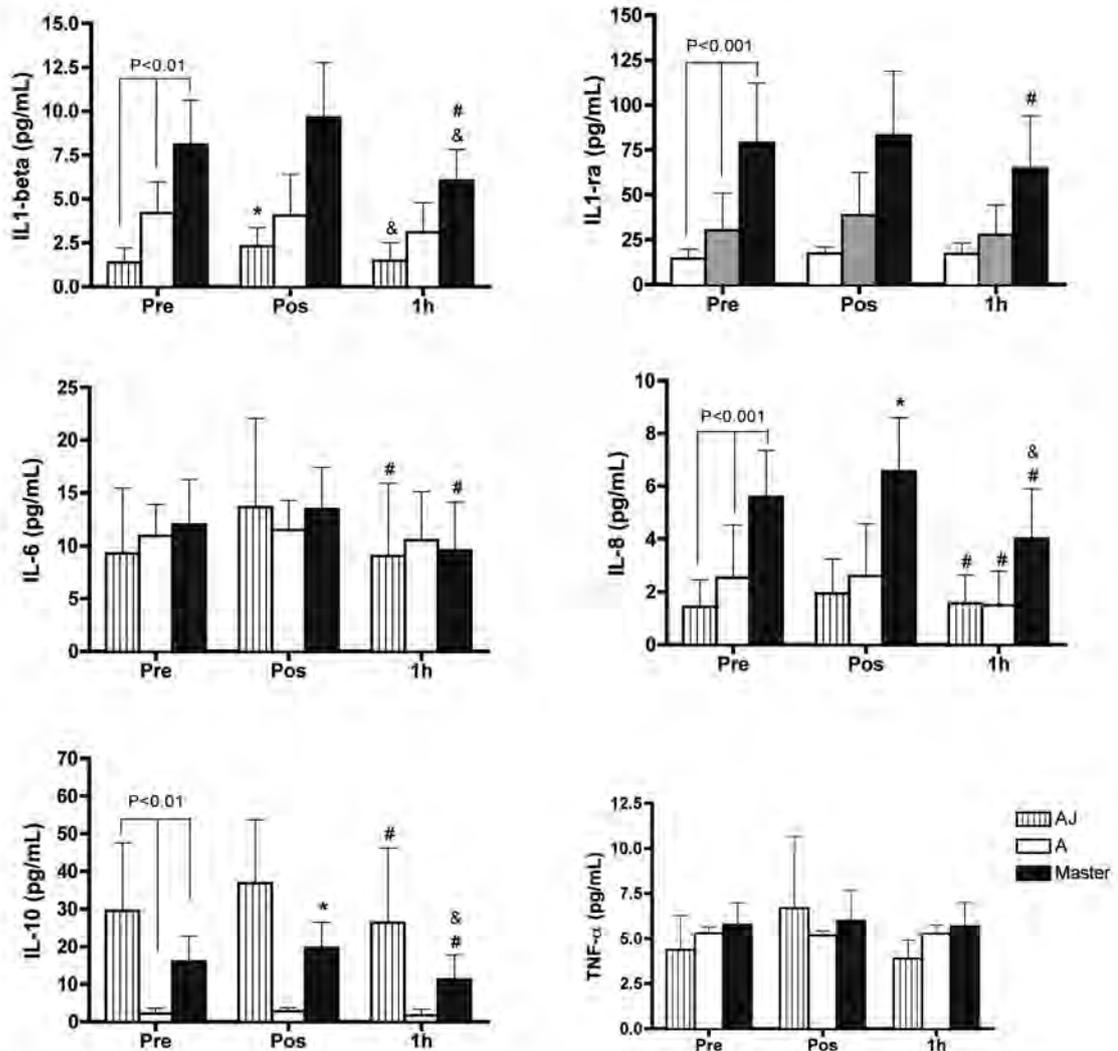
O aumento verificado na contagem de monócitos neste estudo para o grupo A e de granulócitos para os *masters* é consistente com uma resposta inflamatória ao exercício, provavelmente causada por lesão de tecido (Kratz, Lewandrowski, Siegel, *et al.*, 2002). A monocitose em resposta ao exercício agudo é transiente (2 horas aproximadamente) e representa um deslocamento dos monócitos marginados para a circulação (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011). Neste estudo, 1 hora pós-exercício os valores já estavam normalizados (Tabela 4.2). A redução vista nesse momento (1h) para o grupo de *masters* não é representativa pois ela não é diferente dos valores pré-exercício e sim em comparação ao maior valor observado no pós-exercício. Considera-se apenas um resultado estatístico e não de significância fisiológica. A compreensão dessas “perturbações” nos parâmetros hematológicos pode ser vista como uma otimização do desempenho. Após correção pelo volume plasmático, encontramos redução dos valores de HCM e CHCM para todos os grupos no momento Post. Enquanto, o aumento progressivo e significativo do HCM e CHCM provavelmente indica perda de água dos glóbulos vermelhos, ou hemoconcentração (Davidson, Robertson, Galea, *et al.*, 1987), valores mais baixos de CHCM indicam uma maior flexibilidade dos glóbulos vermelhos (Branth, Hambraeus, Piehl-Aulin, *et al.*, 2009), o que pode ser vantajoso no sentido de facilitar o fluxo sanguíneo e o suprimento de oxigênio para a contração muscular. MPV é um indicador da ativação de plaquetas, geralmente utilizado em contextos clínicos (por exemplo, o risco de trombose em pacientes pré-hipertensos) (Yazici, Kaya, Kaya, *et al.*, 2009). A tensão mecânica direta sobre as plaquetas circulantes pode contribuir para esta ativação (Hanke, Staib, Görlinger, *et al.*, 2010). Com os valores de MPV corrigidos pelo volume plasmático, observamos uma redução no período Pós-exercício para todos os grupos. Este é um resultado interessante, pois podemos entender que a prática continuada do exercício pode reduzir um importante fator de risco trombótico.

Em geral, os resultados sugerem que o estado imunológico foi mantido, embora a avaliação de outros indicadores de produção de glóbulos vermelhos (ou seja, variáveis de reticulócitos) pudesse ter fornecido uma visão mais abrangente (Fallon, Sivyver, Sivyver, *et al.*, 1999). Olhando para as diferenças observadas entre os atletas *master* e sedentários, não foi detetado exposição dos indivíduos para qualquer risco clínico. Do contrário, notou-se uma impressionante adaptação dos atletas e manutenção de sua capacidade aeróbia.

## 4.4.2 Citocinas

### 4.4.1.1 Estudo transversal

A Figura 4.3 mostra os resultados para as citocinas IL-1ra, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ .



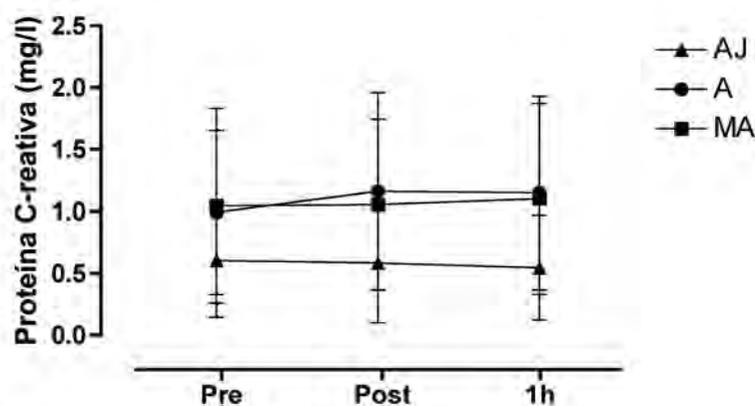
**Figura 4.3: Níveis das citocinas IL-1ra e IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 e TNF- $\alpha$  no plasma em resposta ao protocolo de exercício máximo no cicloergómetro.**

Os valores são média  $\pm$  DP. \* P < 0.05 em comparação com pré e pós-exercício; # P < 0.05 em relação ao Post. & P < 0.05 em comparação com Pre. Adulto-jovens (N = 9); Adulto (N = 10); Atletas *master* (N

= 20). Abreviaturas: Pre (antes), Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). AJ, Adultos-jovens; A, Adultos; AM, Atletas *master*.

Como mostra a Figura 4.3 nenhum efeito da idade, treino ou interação idade-treino estava presente para IL-6 e TNF- $\alpha$ . Houve efeito significativo da idade e do treino nas citocinas IL-1ra, IL-1 $\beta$  e IL-8; os atletas *master* apresentaram maior concentração da citocina anti-inflamatória IL-1ra e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-8 em comparação com os adultos-jovens e adultos ( $P < 0.01$ ; Figura 4.3). Para a IL-10 nenhum efeito da idade, treino ou interação idade-treino foi observado. No entanto, a concentração de IL-10 foi mais baixa no grupo de adultos em comparação com o grupo de atletas *master* ( $P < 0.01$ ; Figura 4.3); e a concentração plasmática de IL-10 foi mais baixa no grupo de atletas em comparação com o grupo de adultos-jovens ( $P < 0.01$ ; Figura 4.3).

Os níveis de CRP não apresentaram diferenças significativas entre os 3 grupos em repouso (AJ =  $0.57 \pm 0.48$ ; A =  $0.98 \pm 0.70$ ; AM =  $1.035 \pm 0.75$ ) e após o teste (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Níveis séricos de proteína C-reativa em resposta ao protocolo de exercício máximo em cicloergómetro.

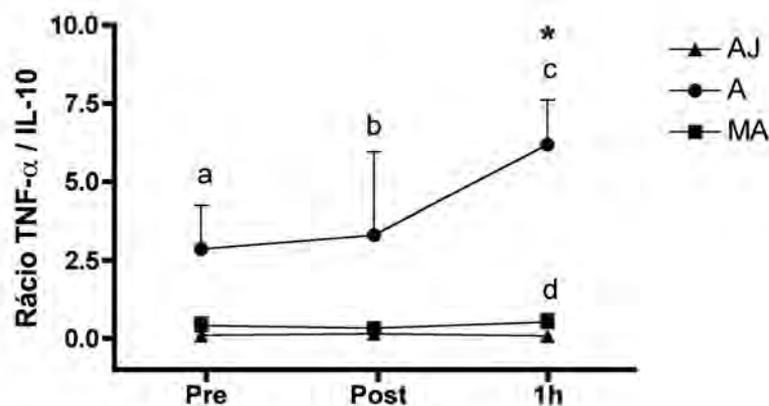
Os valores são Média  $\pm$  DP. Os níveis de PCR foram indetetáveis para 01 participante do grupo AJ ( $N = 8$ ), 01 participante do grupo A ( $N = 9$ ) e 05 participantes do grupo de atletas *master* ( $N = 15$ ). Abreviaturas: Pre (antes), Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). AJ, Adultos-jovens; A, Adultos; AM, Atletas *master*.

#### 4.4.1.1 Estudo agudo

Os efeitos do exercício agudo sobre os níveis de citocinas foram diferentes em relação aos grupos analisados (Figura 4.3). Apenas se observaram efeitos do exercício agudo (Post) para IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) no grupo AJ. O maior número de mudanças ocorreu 1 h após o exercício (1h). Nomeadamente, IL-6, IL-8 e IL-10 diminuíram em comparação com Post, 1 h após o término do exercício no grupo de jovens ( $P < 0.05$ ; Figura 4.3). Esta é uma resposta semelhante que também observada no grupo de atletas *master* ( $P < 0.05$ ; Figura 4.3). Além disso, as concentrações plasmáticas de IL-6, IL-8 e IL-10 também diminuíram em comparação com os valores Pré-exercício no grupo de atletas *master* ( $P < 0.01$ ; Figura 4.3). A única alteração em resposta ao exercício observada no grupo A foi uma diminuição nos níveis de IL-8 em 1 h quando comparado com o Post ( $P < 0.05$ ; Figura 4.3). Nenhum efeito agudo foi observado para CRP no Post e na recuperação (1h) em todos os grupos (ver Figura 4.4). Para a IL-10, todos os sujeitos responderam ao teste de exercício da mesma maneira; no entanto, o nível de IL-10 foi mais baixo no grupo de adultos em comparação com o grupo de *masters* em todos os pontos de tempo ( $P < 0.05$ ; Figura 4.3).

Para avaliar o balanço inflamatório (Lira, Rosa, Zanchi, *et al.*, 2009) foi calculado o rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 (Figura 4.5). O rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 foi maior em todos os pontos medidos para o grupo A, quando comparado com os atletas *master* (Pre,  $P < 0.001$ ; Post,  $P < 0.001$ ; 1h,  $P < 0.001$ ) e com o grupo AJ (Pre,  $P < 0.001$ ; Post,  $P < 0.01$ ; 1h,  $P < 0.001$ ). O rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 também aumentou em resposta ao exercício no grupo de adultos-velhos em 1h (Figura 4.5). O tempo de duração do protocolo de esforço foi correlacionado com as concentrações de IL-10 e IL-1 $\beta$  ( $r = 0.470$ ,  $P = 0.006$ ;  $r = 0.436$ ,  $P = 0.042$ , respetivamente). A idade teve o maior efeito (38%,  $P < 0.001$ ) nas diferenças da IL-10, com os valores mais baixos observados no grupo de adultos. O treino ao longo da vida contou por 27% na variação ( $P < 0.01$ ) e a interação idade\*treino contribuiu para 32% ( $P < 0.001$ ) das diferenças da IL-10 entre os grupos.

Para o rácio TNF/IL-10, a idade contribuiu para 50% da variação, com o grupo AJ apresentando o maior valor médio. A interação idade\*treino foi apontada por 60% da variação, com os atletas *master* e os adultos-jovens apresentando valores similares e mais baixos em relação ao grupo de adultos (Figura 4.5).



**Figura 4.5: Rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 em resposta ao protocolo de exercício máximo em cicloergómetro.**

Os valores são média  $\pm$  DP. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram indetetáveis para 04 participantes no grupo AJ (N = 5), 02 participantes no grupo A (N = 8) e 05 participantes no grupo de AM (N = 15). Diferenças estatisticamente significativas indicadas por \* (P<0.05) em comparação com pré e pós-exercício; a (P<0.05) em comparação com *masters* e grupos de jovens em Pre. b (P <0.05) em comparação com AM e grupos de AJ em Post. c (P<0.05) em comparação com AM e grupos de AJ em 1h. d (P<0.05) entre A e grupo AJ em 1h. Abreviaturas: Pre (antes), Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). AJ: adultos-jovens; A: adultos; AM: atletas *master*.

Quanto ao balanço das citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , a diferença média das concentrações de IL-1 $\alpha$  comparado a IL-1 $\beta$  em repouso foi de 10 vezes para os atletas (~79 pg/mL vs. ~8 pg/mL) e grupo de adultos-jovens (~14 pg/mL vs. ~1.4 pg/mL), e de aproximadamente 7 vezes para o grupo de adultos (~30 pg/mL vs. ~4 pg/mL). Os nossos resultados também mostraram que os níveis de IL-10 e IL-1 $\beta$  pós-exercício correlacionam-se com a duração do exercício de alta-intensidade (r = 0.470, P = 0.006; r = 0.436, P = 0.042; respetivamente).

#### 4.4.1.3 Discussão da resposta das citocinas plasmáticas ao exercício

No presente estudo, os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias foram diferentes em relação ao treino e idade. Em repouso, os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 $\beta$  e da citocina anti-inflamatória IL-1 $\alpha$  foram maiores nos grupos AM e A em comparação com o grupo AJ. As concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  no plasma não foram significativamente

diferentes entre os indivíduos adultos-jovens e adultos (grupos AM e A). Como encontrado por outros (de Gonzalo-Calvo, Fernández-García, de Luxán-Delgado, *et al.*, 2012), os níveis de IL-6 não foram associados com o envelhecimento. Isso pode refletir o papel predominante do estado de saúde sobre a idade cronológica desses indivíduos (Della Gatta, Garnham, Peake, *et al.*, 2014). Por outro lado, os nossos resultados dos atletas *master* mostraram que o treino ao longo da vida tem um efeito mais forte do que o envelhecimento sobre a IL-1 $\beta$ , IL-8 e os níveis de IL-1ra.

O treino aeróbico regular pode desempenhar um importante papel na redução de alguns marcadores de inflamação sistêmica, e na regulação metabólica de certos parâmetros fisiológicos do músculo com o envelhecimento (Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013; Nieman, Henson, Smith, *et al.*, 2001). Em particular, a IL-6 pode ativar cascatas de sinalização molecular que levam a uma resposta inflamatória mediada pela via IKK/NF $\kappa$ B. IL-6 desencadeia a ativação do complexo enzimático IKK e, posteriormente, a translocação do complexo proteico NF $\kappa$ B para o núcleo. Isto resulta na transcrição de genes-alvo da reação inflamatória imune, incluindo as citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-15. No entanto, o aumento transitório nos níveis de IL-6 parece ser também responsável pela produção de mediadores anti-inflamatórios tal como a IL-10, IL-1ra e cortisol (Sallam & Laher, 2016). Além disso, os níveis elevados de IL-6 produzidos pelo músculo esquelético estimulam uma cascata de sinalização anti-inflamatória que inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , suprimem a secreção de PCR (um marcador geral e não específico para a inflamação sistêmica) a partir de fígado (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011), *down-regulam* a expressão de TLR de monócitos em ambos mRNA e proteínas de superfície celular, e, finalmente, inibem a via IKK/NF $\kappa$ B (Rodriguez-Miguel, Fernandez-Gonzalo, Almar, *et al.*, 2014; Röhlíng, Herder, Stemper, *et al.*, 2016). Uma diminuição da concentração plasmática de IL-6 em resposta ao exercício crônico parece caracterizar uma adaptação normal do treino (Fischer, 2006). Além disso, outros estudos tem demonstrado que exercícios agudos bem como exercícios crônicos podem reduzir a ativação desta via de sinalização inflamatória (para revisão ver Röhlíng, Herder, Stemper, *et al.*, 2016). Os nossos resultados não mostraram valores mais baixos de IL-6 para atletas *master* (~12 pg/mL), indo ao encontro com estes estudos anteriores. Níveis elevados de IL-1 $\beta$  foram observados para os atletas *master* quando comparado com os grupos AJ e A. IL-1 $\beta$  é a primeira de duas citocinas na cascata inflamatória, sendo o TNF- $\alpha$  a segunda delas. Níveis elevados de IL-1 $\beta$  são esperados após lesão muscular e alguns estudos têm

mostrado que o exercício pode promover o aumento de IL-1 $\beta$  (Gagnon, Gagnon, Rintamäki, *et al.*, 2014). Seu aumento parece ser compensado pelo aumento da secreção de IL-1ra que inibe as ações pró-inflamatórias da IL-1 $\beta$ . Também foram observados valores mais altos de IL-1ra nos atletas *master* em comparação com indivíduos adultos-jovens e adultos no momento Pre. Em particular, IL-1ra impede os processos inflamatórios, bloqueando a transdução do sinal da citocina pró-inflamatória IL-1 e cria também um equilíbrio anti-inflamatório para a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). O equilíbrio entre a IL-1 e IL-1ra nos tecidos locais influencia a possibilidade de desenvolvimento de doença inflamatória e dano estrutural resultante. IL-1ra deve ser produzida abundantemente para bloquear os efeitos de IL-1. Propõe-se que níveis de IL-1ra sejam 100 vezes maiores ou mais em relação a IL-1 para inibir os efeitos biológicos da IL-1 nas células-alvo (Arend, 2002). Em nosso estudo, o equilíbrio entre a IL-1 $\beta$  e os níveis de IL-1ra observados no início do estudo foram a nível de 10 vezes mais IL-1ra em comparação a IL-1 $\beta$  para os atletas *master* e jovens e aproximadamente a nível de 7 vezes maior para o grupo de adultos. Isto sugere que o treino mais do que idade pode regular o equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias.

O envelhecimento, contudo, parece ter um efeito mais pronunciado sobre a secreção de IL-10, sendo que os indivíduos adultos apresentaram concentrações muito baixas quando comparadas com adultos-jovens e atletas *master*. A IL-10 tem um papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes (Fujio, Okamura & Yamamoto, 2010). A secreção de IL-10 induzida pelo exercício também tem sido associada com um aumento do número de células T regulatórias na corrente sanguínea (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). Handzlik e coautores mostraram que o treino de alta intensidade está associado com contagens de Tregs maiores em repouso e de maior produção de IL-10 após estimulação antigénica (Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013). Os resultados do Estudo 2 corroboraram esta afirmação, mostrando que atletas *master* mantêm o número e função das Tregs e apresentam elevada expressão génica de IL-10 como resposta adaptativa ao exercício (resultados discutidos no estudo 2).

Encontrámos que os níveis de IL-10 e IL-1 $\beta$  pós-exercício correlacionam-se com a duração do exercício de alta-intensidade. Como mencionado anteriormente, IL-1 aumenta em resposta a lesão muscular, e os nossos resultados sugerem que o aumento da duração do teste poderia aumentar o dano muscular e, conseqüentemente, a produção de IL-1 $\beta$ . A duração do teste progressivo foi semelhante nos *masters* e indivíduos jovens (~ 17min), porém mais

elevada quando comparado com a dos indivíduos mais velhos (~ 10 min). No entanto, o aumento da secreção de IL-1 $\beta$  após o exercício foi apenas observado para o grupo de jovens (Figura 4.3). Isso novamente reflete a adaptação ao exercício pelos atletas *master*.

O rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 é um bom indicador do estado inflamatório dos indivíduos e pode ser utilizado como um índice inflamatório. De importância, encontramos mudanças no rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 apenas para o grupo de adultos no momento 1h. Este achado, juntamente com o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  para este grupo neste momento de medida, indicam uma resposta pró-inflamatória ao exercício sofrida pelos adultos, mas que não foi observada nos grupos de atletas *master* e adultos-jovens. Embora um tanto inesperado, a falta de outras diferenças estatisticamente significativas nas citocinas pró e anti-inflamatórias antes e após o exercício agudo não é exclusivo do nosso estudo. Numa revisão bem concebida, Peake e coautores relacionaram os efeitos do exercício com a expressão e produção de citocinas. O exercício agudo estimula aumentos mais significativos em IL-6, IL-8, IL-10, IL-1ra, fator estimulante de colónias de granulócitos (G-CSF) e aumentos mais modestos em TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ , BDNF, IL-12p35/p40 e IL-15 (Peake, Della Gatta, Suzuki, *et al.*, 2015). Muitas destas citocinas são expressas no músculo esquelético, mas nem todos são libertados a partir do músculo esquelético para a circulação durante o exercício. Por outro lado, algumas citocinas que estão presentes na circulação não estão expressas no músculo esquelético após o exercício físico. Além disso, os leucócitos são provavelmente apenas uma fonte menor de citocinas circulantes após o exercício (Peake, Della Gatta, Suzuki, *et al.*, 2015).

#### 4.5 CONCLUSÃO

Em geral, os nossos dados sugerem que a função imunológica foi geralmente mantida em todos os grupos estudados. No entanto, as adaptações ao exercício mais relevantes encontradas nos atletas *master* foi a manutenção da sua capacidade aeróbica e um estado anti-inflamatório semelhante ao observado nos adultos-jovens saudáveis. O envelhecimento teve os efeitos mais pronunciados nos níveis da IL-10 e rácio TNF- $\alpha$ /IL-10. Portanto, o treino ao longo da vida não parece ter efeitos deletérios no equilíbrio das citocinas pró e anti-inflamatórias e foi capaz de reverter parcialmente os efeitos pró-inflamatórios do envelhecimento.

## 5. ESTUDO 2: A INFLUÊNCIA DO TREINO AO LONGO DA VIDA SOBRE A ATIVAÇÃO, SENESCÊNCIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CÉLULAS T REGULADORAS.

### Resumo:

**Objetivo:** o objetivo deste estudo foi quantificar e caracterizar funcionalmente células T reguladoras do sangue periférico, bem como a expressão de um marcador de senescência (KLRG1), de atletas *master* em repouso e após um teste de exercício exaustivo.

**Métodos:** dezoito atletas *master* que participam regularmente em treino e competições por mais de 20 anos e um grupo controle, de 10 indivíduos pareados por idade, que nunca participaram de treino físico regular foram voluntários para este estudo. Todos os indivíduos realizaram um teste incremental até a exaustão num cicloergômetro. As amostras de sangue foram obtidas antes (Pre), 10 min pós-exercício (Post) e 1 h pós-exercício (1h).

**Resultados:** Não houve efeito significativo do exercício agudo sobre a percentagem de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup> dentro da população total de linfócitos em ambos os grupos. Ao contrário, o exercício agudo induziu um aumento significativo no número absoluto de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup> em Post ( $0.049 \pm 0.021$ ;  $0.056 \pm 0.024$ ,  $P = 0.029$  para *masters*;  $0.048 \pm 0.017$ ;  $0.058 \pm 0.020$ ,  $P = 0.037$  para o controle) em ambos os grupos. A expressão de mRNA para FoxP3, IL-10 e TGF- $\beta$  das Tregs purificadas foi semelhante ao longo dos ensaios em ambos os grupos. Entretanto, atletas *master* apresentaram uma maior percentagem de indivíduos que expressam FoxP3 (22%,  $P = 0.038$ ), TGF- $\beta$  (44%,  $P = 0.002$ ) após o exercício e maior concentração plasmática de IL-10 ( $P = 0.001$ ,  $ES = 2.57$ ) em todos os pontos temporais analisadas. A % de KLRG1 nas Tregs não foi alterada.

**Conclusão:** Os resultados mostraram que os atletas *master* têm elevados níveis de marcadores anti-inflamatórios e são capazes de manter o número e função das células T reguladoras como resposta adaptativa ao exercício.

**Palavras-chave:** células T reguladoras; atletas *master*; envelhecimento; FoxP3; TGF- $\beta$ ; IL-10.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O exercício extenuante é usualmente associado com um aumento dos sintomas de ITRS em atletas (Nieman, Johanssen & Lee, 1989; Gleeson, Bishop, Oliveira, *et al.*, 2012) e o exercício de elevado volume pode ter um efeito imunossupressor (Gleeson, 2007). Sabe-se que os mecanismos imunológicos que fundamentam este aparente aumento da suscetibilidade a infecção em atletas são, provavelmente, multifatoriais e incluem perturbações do compartimento de células T (Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015; Cosgrove, Galloway, Neal, *et al.*, 2012; Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014).

As Tregs são cruciais na manutenção da tolerância imunológica e no controlo negativo de respostas imunes patológicas (de Moura Braz, de Melo, da Glória Aureliano de Melo Cavalca, *et al.*, 2014; Fehérvári & Sakaguchi, 2004). As Tregs tem a capacidade de suprimir a ativação, proliferação e as funções efectoras de uma vasta gama de células imunitárias, incluindo as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as células NK, as células B e APCs (Sakaguchi, Miyara, Costantino, *et al.*, 2010; Littwitz-Salomon, Akhmetzyanova, Vallet, *et al.*, 2015), estas células podem suprimir as células T efectoras por mecanismos que incluem a competição direta com moléculas coestimulatórias expressas nas APCs ou através da redução dos níveis de fatores de crescimento essenciais, tais como a IL-2 (Schmidt, Oberle & Krammer, 2012). Além disso, as Tregs secretam IL-10 e TGF- $\beta$  como mecanismos adicionais para suprimir a atividade das células-alvo (Corthay, 2009). Além de expressarem a cadeia  $\alpha$  do recetor da IL-2 (CD25), as Tregs também expressam FoxP3, um gene de controlo que é a chave para o seu desenvolvimento e função (Campbell & Ziegler, 2007). O TGF- $\beta$  desencadeia a expressão de Foxp3 em precursores das Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) e em conjunto com a IL-2, é um regulador chave das vias de sinalização que mantêm a expressão de FoxP3 e a função supressora nas Tregs (Perry, Pick, Bdolach, *et al.*, 2013; Fu, Zhang, Yopp, *et al.*, 2004).

Tregs possuem um papel central na homeostasia do sistema imune, por isso, qualquer perda da função das Tregs, em função da idade, contribuiria para uma atividade imune exacerbada e distúrbios autoimunes, já observados em seres humanos idosos com síndrome inflamatória crónica. Por outro lado, o aumento relacionado com a idade no número de Tregs poderia estar relacionado com o risco aumentado de infeções e doenças malignas entre os idosos

(Fessler, Ficjan, Duftner, *et al.*, 2013). É necessário dizer que, esta expansão da população de Tregs só pode ser considerada fisiologicamente relevante se a função supressora das Tregs permanecer intacta. Com efeito, a produção de IL-10 e a expressão de FoxP3 pelas Tregs mostrou-se preservada com o envelhecimento (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014).

Embora o KLRG1 sirva como um marcador para a senescência, a sinalização através de KLRG1 poderia resultar numa função alterada e senescência das Tregs (Tauro, Nguyen, Li, *et al.*, 2013). Na verdade, as Tregs KLRG1<sup>+</sup> apresentaram-se um pouco mais eficientes do que as Tregs KLRG1<sup>-</sup> na supressão da proliferação de células T naïve *in vitro* (Beyersdorf, Ding, Tietze, *et al.*, 2007).

O impacto do exercício sobre o sistema imunitário tem sido extensivamente estudado e revisto em vários pontos desta tese. No entanto, a maioria dos estudos investiga os efeitos agudos do exercício e há poucas pesquisas relacionadas com os efeitos crónicos ou estudos de base longitudinais em relação às Tregs. As evidências sugerem que as Tregs aumentam em número na sequência de uma sessão aguda de exercício extenuante em humanos (Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013). Além disso, existe evidência de uma associação entre a carga de treino elevada e o aumento da produção de IL-10 estimulada por antígenos *in vitro*, com concomitante aumento do número de Tregs na circulação, suportando a hipótese de que as Tregs exercem seus efeitos inibitórios através de aumentos da produção de IL-10 em indivíduos altamente ativos fisicamente, e isso pode desempenhar um papel importante na modificação do risco de infecção respiratória (Gleeson & Walsh, 2012; Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013). Assim, o estudo de atletas *master* oferece uma oportunidade para investigar os efeitos do treino de longo prazo sobre as respostas das Tregs ao envelhecimento em si, e também a influência que estas adaptações teriam sobre as respostas de exercícios agudos em comparação ao envelhecimento sem treino. Portanto, o objetivo deste estudo foi quantificar e caracterizar funcionalmente as Tregs do sangue periférico, bem como a expressão de um marcador de senescência, KLRG1, em atletas *master* antes e após um teste progressivo até a exaustão. Para que isso fosse possível, procurou-se:

- Analisar o comportamento da contagem das células do sangue periférico e da concentração de IL-10 plasmática em função de um teste progressivo máximo em cicloergómetro.

- Identificar as células T reguladoras e suas subpopulações naïve (CD45RA<sup>+</sup>) e memória (CD45RA<sup>-</sup>) em atletas *master* e comparar com um grupo controlo pareado com a idade, antes e após a realização do protocolo de esforço.
- Determinar a % de Tregs a expressar o marcador de senescência KLRG1 no grupo de atletas *master* e controlo.
- Determinar a expressão génica de FoxP3, IL-10 e TGF- $\beta$  nas Tregs purificadas.

## 5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

### 5.2.1 Sujeitos

Para este estudo, 19 atletas *master* (nadadores, judo, atletismo) que haviam participado de treinos regulares e competições por mais de 20 anos ao longo da vida foram incluídos neste estudo. Um atleta (género masculino) foi excluído da amostra. O estudo também incluiu um grupo controlo, pareado por idade, de 10 indivíduos saudáveis e sedentários (Tabela 5.1). Os atletas e o grupo controlo foram avaliados em sua totalidade não sendo portanto apresentadas comparações entre géneros.

Tabela 5.1. Características dos participantes.

	Controlo	Atletas <i>master</i>
Idade (anos)	54.2 $\pm$ 5.94	53.2 $\pm$ 9.08
Estatuta (cm)	168.6 $\pm$ 8.53	170.4 $\pm$ 5.29
Massa corporal (kg)	70.4 $\pm$ 12.93	74.9 $\pm$ 15.55
IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	24.3 $\pm$ 3.23	25.3 $\pm$ 7.11
% G (%)	21.4 $\pm$ 11.12	26.0 $\pm$ 7.55
MLG (kg)	58.8 $\pm$ 6.94	54.6 $\pm$ 12.10

Valores são Média  $\pm$  (SD). Controlo (N = 10), Atletas *master* (N = 19). Abreviaturas: IMC= Índice de Massa Corporal; %G = Percentagem de gordura; MLG = Massa livre de gordura.

### **5.2.2 Desenho experimental**

Os participantes chegaram ao laboratório às 09:00. Após 10 minutos de descanso na posição sentada, foi feita coleta de sangue venoso para 3 tubos *Vacutainer* com K3EDTA (Becton-Dickinson, Oxford, Reino Unido). Depois os participantes realizaram um protocolo de esforço máximo em cicloergômetro e mais duas amostras de sangue de 15 ml foram coletadas (10 min e 1h após a conclusão de exercício). Todos os detalhes dos procedimentos podem ser vistos no Capítulo 3.

### **5.2.3 Parâmetros hematológicos e citocinas analisadas**

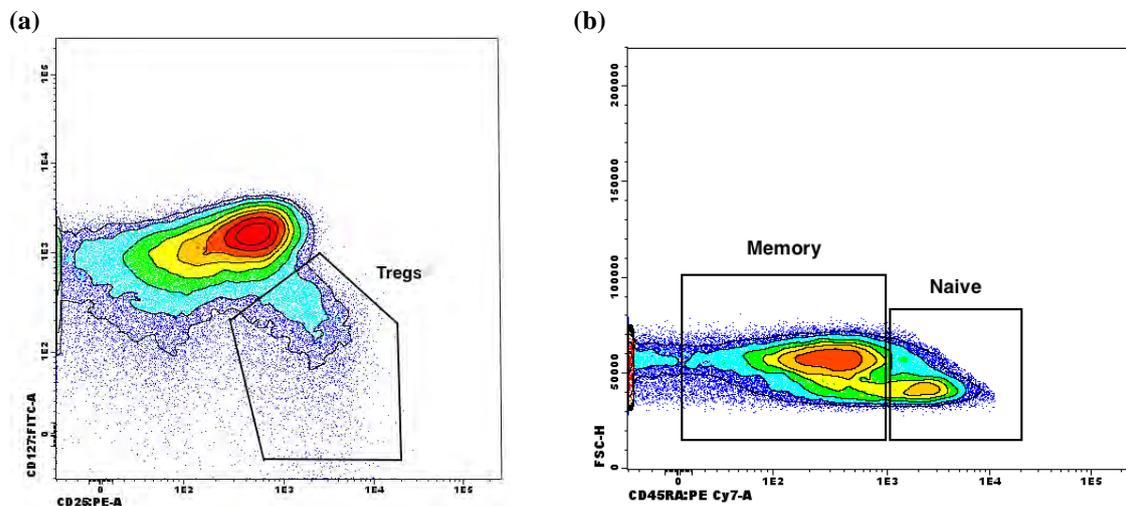
Imediatamente após a coleta do sangue, as contagens de: leucócitos totais, linfócitos, monócitos e granulócitos foram determinadas utilizando um contador de células automatizado (Coulter ACT Diff, Beckman Coulter, EUA). A concentração plasmática de IL-10 foi avaliada utilizando um kit de ELISA disponível comercialmente, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, CA).

### **5.2.4 Citometria de fluxo**

Os estudos de imunofenotipagem no sangue periférico foram realizados utilizando um conjunto de oito anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos, sendo as amostras adquiridas no citômetro FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). Em 200 µl de sangue periférico foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais (mAB) conjugados com os fluorocromos (definidos entre parênteses): 1,5 µl de CD3-PB (Pacific azul, clone UCHT1, Pharmingen, San Diego, CA EUA), 2,5 µl de CD4-APC-H7 (aloficocianina-hilite 7, Clone 13B8.2, Beckman Coulter, Miami, FL, EUA), 10 µl de CD25-PE (ficoeritrina, clone 2A3, BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), 10 µl de CD127-FITC (isotiocianato de fluoresceína anti-humano, clone R.34.34, Beckman Coulter), 2,5 µl de CD27-PECy5

(ficoeritrina-cianina 5, clone R.8.01, Beckman Coulter), 2,5 µl de CD45RA-PECy7 anti-humano (ficoeritrina-cianina 7, clone L48, BD Bioscience) e 1,5 µl de KLRG1-APC (aloficocianina, Clone 2F1 / KLRG1, BioLegend, San Diego, CA).

Os linfócitos T foram identificados de acordo com sua positividade para CD3. As Tregs foram definidas com base no seguinte fenótipo:  $CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$  e subdivididas em naíve ( $CD45RA^+$ ) e memória ( $CD45RA^-$ ). As Tregs senescentes foram detetadas com base na expressão de  $KLRG1^+$ . Um exemplo modelo esquemático da estratégia utilizada para definir as diferentes populações de células estudadas está na figura 5.1.



**Figura 5.1: Identificação de Tregs via citometria de fluxo.**

a) CD127 versus CD25 que identifica células  $CD3^+CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$  (Tregs). b) FSC-H versus CD45RA que identifica Tregs naíve ( $CD45RA^+$ ) e memória ( $CD45RA^-$ ). Tregs = células T reguladoras.

### 5.2.5 Purificação celular e análise do mRNA em células Treg purificadas

Após a purificação das células Treg  $CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$  por FACSAria II (BD) de acordo com o seu fenótipo típico, o conteúdo das células purificadas foi transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 ml e centrifugado durante 5 min a 300 g e o sedimento foi ressuspendido em 350 µL de tampão de lise RLT (Qiagen, Hilden, Alemanha). O ARN total foi extraído com o RNeasy Micro Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Ver seção de metodologias para detalhes.

### 5.2.6 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Comparações entre os grupos foram avaliadas pelo teste de *Mann-Whitney*. Mudanças sequenciais do exercício agudo foram avaliados por análise de medidas repetidas de variância para dados (ANOVA) com distribuição normal. Quando os dados não tinham distribuição normal, um teste de *Friedman* com o teste *post hoc* de *Dunn* foi realizado para avaliar as diferenças estatísticas no tempo. A significância foi aceita em  $P < 0.05$ .

A correlação entre os subgrupos da população de células e a idade foram avaliadas de acordo com o coeficiente de correlação de *Spearman*. A percentagem de diferenças foi testada usando tabulação cruzada e teste qui-quadrado. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 23.0 (SPSS, Chicago, IL). Para relatar a força da intervenção de exercício ou a magnitude do efeito da condição (atletas *master* vs. controlo) o tamanho do efeito de *Cohen* (ES) foi calculado e foi categorizada pela convenção:  $d = 0.2$  pequeno efeito;  $d = 0.5$  efeito médio;  $d = 0.8$  ou mais, grande efeito, utilizando G \* Power Versão 3.1.9.2.

## 5.3 RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significativas na proporção (%) de Tregs  $CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$  quer dentro da população total de linfócitos nem na população de células T  $CD4^+$ , entre os dois grupos estudados, no momento Pre (Tabela 5.3,  $P = 0,890$ ). A frequência das subpopulações de Tregs naïve ( $CD45RA^+$ ) e memória ( $CD45RA^-$ ) também foi semelhante nos dois grupos (Tabela 5.3).

Não houve efeito significativo do exercício agudo sobre a proporção de Tregs  $CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$  na proporção total de linfócitos e células T  $CD4^+$  (Tabela 5.3). Contudo, o exercício agudo induziu um aumento significativo no número de Tregs em Post tanto no grupo dos atletas *master* como no grupo controlo (Tabela 5.3,  $P = 0.034$ , ES = 0.31 para *masters*;  $P = 0.033$ , ES = 0.53 para o controlo). Os respetivos valores retornaram para os valores similares ao pré-exercício em 1h (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Frequência (nos linfócitos totais ou dentro das células T CD4<sup>+</sup>) e contagens absolutas (x10<sup>3</sup>/mL) de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup>, em resposta ao exercício agudo.

Células T reguladoras	Pre	Post	1h
<i>%Total Ly</i>			
Controlo	0.69 ± 0.25	0.63 ± 0.20	0.65 ± 0.27
<i>Masters</i>	0.68 ± 0.23	0.61 ± 0.23	0.58 ± 0.25
<i>% LyT CD4</i>			
Controlo	6.13 ± 1.36	5.72 ± 1.22	6.40 ± 1.80
<i>Masters</i>	6.80 ± 1.43	6.44 ± 1.42	7.43 ± 0.91
<i>Valores absolutos (contagem)</i>			
Controlo	0.048 ± 0.017	0.058 ± 0.020*	0.042 ± 0.025
<i>Masters</i>	0.049 ± 0.021	0.056 ± 0.024*	0.044 ± 0.023
<i>Tregs Naive (% of Tregs)</i>			
Controlo	11.50 ± 4.91	15.20 ± 8.72	10.17 ± 4.55
<i>Masters</i>	14.37 ± 7.05	14.15 ± 6.74	11.96 ± 6.11
<i>Tregs Memória (% of Tregs)</i>			
Controlo	88.49 ± 4.91	84.79 ± 8.72	89.82 ± 4.55
<i>Masters</i>	85.62 ± 7.05	85.84 ± 6.74	87.83 ± 6.02

Valores são Média ± SD. Controlo (N = 10), Atletas *master* (N = 19). Pre (antes), Post (10 min pós-exercício), 1h (1 h pós-exercício). \* P<0.05 Post comparado ao Pre.

A expressão do mRNA das moléculas FoxP3 e TGF-β foi semelhante em todas as medições em ambos os grupos. De modo semelhante, a expressão mRNA da IL-10 não foi alterada em resposta ao exercício (Figura 5.1).

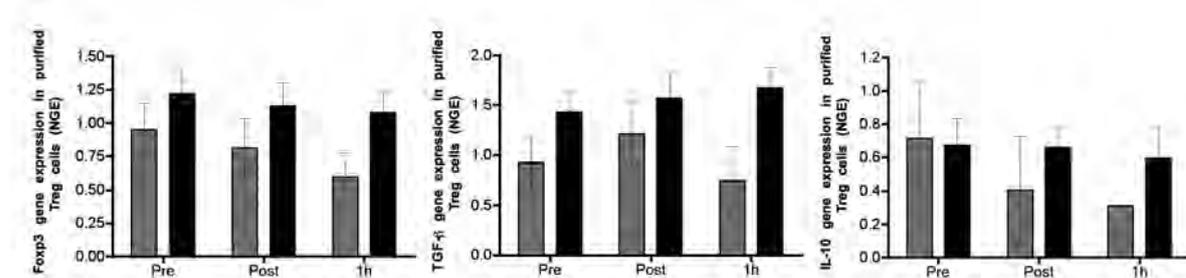


Figura 5.1. Efeito do exercício agudo sobre expressão dos genes FoxP3, TGF-β e IL-10 em Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup> purificadas.

Os dados são apresentados como média ± SD. Para o cálculo da média somente foram incluídos os valores de NGE dos casos expressos (FoxP3, Pre = 9 controlos e 17 *masters*; Post = 7 controlos e 18 *masters*; 1h = 5 controlos e 16 *masters*. TGF-β, Pre = 6 controlos e 18 *masters*; Post = 5 controlos e 18 *masters*; 1h = 3 controlos e 18 *masters*. IL-10, Pre = 2 controlos e 11 *masters*; Post = 5 controlos e 12 *masters*; 1h = 2 controlos e 9 *masters*. Abreviaturas: Pre (antes), Post (10 min pós-exercício), 1h (1 h pós-exercício); Tregs: T reguladoras; NGE: Expressão génica normalizada.

Interessantemente, a porcentagem de casos em que a expressão do mRNA da IL-10 foi detetada, permaneceu inalterada no grupo de *masters* (Pre = 61.1%; Post = 66.7% e 1h = 50% de todos os sujeitos), enquanto no grupo controle, houve uma tendência para um menor número de casos que expressam mRNA para IL-10 (Pre = 22.2%; Post = 55.6% e 1h = 22.2%) (Tabela 5.4). Para FoxP3 e TGF- $\beta$ , após o exercício, o número de casos detetados também foi diferente entre os grupos, com resultados mais elevados para os atletas (Tabela 5.4). A expressão de genes de referência CYC1 e de GAPDH foi detetada em todas as amostras, confirmando a viabilidade das células.

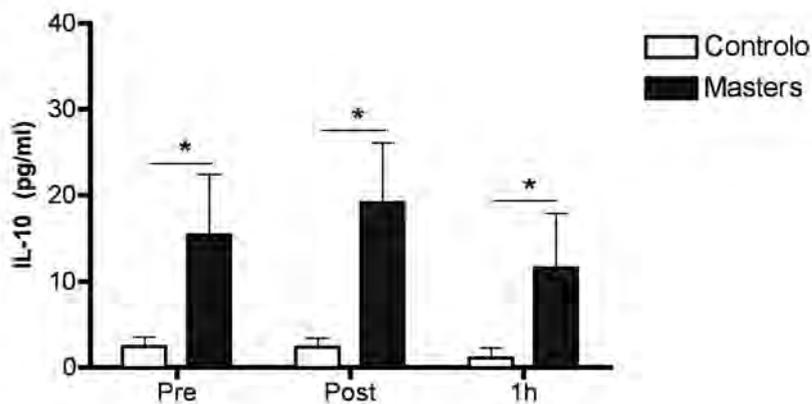
Tabela 5.4. Número de casos detetados para expressão do mRNA Foxp3, TGF- $\beta$  e IL-10.

Genes	Pre			Post			1h		
	Controlo N (%)	Masters N (%)	P	Controlo N (%)	Masters N (%)	P	Controlo N (%)	Masters N (%)	P
<i>Foxp3</i>									
Sim	9 (100)	17 (94)	0.471	7 (78)	18 (100)	0.038	5 (56)	16 (89)	0.050
Não	0 (00)	1 (06)		2 (22)	0 (00)		4 (44)	2 (11)	
<i>TGF-<math>\beta</math></i>									
Sim	6 (67)	18 (100)	0.009	5 (56)	18 (100)	0.002	3 (33)	18 (100)	0.003
Não	3 (33)	0 (00)		4 (44)	0 (00)		6 (67)	0 (00)	
<i>IL-10</i>									
Sim	2 (22)	11 (61)	0.057	5 (56)	12 (67)	0.573	2 (22)	9 (50)	0.166
Não	7 (78)	7 (39)		4 (44)	6 (33)		7 (78)	9 (50)	
<i>KLRG1</i>									
Sim	5 (50)	6 (33)	0.387	5 (50)	6 (33)	0.387	5 (50)	6 (33)	0.387
Não	5 (50)	12 (67)		5 (50)	12 (67)		5 (50)	12 (67)	

P= Pearson Chi-Square. Pre (antes), Post (10 min pós-exercício), 1h (1 h pós-exercício).

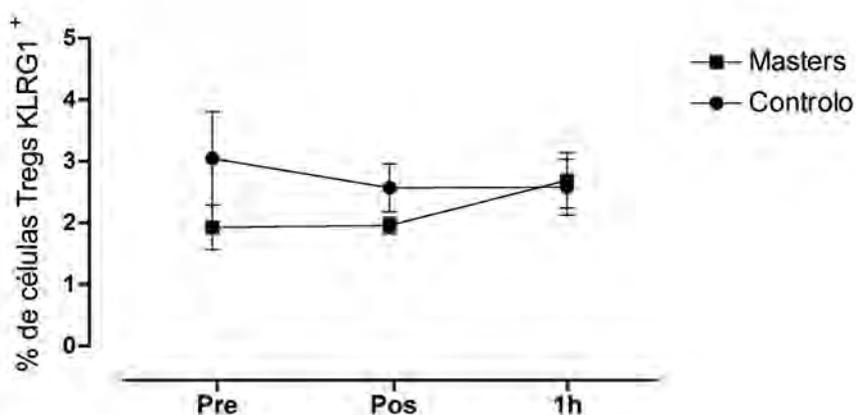
A concentração plasmática da IL-10 foi significativamente maior nos atletas *master* em comparação com o grupo controle antes e depois do teste de exercício ( $P < 0.001$ , ES = 2.57). O exercício agudo não influenciou as concentrações de IL-10 (Figura 5.2).

A expressão de KLRG1 foi observada em aproximadamente 2% das Tregs nos atletas e de 3.1% das Tregs no grupo controle, mantendo-se inalterada em Post e em 1h (Figura 5.3). De interesse, no entanto, foi novamente o número de indivíduos que expressam este marcador de senescência: 6 de 18 (33%) no grupo de atletas contra 5 dos 10 (50%) no grupo controle (Tabela 5.4).



**Figura 5.2. Efeitos agudos do exercício sobre os níveis de IL-10 no plasma.**

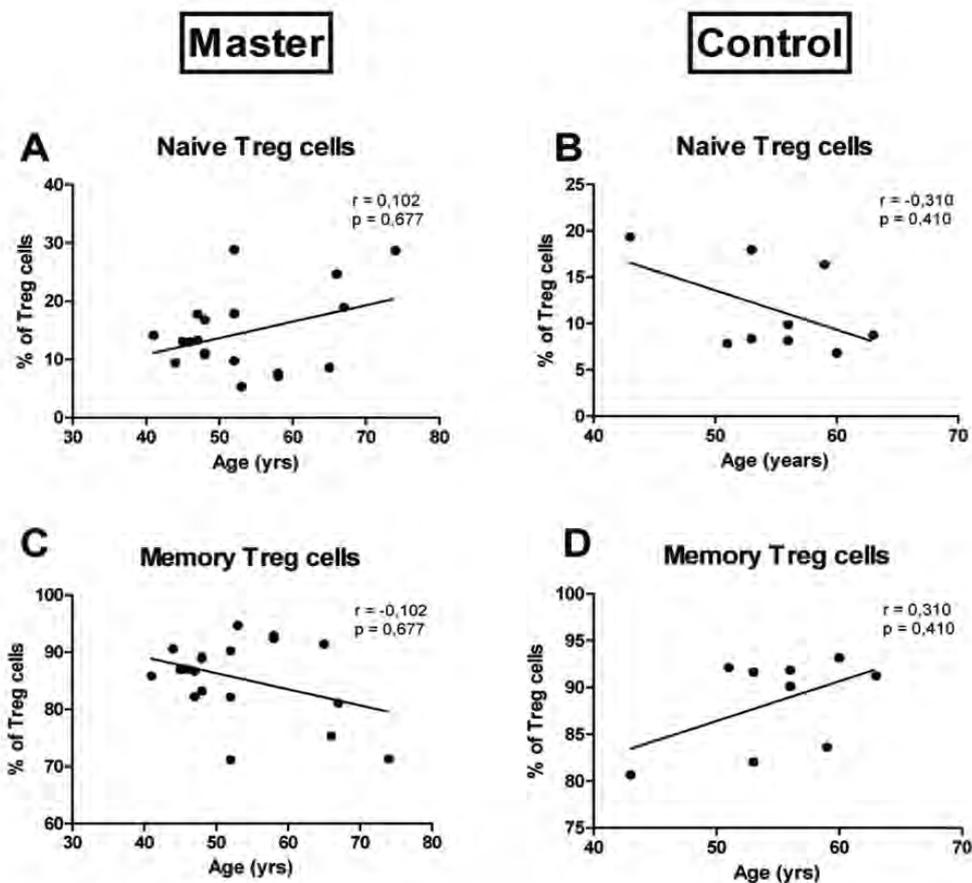
Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Pre (controlo, N = 8; *masters*, N = 16); Post (controlo, N = 10; *masters*, N = 16); 1h (controlo, N = 4; *masters*, N = 16). \* P < 0.001. Pre (antes), Post (10 min pós-exercício), 1h (1 h pós-exercício).



**Figura 5.3. Percentagem de Tregs KLRG1<sup>+</sup>.**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. Pré (antes); Post (10 min pós-exercício); 1h (1 h pós-exercício). Controlo (N = 6 casos positivos do total de 10 indivíduos); Atletas *master* (N = 5 casos positivos do total de 18 indivíduos).

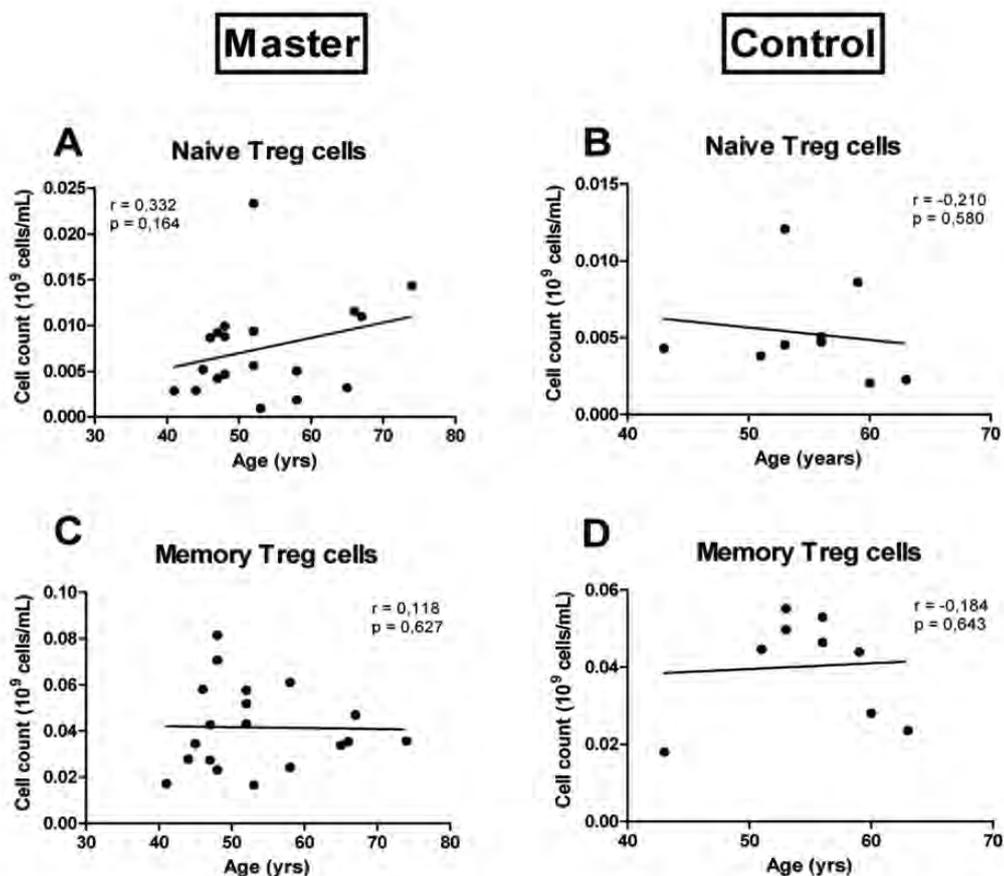
Quando as proporções de Tregs naïve, no sangue periférico, foram analisadas de acordo com a idade dos sujeitos, uma fraca tendência para a diminuição com a idade foi observada para o grupo controlo (Fig. 5.4B), enquanto que no grupo atletas *master* a tendência oposta (aumento da proporção de Tregs naïve) foi encontrada (Fig. 5.4A). Quando o mesmo procedimento foi realizado para subconjunto de Tregs de memória, tendências opostas foram encontradas (fraca tendência de aumento para o grupo controlo e fraca tendência para redução no grupo de atletas *master*) (Fig. 5.4C e 5.4D).



**Figura 5.4. Proporções de Tregs naíve e de memória em função da idade.**

A: As proporções de Tregs naíve ( $CD45RA^+$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo de atletas *master* ( $N = 19$ ). B: As proporções de Tregs naíve ( $CD45RA^+$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo controlo ( $N = 9$ ). C: As proporções de Tregs memória ( $CD45RA^-$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo de atletas *master* ( $N = 19$ ). D: As proporções de Tregs memória ( $CD45RA^-$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo controlo ( $N = 9$ ). Correlações foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Quando os números absolutos de Tregs foram calculados, um número estável de Tregs naíve e de memória foram encontrados para ambos os grupos (Figura 5.5).



**Figura 5.5. Números absolutos de Tregs naïve e memória.**

A: Valores absolutos de Tregs naïve ( $CD45RA^+$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo de atletas *master* ( $N = 19$ ). B: Valores absolutos de Tregs naïve ( $CD45RA^+$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo controle ( $N = 9$ ). C: Valores absolutos de Tregs memória ( $CD45RA^-$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo de atletas *master* ( $N = 19$ ). D: Valores absolutos de Tregs memória ( $CD45RA^-$ ) dentro do total da população de células T  $CD4^+$  no grupo controle ( $N = 9$ ). Correlações foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman.

### 5.3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O objetivo deste estudo foi quantificar e caracterizar funcionalmente as Tregs do sangue periférico antes e após uma sessão de exercício, em dois grupos com diferenças distintas em hábitos de exercício ao longo da vida: atletas *master* e um grupo controle saudável pareados por idade. Os principais resultados deste estudo mostram que ambos os grupos têm níveis semelhantes de Tregs circulantes em repouso, bem como de linfócitos e células T  $CD4^+$ .

Funcionalmente, no grupo de atletas *master* as Tregs parecem estar mais ativadas em comparação com o grupo controlo. Encontrámos níveis ligeiramente aumentados da expressão génica de FoxP3, TGF- $\beta$  e IL-10, associado a um maior número de casos onde se observa a amplificação, o que estaria de acordo com o aumento da concentração plasmática da IL-10 nos atletas *master*. Não se observam diferenças entre o marcador de senescência KLRG1 entre os dois grupos.

Atletas *master* e controlos mostraram ter números semelhantes de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>CD127<sup>dim</sup> circulantes no início do estudo, sugerindo que o treino ao longo da vida não afeta o número destas células. As Tregs são conhecidas por manter a auto-tolerância e controlar respostas imunes excessivas aos antigénios. O ganho, dependente da idade, da atividade das Tregs pode resultar numa imunidade enfraquecida, traduzida pelo aumento do risco de desenvolvimento de doenças malignas e infeções. Por outro lado, a perda relacionada com a idade, da função das Tregs poderia causar um estado imune sobre-ativo, que tem sido reportado em idosos como maior estado de inflamação e aumento do risco de autoimunidade (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014).

O número de estudos que examinou o efeito do exercício na função, fenótipo e efeitos supressores das Tregs é pequeno. Alguns investigadores mostraram que o exercício aumenta o número e função das Tregs em ratinhos (Wang, Song, Tang, *et al.*, 2012; Uchiyama, Jin, Yin, *et al.*, 2015), em modelos animais de asma (Lowder, Dugger, Deshane, *et al.*, 2010) e humanos (Teixeira, Rama, Carvalho, *et al.*, 2014; Lages, Suffia, Velilla, *et al.*, 2008; Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013).

Neste estudo, observamos que a contagem absoluta de Tregs aumentou imediatamente após o exercício em ambos os grupos. É bem conhecido que os esforços máximos tem efeitos profundos sobre a contagem de leucócitos totais, marcados por uma resposta inflamatória aguda que é caracterizada por leucocitose, pela ativação de leucócitos, libertação de mediadores inflamatórios e dano tecidual (Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014). No nosso estudo foi observado um aumento no número absoluto de granulócitos, monócitos e linfócitos, argumentando que parte da leucocitose observada nos grupos controlo e de atletas pode ser devido a uma resposta inflamatória local causada pela lesão de tecido. No entanto, esta é uma resposta temporária e uma hora após o exercício os valores voltaram aos valores pré-exercício. Devido a isso, a hipótese do aumento observado nas Tregs após o exercício (Post) refletir

simplesmente o aumento do número total de linfócitos não deve ser descartada (Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013).

Não encontramos diferenças na expressão do mRNA de FoxP3, TGF- $\beta$  e IL-10 nas Tregs purificadas antes e após o exercício, embora o grupo de atletas *master* tenha apresentado valores ligeiramente mais altos em todos os momentos de medida (Figura 5.1). No entanto, o número de casos detetados foi diferente entre os grupos ( $P < 0.05$ ). O maior número de casos detetados em atletas *master* para o mRNA do FoxP3 após o exercício (Tabela 5.4) implica que o treino ao longo da vida influencia respostas agudas ao exercício para o fator de transcrição das Tregs em atletas *master*. Yeh *et al.* (2009) demonstraram que o exercício físico aumentou a expressão de Foxp3 nas células T, na periferia, em doentes diabéticos Tipo 2. Lowder e colegas mostraram que, o exercício aeróbico de intensidade moderada aumentou a população Tregs/FoxP3<sup>+</sup> no interior do compartimento pulmonar em ratos (Lowder, Dugger, Deshane, *et al.*, 2010). Em vista deste resultado, os autores concluíram que o aumento mediado pelo exercício no número de Tregs dentro das vias aéreas pode ser o mecanismo pelo qual o exercício atenua respostas asmáticas *in vivo* (Yeh, Chuang, Lin, *et al.*, 2009).

Yeh *et al.* (2006), mostraram que a produção de TGF- $\beta$  e IL-10 pelas Tregs, sob a estimulação do vírus varicela *zoster*, foi aumentada depois de um programa de 12 semanas de *tai chi chuan* em voluntários de meia-idade, o que está de acordo com os nossos resultados. Encontramos que o exercício agudo aumentou o número de casos detetados para o mRNA do TGF- $\beta$  e da IL-10 em atletas *master*, mas não no grupo controlo (Tabela 5.4), possivelmente com influência de um efeito residual do treino – exercício crónico realizado pelos atletas. O TGF- $\beta$  tem potentes propriedades imunomoduladoras e pode induzir a secreção de IgA. Isto sugere uma melhoria nas defesas pela imunidade das mucosas que levaria a um risco menor de doenças infecciosas (Yeh, Chuang, Lin, *et al.*, 2006). Além disso, o TGF- $\beta$  pode desempenhar um papel essencial na supressão da inflamação, por inibir a atividade de linfócitos T e B e células NK. Além disso, o TGF- $\beta$  também influencia a produção de outras citocinas por meio de mecanismos dependentes e independentes de FoxP3 (Yoshimura, Wakabayashi & Mori, 2010).

Uma das principais moléculas identificada como responsável pela imunomodulação mediada por Tregs é a IL-10. É, portanto, possível, que a maior concentração plasmática da IL-10 possa estar associada com o aumento do número de Tregs circulantes, a principal fonte de

IL-10 no corpo (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). No nosso estudo, a expressão do gene da IL-10 foi similar entre os dois grupos na linha de base (Pre), mas as concentrações de IL-10 no plasma foram mais elevadas no grupo de atletas *master*. Handzlik e colegas (2013) mostraram que cargas elevadas de treino estão associadas com contagens superiores de Tregs em repouso e uma maior produção de IL-10 após estimulação por antigénio. Ao mostrar uma forte relação entre o aumento do número de Tregs e elevada produção de IL-10 *in vitro*, os autores sugeriram que os atletas tinham uma maior capacidade para produzir IL-10 por causa do aumento do número de Tregs. Por outro lado, Hwang e colaboradores mostraram que Tregs de indivíduos idosos (idade > 65 anos) inibiam a proliferação das células responsivas e que a produção de IL-10 foi reduzida (Hwang, Kim & Kang, 2009). Isto está de acordo com os nossos resultados, uma vez que eles demonstram concentrações mais baixas de IL-10 no grupo controlo (Figura 3). Em conjunto, estes resultados apoiam os efeitos anti-inflamatórios do exercício no modelo proposto por Gleeson e colegas (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011).

Recentemente, a expressão da KLRG1 em Tregs tem sido associada com a alterações funcionais e senescência (Tauro, Nguyen, Li, *et al.*, 2013). Num modelo de doença autoimune, Tregs KLRG1<sup>+</sup> expressavam níveis elevados dos marcadores de ativação CD25 e FoxP3 e estavam numa fase de diferenciação terminal. Além disso, Tregs KLRG1<sup>+</sup> produziam mais IL-10. Os nossos resultados mostraram que uma percentagem muito pequena de Tregs expressavam KLRG1 e diferenças (embora não significativas) foram observadas no número de casos em que as Tregs expressavam KLRG1, entre os grupos. A percentagem de Tregs KLRG1<sup>+</sup> foi cerca de 50% mais baixa no grupo de atletas *master* em comparação com o grupo controlo.

Não foram observadas diferenças nas populações de Tregs naïve e memória entre os atletas *master* e os controlos. Consistente com estudos anteriores (Hwang *et al.* 2009) a maior percentagem das Tregs era de memória (CD45RA<sup>-</sup>). A discriminação entre Tregs naïve e memória é biologicamente relevante. Embora ambas exercem uma ação supressora, elas possuem recetores de *homing* distintos, que permitem a migração entre os órgãos linfoides e tecidos inflamados (Miyara, Yoshioka, Kitoh, *et al.*, 2009; van der Geest, Abdulhad, Tete, *et al.*, 2014). As Tregs naïve podem desempenhar um papel importante na manutenção do *pool* de Tregs em adultos, ao passo que o aumento de Tregs de memória foi associado a uma resposta humoral a vacinas diminuída (van der Geest, Abdulhad, Tete, *et al.*, 2014). Entretanto, as Tregs naïve e memória apresentaram um comportamento ligeiramente diferente quando os dados foram correlacionados com a idade. Outros estudos (Booth, McQuaid, Sobande, *et al.*,

2010; Miyara, Yoshioka, Kitoh, *et al.*, 2009; van der Geest, Abdulahad, Tete, *et al.*, 2014) haviam mostrado que a proporção de Tregs naïve na circulação diminui com a idade, enquanto que a proporção de Tregs de memória aumenta. Observámos uma tendência das Tregs naïve diminuírem no grupo controlo e das Tregs de memória aumentarem com a idade. Já no grupo de atletas *master*, observou-se uma tendência para o aumento das proporções de Tregs naïve com a idade (Figura 4). Sugerimos que novos estudos sejam realizados incluindo um número maior de indivíduos e também com outras faixas etárias para confirmar ou refutar esta hipótese.

#### 5.4 CONCLUSÃO

O número das Tregs foram os mesmos nos atletas *master* e no grupo controlo, sugerindo que o treino ao longo da vida não interfere na perda ou aumento no número destas células. Além disso, as Tregs parecem estar mais ativadas nos atletas *master* em comparação com o grupo controlo. Encontrámos níveis ligeiramente aumentados da expressão génica de FoxP3, TGF- $\beta$  e IL-10, associado a um maior número de casos onde se observou a amplificação, o que estaria de acordo com o aumento da concentração plasmática da IL-10 nos atletas *master*. Não se observam diferenças entre o marcador de senescência entre os dois grupos. Pesquisas futuras devem incluir amostras maiores e testes funcionais.

## 6. ESTUDO 3: A INFLUÊNCIA DO TREINO AO LONGO DA VIDA SOBRE A MOBILIZAÇÃO DE LINFÓCITOS T SENESCENTES EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO AGUDO MÁXIMO.

### **Resumo:**

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treino ao longo da vida sobre a senescência e sua mobilização de linfócitos T em resposta ao exercício agudo.

**Métodos:** Dezanove atletas *master* que participavam regularmente em treino e competições por mais de 20 anos ao longo da vida e um grupo controlo constituído por 9 indivíduos de mesma idade e saudáveis fizeram parte deste estudo. Todos os indivíduos realizaram um teste progressivo até à exaustão num cicloergómetro. As amostras de sangue foram obtidas antes (Pre), 10 min pós-exercício (Post) e 1 h pós-exercício (1h). O estudo fenotípico das células T do sangue periférico foi efetuado por citometria de fluxo. A expressão de genes de interesse foi feita em células T purificadas por *cell sorting*.

**Resultados:** Não se observaram alterações estatisticamente significativas para as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e suas subpopulações entre atletas *master* e controlos em todos os momentos de medida. A idade mostrou ter efeito negativo na subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> naïve e positivo para as células T CD8<sup>+</sup> SLEC (*short-lived effector cell*). O VO<sub>2max</sub> influenciou negativamente a percentagem total de linfócitos e positivamente a proporção de células T CD4<sup>+</sup> naïve. Atletas *master* têm menor percentagem de células T CD8<sup>+</sup> naïve, memória-central e memória-efetora senescentes e de células T CD4<sup>+</sup> naïve e memória-efetora senescentes. Não se observaram diferenças nas células efetoras-terminais para as várias condições do estudo. A expressão de mRNA do gene CCR7 para as células T CD8<sup>+</sup> naïve e do gene FasL para as células T CD8<sup>+</sup> efetoras-terminais não foi diferente entre *masters* e controlos e não mudou em resposta ao teste de esforço máximo.

**Conclusão:** Em conclusão, a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbia durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir o acumular de células T senescentes.

**Palavras-chave:** Imunosenescência; KLRG1; Citomegalovirus; CCR7; FasL; espaço imune.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O declínio com a idade na função imune, referido como imunosenescência, está bem caracterizado no sistema imune adaptativo, e, em particular, entre as células T. Características de imunosenescência obtidas no *pool* de células T, incluem baixos números de células T naïve (em especial nas células T CD8<sup>+</sup>) e um elevado número de células T de memória (células T CD8<sup>+</sup> especialmente no estágio final de diferenciação) (Appay & Sauce, 2014; Fülöp, Larbi & Pawelec, 2013; Pawelec, 2012, 2014), respostas diminuídas à vacinação (Moro-García, Alonso-Arias, López-Vázquez, *et al.*, 2012; Turner, Campbell, Edwards, *et al.*, 2014) e um rácio CD4:CD8 menor que 1.0 (Luz Correa, Ornaghi, Cerutti Muller, *et al.*, 2014). Estas alterações são também potencializadas pela infeção por citomegalovírus (Wills, Akbar, Beswick, *et al.*, 2011).

Foi sugerido que o exercício pode exercer um efeito “anti” imunosenescência (Simpson, 2011b; Simpson & Guy, 2010), talvez por atrasar o início do envelhecimento imunológico ou mesmo melhorar a resposta do sistema imune em pessoas mais velhas (Müller & Pawelec, 2013; Simpson & Guy, 2010; Simpson, 2011b; Simpson, Lowder, Spielmann, *et al.*, 2012; Turner, 2016). Esta teoria tem sido desenvolvida com base na evidência de que o exercício “estimula” a função imune (Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011; Walsh, Gleeson, Pyne, *et al.*, 2011). O treino moderado ou intenso ao longo da vida leva a respostas imunes mais fortes e por um maior tempo, por exemplo, no título de anticorpos de vacinas contra a gripe, resultando em indivíduos mais protegidos (de Araújo, Silva, Fernandes, *et al.*, 2015). Além disso, a imunovigilância exercida pelos linfócitos, onde estas células tem a capacidade de reconhecer antígenos associados a vírus, bactérias ou tumores e de desenvolver respostas específicas a estes, pode ser facilitada pela linfocitose transitória e subsequente linfopenia induzida por sessões de exercício (Gleeson & Bishop, 2005; Turner, 2016). Além disso, alguns tipos de exercício são anti-inflamatórios, e se repetidos regularmente ao longo da vida, há uma menor morbidade e mortalidade por doenças com etiologia imunológica e inflamatória (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). Assim, muitos aspetos da função imune mudam com o envelhecimento, e algumas alterações podem ser restauradas transitoriamente pelo exercício. Uma teoria recente propôs que o exercício pode provocar efeitos preventivos e/ou reparadores na imunosenescência das células T (Simpson, 2011b; Simpson & Guy, 2010). Resumidamente, propõe-se que três processos resultem neste efeito. Em primeiro lugar, as células de um fenótipo

diferenciado de fase final são mobilizadas para o sangue periférico durante o exercício (Campbell, Riddell, Burns, *et al.*, 2009; Simpson, Florida-James, Cosgrove, *et al.*, 2007; Simpson, Cosgrove, Chee, *et al.*, 2010). Em segundo lugar, essas células extravasam a partir de sangue (*homing*) para os tecidos periféricos e / ou inflamados 1-2 h após o exercício (Dhabhar, 2014; Walsh, Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011; Walsh, Gleeson, Pyne, *et al.*, 2011). Nestes locais as células seriam expostas a uma série de estímulos pro-apoptóticos (por exemplo, espécies reativas de oxigénio, glucocorticoides, citocinas) podendo causar a apoptose destas células (Krüger, Frost, Most, *et al.*, 2009). A terceira fase e hipótese final, propõe que o repertório de células T naïve é capaz de expandir em resposta ao “espaço imune” que foi criado, iniciado por um *loop* de feedback negativo hipotético que governa o número de células T naïve e de memória (Simpson, 2011b; Haugen, Norheim, Lian, *et al.*, 2010).

Apesar de vários estudos sugerirem que o exercício pode retardar o envelhecimento biológico humano, os efeitos do exercício de longo prazo sobre a função das células T não são bem conhecidos (Moro-García, Fernández-García, Echeverría, *et al.*, 2014; Prieto-Hinojosa, Knight, Compton, *et al.*, 2014; Cosgrove, Galloway, Neal, *et al.*, 2012; Teixeira, Rama, Carvalho, *et al.*, 2014). Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treino ao longo da vida sobre a senescência e mobilização de linfócitos T em resposta ao exercício agudo.

## 6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.2.1 Participantes

As características dos participantes deste estudo estão apresentadas na Tabela 6.1. Similarmente aos estudos anteriores, o grupo de atletas *master* e o grupo controlo eram de idade, estatura, peso corporal e IMC semelhantes. Os atletas tinham maior  $VO_{2max}$ , em valores absolutos e relativos, em comparação com o grupo controlo. A amostra foi composta por 19 atletas *master* e 9 controlos (Tabela 6.1). Não foi feita estratificação dos grupos por género.

Tabela 6.1. Caracterização da amostra.

	Controlo	Atletas <i>master</i>
Idade (anos)	53.7 ± 6.04	53.5 ± 8.94
Estatura (cm)	169.7 ± 8.23	171.5 ± 5.86
Peso corporal (kg)	70.45 ± 13.71	74.7 ± 15.17
IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	24.6 ± 3.18	25.7 ± 4.65
VO <sub>2max</sub> (L.min <sup>-1</sup> )	2094.55 ± 4.14*	2859.5 ± 697.22
VO <sub>2max</sub> (mL.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	29.29 ± 697.22*	40.36 ± 11.55

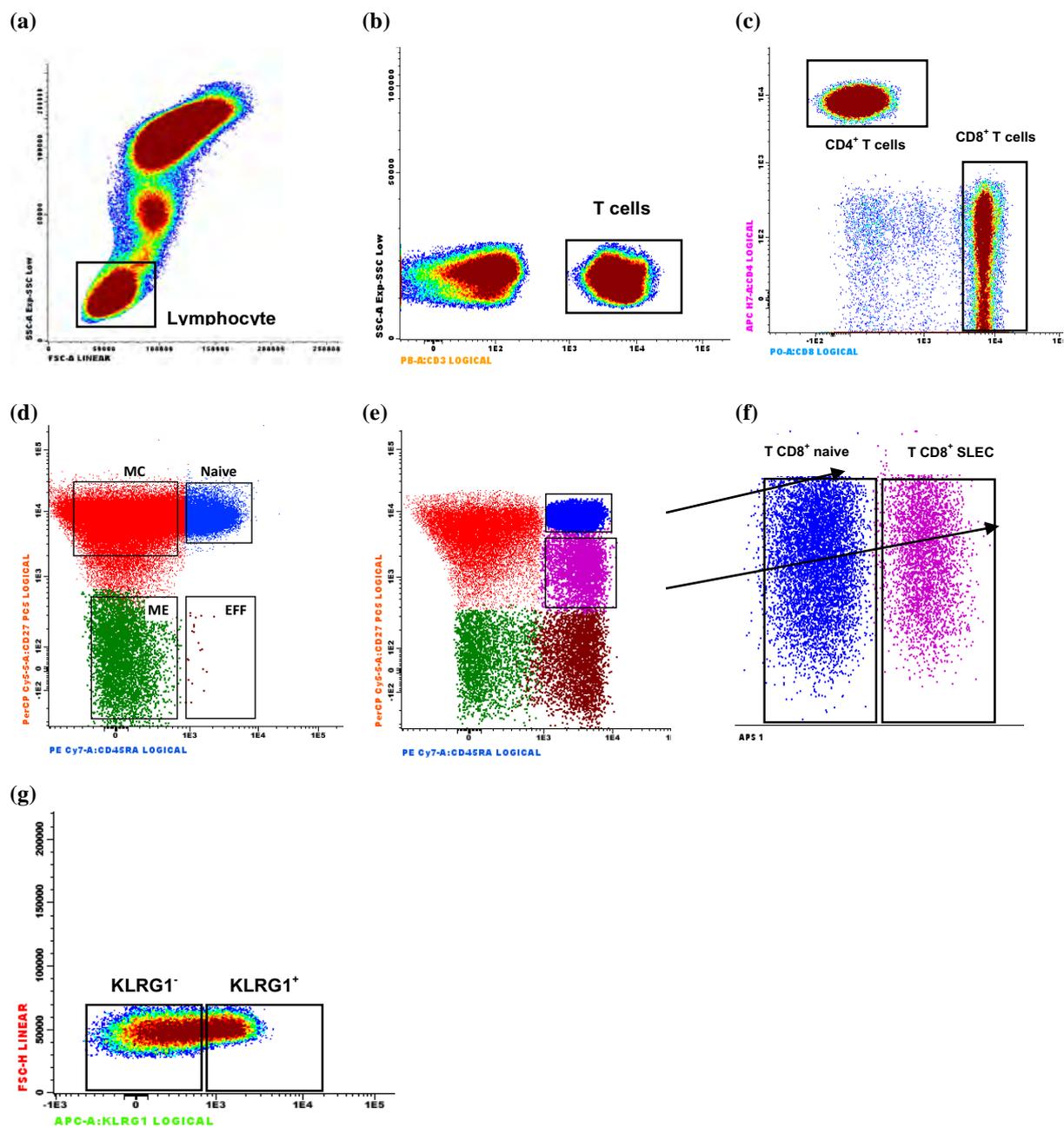
Valores são Média ± desvio padrão (SD). Controlo (N = 9); *Masters* (N = 19). Abreviaturas: IMC= Índice de Massa Corporal; VO<sub>2max</sub>= Consumo máximo de oxigénio. \* P < 0.01 comparado aos atletas *master*.

## 6.2.2 Protocolo experimental e recolhas de sangue

No laboratório e após triagem (ver seção Materiais e Métodos para detalhes), amostras de sangue venoso (10 ml) foram colhidas a partir da veia antecubital por punção venosa e armazenadas em 2 tubos Vacutainer K3EDTA (Becton-Dickinson, Oxford, Reino Unido). As amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração até os procedimentos de citometria de fluxo e *sorting* celular. Seguindo a realização do protocolo para a determinação do VO<sub>2max</sub> (detalhes do teste podem ser vistos na 3.2.4 do Capítulo 3), mais duas amostras de sangue (10 ml) foram recolhidas 10 min e 1h após o término do teste. Os procedimentos da recolha foram os mesmos para os 3 momentos de medida e estão previamente detalhados na seção 3.2.5 do Capítulo 3.

## 6.2.3 Citometria de fluxo

Os estudos de imunofenotipagem no sangue periférico foram realizados utilizando um conjunto de oito anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos, sendo as amostras adquiridas no citómetro FACS Canto II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA). Um modelo esquemático da estratégia utilizada para definir as diferentes populações de células está na Figura 6.1.



**Figura 6.1.** Estratégia de análise utilizada para definir as diferentes populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e para a % das células que expressam o marcador KLRG1.

A população de linfócitos foi definida com base na sua baixa granularidade (*side scatter*) e seu pequeno tamanho (*forward scatter*) (Figura 6.1a). Os linfócitos T foram identificados de acordo com sua positividade para CD3 (Figura 6.1b). As células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram definidas com base na sua positividade para CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respectivamente (Figura 6.1c). Cada subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi dividida em naïve (CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), memória-central (CM; CD27<sup>+</sup>/CD45RA<sup>-</sup>), memória-efetoras (EM; CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>-</sup>) e efetoras-terminais (EMRA; CD27<sup>-</sup>/CD45RA<sup>+</sup>) (Figura 6.1d, e). As células T CD8<sup>+</sup> ainda foram subdivididas em mais uma população, SLEC (CD27<sup>-low</sup>, CD45RA<sup>++</sup>)

(Figura 6.1f). Todas as populações foram analisadas quanto a sua positividade para o marcador KLRG1 (Figura 6.1g).

#### 6.2.4 Purificação celular e análise do mRNA em células purificadas

Após a purificação das células T CD8<sup>+</sup> naïve e efetoras-terminais por FACS Aria II (BD) de acordo com o seu fenótipo típico, o conteúdo das células purificadas foi transferido para um tubo *Eppendorf* de 1,5 ml e centrifugado durante 5 min a 300 g e o sedimento foi ressuspensionado em 350 µL de tampão de lise RLT (Qiagen, Hilden, Alemanha). O RNA total foi extraído com o RNeasy Micro Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante (ver seções 3.4.1 e 3.5 do Capítulo 3 para detalhes).

#### 6.2.5 Análise estatística

Os resultados descritivos são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão (DP). A distribuição *Gaussiana* para cada parâmetro foi avaliada por um teste de *Shapiro-Wilk*. O nível alfa foi ajustado em 0.05. Para as análises de mudança, considerando o planejamento multinível do estudo [unidades de nível 1 (intra-individual) dentro de cada unidade de nível 2 (indivíduos de diferentes grupos)], foram construídos modelos hierárquicos de efeitos aleatórios (REM) usando uma abordagem de modelagem multinível (MLwiN v2.26, Center for Multilevel Modeling, Universidade de Bristol, Bristol, Reino Unido) (Baxter-Jones, Mirwald, McKay, *et al.*, 2003).

Modelos de análise que continham variáveis medidas em diferentes níveis de uma hierarquia são conhecidos como modelos de regressão multinível. O seguinte modelo multinível polinomial aditivo foi adotado para descrever as mudanças em resposta a um protocolo de esforço máximo:

$$y_{ij} = (\alpha + \mu_j) + (\beta + \nu_j) x_{ij} + (\zeta_{1ij} + \zeta_{2ij} + \dots + \zeta_{nij}) + \epsilon_{ij}$$

Esta equação é um exemplo de REM no qual os coeficientes de regressão de nível 1 são tratados como variáveis aleatórias no nível 2. Neste exemplo, os minutos de início (x) estão nas partes fixa e aleatória do modelo. Isto é visto claramente quando a equação 1 é rearranjada em partes fixas e aleatórias:

$$y_{ij} = (\alpha + \beta_j x_{ij}) + (\zeta_{1ij} + \zeta_{2ij} + \dots + \zeta_{nij}) + (\mu_j + \nu_j x_{ij} + \varepsilon_{ij})$$

onde y é a %Total Ly, %Total LyT, %LyT, %Total CD4<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>, %Total CD8<sup>+</sup> e %CD8<sup>+</sup>; células T CD4<sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efectoras-terminais (EMRA) ; células T CD8<sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efectoras-terminais (EMRA); LyT/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> na ocasião da medição i no j<sup>th</sup> indivíduo,  $\alpha$  é a constante para cada j<sup>th</sup> indivíduo,  $\beta_j x_{ij}$  é a inclinação para os parâmetros dependentes ao longo do tempo (isto é, minuto de medida) para j<sup>th</sup> indivíduo; e  $\zeta_1$  a  $\zeta_n$  foram os coeficientes das variáveis explicativas (por exemplo, idade, sexo, VO<sub>2max</sub> etc.) na ocasião da avaliação i no j<sup>th</sup> indivíduo. Estes foram os parâmetros fixos no modelo.

Ambos  $\mu_j$ ,  $\nu_j x_{ij}$  e  $\varepsilon_{ij}$  formaram os parâmetros aleatórios no modelo. Eles foram assumidos como independentes e seguem uma distribuição normal, com médias iguais a zero e variância  $\sigma^2$ .  $\varepsilon_{ij} \sim N[0, \text{var}(\varepsilon_{ij})]$  foi o nível residual 1 (variação intra-individual) para a i<sup>th</sup> avaliação de %Total Ly, %Total LyT, %LyT, %Total CD4<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>, %Total CD8<sup>+</sup> ou %CD8<sup>+</sup>; células T CD4<sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) ou efectoras-terminais (EMRA); células T CD8<sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) ou efectoras-terminais (EMRA); LyT KLRG1<sup>+</sup>, % LyT CD4<sup>+</sup>KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup> ou %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> no j<sup>th</sup> indivíduo. Além disso,  $\mu_j \sim N[0, \text{var}(\mu)]$  foi a variância de intercetação entre indivíduos e  $\nu_j x_{ij} \sim N[0, \text{var}(\nu_j x_{ij})]$  foi a variância de inclinação entre indivíduos; sendo assim utilizadas como variâncias de resíduos de nível 2 (entre sujeitos) para o j<sup>th</sup> indivíduo. A equação  $\mu_j \times \nu_j x_{ij} \sim N[0, \text{var}(\mu_j \times \nu_j x_{ij})]$  explicou as relações de covariância entre os interceptos e *slopes* no modelo (Baxter-Jones, Mirwald, McKay, *et al.*, 2003; Jackowski, Baxter-Jones, Gruodyte-Raciene, *et al.*, 2015).

Modelos foram construídos usando um procedimento *stepwise*, ou seja, variáveis preditoras (efeitos fixos z) foram adicionadas uma de cada vez, e as estatísticas de razão de verossimilhança foram usadas para julgar o ajuste estatístico do modelo (Baxter-Jones,

Mirwald, McKay, *et al.*, 2003). As variáveis preditoras ( $z$ ) foram aceitas como significativas se o coeficiente médio estimado fosse maior do que o dobro do erro padrão da estimativa. Se o critério de retenção não foi cumprido, a variável preditora foi descartada. Funções de potência do minuto de medida foram introduzidas nos modelos lineares para permitir a não-linearidade de mudanças nos parâmetros dependentes. As variáveis a seguir foram introduzidas como preditores nos modelos multinível: minuto de medida, minuto de medida<sup>2</sup>, idade, estatura, massa corporal e  $VO_{2max}$ . Foram criadas variáveis *dummy* para grupos de sexo e amostra com participantes do sexo feminino e controlos como categorias de referência, respectivamente. Um total de vinte oito independentes REMs multiníveis foram construídos.

### 6.3 RESULTADOS

A Tabela 6.2 apresenta o modelo de regressão multinível para a % de linfócitos (% Total Ly) e linfócitos T (% Total LyT) dentro da população total de células, a % de linfócitos T dentro da população de linfócitos (% LyT), a % de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  dentro da população total de células (% Total  $CD4^+$  e % Total  $CD8^+$ , respetivamente) e a % de linfócitos T  $CD4^+$  e linfócitos T  $CD8^+$  (%  $CD4^+$  e %  $CD8^+$ , respetivamente). Para os seis modelos, os efeitos aleatórios são significativos dentro dos indivíduos, indicando que a % Total Ly, % Total LyT, % Total  $CD4^+$ , %  $CD4^+$ , % Total  $CD8^+$  e %  $CD8^+$  aumenta significativamente em cada minuto de medida dentro dos indivíduos ( $P < 0.05$ ). A matriz de variância entre indivíduos para cada modelo indica que os indivíduos têm curvas significativamente diferentes em termos de seus interceptos [constante / constante ( $\mu_j \times \mu_j$ ),  $P < 0.05$ ], mas não em termos das inclinações de suas linhas [minuto de medida / minuto de medida ( $v_{xij} \times v_{xij}$ ),  $P > 0.05$ ], exceto para a % Total  $CD4^+$  ( $P < 0.05$ ). Além disso, a variância desses interceptos e *slopes* não está significativamente correlacionada [constante / idade ( $\mu_j \times v_{xij}$ ),  $P > 0.05$ ], com exceção da % Total  $CD8^+$ . A variação entre indivíduos não é, portanto, diferente em diferentes minutos de medida, com exceção da % Total  $CD4^+$  e % Total  $CD8^+$ .

Tabela 6.2. Modelo de regressão multinível para a % Total Ly; % Total LyT, % LyT, % Total CD4<sup>+</sup>, % CD4<sup>+</sup>, % Total CD8<sup>+</sup> e % CD8<sup>+</sup>.

	% Total Ly	% Total LyT	% LyT	% Total CD4	% CD4	% Total CD8	% CD8
<b>Efeitos fixos</b>							
Constante	31.3845±4.0097	18.1119±1.0056	75.4511±2.9632	13.1916±1.0026	59.0956±1.6833	6.0599±0.5640	32.5100±1.5327
Min de medida	0.3709±0.0756	0.0930±0.0339	-0.5072±0.0838	-0.0470±0.0190	-0.6316±0.0675	0.1038±0.0238	0.3606±0.0578
Min de medida <sup>2</sup>	-0.0075±0.0012	-0.0023±0.0008	0.0092±0.0013	0.0005±0.0002	0.0112±0.0011	-0.0021±0.0004	-0.0066±0.0009
Idade	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Mulheres vs homens	NS	NS	-6.4202±3.1680	-3.4520±1.1493	NS	NS	NS
Controlos vs <i>masters</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Estatura	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Peso corporal	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
VO <sub>2max</sub>	-0.023±0.0010	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Efeitos aleatórios</b>							
<i>Nível 1</i>							
Constante ( $\epsilon_{ij}$ )	10.8641±2.0350	5.5379±1.0374	13.3507±2.5010	0.6474±0.1702	8.6572±1.6217	1.0756±0.2820	6.3568±1.1908
<i>Nível 2</i>							
Constante ( $\mu_j$ )	26.6720±7.9999	24.0956±6.8292	55.4478±15.7697	6.6531±1.8609	73.9934±20.2087	8.2070±2.3434	62.1141±16.8800
Min de medida ( $\nu_{X_{ij}}$ )	NS	NS	NS	0.0005±0.0002	NS	NS	NS
$\mu_j \times \nu_{X_{ij}}$	NS	NS	NS	NS	NS	-0.0344±0.0169	NS

Abreviaturas: % Total Ly= % de linfócitos dentro da população total de células; % Total LyT= % de linfócitos T dentro da população total de células; % LyT= % de linfócitos T dentro da população de linfócitos; % Total CD4= % de linfócitos T CD4<sup>+</sup> dentro da população total de células; % CD4= % de linfócitos T CD4<sup>+</sup>; % Total CD8= % de linfócitos T CD8<sup>+</sup> dentro da população total de células; % CD8= % de linfócitos T CD8<sup>+</sup>; VO<sub>2max</sub>: consumo máximo de oxigénio.

Os valores para os Efeitos fixos estão apresentados como a média dos coeficientes estimados ± SEE (erro padrão da estimativa) do Total Ly, Total LyT, LyT, Total CD4, CD4, Total CD8 e CD8 em %. Os valores para os Efeitos aleatórios estão apresentados como a média da variância estimada ± SEE (Total Ly, Total LyT, LyT, Total CD4, CD4, Total CD8 e CD8 em %<sup>2</sup>).

Os efeitos fixos que significativamente predisseram a % Total Ly, % Total LyT, % Total CD4<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>, %Total CD8<sup>+</sup> e %CD8<sup>+</sup> indicam que uma vez que o tempo de medida é controlado (1 minuto prevê 0.4%, 0.1, -0.5, -0.05, -0.6, 0.1 e 0.4, respetivamente) nenhum efeito significativo da participação desportiva (controlos *vs. masters*) foi observado para todas as variáveis. O VO<sub>2max</sub> teve associação independente, significativa e negativa com a % Total Ly (-0.023 ± 0.0010) (Tabela 6.2).

Tabela 6.3 apresenta o modelo de regressão multinível para a % das células T CD4<sup>+</sup> naïve, CM, EM e EMRA. Para os quatro modelos, os efeitos aleatórios são significativos dentro dos indivíduos. A % das células T CD4<sup>+</sup> naïve, CM, EM e EMRA aumenta significativamente a cada minuto de medida dentro dos indivíduos (P<0.05). A matriz de variância entre indivíduos para cada modelo indica que os indivíduos têm curvas significativamente diferentes em termos de seus interceptos (( $\mu_j \times \mu_j$ ); P<0.05), mas não em termos das inclinações de suas linhas (( $v_{xij} \times v_{xij}$ ); P>0.05). Além disso, a variância desses interceptos e *slopes* não está significativamente correlacionada (( $\mu_j \times v_{xij}$ ); P>0.05). A variância entre indivíduos não é, portanto, diferente nos diferentes minutos de medida. Os efeitos fixos que predisseram significativamente a % de células T CD4<sup>+</sup> naïve, CM, EM e EMRA indicam que uma vez que o tempo de medida é controlado (1 minuto prevê -0.01%, -0.4, 0.3 e -0.01, respetivamente), nenhum efeito significativo da participação desportiva (controlos *vs. masters*) foi observado para todas as variáveis. O VO<sub>2max</sub> teve uma associação independente, significativa e positiva com % de células T CD4<sup>+</sup> naïve (0.0599 ± 0.0024).

O modelo de regressão multinível para valores percentuais para as subpopulações de células T CD8 naïve, SLEC, CM, EM e EMRA está apresentado na Tabela 6.4. Para os cinco modelos, os efeitos aleatórios são significativos dentro dos indivíduos, e a % de células T CD8<sup>+</sup> naïve, SLEC, CM, EM e EMRA também aumenta significativamente a cada minuto de medida dentro dos indivíduos (P<0.05), como acontece com as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup>. A matriz de variância entre indivíduos para cada modelo indica que os indivíduos têm curvas significativamente diferentes em termos de seus interceptos (( $\mu_j \times \mu_j$ ); P<0.05), mas não em termos das inclinações de suas linhas (( $v_{xij} \times v_{xij}$ ); P>0.05), com exceção da % de células T CD8<sup>+</sup> SLEC (P>0.05). Além disso, a variância desses interceptos e *slopes* não está significativamente correlacionada (( $\mu_j \times v_{xij}$ ); P>0.05). A variância entre indivíduos não é, portanto, diferente em diferentes minutos de medida, exceto para % de células T CD8<sup>+</sup> SLEC. Os efeitos fixos que predisseram significativamente % de células T CD8<sup>+</sup> naïve, SLEC, CM e

EMRA indicam que uma vez que o tempo de medição é controlado (1 minuto prediz -0.4%, 0.1, -0.3 e 0.5, respetivamente), nenhum efeito significativo da participação desportiva (controlos *vs. masters*) foi observado para todas as variáveis.

Tabela 6.3. Modelos de regressão multinível para as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efetoras-terminais (EMRA).

	%CD4			
	Naïve	CM	EM	EMRA
<b>Efeitos Fixos</b>				
Constante	116.9764±48.9146	50.9481±2.9232	-78.6447±38.3960	1.2080±0.5510
Min de medida	-0.0061±0.0140	-0.4028±0.0789	0.2614±0.0515	-0.0097±0.0073
Min de medida <sup>2</sup>	NS	0.0071±0.0012	-0.0046±0.0008	NS
Idade	NS	NS	0.2820±0.1317	NS
Mulheres <i>vs</i> homens	NS	9.1919±3.2184	-11.8384±3.5127	NS
Controlos <i>vs masters</i>	NS	NS	NS	NS
Estatura	-0.6979±0.3126	NS	NS	NS
Peso corporal	NS	NS	NS	NS
VO <sub>2max</sub>	0.0599±0.0024	NS	NS	NS
<b>Efeitos aleatórios</b>				
<i>Nível 1</i>				
Constante ( $\epsilon_{ij}$ )	10.8009±2.0115	11.6590±3.0609	5.0347±0.9431	6.8678±2.0783
<i>Nível 2</i>				
Constante ( $\mu_j$ )	78.9011±21.7285	65.4753±19.2889	34.9337±9.6265	2.9954±0.5611
Min de medida ( $v_j \bar{x}_{ij}$ )	NS	NS	NS	NS
$\mu_j \times v_j \bar{x}_{ij}$	NS	NS	NS	NS

Abreviaturas: %CD4, % das células T CD4<sup>+</sup>; CM, memória-central; EM, memória-efetora; EMRA, efetoras-terminais; VO<sub>2max</sub>, consumo máximo de oxigénio. Os valores para os Efeitos fixos estão apresentados como a média dos coeficientes estimados ± SEE (erro padrão da estimativa) das subpopulações de Naïve, CM, EM e EMRA em %. Os valores para os Efeitos aleatórios estão apresentados como a média da variância estimada ± SEE (Naïve, CM, EM e EMRA em %<sup>2</sup>).

Tabela 6.4. Modelos de regressão multinível para as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> naïve, memória-central (CM), memória-efetora (EM) e efectoras-terminais (EMRA).

	%CD8				
	Naïve	SLEC	CM	EM	EMRA
<b>Efeitos Fixos</b>					
Constante	59.3528±12.6252	-52.4484±17.0325	36.0371±2.1766	14.2907±1.4504	23.8093±2.9579
Min de medida	-0.4232±0.06554	0.1254±0.0259	-0.2643±0.0707	NS	0.4659±0.0876
Min de medida <sup>2</sup>	0.0074±0.0010	-0.0023±0.0004	0.0052±0.0011	NS	-0.0085±0.0014
Idade	-0.5964±0.2192	0.1840±0.0774	NS	NS	NS
Mulheres vs homens	-8.9289±4.0912	NS	NS	NS	NS
Controlos vs <i>masters</i>	NS	NS	NS	NS	NS
Estatura	NS	0.2856±0.0969	NS	NS	NS
Peso corporal	NS	NS	NS	NS	NS
VO <sub>2max</sub>	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Efeitos aleatórios</b>					
<i>Nível 1</i>					
Constante ( $\epsilon_{ij}$ )	7.6713±1.4370	1.2250±0.3217	9.5113±1.7816	8.3741±1.5687	14.4887±3.8030
<i>Nível 2</i>					
Constante ( $\mu_j$ )	85.4878±23.1379	22.7971±6.1739	128.3961±34.5698	55.5906±15.3509	240.0121±65.5292
Min de medida ( $v_j x_{ij}$ )	NS	0.0007±0.0003	NS	NS	NS
$\mu_j x_j x_{ij}$	NS	-0.1136±0.0410	NS	NS	NS

Abreviaturas: %CD8, % das células T CD8<sup>+</sup>; SLEC, *short-lived EMRAector cell*; CM, memória-central; EM, memória-efetora; EMRA, efectoras-terminais; VO<sub>2max</sub>, consumo máximo de oxigénio.

Os valores para os Efeitos fixos estão apresentados como a média dos coeficientes estimados ± SEE (erro padrão da estimativa) das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> Naïve, SLEC, CM, EM e EMRA em %. Os valores para os Efeitos aleatórios estão apresentados como a média da variância estimada ± SEE (Naïve, SLEC, CM, EM e EMRA em %<sup>2</sup>).

A tabela 6.5 apresenta uma análise comparativa da % das células T e das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> entre o grupo de atletas *master* e o grupo controlo. Além disso, está indicada a % das células T e das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que expressam KLRG1. A % dos linfócitos T e dos compartimentos das células T CD4<sup>+</sup> e das células T CD8<sup>+</sup> não foi diferente entre *masters* e controlos. Em relação as células que expressam KLRG1, a % das células T CD4<sup>+</sup> e das células T CD8<sup>+</sup> senescentes é maior nos controlos em relação aos *masters* (P<0.05).

Tabela 6.5. Valores percentuais de células T, células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> e a percentagem destas células a expressar KLRG1 antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo.

	Pre		Post		1h	
	<i>Masters</i>	Controlo	<i>Masters</i>	Controlo	<i>Masters</i>	Controlo
LyT	66.28 ± 10.45	70.99 ± 6.94	62.46 ± 9.06	66.38 ± 7.66	67.34 ± 12.10	72.16 ± 10.13
KLRG1 <sup>+</sup>	6.58 ± 4.08	9.19 ± 4.92	9.70 ± 5.77	12.23 ± 6.09	8.68 ± 5.33	13.69 ± 7.57
T CD4 <sup>+</sup>	58.66 ± 8.30	58.73 ± 9.68	51.95 ± 10.70	53.15 ± 10.20	60.44 ± 8.53	60.67 ± 9.58
KLRG1 <sup>+</sup>	8.05 ± 5.06	13.49 ± 8.17*	11.35 ± 6.79	17.07 ± 9.80*	7.31 ± 4.97	12.78 ± 6.17*
T CD8 <sup>+</sup>	30.64 ± 8.20	31.93 ± 8.18	35.63 ± 10.24	35.26 ± 8.49	28.37 ± 9.77	30.73 ± 7.14
KLRG1 <sup>+</sup>	25.22 ± 12.94*	36.54 ± 14.91	32.32 ± 15.90	42.63 ± 12.58*	22.14 ± 12.83	37.90 ± 11.80*

Valores são Média ± Desvio Padrão. Controlo (N = 9); *Masters* (N = 19). Pre (antes); Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). \* P<0.05 comparado aos Atletas *master*.

A Tabela 6.6 resume os resultados dos modelos multiníveis para %LyT KLRG1<sup>+</sup> e a % das células T CD4<sup>+</sup> e suas subpopulações que expressam KLRG1 (CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>). Os efeitos aleatórios descrevem os dois níveis de variância, intra-individual (nível 1 da hierarquia) e entre indivíduos (nível 2 da hierarquia). Para os seis modelos, os efeitos aleatórios são significativos dentro dos indivíduos, indicando que a % dos linfócitos T e das células T CD4<sup>+</sup> e suas subpopulações senescentes aumenta significativamente a cada minuto de medida dentro dos indivíduos (P<0.05). A matriz de variância entre indivíduos para cada modelo indica que os indivíduos têm curvas significativamente diferentes em termos de seus interceptos [constante / constante ( $\mu_j \times \mu_j$ ), P<0.05], mas não em termos das inclinações de suas linhas [minuto de medida/minuto de medida ( $v_{xij} \times v_{xij}$ ), P>0.05]. Além disso, a variância desses interceptos e *slopes* não é significativamente correlacionada [constante / idade

( $\mu_j \times v_{xij}$ ),  $P > 0.05$ ]. A variância entre indivíduos não é, portanto, diferente nos diferentes minutos de medida. Os efeitos fixos que significativamente predizem a %LyT/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup> indicam que, uma vez que o tempo de medida é controlado (1 minuto prevê que 0,5%, 0,3, 0,1 e 0,1% respetivamente), atletas *master* tem significativamente menor %LyT/KLRG1<sup>+</sup> (-6.7829 ± 3.0608), %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup> (-5.8145 ± 2.4227), %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup> (-5.3182 ± 2.5761) e %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> (-4.3505 ± 1.9356%) do que os controlos. Entretanto, nenhum efeito significativo da participação no desporto (controlos vs. *masters*) foi observado para a %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>.

Não foi encontrada diferença entre *masters* e controlos na expressão de KLRG1, medida pela intensidade média de fluorescência (MIF) para as subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e subpopulações (%CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>) (Figura 6.2).

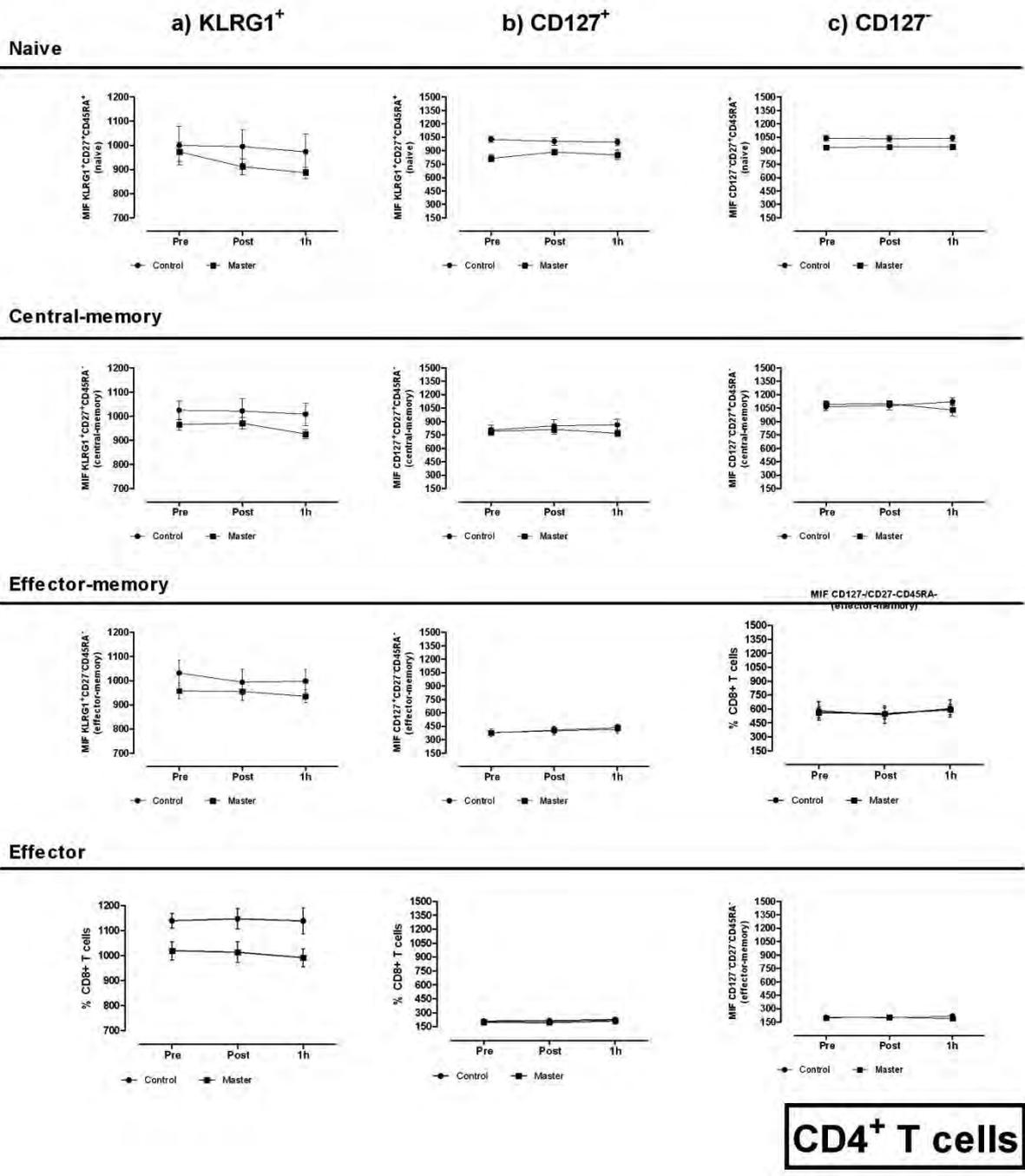
Considerando que a % das células T CD4<sup>+</sup> e subpopulações senescentes (%CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>) aumenta a cada minuto de medida, comparámos os valores médios da % destas células KLRG1<sup>+</sup> nos momentos de medida Pre, Post e 1h utilizando ANOVA para medidas repetidas. Os resultados desta análise estão apresentados na Figura 6.3. As células T CD4<sup>+</sup> senescentes são mobilizadas pelo exercício apenas no grupo de atletas *master*, como mostra o aumento significativo das células T CD4<sup>+</sup> senescentes no momento Post (Figura 6.2e), corroborando os resultados da análise multinível (Tabela 6.6). A % das células T CD4<sup>+</sup> senescentes retorna aos valores de repouso em 1h (Figura 6.2e). Isto demonstra que o aumento significativo da % das células T CD4<sup>+</sup> senescentes a cada minuto de medida apresentado pelo modelo multinível não é uma resposta linear. O modelo indica a não-linearidade dos resultados quando se observam valores negativos para Minuto de medida<sup>2</sup>, correspondente ao momento de medida 1h (Tabela 6.6). Os resultados indicam que a % de células T CD4<sup>+</sup> naïve e MC senescentes não é diferente entre os momentos de medida para os dois grupos. As populações de T CD4<sup>+</sup> EM e EMRA aumentam no Post no grupo de atletas *master* e retornam aos valores basais em 1h. No grupo controlo a única diferença observada foi para a % das células T CD4<sup>+</sup> EM senescentes com os valores obtidos em 1h inferiores àqueles do momento Pre.

Tabela 6.6. Modelos de regressão multinível para %LyT/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>.

	%LyT/KLRG1 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> /KLRG1 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> /naïve/ KLRG1 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> /CM/KLRG1 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> /EM/KLRG 1 <sup>+</sup>	%CD4 <sup>+</sup> /EMRA/KL RG1 <sup>+</sup>
<b>Efeitos fixos</b>						
Constante	23.7922±2.9145	13.8351±2.0220	10.9632±1.9997	8.8069±1.5148	NS	NS
Mínuto de medida (Post)	0.4936±0.0856	0.3158±0.0583	0.1216±0.0496	0.1227±0.0507	0.4557±0.1047	0.3514±0.1577
Mínuto de medida <sup>2</sup> (1h)	-0.0090±0.0013	-0.0055±0.0009	-0.0019±0.0008	-0.0022±0.0008	-0.0087±0.0016	-0.0076±0.0028
Idade	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Controlos <i>vs</i> <i>masters</i>	-6.7829±3.0608	-5.8145±2.4227	-5.3182±2.5761	-4.3505±1.9356	NS	NS
VO <sub>2max</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Efeitos aleatórios</b>						
<i>Level 1</i>						
Constante ( $\epsilon_{ij}$ )	14.0597±2.6338	6.0097±1.1357	3.5199±0.7511	3.6377±0.7756	18.3809±3.6048	34.3770±12.1479
<i>Level 2</i>						
Constante ( $\mu_j$ )	69.5709±19.5392	33.8227±9.5824	34.0991±10.6367	18.6913±6.0067	183.2635±52.5409	349.0878±131.5839
Mínuto de medida ( $v_{p,ij}$ )	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\mu_j \times v_{p,ij}$	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Abreviaturas: %LyT, % de linfócitos T dentro da população total de Ly; %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD4<sup>+</sup> que expressam KLRG1, %CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD4<sup>+</sup> naïve que expressam KLRG, %CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD4<sup>+</sup> CM que expressam KLRG1, %CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD4<sup>+</sup> EM que expressam KLRG1, %CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD4<sup>+</sup> EMRA que expressam KLRG1. CM, memória-central; EM, memória-efetora; EMRA, efectoras-terminais; VO<sub>2max</sub>, consumo máximo de oxigénio.

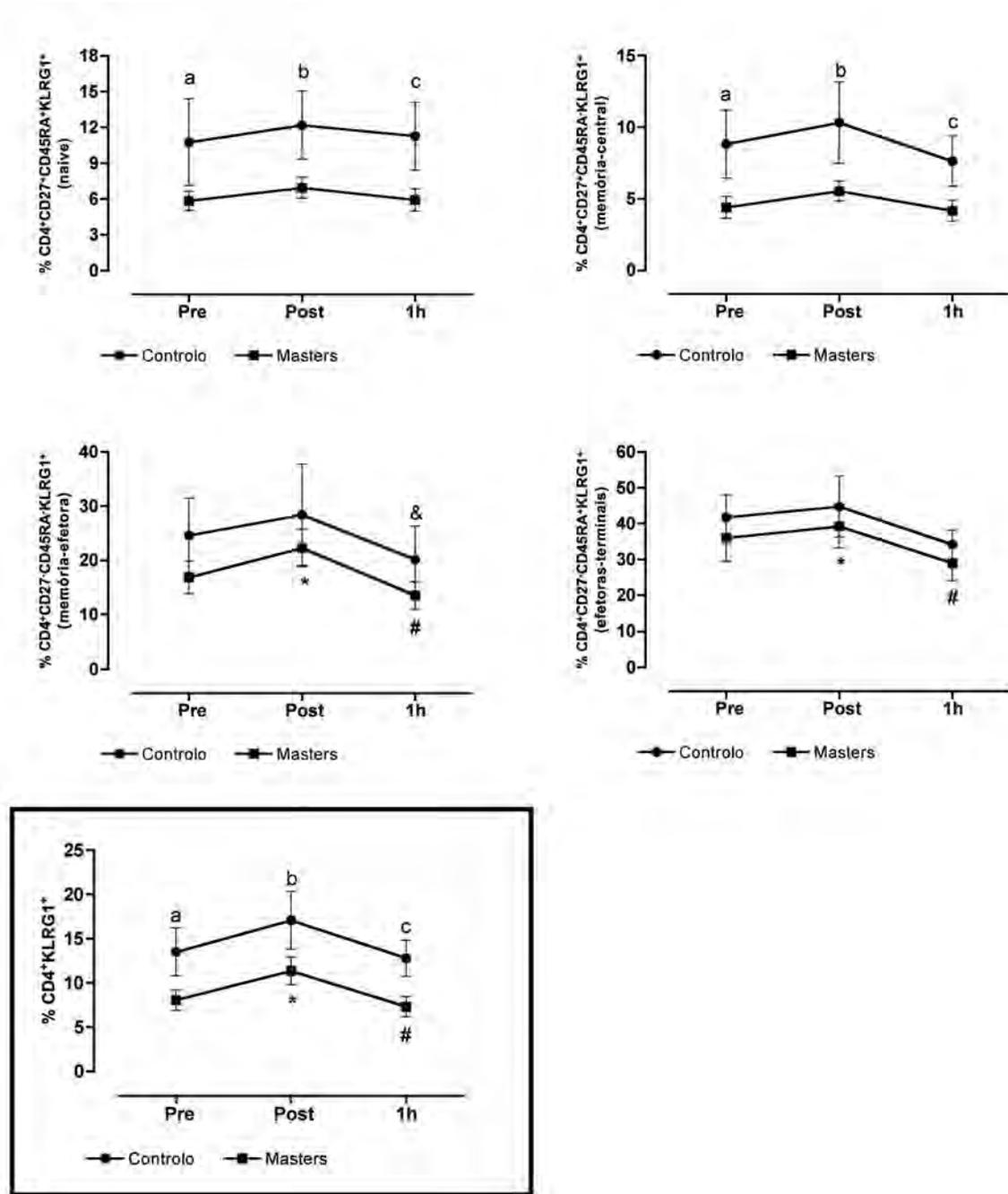
Os valores para os Efeitos fixos estão apresentados como a média dos coeficientes estimados ± SEE (erro padrão da estimativa) de LyT/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> em %. Os valores para os Efeitos aleatórios estão apresentados como a média da variância estimada ± SEE (LyT/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> em %<sup>2</sup>).



**CD4<sup>+</sup> T cells**

**Figura 6.2:** Intensidade média de fluorescência (MIF) de KLRG1 nas células T CD4<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>, e dentro destas nas CD127<sup>+</sup> e CD127<sup>-</sup>, antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controle e atletas *master*.

Os valores estão apresentados como a média ± desvio padrão. A coluna A indica a MIF das células KLRG1<sup>+</sup>; A coluna B indica a MIF das células CD127<sup>+</sup>; A coluna C indica os resultados das células CD127<sup>-</sup>. Pre (antes); Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). Controle (N = 9); *Masters* (N = 19).



**Figura 6.3: Resultados para a percentagem de células T CD4<sup>+</sup>, naïve, memória-central, memória-efetora e efetoras-terminais que expressam o marcador de senescência KLRG1, antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controlo e atletas *master*.**

Os valores estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. a  $P < 0.05$  em comparação com os atletas *master* no momento Pre. b  $P < 0.05$  em comparação com os atletas *master* no momento Post. c  $P < 0.05$  em comparação com os atletas *master* no momento 1h. \*  $P < 0.05$  Post comparado com o momento Pre. #  $P < 0.05$  1h comparado com o momento Post. &  $P < 0.05$  1h comparado com o momento Pre. Abreviaturas: %CD4<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD4<sup>+</sup> que expressam KLRG1. Pre (antes), Post (10 min pós-exercício), 1h (1 h pós-exercício). Controlo (N = 9); *Masters* (N = 19).

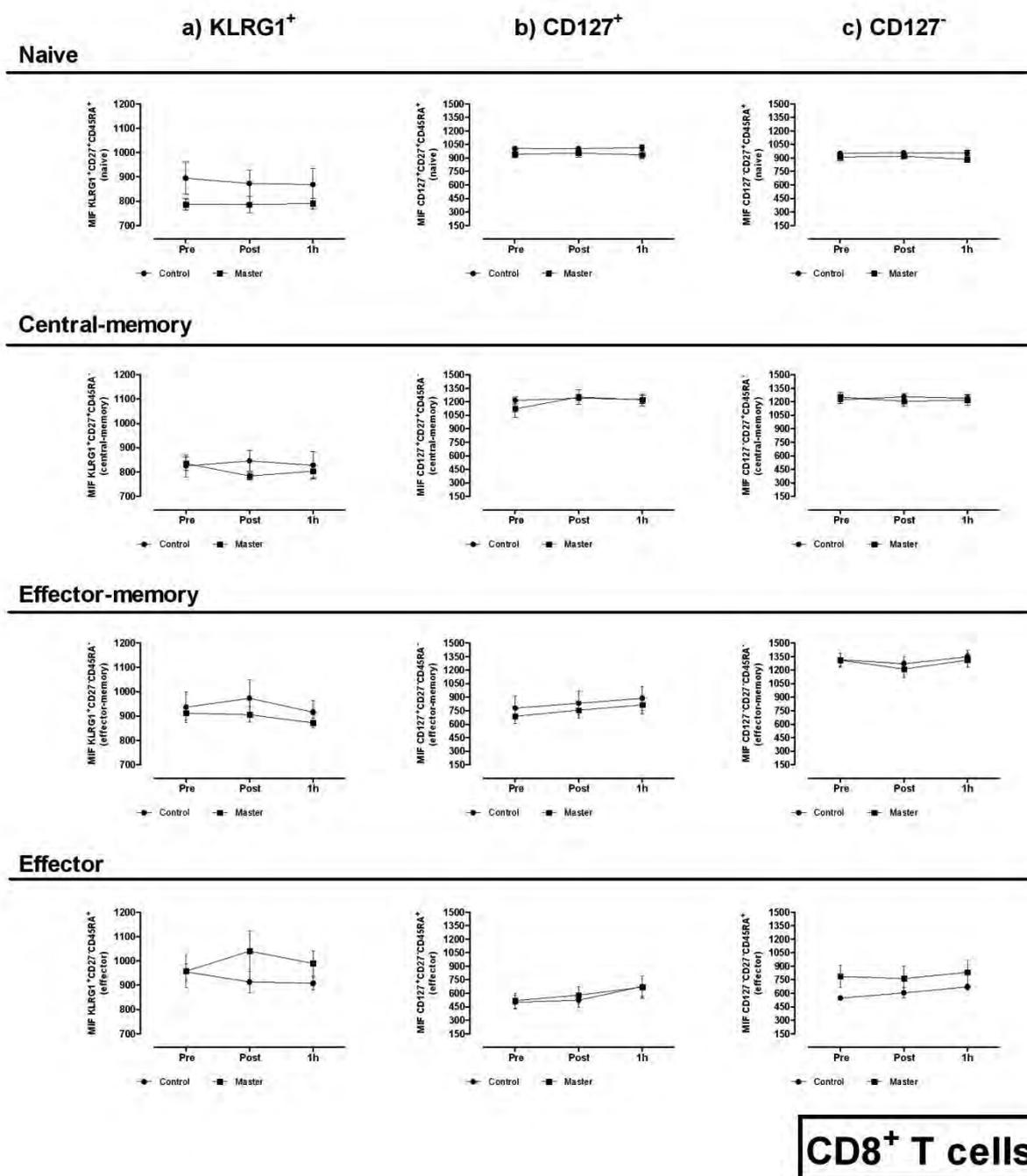
A Tabela 6.7 resume os resultados do modelo multinível para a % de células T CD8<sup>+</sup> e subpopulações senescentes. Os efeitos aleatórios são significativos dentro dos indivíduos, indicando que a % de células T CD8<sup>+</sup> e subpopulações senescentes aumenta significativamente a cada minuto de medida dentro dos indivíduos (P<0.05). A matriz de variância entre indivíduos para cada modelo indica que os indivíduos têm curvas significativamente diferentes em termos de seus interceptos [constante / constante ( $\mu_j \times \mu_j$ ), P<0.05], mas não em termos das inclinações de suas retas [minuto de medida / minuto de medida ( $v_{xij} \times v_{xij}$ ), P>0.05]. Além disso, a variância desses interceptos e *slopes* não é significativamente correlacionada [constante / idade ( $\mu_j \times v_{xij}$ ), P>0.05]. A variância entre indivíduos não é, portanto, diferente nos diferentes minutos de medida. Os efeitos fixos que predizem significativamente a %CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/SLEC/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e %CD8<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> indicam que uma vez que o tempo de medida é controlado (1 minuto prevê 0.7, 0.1, 0.7, 0.6 e 0.5 e 0.3 respectivamente), os atletas *master* apresentam menor %CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup> (-13.0661 ± 4.9568), %CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup> (-9.3624 ± 2.0992), %CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup> (-7.0282 ± 3.0654) e %CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> (-12.0034 ± 5.4968) do que os controles. Não foi encontrada nenhuma diferença entre atletas *master* e controles na expressão de KLRG1 dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e subpopulações senescentes (Figura 6.4).

Os resultados que estão apresentados na Figura 6.5 mostram que a % das células T CD8<sup>+</sup> senescentes é mobilizada pelo exercício e retorna ao valores pré-exercício em 1h após o final do teste, no grupo de atletas *master*. A % de células T CD8<sup>+</sup> e a % das células T CD8<sup>+</sup> SLEC, CM, EM senescentes é mobilizada pelo exercício no grupo de atletas *master*. Para todos os grupos celulares os valores retornam ao basal em 1h após o término do exercício. No grupo controle, apenas a % de células T CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup> aumentou no momento Post e os valores mantiveram-se elevados em comparação ao momento Pre, 1h após o término do teste. A % das células T CD8<sup>+</sup> EMRA senescentes não aumenta no momento Post mas diminui em 1h para valores abaixo daqueles observados no momento Post e do momento Pre, no grupo de atletas *master* (P<0.05).

Tabela 6.7. Modelos de regressão multinível para %CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/SLEC/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup>, %CD8<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>.

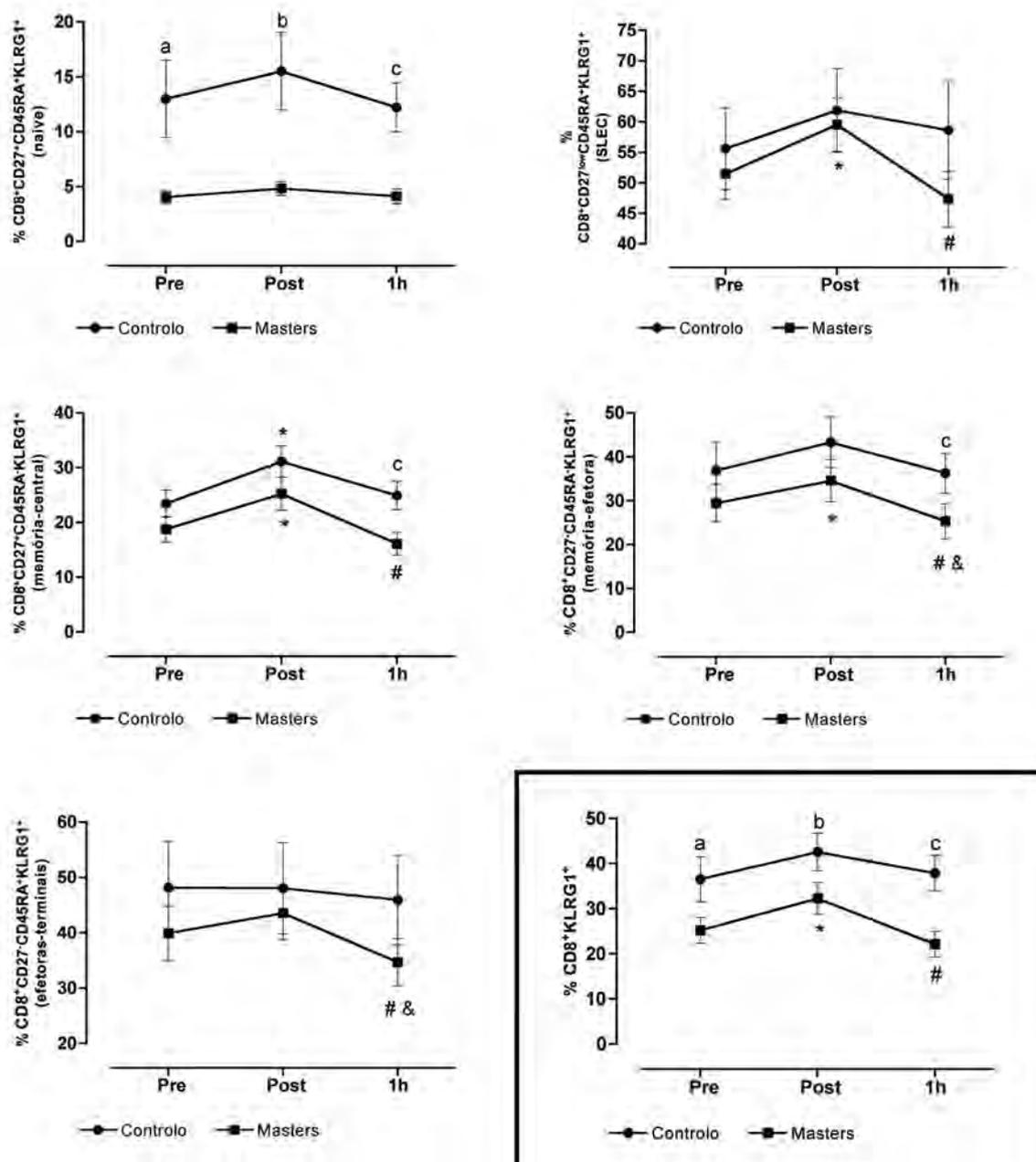
	%CD8 <sup>+</sup> /KLRG1 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> /naïve/ KLRG1 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> /SLEC/ KLRG1 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> /CM/KLRG1 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> /EM/KLRG1 <sup>+</sup>	%CD8 <sup>+</sup> /EMRA/KLRG1 <sup>+</sup>
<b>Efeitos fixos</b>						
Constante	NS	15.8408±7.023	53.0178±3.6679	25.4383±3.3874	40.3917±5.7790	42.8580±4.2705
Minuto de medida	0.6729±0.1108	0.1058±0.0538	0.6824±0.1846	0.6063±0.0877	0.4867±0.1173	0.2627±0.1247
Minuto de medida <sup>2</sup>	-0.0117±0.0017	-0.0019±0.0008	-0.0120±0.0029	-0.0106±0.0014	-0.0091±0.0018	-0.0056±0.0019
Idade	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Controlos vs. <i>masters</i>	-13.0661±4.9568	-9.3624±2.0992	NS	-7.0282±3.0654	-12.0034±5.4968	NS
VO <sub>2max</sub>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Efeitos aleatórios</b>						
<i>Level 1</i>						
Constante ( $\epsilon_{ij}$ )	23.3417±4.3484	5.3239±1.0110	64.9409±12.1082	14.3256±2.7075	26.0568±6.8358	27.2463±7.4122
<i>Level 2</i>						
Constante ( $\mu_j$ )	114.6349±40.0272	25.0755±7.1753	328.8600±92.0476	85.0265±24.0171	344.0468±94.86575	466.6415±131.9003
Minuto de medida ( $v_j \times_{ij}$ )	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\mu_j \times v_j \times_{ij}$	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Abreviaturas: %CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> que expressam KLRG1, %CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> naïve que expressam KLRG1, %CD8<sup>+</sup>/SLEC/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> SLEC que expressam KLRG1, %CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> CM que expressam KLRG1, %CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> EM que expressam KLRG1, %CD8<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> EMRA que expressam KLRG1. Os valores para os Efeitos fixos estão apresentados como a média dos coeficientes estimados ± SEE (erro padrão da estimativa) de CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/SLEC/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> em %. Os valores para os Efeitos aleatórios estão apresentados como a média da variância estimada ± SEE (CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/SLEC/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup> em %<sup>2</sup>).



**Figura 6.4:** Intensidade média de fluorescência (MIF) de KLRG1 nas células T CD8<sup>+</sup>/naïve/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/CM/KLRG1<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>/EM/KLRG1<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>/EMRA/KLRG1<sup>+</sup>, e dentro destas nas CD127<sup>+</sup> e CD127<sup>-</sup>, antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controle e atletas *master*.

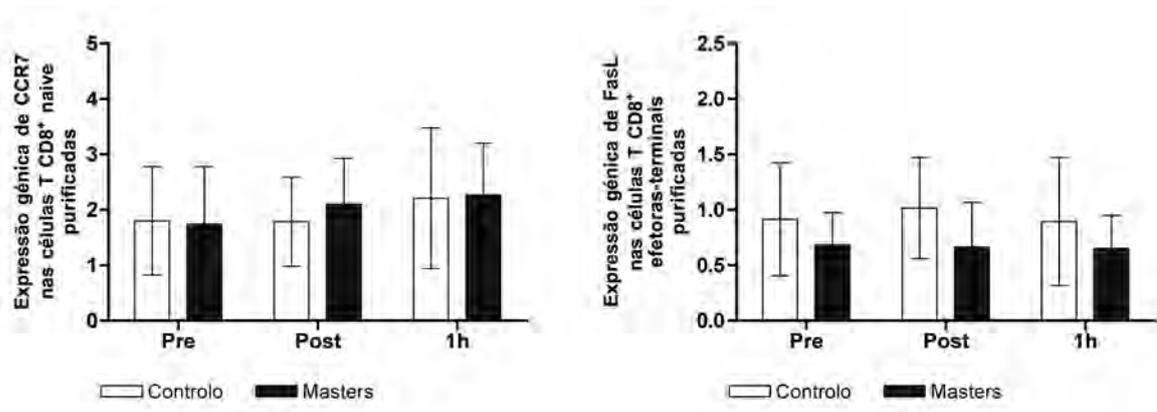
Os valores estão apresentados como a média ± desvio padrão. A coluna A indica a MIF das células KLRG1<sup>+</sup>; A coluna B indica a MIF das células CD127<sup>+</sup>; A coluna C indica os resultados das células CD127<sup>-</sup>. Pre (antes); Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). Controlo (N = 9); *Masters* (N = 19).



**Figura 6.5: Resultados para a % de células T CD8<sup>+</sup>, naïve, SLEC, memória-central, memória-efetora e efetoras-terminais que expressam o marcador de senescência KLRG1, antes e em resposta a um protocolo de esforço máximo para os grupos controlo e atletas *master*.**

Os valores estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. a  $P < 0.05$  em comparação com os atletas *master* no momento Pre. b  $P < 0.05$  em comparação com os atletas *master* no momento Post. c  $P < 0.05$  em comparação com os atletas *master* no momento 1h. \*  $P < 0.05$  Post comparado com o momento Pre. #  $P < 0.05$  1h comparado com o momento Post. &  $P < 0.05$  1h comparado com o momento Pre. Abreviaturas: %CD8<sup>+</sup>/KLRG1<sup>+</sup> = % de células T CD8<sup>+</sup> que expressam KLRG1. SLEC: *short-lived effector cells*. Pre (antes); Post (10 min pós-exercício) e 1h (1 h pós-exercício). Controlo (N = 9); *Masters* (N = 19).

A expressão do mRNA do gene CCR7 para as células T CD8<sup>+</sup> naïve e do gene FasL para as células T CD8<sup>+</sup> EMRA não foi diferente entre *masters* e controlos. A expressão dos genes também não sofreu alteração em resposta ao teste de esforço máximo (Figura 6.6).



**Figura 6.6.** Efeito do exercício agudo sobre expressão dos genes CCR7 em células T CD8<sup>+</sup> naïve (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>) e FASL em T CD8<sup>+</sup> EMRA (CD8<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) purificadas.

Os dados são apresentados como média  $\pm$  SD. Pre (antes), Post (10 min pós-exercício), 1h (1 h pós-exercício). Controlo (N = 9); *Masters* (N = 19).

#### 6.4 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treino ao longo da vida sobre a senescência e mobilização de linfócitos T em resposta ao exercício agudo. A hipótese do aumento da frequência das células T terminalmente diferenciadas no sangue após o exercício agudo sugere que a mobilização seletiva e morte destas células pelo exercício agudo e regular poderia eventualmente permitir que as células T naïve ocupassem o espaço imune vago e aumentassem o repertório de células T (Simpson, Cosgrove, Chee, *et al.*, 2010). A análise desta teoria em atletas *master* é original e foi testada neste estudo.

Os resultados indicam que a % das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e suas subpopulações não são diferentes entre atletas *master* e controlos em todos os momentos de medida (Tabelas 6.3, 6.4 e 6.5). A idade mostrou ter efeito negativo na % de células T CD8<sup>+</sup> naïve e positivo na % de células T CD8<sup>+</sup> SLEC. O VO<sub>2max</sub> influencia negativamente a %Total de linfócitos e

positivamente a proporção de células T CD4<sup>+</sup> naïve. Diferenças entre *masters* e controles, sugerindo efeitos do treino ao longo da vida, foram observadas para as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> naïve e CM senescentes e para as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> naïve, CM e EM senescentes. Em ambos os conjuntos, a % das células EMRA senescentes não foi diferente entre as condições.

Em geral, tanto em ratinhos como em humanos, há uma redução gradual do número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> naïve com o envelhecimento, uma consequência da diminuição da produção destas células pelo timo. Apesar desse decréscimo na produção tímica da puberdade à velhice, sabe-se que os seres humanos têm uma capacidade notável de manter números de linfócitos relativamente constantes ao longo de muitas décadas, através da proliferação homeostática de células T periféricas em adultos saudáveis (Appay & Sauce, 2014). No entanto, existem diferenças importantes entre as populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Foi demonstrado, em idosos, que a baixa funcionalidade do timo mostra uma produção de timócitos tendenciosa para as células T CD4<sup>+</sup> (Ferrando-Martínez, Ruiz-Mateos, Hernández, *et al.*, 2011). De fato, no estudo de Ferrando-Martínez todos os sujeitos com uma função tímica muito baixa, definida pela percentagem de timócitos duplos positivos inferiores a 10%, apresentaram rácios CD4/CD8 superiores a dois. Isso sugere uma desregulação da homeostasia, afetando principalmente o subgrupo de células T CD8<sup>+</sup> naïve. As células T CD8<sup>+</sup> sofrem uma grande expansão após a ativação e podem estabelecer um conjunto estável de células de memória altamente diferenciadas em repouso. Ao contrário, a capacidade das células T CD4<sup>+</sup> expandirem e sobreviverem parece ser menor, de modo que a grande maioria das células T CD4<sup>+</sup> ativadas pode sofrer apoptose rapidamente. Mais ainda, o conjunto total de células T CD4<sup>+</sup> parece ter menos tendência para a diferenciação tardia em comparação com os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Appay & Sauce, 2014). Observámos uma influência negativa da idade nas células T CD8<sup>+</sup> naïve, e um efeito positivo do VO<sub>2max</sub> em relação as células T CD4<sup>+</sup> naïve. Isto sugere que o efeito da idade é superior ao efeito do treino nas células T CD8<sup>+</sup> naïve, enquanto indivíduos com uma melhor condição física, que apresentem valores mais altos de VO<sub>2max</sub>, tendem a apresentar um número maior de células T CD4<sup>+</sup> naïve (Tabela 6.2).

Os resultados mostram um efeito positivo da idade nas células T CD8<sup>+</sup> SLEC. As células T CD8<sup>+</sup> SLEC são células que ainda expressam CD45RA mas perdem a expressão de CD27 (Figura 6.1e) e têm alta expressão de KLRG1 (Figura 6.3). Quando visualizadas por APS (Separador Automático de Populações) mostravam ser uma população distinta das células naïve

(Figura 6.1f). Classificámos estas células com base na definição encontrada na literatura para as células SLEC (do inglês *short-lived effector cells*), células efetoras de vida curta. Yuzefpolskiy e colegas viram que células com alta expressão de KLRG1 (KLRG1<sup>hi</sup>) representam a população SLEC. Além disso, parece que as células SLEC têm localização preferencial em locais não-linfoides, sugerindo que estas encontram continuamente antigénios em locais periféricos, passando assim por um processo de diferenciação terminal (Yuzefpolskiy, Baumann, Kalia, *et al.*, 2014). Sugerimos que estudos futuros abordem metodologias para uma melhor caracterização desta população.

Têm sido observadas alterações na expressão génica em vários genes no compartimento naíve das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Mirza *et al.*, 2011). Neste sentido, fomos quantificar a expressão de mRNA de CCR7 nas células T CD8<sup>+</sup> naíve. Os resultados não foram diferentes entre *masters* e controlos. Esta expressão também não foi modificada pelo teste de esforço (Figura 6.5). O CCR7 participa tanto da regulação do tráfico quanto do *homing* de leucócitos para os nódulos linfáticos (Förster, Davalos-Misslitz & Rot, 2008). As células T tornam-se progressivamente diferenciadas, sofrendo perda das moléculas de superfície, inicialmente o CD45RA sofre uma regulação negativa, seguida da perda de expressão de CCR7 e finalmente uma diminuição da expressão de CD28 e de CD27 (Reinke, Geissler, Taylor, *et al.*, 2013).

Apesar do exercício induzir leucocitose, a resposta dos principais subtipos de leucócitos não é uniforme. Segundo Simpson e colegas (2015) há 3 principais características que são compartilhadas por todos os subconjuntos de leucócitos que são preferencialmente redistribuídos após uma única sessão de exercício, nomeadamente: 1) as células mobilizadas pelo exercício tendem a ter uma função citotóxica/efetora aumentada e possuem um fenótipo maduro/diferenciado; 2) estas células redistribuídas com o exercício tendem a apresentar fenótipos associados à migração tecidual; 3) os subtipos de leucócitos que são preferencialmente redistribuídos com exercício apresentam alta expressão dos recetores adrenérgicos ( $\beta$ 2-ARS) e dos recetores de glucocorticoides, e são, portanto, altamente sensíveis às catecolaminas e ao cortisol (Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015). Isto é um fator importante a ser considerado, uma vez que, o envelhecimento está associado a profundos declínios da imunidade e que os indivíduos mais velhos (> 50 anos) têm uma capacidade diminuída para redistribuir certos subtipos de leucócitos em resposta a uma única sessão de exercício (Spielmann, Bollard, Bigley, *et al.*, 2014). Spielmann e colegas (2014) mostraram que este

efeito se deve a uma mobilização mais baixa de células naïve, possivelmente devido à redução na saída destas células do timo.

Assim, as células T senescentes acumulam-se com a idade, reduzindo o repertório de células T naïve e aumentando o risco de infecção no hospedeiro. Como esta resposta é suscetível de ser influenciada por certos fatores de estilo de vida, examinámos a associação entre a aptidão aeróbia ( $VO_{2max}$ ) e a acumulação de células T senescentes relacionada com a idade. Verificámos que o  $VO_{2max}$  (e a idade) não exerce efeito (interação) em nenhuma das subpopulações de células  $KLRG1^+$  o que contraria estudos anteriores (Spielmann, McFarlin, O'Connor, *et al.*, 2011). Os linfócitos T senescentes são células que já entraram em contacto com o antigénio, que expressam o recetor  $KLRG1$  e/ou  $CD57$ , que não expandem clonalmente após reestimulação antigénica e prevalecem no sangue de adultos mais velhos. No nosso estudo, os atletas *master* apresentaram valores de capacidade aeróbia maiores em relação aos controlos, e tinham valores mais baixos de subpopulações das células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  senescentes em comparação com os controlos. A exceção foi observada para as células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  efectoras-terminais senescentes. Isto sugere que repetições do exercício ao longo da vida evitam o acumular destas células, corroborando a teoria do espaço-imune proposta por Simpson (Simpson, 2011b). Portanto, postulámos que a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbia durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir o acumular de células T senescentes, realçando os efeitos benéficos da manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo no sistema imunológico de indivíduos adultos. Se for possível manter um número adequado de células T naïve, o sistema imune será mais capaz de reconhecer e responder a novos agentes patogénicos (Spielmann, McFarlin, O'Connor, *et al.*, 2011).

A teoria do espaço-imune indica que a criação do espaço-imune é feita pela mobilização de células senescentes ou terminalmente diferenciadas pelo exercício e morte por apoptose em decorrência dos sinais apoptóticos produzidos pelo exercício. Avaliámos um marcador de apoptose nas células efectoras-terminais e verificámos que a expressão génica de FasL nestas células não foi diferente entre os grupos e entre os momentos de medida. Fas e FasL são duas moléculas envolvidas na regulação da morte celular, e a sua interação leva à apoptose de timócitos que não conseguem rearranjar corretamente os genes do TCR e dos que reconhecem auto-antigénios, um processo chamado de seleção negativa.

Além disso, a interação Fas-FasL conduz à morte celular induzida por ativação, uma forma de apoptose por estimulação repetida do TCR, responsável pela deleção periférica de células T ativadas (Volpe, Sambucci, Battistini, *et al.*, 2016). Uma vez que a expressão gênica do FasL não foi diferente entre os grupos, é possível que marcadores de *homing* celular estejam envolvidos (Krüger & Mooren, 2007). Sugerimos que futuramente os investigadores façam a determinação de marcadores de *homing* celular e outros marcadores de apoptose como a caspase-3 e anti-apoptóticos como a Bcl-2, para refutar ou corroborar esta hipótese. Os resultados de um estudo similar ao nosso, mostraram que nos atletas (65-85 anos) que realizavam treino intenso, ocorria uma menor apoptose de células T CD45RO<sup>+</sup> e CD45RA<sup>+</sup> do que atletas com rotina de treino moderado ou pessoas não treinadas, uma vez que essas células apresentavam uma elevada expressão de Bcl-2 e baixa de caspase-3 (Silva, de Araújo, Fernandes, *et al.*, 2016). Portanto, é necessário determinar que mecanismos são responsáveis pelo menor número de células senescentes em atletas *master* adultos e se essa resposta é mantida em atletas *master* idosos. Sugerimos que estudos futuros sejam capazes de determinar o comprimento de telômeros nas células T naïve e de memória, a expressão da IL-7 que é produzida pelo músculo esquelético e que regula a expressão da Bcl-2, o que poderia explicar porque os atletas estariam protegidos da apoptose espontânea das células T (Silva, de Araújo, Fernandes, *et al.*, 2016).

## 6.5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo parecem mostrar que atletas *master* possuem valores semelhantes de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e suas subpopulações em comparação com indivíduos da mesma idade, mas não treinados. As células T senescentes são mobilizadas pelo exercício agudo, mas a distribuição das diferentes populações celulares estudadas continua semelhante entre os grupos. A idade mostrou ter efeito negativo na subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> naïve e positivo para as células T CD8<sup>+</sup> SLEC, enquanto o VO<sub>2max</sub> influenciou positivamente a proporção de células T CD4<sup>+</sup> naïve. O treino ao longo da vida diminuiu a percentagem das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> naïve, CM e EM senescentes e das células T CD4<sup>+</sup> naïve e CM senescentes. Em ambas subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, a percentagem de células efetoras-terminais senescentes foi diferente entre os atletas *master* e os controles. Isso sugere

que repetições do exercício ao longo da vida provocam a morte dessas células e corroboram a teoria do espaço-imune proposta por Simpson (Simpson, 2011b). Além disso, postulámos que a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbia durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir a acumulação de células T senescentes, realçando os efeitos benéficos da manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo no sistema imunológico de indivíduos adultos.

## **7. ESTUDO 4: RESPOSTAS DE MARCADORES FISIOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS E SALIVARES DURANTE UMA ÉPOCA DESPORTIVA EM ATLETAS *MASTER*.**

### **Resumo:**

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de uma época de treino sobre mudanças fisiológicas, hematológicas e de marcadores salivares em atletas *master*.

**Métodos:** nove homens e mulheres atletas *master* fizeram parte da amostra deste estudo. Os atletas foram avaliados no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da época desportiva (M2). As variáveis incluídas foram o  $VO_{2max}$ , variáveis antropométricas, variáveis funcionais e marcadores salivares.

**Resultados:** os atletas apresentaram redução na percentagem de gordura e aumento da massa livre de gordura ao final da época desportiva. Os valores do  $VO_{2max}$  foram semelhantes (valores relativos e absolutos) no início e no final da época desportiva. O mesmo foi observado para o tempo total do teste de esforço realizado e a percepção subjetiva do esforço obtida ao final da realização do teste. Interessantemente, os resultados obtidos para  $FC_{max}$  e  $Lac_{max}$  em M2 foram menores daqueles alcançados em M1 ( $P= 0.013$  e  $P= 0.047$ , respetivamente). Não foram observadas diferenças nos níveis de IgA e cortisol entre os momentos M1 e M2, enquanto os valores para as concentrações de testosterona foram significativamente menores em M2.

**Conclusão:** os resultados do presente estudo sugerem que a manutenção do treino regular ao longo de uma época desportiva é capaz de provocar mudanças benéficas na composição corporal, e efeitos positivos sobre variáveis fisiológicas, nomeadamente no decréscimo da  $FC_{max}$  e  $Lac_{max}$  para atingir o mesmo patamar de um teste de esforço máximo. Os atletas apresentam, no entanto, pequenos sinais de fadiga acumulada ao longo de uma época de treino e competição, tais como a diminuição dos níveis de testosterona salivar e a redução do rácio T/C.

**Palavras-chave:** IgA; Cortisol; Testosterona;  $VO_{2max}$ ; Atletas *master*; Composição corporal.

## 7.1 INTRODUÇÃO

O treino físico pode influenciar a função imunológica, saúde e desempenho. O exercício extenuante e prolongado tem sido associado a uma depressão transitória da função imune (Gleeson & Bishop, 2005; Gleeson, 2007) e uma programação pesada de treino e competição podem levar à deficiência imunológica em atletas (Gleeson, Bishop, Oliveira, *et al.*, 2012). Além disso, outros fatores, incluindo estilo de vida, stresse e estado nutricional, podem influenciar a função imune de um atleta, e conseqüentemente afetando a sua performance (Gleeson & Bishop, 2013). A saliva contém células e compostos de origem local e não local, incluindo diversas hormonas esteroides, proteínas/peptídeos e hormonas não esteroides. O ambiente de prática desportiva e a disponibilidade dos atletas, juntamente com as características moleculares das hormonas na saliva e os efeitos dos exercícios físicos, confirmam a utilização deste fluido corporal como uma alternativa ao soro (Gatti & De Palo, 2011) para a análise bioquímica de marcadores de fadiga. De interesse para este estudo são as concentrações de IgA, cortisol e testosterona livres na saliva. A concentração salivar de IgA está associada e pode prever ITRS em atletas de elite (Neville, Gleeson & Folland, 2008; Trochimiak & Hübner-Woźniak, 2012; Gleeson, Bishop, Oliveira, *et al.*, 2012). A testosterona salivar reflete a fração livre da hormona esteroide bio disponível encontrada na corrente sanguínea (Hayes, Grace, Baker, *et al.*, 2015). Níveis elevados de testosterona livre podem indicar um melhor "status de bioatividade" da hormona no sangue dos atletas *master* (Hayes, Grace, Sculthorpe, *et al.*, 2013), enquanto baixas doses de testosterona são indicadores de fadiga (Gatti & De Palo, 2011). O cortisol é uma hormona esteroide e um membro importante da família dos glucocorticoides. Ele é segregado a partir do córtex adrenal, através do eixo hipotálamo-pituitário-supra-renal (HPA) e aumenta em resposta ao stresse, incluindo o esforço físico (Papacosta & Nassis, 2011). O cortisol é considerado a principal hormona responsável por processos catabólicos, uma vez que reduz a síntese de proteínas, aumenta a degradação proteica e inibe o processo inflamatório e a imunidade (Hayes, Grace, Baker, *et al.*, 2015). O monitoramento do cortisol no desporto pode ser usado como marcador da resposta ao esforço físico (Papacosta & Nassis, 2011). Assim, a avaliação do equilíbrio entre testosterona e cortisol pode oferecer um bom preditor aos processos metabólicos envolvidos durante o exercício. O rácio testosterona/cortisol (T/C) foi utilizado como indicação do balanço anabólico/catabólico (Urhausen, Gabriel & Kindermann, 1995) e como marcador bioquímico de recuperação e sobrecarga incompletas (Banfi, Marinelli, Roi, *et al.*, 1993; Vervoorn, Vermulst, Boelens-Quist, *et al.*, 1992). O rácio diminui em relação

à intensidade e duração do exercício físico, bem como durante períodos de treino intenso ou competição repetitiva, e pode ser revertido por medidas regenerativas (Urhausen, Gabriel & Kindermann, 1995).

As mudanças na contagem de sangue vermelho contribuem para melhorias no  $VO_{2max}$  com o treino físico, evidenciado pelo fato de que os atletas treinados em resistência têm maiores volumes de sangue e valores  $VO_{2max}$  do que os controles sedentários (Krip, Gledhill, Jamnik, *et al.*, 1997). Enquanto isso, uma contribuição indireta no desempenho dos atletas poderia ser mediada pelos glóbulos brancos, o que ajuda o corpo a lutar contra a infecção (Horn, Pyne, Hopkins, *et al.*, 2010). A influência do exercício regular no envelhecimento nesses parâmetros pode explicar como uma época desportiva afeta as respostas hematopoiéticas e imunes. Por isso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de uma época de treino sobre mudanças fisiológicas, hematológicas e de marcadores salivares em atletas *master*. Para atingir este objetivo este estudo incluiu:

- Quantificar a intensidade do treino e o tempo despendido em sessões de treino auto-reportadas por atletas durante uma época desportiva;
- Comparar os parâmetros fisiológicos e hematológicos obtidos a um protocolo de esforço máximo no início e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da época desportiva.
- Determinar as concentrações salivares de IgA, testosterona e cortisol medidas em repouso e avaliar possíveis mudanças nestes parâmetros após uma época desportiva.

## 7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nove indivíduos (homens,  $N = 8$ ; mulheres,  $N = 1$ ) fizeram parte da amostra deste estudo. Os atletas estavam envolvidos nos desportos de atletismo, natação e judo. A participação dos indivíduos foi voluntária, sendo proporcional e em referência a modalidade praticada, do número total de atletas avaliados nos estudos anteriores. Os atletas foram avaliados no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da época desportiva (M2) (Tabela 7.1). O tempo de duração média entre M1 e M2 foi de  $7.00 \pm 0.82$  meses. As características de todos os atletas em cada momento (M1 e M2) estão descritas na tabela 7.1.

Tabela 7.1. Caracterização da amostra.

	<b>M1</b>	<b>M2</b>
Idade (anos)	55.8 ± 9.46	56.4 ± 9.54
Estatura (cm)	171.5 ± 5.86	171.5 ± 5.86
Peso corporal (kg)	81.6 ± 17.67	79.89 ± 15.14
IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	27.6 ± 5.13	27.0 ± 4.17
% MG (%)	26.0 ± 12.64	23.3 ± 10.22*
MLG (kg)	59.3 ± 10.69	60.9 ± 11.05*

Valores são Média ± desvio padrão (SD). N= 09. Abreviaturas: IMC= Índice de Massa Corporal. \* P<0.05 comparado a M1.

As medidas antropométricas, o protocolo de teste de esforço e as recolhas de saliva e da amostra de sangue foram executados seguindo todos os procedimentos previamente descritos (Seção Materiais e Métodos). Os testes foram realizados no momento M1 e repetidos no momento M2. A padronização dos protocolos e das condições laboratoriais foram rigorosamente controladas e o máximo de esforço possível foi feito para que as duas situações de medida fossem as mais similares possíveis. Isto evitaria uma possível influência de diferentes métodos de recolha nos resultados, permitindo uma comparação segura entre os dois momentos.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS software pacote estatístico versão 23 para Mac (Chicago, IL, EUA). Pressupostos de homogeneidade foram verificados. Os efeitos agudos do exercício (Pre, Post e 1h) sobre parâmetros antropométricos, funcionais e hematológicos e nas concentrações salivares de IgA, cortisol e testosterona foram testados usando ANOVA de medidas repetidas para dados distribuídos normalmente ou pelo teste de *Friedman* para dados que não tinham distribuição normal. Efeitos significativos para os testes ANOVA ou *Friedman* foram analisados usando testes t de pares com correção de *Bonferroni* para detetar diferenças pontuais entre as medidas Pre, Post e 1h. Os efeitos da época de treino (M2 vs. M1) sobre as variáveis acima apontadas foram testadas usando test t de amostras pareadas. A significância estatística foi aceita em p <0,05. Os gráficos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

### 7.3 RESULTADOS

A rotina de treino dos atletas *master* durante a época desportiva está apresentada na Tabela 7.2. A análise dos questionários indicou uma média aproximada de 4h de treino por semana (mínimo de 2 horas e máximo de 7 horas/semana). A intensidade média das sessões de treino foi classificada como moderada. Apenas 1 atleta (11.2% do total da amostra) reportou que a intensidade média realizada em sua época desportiva foi fácil. Para o restante da amostra 44.4% reportaram realizar atividades moderadas e igualmente, 44.4% da amostra relataram realizar atividades intensas durante o período. Durante a época, os atletas participaram em média, aproximadamente, de 3 eventos competitivos (Tabela 7.2).

Tabela 7.2. Valores médios individuais e valores médios totais referentes a horas por semana de treino, intensidade e número de competições para uma época de treino de 09 atletas *master*.

ID Atleta	Desporto	Horas/semana	Intensidade	Competição
01	Atletismo	4	2	2
02	Atletismo	5	2	0
03	Atletismo	6	3	4
04	Natação	4	2	4
05	Natação	3	2	3
06	Judo	3	3	0
07	Natação	2	1	2
08	Atletismo	6	3	3
09	Atletismo	7	3	3
<i>Média total</i>		4,44	2,33	2,56
<i>SD total</i>		1,67	0,71	1,13
<i>Mínimo</i>		2	1	0
<i>Máximo</i>		7	3	4

Valores são Média  $\pm$  desvio padrão (SD). N= 09. Classificação da intensidade: 1= fácil; 2= moderado; 3=intenso; 4= muito intenso.

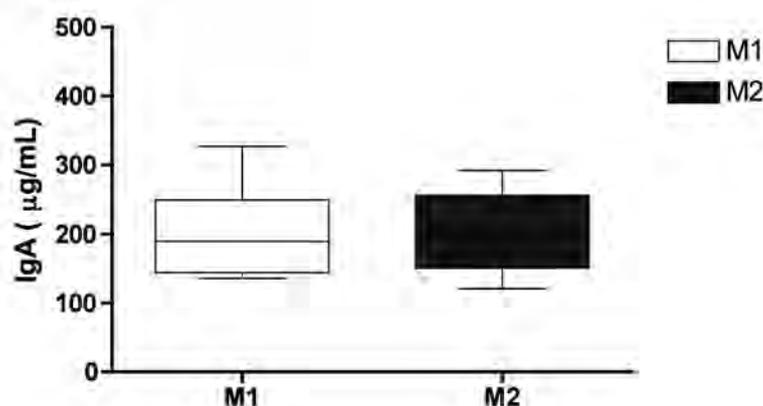
A Tabela 7.3 mostra os valores médios das variáveis fisiológicas obtidas pela realização do protocolo de esforço máximo nos momentos M1 e M2. Os valores de  $VO_{2max}$  (valores relativos e absolutos) foram similares no início e no final da época desportiva. O mesmo foi observado para o tempo total do teste de esforço realizado no laboratório e a percepção subjetiva do esforço obtida ao final da realização do teste, em ambos os momentos. Interessantemente, os resultados obtidos para  $FC_{max}$  e  $Lac_{max}$  em M2 foram menores daqueles alcançados em M1 ( $P = 0.013$  e  $P = 0.047$ , respetivamente) (Tabela 7.3).

Tabela 7.3. Parâmetros fisiológicos em resposta ao protocolo de esforço máximo.

	M1	M2	P valor
VO <sub>2max</sub> (L/min)	3034.0 ± 647.2	2993.3 ± 650.8	0.493
VO <sub>2max</sub> (mL/kg/min)	38.55 ± 10.43	38.46 ± 9.09	0.922
Tempo total de teste (min)	17.81 ± 5.50	18.00 ± 5.69	0.690
FC <sub>max</sub> (bpm)	164.67 ± 13.82	156.78 ± 17.00	0.013
Lac <sub>max</sub> (mmol)	10.11 ± 2.03	8.92 ± 5.69	0.047
RPE	7.22 ± 2.10	7.00 ± 2.50	0.665

Valores são Média ± desvio padrão (SD). N= 09. Abreviaturas: VO<sub>2max</sub>= Consumo máximo de oxigênio. FC<sub>max</sub>= frequência cardíaca máxima; Lac<sub>max</sub>= concentração máxima de lactato no sangue; RPE: Percepção subjetiva de esforço.

A Figura 7.2 mostra uma comparação da concentração salivar de IgA entre os momentos M1 e M2. Não foram observadas diferenças nos níveis de IgA entre as mensurações (211.00 ± 67.27 µg/mL vs. 205.2 ± 62.87 µg/mL, respectivamente; Figura 7.2).



**Figura 7.2. Valores médios para IgA (µg/mL) em atletas *master* (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2).**

O gráfico mostra as médias ± desvio padrão.

A Tabela 7.4 mostra os valores médios dos parâmetros hematológicos analisados nos atletas *master* antes e após sete meses de treino regular e sistematizado. Nenhuma diferença foi observada para todos os parâmetros analisados no momento Pre, quando comparados os momentos M1 e M2. Como resposta ao esforço, todos os participantes apresentaram um aumento no número de leucócitos (leucocitose) em Post (contagem de leucócitos > 10.0 x 10<sup>3</sup>/µL em M1 e contagem de leucócitos > 9.0 x 10<sup>3</sup>/µL, M2) em M1 e M2.

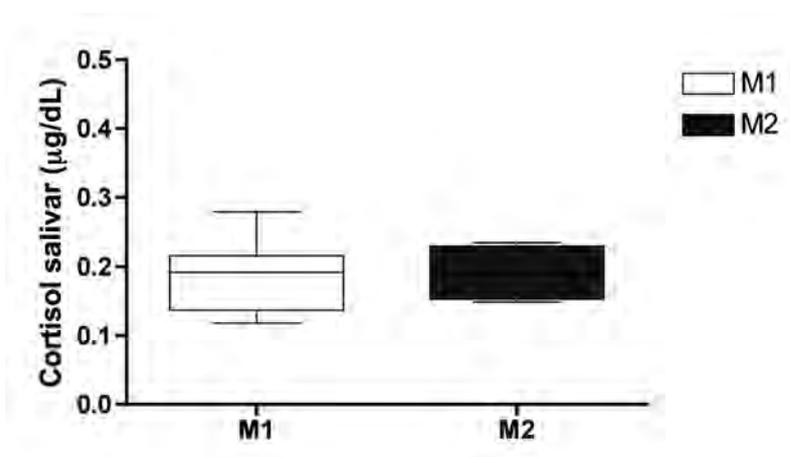
Tabela 7.4. Contagem de células totais do sangue antes (Pre), em 10 minutos (Post) e 1 hora (1h) após o final do teste de esforço. Os valores apresentados são referentes ao total de participantes para o início (M1) e o final de uma época desportiva (M2).

Parâmetros	M1				M2				P valor M1 vs. M2	
	Pre	Post	1h	Pre	Post	1h	Pre	Post	1h	Post
Leucócitos (10 <sup>3</sup> /µL)	7.90 ± 1.95	10.93 ± 3.56 <sup>*,***</sup>	7.30 ± 2.15	7.02 ± 1.08	9.00 ± 1.33 <sup>*,***</sup>	6.56 ± 1.54	.101	.056	.142	
Granulócitos (10 <sup>3</sup> /µL)	4.54 ± 1.21	5.56 ± 2.18	4.70 ± 1.74	1.07 ± 1.01	4.79 ± 1.19 <sup>*</sup>	3.91 ± 1.19	.278	.237	.073	
Linfócitos (10 <sup>3</sup> /µL)	2.81 ± 0.94	4.74 ± 2.06 <sup>*,***</sup>	2.22 ± 0.78 <sup>**</sup>	2.49 ± 0.70	3.58 ± 0.99 <sup>*,***</sup>	2.22 ± 0.72 <sup>**</sup>	.104	.032	1.000	
Monócitos (10 <sup>3</sup> /µL)	0.54 ± 0.23	0.63 ± 0.21	0.34 ± 0.16	0.47 ± 0.17	0.61 ± 0.20	0.51 ± 0.35	.523	.791	.183	
Hemoglobina (g/dL)	14.60 ± 1.24	15.26 ± 1.49 <sup>*</sup>	14.26 ± 1.46	13.86 ± 0.75	14.57 ± 1.49 <sup>*</sup>	13.69 ± 1.15	.024	.030	.013	
Hematócrito (%)	44.93 ± 2.88	47.00 ± 4.00 <sup>*</sup>	44.40 ± 3.19	45.08 ± 2.96	47.34 ± 3.38 <sup>*</sup>	44.94 ± 3.83	.802	.657	.273	
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /µL)	5.20 ± 0.39	5.43 ± 0.50 <sup>*</sup>	5.15 ± 0.43	5.18 ± 0.35	5.44 ± 0.38 <sup>*</sup>	5.19 ± 0.46	.801	.867	.533	
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /µL)	248.78 ± 80.95	303.56 ± 85.08 <sup>*</sup>	250.44 ± 70.83	237.67 ± 67.28	292.56 ± 85.65 <sup>*</sup>	241.56 ± 65.36	.228	.216	.301	
VCM (fL)	86.41 ± 2.67	86.66 ± 3.04	86.33 ± 2.71	86.97 ± 2.98	86.98 ± 3.26	86.67 ± 3.09	.040	.529	.470	
HCM (pg)	28.08 ± 1.45	28.13 ± 1.47	27.69 ± 1.47	26.78 ± 1.50	26.81 ± 1.42	26.47 ± 1.32	.012	.011	.015	
CHCM (g/dL)	32.48 ± 1.02	32.44 ± 1.29	32.07 ± 1.14	30.76 ± 0.92	30.82 ± 0.63	30.52 ± 0.68	.007	.010	.010	
MPV (fL)	8.84 ± 0.99	8.98 ± 1.19	8.23 ± 0.97	8.83 ± 0.81	8.78 ± 0.84	8.21 ± 0.92 <sup>**</sup>	.945	.409	.878	

Valores são Média ± desvio padrão (SD). N= 09. Abreviaturas: volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); volume médio de plaquetas (MPV). \* = P < 0.05 Post vs. Pre; \*\* = P < 0.05 1h vs. Pre; \*\*\* = P < 0.05 Post vs. 1h.

Houve um aumento significativo ( $P < 0.05$ ) na contagem dos linfócitos, eritrócitos e plaquetas após o protocolo de exercício para ambos momentos M1 e M2. Em 1h, uma linfopenia foi observada, ou seja, os valores dos linfócitos apresentaram-se reduzidos em comparação com os valores obtidos no Pre. Os valores de hemoglobina e hematócrito aumentaram em Post, mas foram restabelecidos em 1h tanto em M1 e M2. Não houveram mudanças significativas para a contagem de granulócitos e monócitos, e para VCM, HCM, CHCM e MPV em decorrência do protocolo de exercício realizado nas medidas obtidas em M1 e M2 (Tabela 7.4).

Os níveis de cortisol foram consistentes em ambos os momentos de medida (M1 =  $0.185 \pm 0.056 \mu\text{g/dL}$ ; M2 =  $0.192 \pm 0.033 \mu\text{g/dL}$ ; Figura 7.3).

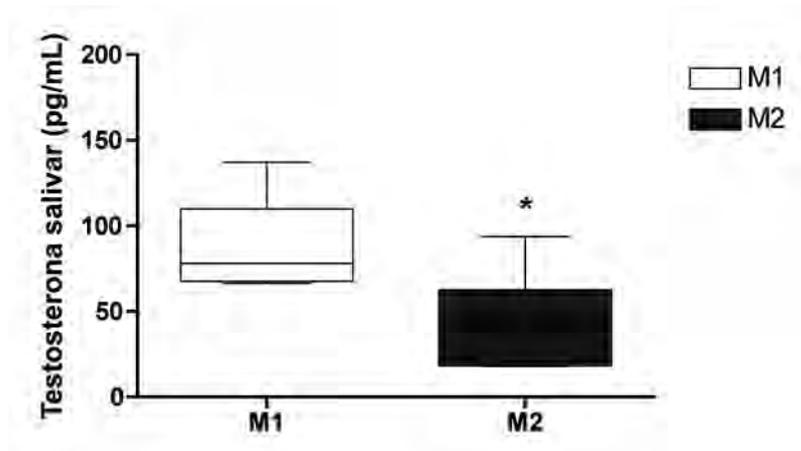


**Figura 7.3.** Valores médios para as concentrações de cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ ) em atletas *master* ( $n = 7$ ) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do esporte praticado no final da temporada (M2).

O gráfico mostra as médias  $\pm$  desvio padrão.

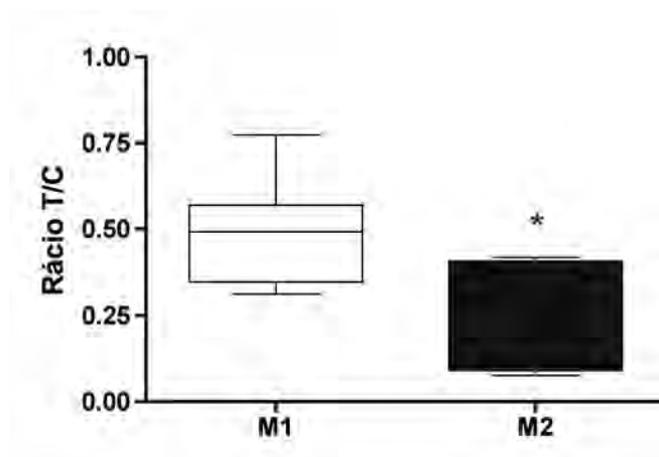
Os valores para as concentrações de testosterona foram significativamente menores em M2 ( $46.34 \pm 27.09 \text{ pg/mL}$ ) em comparação com o momento M1 ( $89.00 \pm 26.07 \text{ pg/mL}$ ;  $P = 0.023$ ; Figura 7.4).

O rácio T/C também reduziu ao final da época desportiva conforme mostra a Figura 6. No início da época, o rácio T/C dos atletas *master* era de  $0.504 \pm 0.154$ , enquanto no momento M2 foi aproximadamente 50% menor ( $0.250 \pm 0.142$ ;  $P = 0.008$ ; Figura 7.5).



**Figura 7.4:** Valores médios para as concentrações de testosterona (pg/mL) em atletas *master* (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2).

O gráfico mostra as médias  $\pm$  desvio padrão. \* P < 0.05.



**Figura 7.5:** Rácio testosterona/cortisol (T/C) em atletas *master* (n = 7) no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2).

O gráfico mostra as médias  $\pm$  desvio padrão. \* P < 0.01.

#### 7.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O Estudo 4 foi um estudo complementar, sem grupo controlo, constituído com uma parte da amostra do grupo de atletas, mas realizado com o propósito de determinar os efeitos de uma época desportiva sobre marcadores fisiológicos, hematológicos e salivares desses

atletas. Foram obtidas medidas no início (M1) e na semana seguinte ao principal evento competitivo do desporto praticado no final da temporada (M2), sendo que as cargas realizadas durante o período foram auto-reportadas pelos atletas *master*. Os principais resultados encontrados foram: 1) a redução da  $FC_{max}$  e da concentração de  $Lac_{max}$  após o teste de esforço em M2; 2) a redução nos níveis de testosterona e no rácio T/C ao final da época desportiva.

O  $VO_{2max}$  é fortemente e positivamente relacionado com o desempenho aeróbico em corredores altamente treinados de várias idades, enquanto que o envelhecimento está altamente associado com correspondentes declínios no  $VO_{2max}$  (Tanaka & Seals, 2008; Betik & Hepple, 2008; Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013). Os principais mecanismos responsáveis pela redução no  $VO_{2max}$  são diminuições no estímulo em manter o treino regular, a destacar a manutenção dos níveis de intensidade do exercício, duração das sessões e frequência semanal. Outros fatores que contribuem tanto para a redução do desempenho quanto do  $VO_{2max}$  com a idade estão relacionados a fatores centrais (p.ex. débito cardíaco máximo,  $FC_{max}$ , volume máximo de ejeção) e periféricos (p.ex. diferença arteriovenosa de oxigénio) (Tanaka & Seals, 2008). Contudo, se a diminuição do  $VO_{2max}$  é o principal mecanismo que causa reduções relacionadas com a idade no desempenho aeróbico, a manutenção desta variável durante uma época desportiva apresentada no presente estudo tem importantes implicações para a saúde e rendimento desportivo destes atletas. Obviamente deve considerar-se as limitações do reduzido tempo da época desportiva (aproximadamente 7 meses) e do reduzido tamanho da amostra, o que limita expandir os resultados para atletas de todas as modalidades ou de idade mais avançada. O  $VO_{2max}$  observado neste estudo é inferior ao exibido por atletas *master* dinamarqueses (Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013) e semelhante a atletas *master* escoceses (Hayes, Grace, Sculthorpe, *et al.*, 2013) e não apresentou alterações no final da época.

Investigações prévias sugeriram que a taxa de declínio no  $VO_{2max}$  com a idade avançada foi 50% menor em atletas treinados em resistência do que em adultos sedentários (Tanaka & Seals, 2008). Porém, alguns autores posteriormente estabeleceram que quando a diminuição é expressa em percentagem tendo como referência a idade adulta, a taxa de declínio no  $VO_{2max}$  com a idade não é reduzida em adultos saudáveis que habitualmente realizam exercícios físicos (Gent & Norton, 2013). Gent e Norton (2013) realizaram um estudo transversal com o objetivo de avaliar as mudanças relativas em três sistemas energéticos em ciclistas *master* altamente treinados, com idades entre 35 a 64 anos (amplitude de 30 anos). Resultados obtidos por regressão linear mostraram que, enquanto o pico de potencia anaeróbia (W/kg) e a capacidade

anaeróbia (kJ/kg) declinaram a uma taxa de aproximadamente 8% por década, a potência aeróbica de pico (W/kg) não mudou significativamente com a idade. Esses resultados vêm evidenciar a manutenção do  $VO_{2max}$  por atletas *master* neste estudo independentemente do aumento da idade do grupo ( $P < 0.001$ ) e correlações negativas encontradas entre o  $VO_{2max}$  e a idade ( $r = -.796$  para M1;  $r = -.845$  para M2), pelo que esperar-se-iam valores mais baixos em M2, o que não foi observado.

M1 corresponde ao início da época desportiva, onde os atletas vêm de um período mais prolongado de descanso (~2 meses), pelo que é necessária uma menor capacidade metabólica à exigência do teste de esforço. A acumulação do lactato em consequência da realização de um exercício poderá acontecer pelo aumento da demanda energética, esgotamento dos fosfagénios e pela demora do sistema oxidativo em responder as exigências do exercício (Powers & Howley, 2012). Nesse sentido, é conhecida a sensibilidade do lactato sanguíneo ao esforço muscular exigido pelo exercício. Os valores médios da lactatemia máxima ( $Lac_{max}$ ) foram menores em M2 quando comparados com M1. Uma vez que os atletas deste estudo participam de exercícios prolongados, é provável que as reduções na concentração máxima de lactato, como observado em M2 em comparação com M1 (tabela 7.4), indicam um melhor uso energético no final da época e representam efeitos positivos do treino sobre os processos metabólicos (Bogdanis, 2012). Também, a  $FC_{max}$  revelou-se inferior no momento M2 em relação aos resultados deste componente obtidos pelo teste de esforço realizado no início da época de treino dos atletas (M1). O comportamento deste indicador vem ao encontro de resultados de estudos anteriores, que largamente reportaram a tendência para redução da  $FC_{max}$  em resposta ao treino aeróbico (Zavorsky, 2000). Esta redução tem sido interpretada como consequência do aumento do sistema parassimpático, ou seja, uma adaptação central ao esforço, aumentando a eficiência do funcionamento cardíaco (Zavorsky, 2000).

Não foram observadas diferenças em nenhuma das variáveis hematológicas nas medidas basais feitas nos momentos M1 e M2. Como discutido no Estudo 1, alterações nestas células estariam relacionadas a condições inflamatórias, como por exemplo, o aumento na contagem de monócitos representa uma resposta inflamatória. Portanto, a manutenção ao longo da época desportiva destas variáveis sugere que em relação a estes marcadores nenhuma resposta inflamatória foi aumentada. O aumento observado na contagem de leucócitos logo após ao exercício já está bem documentado (Banfi, Del Fabbro, Mauri, *et al.*, 2006; Kratz, Wood, Siegel, *et al.*, 2006; Krüger & Mooren, 2014; Simpson, Kunz, Agha, *et al.*, 2015; Walsh,

Gleeson, Shephard, *et al.*, 2011; Tossige-Gomes, Ottone, Oliveira, *et al.*, 2014) e foi anteriormente discutida nesta tese (Capítulo 4). Os mecanismos exatos que levam à leucocitose ainda não estão claros, embora fortes evidências indiquem que as catecolaminas produzidas durante o exercício aumentam a proporção de leucócitos na circulação, ao passo que o cortisol pode atuar por um mecanismo que envolva um intervalo de tempo para a elevação dos leucócitos no compartimento vascular. Além disso, uma resposta inflamatória a uma lesão tecidual local também pode contribuir para a leucocitose (Traiperm, Gatterer & Burtscher, 2013). Deve-se considerar também, que algumas medições dadas como concentração em relação ao volume de sangue podem ser influenciadas pelo aumento do volume plasmático. Há estudos que mostraram redução nos valores do hematócrito e da hemoglobina imediatamente após exercício de longa duração (maratona, por exemplo), sugerindo uma expansão no volume plasmático (Traiperm, Gatterer & Burtscher, 2013). Nos nossos resultados, os valores do hematócrito e da hemoglobina, após a correção para Pv, foram aumentados em Post, mostrando uma resposta contrária (independentemente do tempo de exercício entre os estudos). Isto quer dizer que, provavelmente, a maioria de discrepâncias na interpretação dos resultados em grandes estudos poderia ser apenas um reflexo da expansão do volume plasmático.

As concentrações de IgA e cortisol na saliva podem ser usadas para refletir mudanças na função imune (Gatti & De Palo, 2011). Nos atletas, a diminuição dos níveis de IgA só é observada em tempos de maior intensidade de treino, tornando o atleta menos resistente a microrganismos patogênicos, aumentando a incidência de ITRS neste grupo (Gleeson & Walsh, 2012; Gleeson, Bishop, Oliveira, *et al.*, 2012). Aumentos da concentração da IgA tem sido observados em indivíduos idosos sedentários submetidos a um programa de treino regular (Akimoto, Kumai, Akama, *et al.*, 2003; Martins, Cunha, Neves, *et al.*, 2009). Num estudo com idosos sedentários ( $64.9 \pm 8.4$  anos), um programa de 12 meses de treino, com sessões semanais de 60 minutos de treino aeróbico e 60 minutos de treino aeróbico foi eficiente em aumentar as concentrações de IgA de  $24.7 \pm 14.4$  para  $33.8 \pm 18.5$   $\mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.05$ ) (Akimoto, Kumai, Akama, *et al.*, 2003). Similarmente, Martins e colegas (2009) concluiu que 16 semanas de treino aeróbico significativamente aumentaram a IgA em homens e mulheres idosos. Parece existir um papel inibidor na produção ou mobilização da IgA provocada pelo cortisol. Coexistindo frações de ambos na saliva postula-se que a elevação do cortisol em resposta ao exercício possa ser a razão da redução dos níveis de IgA salivar nesta condição. No presente estudo, não foram observadas mudanças nas concentrações de cortisol e IgA no decorrer da época desportiva dos atletas *master*, sugerindo que a resposta imune das mucosas foi preservada (Martins, Cunha,

Neves, *et al.*, 2009). Por outro lado, também pode ser considerado que a carga de treino dos atletas nos momentos de coleta foi similar (Tabela 7.2), o que resultou em uma resposta semelhante nos níveis de cortisol e IgA avaliados na saliva.

A testosterona tem um importante papel na regulação da massa muscular e na MLG (Hayes, Bickerstaff & Baker, 2010) e declina com a idade em homens e mulheres (Wu, Lin, Liu, *et al.*, 2010). A deficiência de testosterona tem sido relacionada com aumentos na gordura visceral, diminuição da massa magra e diminuição da força muscular (Wu, Lin, Liu, *et al.*, 2010). Enquanto a redução na testosterona livre (salivar) no momento M2, poderia estar relacionada a prejuízos no ambiente anabólico dos atletas *master*, nenhuma alteração na composição corporal foi observada (Tabela 7.1). Em vez disso, os atletas *master* apresentaram redução da % de gordura e aumento da MLG em M2. Sabe-se que o cortisol pode suprimir os níveis de testosterona, no entanto, esta parece não ser a explicação pontual para este estudo, uma vez que, não foram observadas mudanças (incrementos) na concentração de cortisol ao fim da época (Figura 7.3). Portanto, é possível que mecanismos relacionados com a fadiga possam estar envolvidos na redução da testosterona observada em M2. Os atletas que muitas vezes treinam para induzir a fadiga muscular (por exemplo, corredores de Sprint de 400m) mostraram uma redução na testosterona após sessões de exercício (Słowska-Lisowska & Majda, 2002). Hejazi (2012) comparou os níveis de imunoglobulina (IgA, IgM, IgG), testosterona e cortisol no soro em corredores de elite ( $18.92 \pm 1.7$  anos) durante a etapa geral de preparação e fase de competição do treino. Os corredores participaram num programa de treino selecionado por um período de 14 semanas com 12 sessões por semana (de manhã e à tarde). Os níveis de testosterona aumentaram e diminuíram respetivamente, após as fases de preparação e antes da competição. Os níveis de cortisol diminuíram significativamente após a fase de preparação, embora tenham aumentado antes da fase da competição. Por fim, os autores mostraram que o rácio testosterona / cortisol aumentou significativamente após a fase de preparação e diminuiu antes da fase de competição, o que indicaria um aumento no processo catabólico dos corredores antes das competições, largamente provocado pelo aumento do cortisol (Hejazi & Hosseini, 2012). Por outro lado, sabe-se que o treino físico pode aumentar os níveis de testosterona em idosos sedentários (Hayes, Grace, Sculthorpe, *et al.*, 2013), sugerindo que o status do exercício dos atletas *master* pode preservar os níveis de testosterona na velhice, também suportado por outros estudos (Pollock, Carter, Velloso, *et al.*, 2015). Fundamentalmente, isso sugere que os declínios previamente relatados na testosterona com a idade também podem estar relacionados com a diminuição dos níveis de atividade (Pollock,

Carter, Velloso, *et al.*, 2015). Embora não reportados na seção dos resultados, *masters* e controlos não apresentaram diferenças quanto aos níveis basais de testosterona ( $87.06 \pm 23.23$  versus  $87.81 \pm 39.96$ , respetivamente). Isso sugere que a longo-prazo efeitos residuais da fadiga permanecem nos atletas, o que torna seus valores similares a de indivíduos não treinados.

A diminuição do rácio T/C é evidenciada pela redução da testosterona, uma vez que os níveis de cortisol foram mantidos, para o momento M2. Estes resultados realçam alguns aspetos distintos dos atletas *master*, nomeadamente a incapacidade de recuperação na concentração salivar da testosterona, ao contrário do cortisol, no final da época desportiva. Um outro aspeto a ser considerado é que a redução do rácio T/C foi numa proporção de ~50% do momento M2 comparado ao momento M1. Considerando dados da literatura em que reduções no rácio T/C na escala de 30% podem ser indicativas de recuperação incompleta (Banfi, Marinelli, Roi, *et al.*, 1993; Vervoorn, Vermulst, Boelens-Quist, *et al.*, 1992), uma redução de 50% observada nos atletas *master* pode indicar uma condição fadiga acumulada.

## 7.5 CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que a manutenção do treino regular ao longo de uma época desportiva é capaz de provocar mudanças benéficas na composição corporal, e efeitos positivos sobre variáveis funcionais, nomeadamente no decréscimo da  $FC_{max}$  e  $Lac_{max}$  para atingir o mesmo patamar de um teste de esforço máximo. Os atletas apresentam, no entanto, pequenos sinais de fadiga acumulada ao longo de uma época de treino e competição, tais como a diminuição dos níveis de testosterona salivar e a redução do rácio T/C.

# Discussão geral

---

## Capítulo 5



Finalizada a apresentação dos 4 estudos em que esta tese foi subdividida, torna-se necessário compreender e discutir os resultados no âmbito dos objetivos definidos no capítulo 1. Também incluímos uma breve discussão baseada nas “implicações”, o texto informativo sobre as principais implicações dos resultados já publicados na literatura que foi incluído no final de cada subsecção da revisão de literatura no capítulo 2, com a denominação de **Implicações**. Esta discussão geral está dividida conforme os objetivos e descreve os principais resultados desta tese por vezes confrontados com recentes achados da literatura. Reforçamos um pormenor, os resultados do objetivo 5, definido como “Analisar a resposta de parâmetros imunitários e seu comportamento em resposta a um protocolo de esforço máximo para explicar que porção da variação depende da idade e/ou da aptidão funcional em atletas *master* e no grupo controlo” não estão apresentados separadamente, pois estão inseridos aos 4 objetivos anteriores.

## **1. Diferenças na aptidão funcional, variáveis hematológicas e balanço inflamatório de citocinas (Objetivo 1)**

O efeito anti-inflamatório do exercício é uma área de debate científico atual, por isso investigámos os efeitos do treino ao longo da vida no  $VO_{2max}$ , na contagem de células do sangue e na concentração das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ , com ênfase no balanço inflamatório (medido pelo rácio TNF- $\alpha$ /IL-10). Este estudo está descrito no Capítulo 4.

### 1.1 Atletas *master* tem valores superiores de $VO_{2max}$ em comparação com indivíduos saudáveis da mesma idade

Os resultados obtidos mostraram que os atletas *master* tem valores de  $VO_{2max}$  similares a de adultos-jovens saudáveis, porém maiores em comparação com os participantes não treinados de mesma idade. A observação de que a capacidade aeróbica era mantida em atletas masters já tinha sido demonstrada (Mikkelsen et al., 2013; Pollock et al., 2015; Rittweger et al., 2009; Tanaka & Seals, 2008). Por outro lado, o declínio no  $VO_{2max}$  com o envelhecimento está relacionado com a perda da resistência funcional (Rittweger, di Prampero, Maffulli, *et al.*,

2009), mas sugerimos que o treino regular ao longo da vida pode reverter essa perda. Além disso, o estado imunológico geral dos atletas parece estar mantido, pois não observamos diferenças na contagem de células sanguíneas em comparação aos demais grupos avaliados no Estudo 1. Assim, os nossos resultados parecem confirmar a utilização dos atletas masters como modelo de “envelhecimento excepcionalmente bem-sucedido” (Kusy & Zieliński, 2015; Tanaka & Seals, 2008; Mikkelsen, Couppé, Karlsen, *et al.*, 2013) sugerindo que, uma prática regular e sistemática de exercício ao longo da vida tem efeito benéfico sobre o processo de envelhecimento.

## 1.2 Atletas *master* apresentam indicadores anti-inflamatórios elevados

De acordo com os nossos resultados, os atletas *master* possuem concentrações maiores das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra e IL-10 em comparação com os adultos da mesma idade não treinados. Além disso, o treino mais que a idade mostrou regular o equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, pelo melhor equilíbrio observado na relação entre as concentrações de IL-1ra e IL-1 $\beta$  nos *masters* em comparação com o grupo de adultos. Se por um lado, o aumento da concentração de IL-1 $\beta$  poderia refletir um aumento da resposta inflamatória, por outro lado, o aumento das concentrações da IL-1ra compensa esse efeito, pela ação inibitória da IL-1ra nas ações pro-inflamatórias da IL-1 $\beta$ . De fato, o possível equilíbrio inflamatório entre as citocinas IL-1ra e IL-1 $\beta$  potencialmente atenuaria danos inflamatórios e estruturais nos atletas *master*. Além disso, a diminuição das concentrações da IL-1 $\beta$  e IL-8 encontradas 1h após o exercício no grupo de atletas *master* também são um indicativo de um efeito anti-inflamatório do exercício neste grupo. Para outras citocinas, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , não foi observado efeito do treino ou da idade nas suas concentrações plasmáticas. Os níveis de IL-6 não foram alterados em resposta ao treino ou ao esforço agudo. É de conhecimento que a IL-6 pode exercer funções pró e anti-inflamatórias (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, *et al.*, 2011). Do ponto de vista inflamatório, a IL-6 pode ativar cascatas de sinalização celular que levam a uma potente resposta inflamatória. Como ação anti-inflamatória, seu aumento transitório em função do exercício, parece ser responsável pela produção de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, a IL-1ra e o cortisol, além da inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como da secreção de CRP (Sallam & Laher, 2016; Steensberg, Fischer, Keller, *et al.*, 2003). De fato, não observamos diferenças nas concentrações de TNF- $\alpha$ , cortisol e CRP entre o grupo de *masters*

e adultos. Possivelmente, a produção regular de IL-6 pela contração do músculo esquelético em função do treino dos atletas *master* estimularia a cascata de sinalização anti-inflamatória. Os resultados mostraram também que o rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 foi mantido no grupo de atletas *master* e adultos-jovens, enquanto que o grupo de adultos apresentou um aumento progressivo deste índice inflamatório em resposta ao esforço agudo. Os níveis de IL-1 $\beta$  no grupo de adultos também estavam aumentados 1h após o exercício, indicando uma resposta inflamatória aguda que tem efeito da idade, mas é revertida pelo treino nos atletas *master*.

De relevância, está a observação de que os atletas masters mantêm sua capacidade aeróbica e apresentam marcadores anti-inflamatórios favoráveis, semelhante ao observado em adultos-jovens saudáveis. A IL-10 e o rácio TNF- $\alpha$ /IL-10 foram as variáveis que mais sofreram os efeitos da idade. Assim, o treino ao longo da vida parece não ter efeitos deletérios no equilíbrio das citocinas pró e anti-inflamatórias. Pelo contrário, foi capaz de reverter parcialmente os efeitos pro-inflamatórios do envelhecimento. Portanto, a resposta das citocinas ao exercício regular pode ser um dos mecanismos anti-inflamatórios que podem ajudar os atletas a “neutralizar” o processo do envelhecimento.

## **2. A influência do treino ao longo da vida sobre a ativação, senescência e produção de citocinas pelas células T regulatórias (Objetivo 2)**

O estudo 2, descrito no Capítulo 5, pretendia esclarecer o efeito do treino ao longo da vida no número e funcionalidade das Tregs do sangue periférico e explorar se atletas *master* apresentavam menor senescência destas células quando comparados com um grupo controlo antes e após a um teste progressivo até à exaustão. De acordo com os nossos resultados, os atletas *master* mantêm os níveis das Tregs circulantes em repouso, similares a de indivíduos saudáveis da mesma idade. Entretanto, a contagem absoluta das Tregs aumenta imediatamente pós-exercício em ambos os grupos. Funcionalmente, o grupo de atletas *master* parece ter aumentado os níveis de ativação das Tregs em comparação com o grupo controlo nas condições de repouso (aumento da percentagem de indivíduos que expressam FoxP3 e TGF- $\beta$  e uma concentração plasmática mais elevada da IL-10).

## 2.1 O número das Tregs é mantido em repouso e aumenta em resposta ao esforço agudo em atletas *master*

Nossos resultados mostraram que o treino ao longo da vida não afeta o número das Tregs de atletas *master* em repouso. Consequentemente, atletas *master* podem estar protegidos contra doenças relacionadas com a perda da homeostasia imunológica devida ao envelhecimento (Jagger, Shimojima, Goronzy, *et al.*, 2014). Além disso, as Tregs produzem IL-10, uma das principais moléculas identificadas como responsável por sua imunomodulação. É possível que a elevação dos níveis de IL-10 possa também estar associada com o aumento do número de Tregs na circulação sanguínea, como observado em sujeitos mais jovens (Handzlik, Shaw, Dungey, *et al.*, 2013). Assim, o treino teria profundo impacto sobre a manutenção de níveis elevados de IL-10 e consequentemente na manutenção do número das Tregs. Esses resultados apoiam os efeitos anti-inflamatórios do exercício no modelo proposto por Gleeson e colegas (Gleeson, Bishop, Stensel, *et al.*, 2011). A nível de expressão génica da IL-10, os valores não foram diferentes entre os grupos de atletas *master* e controlos. Ou seja, a capacidade de produção de IL-10 pelas Tregs é igual nos dois grupos.

## 2.3 As Tregs de atletas *master* parecem estar mais ativadas

Sob nossas condições experimentais, não encontramos diferenças na expressão do mRNA dos genes FoxP3, TGF- $\beta$  e IL-10 nas Tregs purificadas antes e após o exercício. Entretanto, no grupo de atletas *master*, as Tregs parecem estar mais ativadas em comparação com o grupo controlo, pois os *masters* mostraram níveis ligeiramente aumentados da expressão génica de FoxP3, TGF- $\beta$  e IL-10, associado a um maior número de casos onde se observou a amplificação dos genes. Publicações anteriores mostraram aumento da expressão do FoxP3 nas Tregs em resposta ao exercício (Yeh, Chuang, Lin, *et al.*, 2009; Lowder, Dugger, Deshane, *et al.*, 2010). As taxas de deteção do TGF- $\beta$  e IL-10 em atletas *master*, mas não no grupo controlo, aumentaram em resposta ao esforço agudo. Considerando que o TGF- $\beta$  desempenha um papel essencial na supressão da inflamação e a IL-10 tem potencial anti-inflamatório (revisados na seção 2.3), o aumento observado no número de casos que expressam o mRNA destas moléculas no grupo de atletas *masters* contribui para o melhor ambiente anti-inflamatório deste grupo, o que estaria de acordo com o aumento da concentração plasmática da IL-10 observada para os atletas *master*. A senescência das Tregs manteve-se baixa e similar entre os grupos. Embora

uma expressão 50% menor das Tregs KLRG1<sup>+</sup> no grupo de atletas tenha sido observada quando comparada com o grupo controle.

Este é o primeiro estudo a mostrar que atletas *master* têm elevados marcadores anti-inflamatórios e mantêm o número e função das Tregs como resposta adaptativa ao exercício.

### **3. Influência do treino sobre a redistribuição de linfócitos T senescentes e resposta a uma sessão máxima de exercício agudo (Objetivo 3)**

Embora a mobilização de células T senescentes com o exercício tenha sido anteriormente descrita na literatura, uma abordagem experimental que analisou os efeitos do treino ao longo da vida sobre a senescência e mobilização de linfócitos T senescentes em resposta ao exercício agudo máximo em atletas *master*, ainda não tinha sido descrita. Este assunto assume grande relevância quando se considera o acumular de células T senescentes com o envelhecimento e o possível papel do exercício na remoção destas células altamente citotóxicas. Uma percentagem das subpopulações de linfócitos senescentes CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é mobilizada com o exercício agudo. Além disso, os atletas *master* tinham valores mais baixos para as percentagens de linfócitos T, CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> naïve e EM, CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> naïve, CM e EM senescentes do que os controlos. A influência do treino ao longo da vida sobre a senescência e mobilização de linfócitos T senescentes em resposta ao exercício agudo máximo em atletas *master* foi objeto de estudo descrito no Capítulo 6.

#### **3.1 Linfócitos T senescentes são mobilizados pelo exercício em atletas *master***

Nossos resultados mostraram que a % das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> naïve, CM, EM e EMRA senescentes aumentou em resposta ao minuto de medida, sugerindo que o exercício mobiliza estas populações; resultados que corroboram os estudos anteriores quanto à mobilização de células senescentes pelo exercício (Simpson, Florida-James, Cosgrove, *et al.*, 2007; Simpson, Cosgrove, Ingram, *et al.*, 2008; Simpson & Guy, 2010; Simpson, 2011b). Os

mecanismos da mobilização de células T senescentes pelo exercício físico foram previamente descritos e são detalhados no capítulo 2, seção 2.4.

Nosso objetivo principal era saber se os pressupostos da teoria do “espaço-imune” (Simpson, 2011b) poderiam ser observados em atletas *master*. De fato, foi possível confirmar a hipótese da mobilização de linfócitos T senescentes com o exercício. Estudos anteriores mostraram que os linfócitos mobilizados eram predominantemente subpopulações citotóxicas, células altamente pró-inflamatórias e que o seu acumular no sangue e nos tecidos poderia contribuir para um certo número de patologias associadas com a inflamação (Campbell et al., 2009). Por outro lado, mecanismos de apoptose induzidos pelo exercício provocariam a morte do excesso dessas células aumentando o “espaço vago” disponível para as células T naïve, o que seria potencialmente benéfico (Simpson, Florida-James, Cosgrove, *et al.*, 2007; Simpson, Cosgrove, Ingram, *et al.*, 2008; Simpson, Cosgrove, Chee, *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostraram que a expressão génica do marcador de apoptose FasL nas células T CD8<sup>+</sup> efetoras não foi diferente entre condições ou tempo de medida (Pre, Post e 1h). O aumento da expressão de FasL pelas células T CD8<sup>+</sup> efetoras poderia induzir a morte programada destas células, favorecendo a criação do espaço imune (vago). Neste sentido, os nossos resultados não parecem confirmar a apoptose das células T CD8<sup>+</sup> efetoras subsequente à sua mobilização. No entanto, é de referir que o aumento das células senescentes em resposta ao minuto de medida, não foi um comportamento linear, apresentando uma tendência para a diminuição destas células 1 hora após o esforço. Se não podemos atribuir esta ligeira redução à apoptose, é possível que, o *homing* destas células para os tecidos periféricos seja o mecanismo alternativo mais evidente (Krüger & Mooren, 2007, Campbell et al., 2009). Além disso, a expressão génica de FasL foi determinada no número total de células CD8<sup>+</sup> efetoras, portanto, não sabemos se existiriam diferenças na expressão deste marcador de apoptose numa população separada de células senescentes. Sugerimos que futuramente sejam determinados marcadores de *homing* celular para refutar ou corroborar esta hipótese. Outros marcadores de apoptose e a determinação da sua expressão génica nas células de memória e senescentes também precisa de ser realizada.

### 3.2 Atletas *master* tem menor percentagem de linfócitos T senescentes

Atletas *master*, mostraram valores mais baixos para a % de células T, células T CD4<sup>+</sup> naïve e EM, CD8<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup> naïve, CM e EM senescentes do que os controlos. O grupo de RJ Simpson mostrou que a aptidão aeróbia era associada com uma baixa proporção de células T senescentes e uma alta proporção de células naïve (Spielmann, McFarlin, O'Connor, *et al.*, 2011). Consequentemente, o exercício teria benefícios preventivos contra a imunosenescência celular associada ao envelhecimento e fomos verificar se a prática regular e longa (mais de 20 anos) de exercício potencializaria ou não esses benefícios. Em primeiro lugar, sendo a proporção de células T senescentes aumentada em cerca de 10% por década de vida com o avanço da idade em pessoas saudáveis / assintomáticos, verificámos que níveis elevados de aptidão física e exercício regular impediam o acumular de células T senescentes. Em segundo lugar, os níveis de atividade e aptidão física são os principais fatores moderadores na relação idade-imunosenescência e são preditores independentes da "idade imunológica", portanto a menor percentagem de células senescentes nos atletas sugere um sistema imune mais jovem neste grupo. Em terceiro lugar, o valor terapêutico do exercício em melhorar a imunocompetência da população em envelhecimento assintomático e imunocomprometidos clinicamente é potencialmente imenso (Hong, 2011), confirmado pela ausência de doenças crónicas e ITRS reportadas pelos atletas *master*. Assim, o nosso estudo mostrou que os atletas *master* têm valores maiores de capacidade aeróbia e percentagens mais baixas de células senescentes, nomeadamente nas subpopulações dos linfócitos T CD4 e CD8 em comparação com adultos saudáveis, porém não treinados. Isto sugere que a repetição do exercício ao longo da vida mobiliza e provoca a morte destas células senescentes, corroborando a teoria do espaço-imune proposta por Simpson (Simpson, 2011b).

Uma vez que, o histórico de infeção pode ser um dos principais fatores de confusão nas diferenças relacionadas com a idade na resposta imune ao exercício (Spielmann, Bollard, Bigley, *et al.*, 2014), testámos esta hipótese através da verificação da presença da infeção viral por CMV na nossa amostra. Entretanto, apenas 3 indivíduos não eram portadores do vírus o que impossibilitou comparar os resultados de indivíduos infetados e não infetados. Estudos anteriores (Spielmann, Bollard, Bigley, *et al.*, 2014; Turner, Aldred, Witard, *et al.*, 2010) mostraram que células T CD8<sup>+</sup> e células T  $\gamma\delta$  de indivíduos infetados eram redistribuídas em números relativamente maiores.

Um estudo recente, sugeriu que a capacidade do hospedeiro para controlar o CMV (ou seja, mantendo o CMV em estado latente) pode conectar aparentes efeitos bidirecionais do volume de exercício sobre a imunidade do hospedeiro e risco de infecção, ou seja, um novo paradigma em que as respostas imunes ao exercício agudo e crônico podem ser governadas pelo histórico de infecção do hospedeiro (Simpson, Bigley, Spielmann, *et al.*, 2016), ou seja, o exercício pode prevenir o número de a reativação de infecções virais latentes e com isso reduzir o número de células senescentes. Esta é uma hipótese que precisa ser testada, pois pode explicar porque os atletas *master* tiveram valores mais baixos de células senescentes.

### 3.3 O $VO_{2max}$ é associado positivamente com a proporção de células T CD4<sup>+</sup> naïve

Uma correlação positiva entre o  $VO_{2max}$  e a proporção de células T CD4<sup>+</sup> naïve e uma associação negativa entre o  $VO_{2max}$  e a percentagem total de linfócitos foi observada.

Um estudo com atletas jovens (20.7 anos) mostrou que os níveis circulantes de TREC foram reduzidos nos atletas em comparação com os controlos, assemelhando-se ao envelhecimento prematuro das células T. Além disso, os atletas jovens tinham uma redução no número absoluto de células T naïve, particularmente em células T CD4<sup>+</sup>, com aumento das células de memória. Portanto, uma vez que a produção tímica de células T declina naturalmente com a idade, estes resultados levantaram a preocupação de que prolongar o exercício de alta intensidade na quarta década de vida poderia ter consequências deletérias para a saúde dos atletas (Prieto-Hinojosa, Knight, Compton, *et al.*, 2014). Nossos resultados contrariam este pressuposto, pois observámos uma relação positiva entre o  $VO_{2max}$  e as células T CD4<sup>+</sup> naïve. Nossos resultados são corroborados por um outro estudo, onde a participação frequente em exercícios de alto volume ao longo da vida foi associada a uma resposta imunitária adaptativa mais diferenciada (Moro-García, Fernández-García, Echeverría, *et al.*, 2014). Ao estudar jovens e atletas idosos, estratificados pela infecção por CMV, Moro-García e colegas mostraram que a participação frequente em exercícios de alto volume ao longo da vida está associada a mudanças fenotípicas e funcionais na resposta imune adaptativa com alto grau de diferenciação e com menor responsividade funcional. Essas diferenças são mais pronunciadas em jovens com níveis prolongados de atividade física, mas parecem ser reduzidas à medida que o envelhecimento fisiológico ocorre. Isso também sugere que podem haver mecanismos

compensatórios que ajudam a manter a saúde imunológica dos atletas (Moro-García, Fernández-García, Echeverría, *et al.*, 2014).

A baixa funcionalidade do timo em idosos mostra uma produção tendenciosa para as células T CD4<sup>+</sup>, aumentando o rácio CD4/CD8. Isto também interfere na desregulação da homeostasia, afetando principalmente o subgrupo de células T CD8<sup>+</sup> naïve. Encontrámos uma influência negativa da idade nas células T CD8<sup>+</sup> naïve que pode estar relacionada a esta hipótese. Porém, não encontrámos diferenças na % de células T CD8<sup>+</sup> naïve entre os atletas *master* e o grupo controlo, sugerimos que isso possa ser decorrente de uma resposta ao treino, que neste caso reverteria o impacto da idade. Além disso, a expressão de CCR7 nas células CD8 naïve foi similar entre *masters* e controlos.

Assim, sugerimos que a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbica durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir o acumular de células T senescentes e, ao mesmo tempo, manter um número suficiente de células T naïve capazes de reconhecer e responder a novos antigénios.

#### **4. Alterações no número de células do sangue periférico e marcadores da imunidade das mucosas em função das cargas de treino e ao longo de uma época desportiva. Objetivo 4**

O objetivo do estudo 4 foi investigar os efeitos de uma época de treino sobre marcadores fisiológicos, hematológicos e salivares em atletas *master*.

Nossos resultados mostraram que os atletas *master* mantêm constantes as cargas e volume de treino ao longo da época desportiva. Os atletas reduziram a percentagem de gordura corporal, aumentaram a massa livre de gordura e mantiveram os valores de VO<sub>2max</sub> do início ao final da época de treino. Interessantemente, os resultados obtidos para FC<sub>max</sub> e Lac<sub>max</sub> no teste de esforço realizado no final da época foram menores do que os alcançados no teste realizado no início. Estes dados sugerem que a manutenção do treino regular ao longo de uma época desportiva é capaz de provocar mudanças benéficas na composição corporal, e efeitos positivos sobre variáveis funcionais, nomeadamente no decréscimo da FC<sub>max</sub> e do Lac<sub>max</sub> necessários para atingir o mesmo patamar de um teste de esforço máximo.

Os atletas *master* demonstraram não estar imunocomprometidos quando avaliados pela concentração de IgA, e a época de treino não teve influência nesta variável. O mesmo aconteceu para a concentração de cortisol salivar. Entretanto, foi observada uma redução dos níveis de testosterona salivar ao longo da época. Tendo em conta a relação desta hormona com os níveis de fadiga (Vervoorn, Vermulst, Boelens-Quist, *et al.*, 1992; Vervoorn, Quist, Vermulst, *et al.*, 1991), a acumulação de fadiga ao longo dos meses de treino e competição pode explicar a queda nos níveis de testosterona salivar. É importante referir que no início da época desportiva os atletas não apresentavam valores de testosterona diferentes do grupo controlo, possivelmente porque períodos de recuperação maior (época de férias) fazem com que os valores de testosterona sejam restaurados. Este resultado é corroborado pela correlação positiva observada entre os níveis de testosterona e o  $VO_{2max}$ , sugerindo que o aumento da capacidade aeróbia está relacionado com alta concentração de testosterona. Estes resultados indicam que o exercício ao longo da vida parece estar associado a uma favorável composição corporal também observado por outros investigadores (Hayes et al., 2013). Sugerimos que próximos estudos avaliem atletas *master* com idade mais avançada para saber se estas adaptações são mantidas.

# Conclusão

---

## Capítulo 6



Em conclusão, verificou-se que os atletas *master* apresentaram menor % das células T CD4<sup>+</sup> naïve e de memória central e das células T CD8<sup>+</sup> naïve, memória-central e memória-efetora senescentes. As diferenças não foram relevantes para as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras senescentes. As populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> senescentes e as suas subpopulações são mobilizadas em resposta ao exercício agudo, corroborando em parte a teoria do espaço imune proposta pelo grupo de Simpson. Parece que o treino ao longo da vida, mais que o efeito agudo do exercício provoca a morte destas células, considerando que a expressão do gene FasL foi similar entre atletas *master* e controlos e não sofreu efeito do exercício agudo.

Do ponto de vista inflamatório, indicadores como o rácio TNF- $\alpha$ /IL-10, estão a níveis comparáveis entre os atletas *master* e indivíduos saudáveis mais jovens (~20 anos). O número e a função das Tregs são mantidos nos atletas *master*. Entretanto, a idade exerce um efeito um pouco maior nas concentrações de IL-10, que é revertida em parte pelo treino regular. Embora as concentrações de IL-1 $\beta$  estejam aumentadas nos atletas, a concentração de IL-1ra também é maior, sugerindo uma tendência dos atletas *master* para a manutenção de um nível favorável dos marcadores que determinam a inflamação sistémica de baixo grau e do equilíbrio pró e anti-inflamatório destas citocinas.

Os atletas *master* demonstraram não estar imunocomprometidos quando avaliados pelas concentrações iniciais de IgA e a época de treino não influenciou nesta variável. O mesmo aconteceu para a concentração de cortisol salivar. Foi observada uma redução dos níveis de testosterona salivar ao longo da época, possivelmente decorrente de fadiga residual.

Assim, a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbica durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir o acumular de células T senescentes, tornando o sistema imunitário de atletas *master* mais jovem. Atletas *master* são, portanto, um modelo de envelhecimento excecionalmente bem-sucedido.

## 9.1 LIMITAÇÕES

Nosso estudo teve algumas limitações. A principal limitação deste estudo foi o pequeno tamanho da amostra, devido à dificuldade em encontrar atletas com as características de treino

necessárias para este estudo. O mesmo ocorreu para o grupo controle, uma vez que esses indivíduos tiveram que ter as características sociais, físicas e de saúde combinadas com as dos atletas. O questionário utilizado para determinar as características do treino baseava-se na recordação das atividades realizadas pelos participantes. É difícil estabelecer o histórico de treino após um período médio de  $24.6 \pm 1.83$  anos de formação. Os atletas *master* que participaram deste estudo competiram em diferentes esportes, o que nos levou a projetar um protocolo de exercício padronizado para todos eles para minimizar as diferenças devido à especificidade do treino. Este fato poderia contribuir para variâncias no tempo de teste e  $VO_{2max}$  entre os atletas *master* devido ao status de pré-condicionamento diferente. Todas as comparações *baseline* foram transversais, e não temos dados sobre o desempenho de vinte anos atrás desses atletas antes de começar suas competições. Nossa intenção foi analisar uma visão geral do treino ao longo da vida fornecendo dados das atividades físicas passadas e atuais dos participantes. Como as adaptações específicas do treino estão relacionadas com a natureza (aeróbico, força, equilíbrio), intensidade e duração do treino (Chodzko-Zajko et al., 2009), sugere-se uma interpretação cautelosa dos resultados obtidos nesta tese.

## 9.2 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Para corroborar ou refutar a tendência do aumento das proporções de Tregs naïve nos atletas *master* com a idade, sugerimos que novos estudos sejam realizados incluindo um número maior de participantes e com faixas etárias mais amplas. Sugerimos também que em estudos futuros se faça o cultivo das Tregs com estimulação para a produção de IL-10 *in vitro*. Assim, poderemos saber se o alto nível de IL-10 observado nos atletas *master* está associado a uma maior capacidade de produzir IL-10 pelas Tregs. É necessário determinar quais mecanismos são responsáveis pelo menor número de células senescentes em atletas *master* adultos e se essa resposta é mantida em atletas *master* idosos. Sugerimos que estudos futuros sejam capazes de determinar o comprimento dos telômeros nas células T naïve e de memória e que sejam determinados marcadores de *homing* celular bem como outros marcadores de apoptose. E finalmente, explorar os mecanismos pelos quais o ambiente anti-inflamatório dos atletas é melhor.

---

## Referências



- Aagaard, P., Suetta, C., Caserotti, P., Magnusson, S.P., et al. (2010) Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. [Online] 20 (1), 49–64. Available from: doi:10.1111/j.1600-0838.2009.01084.x.
- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., Kim, J.H., Bhardwaj, A., et al. (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. [Online] 119 (3), 651–665. Available from: doi:10.1182/blood-2011-04-325225 [Accessed: 31 July 2016].
- Akimoto, T., Kumai, Y., Akama, T., Hayashi, E., et al. (2003) Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. *Br J Sports Med*. [Online] 37 (1), 76–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12547749>.
- Allgrove, J.E., Gomes, E., Hough, J. & Gleeson, M. (2008) Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men. *Journal of Sports Sciences*. [Online] 26 (6), 653–661. Available from: doi:10.1080/02640410701716790 [Accessed: 29 January 2014].
- Appay, V. & Sauce, D. (2014) Naive T cells: The crux of cellular immune aging? *Experimental Gerontology*. [Online] 5490–93. Available from: doi:10.1016/j.exger.2014.01.003 [Accessed: 14 January 2015].
- de Araújo, A.L., Silva, L.C.R., Fernandes, J.R., Matias, M. de S.T., et al. (2015) Elderly men with moderate and intense training lifestyle present sustained higher antibody responses to influenza vaccine. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. [Online] 37 (6), 105. Available from: doi:10.1007/s11357-015-9843-4 [Accessed: 12 September 2016].
- Arend, W.P. (2002) The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. [Online]. 13 (4–5) pp.323–340. Available from: doi:10.1016/S1359-6101(02)00020-5.
- Armstrong, L.E., Casa, D.J., Millard-Stafford, M., Moran, D.S., et al. (2007) Exertional heat illness during training and competition. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. [Online] 39 (3), 556–572. Available from: doi:10.1249/MSS.0b013e31802fa199.
- Arruda, A.F.S., Aoki, M.S., Freitas, C.G., Spigolon, L.M.P., et al. (2015) Testosterone Concentration and Lower Limb Power Over an Entire Competitive Season in Elite Young Soccer Players. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. [Online] 29 (12), 3380–3385. Available from: doi:10.1519/JSC.0000000000000993 [Accessed: 12 September 2016].
- Banchereau, J., Pascual, V., O’Garra, A. & Anne, O. (2012) From {IL-2} to {IL-37:} the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nature immunology*. [Online] 13 (10), 925–931. Available from: doi:10.1038/ni.2406 [Accessed: 21 January 2014].
- Banfi, G., Del Fabbro, M., Mauri, C., Corsi, M.M., et al. (2006) Haematological parameters in

- elite rugby players during a competitive season. *Clinical and laboratory haematology*. [Online] 28 (3), 183–188. Available from: doi:10.1111/j.1365-2257.2006.00771.x [Accessed: 10 April 2014].
- Banfi, G., Lundby, C., Robach, P. & Lippi, G. (2011) Seasonal variations of haematological parameters in athletes. *European journal of applied physiology*. [Online] 111 (1), 9–16. Available from: doi:10.1007/s00421-010-1641-1 [Accessed: 25 August 2014].
- Banfi, G., Marinelli, M., Roi, G.S. & Agape, V. (1993) Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. *International journal of sports medicine*. [Online] 14 (7), 373–379. Available from: doi:10.1055/s-2007-1021195.
- Banfi, G., Roi, G.S., Dolci, A. & Susta, D. (2004) Behaviour of haematological parameters in athletes performing marathons and ultramarathons in altitude ('skyrunners'). *Clinical and laboratory haematology*. [Online] 26 (6), 373–377. Available from: doi:10.1111/j.1365-2257.2004.00642.x [Accessed: 10 April 2014].
- Baxter-Jones, A.D.G., Mirwald, R.L., McKay, H.A. & Bailey, D.A. (2003) A longitudinal analysis of sex differences in bone mineral accrual in healthy 8-19-year-old boys and girls. *Annals of human biology*. [Online] 30 (2), 160–175. Available from: doi:10.1080/0301446021000034642 [Accessed: 7 February 2017].
- Beavers, K.M., Ambrosius, W.T., Nicklas, B.J. & Rejeski, W.J. (2013) Independent and combined effects of physical activity and weight loss on inflammatory biomarkers in overweight and obese older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. [Online] 61 (7), 1089–1094. Available from: doi:10.1111/jgs.12321 [Accessed: 14 April 2016].
- Beavers, K.M., Brinkley, T.E. & Nicklas, B.J. (2010) Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. [Online] 411 (11–12), 785–793. Available from: doi:10.1016/j.cca.2010.02.069 [Accessed: 17 February 2014].
- Beavers, K.M., Hsu, F., Isom, S., Kritchevsky, S.B., et al. (2010) Long-term physical activity and inflammatory biomarkers in older adults. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 42 (12), 2189–2196. Available from: doi:10.1249/MSS.0b013e3181e3ac80 [Accessed: 10 April 2014].
- Beshgetoor, D., Arrues, S. & McGuire, K. (2004) Effect of competitive training on T-cell mediated immune function in Master's female athletes. *Int J Sports Med*. [Online] 25 (7), 553–558. Available from: doi:10.1055/s-2004-820944.
- Betik, A.C. & Hepple, R.T. (2008) Determinants of VO<sub>2</sub> max decline with aging: an integrated perspective. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. [Online] 33 (1), 130–140. Available from: doi:10.1139/H07-174 [Accessed: 12 June 2017].
- Beyersdorf, N., Ding, X., Tietze, J.K. & Hanke, T. (2007) Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *European Journal of Immunology*. [Online] 37 (12), 3445–3454. Available from: doi:10.1002/eji.200737126.

- Bogdanis, G.C. (2012) Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. *Frontiers in physiology*. [Online] 3142. Available from: doi:10.3389/fphys.2012.00142 [Accessed: 12 June 2017].
- Booth, N.J., McQuaid, A.J., Sobande, T., Kissane, S., et al. (2010) Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. [Online] 184 (8), 4317–4326. Available from: doi:10.4049/jimmunol.0903781.
- Borges, G.G., Rama, L.L., Pedreiro, S., Rosado, F., et al. (2012) Haematological changes in elite kayakers during a training season. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme*. [Online] 37 (6), 1140–1146. Available from: doi:10.1139/h2012-102 [Accessed: 16 March 2014].
- Branth, S., Hambraeus, L., Piehl-Aulin, K., Essén-Gustavsson, B., et al. (2009) Metabolic stress-like condition can be induced by prolonged strenuous exercise in athletes. *Uppsala journal of medical sciences*. [Online] 114 (1), 12–25. Available from: doi:10.1080/03009730802579778 [Accessed: 10 April 2014].
- Brolinson, P.G. & Elliott, D. (2007) Exercise and the immune system. *Clinics in Sports Medicine*. [Online] 26 (3), 311–319. Available from: doi:10.1016/j.csm.2007.04.011 [Accessed: 28 July 2014].
- Brown, S.J., Ryan, H.J. & Brown, J. a (2007) Age-Associated Changes In VO<sub>2</sub> and Power Output - A Cross-Sectional Study of Endurance Trained New Zealand Cyclists. *Journal of sports science & medicine*. [Online] 6 (4), 477–483. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24149481>.
- Brun, J.-F. (2002) Exercise hemorheology as a three acts play with metabolic actors: is it of clinical relevance? *Clinical hemorheology and microcirculation*. 26 (3), 155–174.
- Brunsgaard, H. & Pedersen, B.K. (2003) Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. [Online] 23 (1), 15–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645876>.
- Buskirk, E.R. & Hodgson, J.L. (1987) Age and aerobic power: the rate of change in men and women. *Federation proceedings*. [Online] 46 (5), 1824–1829. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3493922>.
- Buyukyazi, G. (2004) Differences in the cellular and humoral immune system between sedentary and endurance-trained elderly males. *Science & Sports*. [Online] 19 (3), 130–135. Available from: doi:10.1016/j.scispo.2003.10.006 [Accessed: 11 March 2014].
- Campbell, D.J. & Ziegler, S.F. (2007) FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. [Online] 7 (4), 305–310. Available from: doi:10.1038/nri2061 [Accessed: 1 September 2016].
- Campbell, J.P., Riddell, N.E., Burns, V.E., Turner, M., et al. (2009) Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. *Brain, behavior, and*

- immunity*. [Online] 23 (6), 767–775. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2009.02.011.
- Chiu, B.-C., Stolberg, V.R., Zhang, H. & Chensue, S.W. (2007) Increased Foxp3(+) Treg cell activity reduces dendritic cell co-stimulatory molecule expression in aged mice. *Mechanisms of ageing and development*. [Online] 128 (11–12), 618–627. Available from: doi:10.1016/j.mad.2007.09.002 [Accessed: 6 October 2016].
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., et al. (2009) Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing research reviews*. [Online] 8 (1), 18–30. Available from: doi:10.1016/j.arr.2008.07.002 [Accessed: 22 January 2014].
- Corthay, A. (2009) How do regulatory T cells work? *Scandinavian journal of immunology*. [Online] 70 (4), 326–336. Available from: doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x [Accessed: 20 February 2014].
- Cosgrove, C., Galloway, S.D.R., Neal, C., Hunter, A.M., et al. (2012) The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naïve, memory and senescent T cells in resting blood. *European journal of applied physiology*. [Online] 112 (8), 2989–2998. Available from: doi:10.1007/s00421-011-2273-9 [Accessed: 1 September 2016].
- Davidson, R.J., Robertson, J.D., Galea, G. & Maughan, R.J. (1987) Hematological changes associated with marathon running. *International journal of sports medicine*. [Online] 819–25. Available from: doi:10.1055/s-2008-1025634.
- DelaRosa, O., Pawelec, G., Peralbo, E., Wikby, A., et al. (2006) Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology*. [Online] 7 (5–6), 471–481. Available from: doi:10.1007/s10522-006-9062-6.
- Dhabhar, F.S. (2014) Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic research*. [Online] 58 (2–3), 193–210. Available from: doi:10.1007/s12026-014-8517-0 [Accessed: 12 September 2016].
- Dill, D.B. & Costill, D.L. (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *Journal of applied physiology*. [Online] 37 (2), 247–248. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4850854> [Accessed: 23 March 2016].
- Dinarello, C.A. (2011) A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol*. [Online] 41 (5), 1203–1217. Available from: doi:10.1002/eji.201141550.
- Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., et al. (2010) IL-1 family nomenclature. *Nature immunology*. [Online] 11 (11), 973. Available from: doi:10.1038/ni1110-973.
- El-Sayed, M., Ali, N. & El-Sayed Ali, Z. (2005) Haemorheology in exercise and training. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. 35 (8), 649–670.
- Fallon, K.E., Sivyer, G., Sivyer, K. & Dare, A. (1999) Changes in haematological parameters and iron metabolism associated with a 1600 kilometre ultramarathon. *British journal of*

- sports medicine*. [Online] 33 (1), 27–31; discussion 32. Available from: doi:10.1136/bjism.33.1.27.
- Faulkner, J.A., Davis, C.S., Mendias, C.L. & Brooks, S. V (2008) The aging of elite male athletes: age-related changes in performance and skeletal muscle structure and function. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. [Online] 18 (6), 501–507. Available from: doi:10.1097/JSM.0b013e3181845f1c [Accessed: 3 March 2016].
- Fehérvári, Z. & Sakaguchi, S. (2004) CD4+ Tregs and immune control. *The Journal of clinical investigation*. [Online] 114 (9), 1209–1217. Available from: doi:10.1172/JCI23395 [Accessed: 1 September 2016].
- Ferrando-Martínez, S., Ruiz-Mateos, E., Hernández, A., Gutiérrez, E., et al. (2011) Age-related deregulation of naive T cell homeostasis in elderly humans. *Age*. [Online] 33 (2), 197–207. Available from: doi:10.1007/s11357-010-9170-8.
- Fessler, J., Ficjan, A., Duftner, C. & Dejaco, C. (2013) The impact of aging on regulatory T-cells. *Frontiers in Immunology*. [Online] 4 (AUG), 1–6. Available from: doi:10.3389/fimmu.2013.00231.
- Feurerer, M., Hill, J. a, Mathis, D. & Benoist, C. (2009) Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nature immunology*. [Online] 10 (7), 689–695. Available from: doi:10.1038/ni.1760 [Accessed: 26 February 2014].
- Fischer, C.P. (2006) Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review*. [Online] 126–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201070> [Accessed: 18 April 2016].
- Förster, R., Davalos-Miszlitz, A.C. & Rot, A. (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology*. [Online] 8 (5), 362–371. Available from: doi:10.1038/nri2297.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D.D., et al. (2004) TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. [Online] 4 (10), 1614–1627. Available from: doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x [Accessed: 30 July 2016].
- Fujio, K., Okamura, T. & Yamamoto, K. (2010) The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in immunology*. [Online] 105 (10), 99–130. Available from: doi:10.1016/S0065-2776(10)05004-2 [Accessed: 11 March 2014].
- Fülöp, T., Larbi, A. & Pawelec, G. (2013) Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in immunology*. [Online] 4 (September), 271. Available from: doi:10.3389/fimmu.2013.00271 [Accessed: 19 February 2014].
- Gagnon, D.D., Gagnon, S.S., Rintamäki, H., Törmäkangas, T., et al. (2014) The Effects of Cold Exposure on Leukocytes, Hormones and Cytokines during Acute Exercise in Humans.

- PLoS ONE*. [Online] 9 (10), e110774. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0110774 [Accessed: 9 December 2014].
- Garg, S.K., Delaney, C., Toubai, T., Ghosh, A., et al. (2014) Aging is associated with increased regulatory T-cell function. *Aging Cell*. [Online] 13 (3), 441–448. Available from: doi:10.1111/accel.12191.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A. & Mantovani, A. (2013) The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. [Online]. 39 (6) pp.1003–1018. Available from: doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010 [Accessed: 30 July 2016].
- Della Gatta, P.A., Garnham, A.P., Peake, J.M. & Cameron-Smith, D. (2014) Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 39 80–86. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2014.01.006 [Accessed: 16 July 2014].
- Gatti, R. & De Palo, E. (2011) An update: salivary hormones and physical exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. [Online] 21 (2), 157–169. Available from: doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01252.x.
- Gaviglio, C.M., Osborne, M., Kelly, V.G., Kilduff, L.P., et al. (2015) Salivary testosterone and cortisol responses to four different rugby training exercise protocols. *European Journal of Sport Science*. [Online] 15 (6), 497–504. Available from: doi:10.1080/17461391.2015.1017012 [Accessed: 12 September 2016].
- van der Geest, K.S.M., Abdulahad, W.H., Tete, S.M., Lorencetti, P.G., et al. (2014) Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4+ T cells. *Experimental Gerontology*. [Online] 60 190–196. Available from: doi:10.1016/j.exger.2014.11.005.
- Gent, D.N. & Norton, K. (2013) Aging has greater impact on anaerobic versus aerobic power in trained masters athletes. *Journal of Sports Sciences*. [Online] 31 (1), 97–103. Available from: doi:10.1080/02640414.2012.721561.
- Gleeson, M. (2007) Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*. [Online] 103 (2), 693–699. Available from: doi:10.1152/jappphysiol.00008.2007 [Accessed: 15 July 2014].
- Gleeson, M., Bishop, N., Oliveira, M., McCauley, T., et al. (2012) Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion. *Scand J Med Sci Sports*. [Online] 22 (3), 410–417. Available from: doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01272.x.
- Gleeson, M. & Bishop, N.C. (2005) The T cell and NK cell immune response to exercise. *Annals of transplantation*. [Online] 10 (4), 43–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037088>.
- Gleeson, M. & Bishop, N.C. (2013) URI in Athletes. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. [Online] 41 (3), 148–153. Available from: doi:10.1097/JES.0b013e3182956ead.
- Gleeson, M., Bishop, N.C., Stensel, D.J., Lindley, M.R., et al. (2011) The anti-inflammatory

- effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. [Online] 11 (9), 607–615. Available from: doi:10.1038/nri3041.
- Gleeson, M. & Walsh, N.P. (2012) The BASES Expert Statement on Exercise, Immunity, and Infection. *Journal of Sports Sciences*. [Online] 30 (3), 321–324. Available from: doi:10.1080/02640414.2011.627371.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., et al. (2008) Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Online] 105 (22), 7845–7850. Available from: doi:10.1073/pnas.0712153105.
- de Gonzalo-Calvo, D., Fernández-García, B., de Luxán-Delgado, B., Rodríguez-González, S., et al. (2012) Long-term training induces a healthy inflammatory and endocrine emergent biomarker profile in elderly men. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. [Online] 34 (3), 761–771. Available from: doi:10.1007/s11357-011-9266-9 [Accessed: 25 February 2014].
- de Gonzalo-Calvo, D., Neitzert, K., Fernández, M., Vega-Naredo, I., et al. (2010) Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free radical biology & medicine*. [Online] 49 (5), 733–737. Available from: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.019 [Accessed: 27 January 2014].
- Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. (2013) Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nature immunology*. [Online] 14 (5), 428–436. Available from: doi:10.1038/ni.2588 [Accessed: 19 February 2014].
- Gottenberg, J.-E., Lavie, F., Abbed, K., Gasnault, J., et al. (2005) CD4 CD25high regulatory T cells are not impaired in patients with primary Sjögren's syndrome. *Journal of autoimmunity*. [Online] 24 (3), 235–242. Available from: doi:10.1016/j.jaut.2005.01.015.
- Gregg, R., Smith, C.M., Clark, F.J., Dunnion, D., et al. (2005) The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clinical and Experimental Immunology*. [Online] 140 (3), 540–546. Available from: doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02798.x.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., et al. (2010) Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*. [Online] 116 (6), 935–944. Available from: doi:10.1182/blood-2009-07-234872 [Accessed: 30 July 2016].
- Gwozdzinski, K., Pieniazek, A., Brzeczczynska, J., Tabaczar, S., et al. (2013) Alterations in red blood cells and plasma properties after acute single bout of exercise. *The Scientific World Journal*. [Online] 2013. Available from: doi:10.1155/2013/168376.
- Hampras, S.S., Nesline, M., Wallace, P.K., Odunsi, K., et al. (2012) Predictors of immunosuppressive regulatory T lymphocytes in healthy women. *Journal of cancer epidemiology*. [Online] 2012191090. Available from: doi:10.1155/2012/191090 [Accessed: 6 March 2014].

- Handzlik, M.K., Shaw, A.J., Dungey, M., Bishop, N.C., et al. (2013) The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *European Journal of Applied Physiology*. [Online] 113 (7), 1839–1848. Available from: doi:10.1007/s00421-013-2614-y [Accessed: 5 December 2015].
- Hanke, A.A., Staib, A., Görlinger, K., Perrey, M., et al. (2010) Whole blood coagulation and platelet activation in the athlete: a comparison of marathon, triathlon and long distance cycling. *European journal of medical research*. [Online] 15 (2), 59–65. Available from: doi:10.1186/2047-783X-15-2-59 [Accessed: 21 April 2014].
- Haugen, F., Norheim, F., Lian, H., Wensaas, A.J., et al. (2010) IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology*. [Online] 298 (4), C807–C816. Available from: doi:10.1152/ajpcell.00094.2009 [Accessed: 12 September 2016].
- Hayes, L.D., Bickerstaff, G.F. & Baker, J.S. (2010) Interactions of cortisol, testosterone, and resistance training: influence of circadian rhythms. *Chronobiology international*. [Online] 27 (4), 675–705. Available from: doi:10.3109/07420521003778773.
- Hayes, L.D., Grace, F.M., Baker, J.S. & Sculthorpe, N. (2015) Exercise-Induced Responses in Salivary Testosterone, Cortisol, and Their Ratios in Men: A Meta-Analysis. *Sports Medicine*. [Online] 45 (5), 713–726. Available from: doi:10.1007/s40279-015-0306-y.
- Hayes, L.D., Grace, F.M., Sculthorpe, N., Herbert, P., et al. (2013) Does chronic exercise attenuate age-related physiological decline in males? *Research in sports medicine (Print)*. [Online] 21 (4), 343–354. Available from: doi:10.1080/15438627.2013.825799 [Accessed: 22 July 2016].
- Hayes, L.D., Sculthorpe, N., Herbert, P., Baker, J.S., et al. (2015) Resting steroid hormone concentrations in lifetime exercisers and lifetime sedentary males. *The Aging Male*. [Online] 18 (1), 22–26. Available from: doi:10.3109/13685538.2014.977246 [Accessed: 12 September 2016].
- Hayes, L.D., Sculthorpe, N., Young, J.D., Baker, J.S., et al. (2014) Critical difference applied to exercise-induced salivary testosterone and cortisol using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): distinguishing biological from statistical change. *Journal of Physiology and Biochemistry*. [Online] 70 (4), 991–996. Available from: doi:10.1007/s13105-014-0368-6.
- Hecht, H.S. (2001) Recommendations for preparticipation screening and the assessment of cardiovascular disease in masters athletes. *Circulation*. [Online] 104 (11), E58. Available from: doi:10.1161/01.CIR.103.2.327.
- Hejazi, K. & Hosseini, S.-R.A. (2012) Influence of selected exercise on serum immunoglobulin, testosterone and cortisol in semi-endurance elite runners. *Asian journal of sports medicine*. [Online] 3 (3), 185–192. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012638> [Accessed: 9 September 2016].

- Hill, E.E., Zack, E., Battaglini, C., Viru, M., et al. (2008) Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. *Journal of endocrinological investigation*. [Online] 31 (7), 587–591. Available from: doi:10.1007/BF03345606.
- Horn, P., Pyne, D., Hopkins, W. & Barnes, C. (2010) Lower white blood cell counts in elite athletes training for highly aerobic sports. *European journal of applied physiology*. [Online] 110 (5), 925–932. Available from: doi:10.1007/s00421-010-1573-9.
- Hsieh, C.-S., Lee, H.-M. & Lio, C.-W.J. (2012) Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews. Immunology*. [Online] 12 (3), 157–167. Available from: doi:10.1038/nri3155 [Accessed: 21 January 2014].
- Hunter, C.A. & Jones, S.A. (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*. [Online] 16 (5), 448–457. Available from: doi:10.1038/ni.3153 [Accessed: 31 July 2016].
- Hwang, K.-A., Kim, H.-R. & Kang, I. (2009) Aging and human CD4(+) regulatory T cells. *Mechanisms of ageing and development*. [Online] 130 (8), 509–517. Available from: doi:10.1016/j.mad.2009.06.003 [Accessed: 21 April 2014].
- Jackowski, S.A., Baxter-Jones, A.D.G., Gruodyte-Raciene, R., Kontulainen, S.A., et al. (2015) A longitudinal study of bone area, content, density, and strength development at the radius and tibia in children 4–12 years of age exposed to recreational gymnastics. *Osteoporosis International*. [Online] 26 (6), 1677–1690. Available from: doi:10.1007/s00198-015-3041-1 [Accessed: 7 February 2017].
- Jagger, A., Shimojima, Y., Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. (2014) Regulatory T cells and the immune aging process: A mini-review. *Gerontology*. [Online] 60 (2), 130–137. Available from: doi:10.1159/000355303.
- Kakanis, M.W., Peake, J., Brenu, E.W., Simmonds, M., et al. (2014) T Helper Cell Cytokine Profiles After Endurance Exercise. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. [Online] 34 (9). Available from: doi:10.1089/jir.2013.0031 [doi].
- Kallioliass, G.D. & Ivashkiv, L.B. (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews. Rheumatology*. [Online] 12 (1), 49–62. Available from: doi:10.1038/nrrheum.2015.169 [Accessed: 31 July 2016].
- Kettunen, J.A., Kujala, U.M., Kaprio, J. & Sarna, S. (2006) Health of master track and field athletes: a 16-year follow-up study. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. [Online] 16 (2), 142–148. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603884 [Accessed: 1 August 2016].
- Kilian, Y., Engel, F., Wahl, P., Achtzehn, S., et al. (2016) Markers of biological stress in response to a single session of high-intensity interval training and high-volume training in young athletes. *European journal of applied physiology*. [Online] 116 (11–12), 2177–2186. Available from: doi:10.1007/s00421-016-3467-y [Accessed: 12 September 2016].

- Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Özcelik, D., et al. (2008) Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immunity & ageing : I & A*. [Online] 56. Available from: doi:10.1186/1742-4933-5-6 [Accessed: 17 November 2014].
- Kratz, A., Lewandrowski, K.B., Siegel, A.J., Chun, K.Y., et al. (2002) Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. *American Journal of Clinical Pathology*. [Online] 118 (6), 856–863. Available from: doi:10.1309/14TY-2TDJ-1X0Y-1V6V [Accessed: 21 September 2014].
- Kratz, A., Wood, M.J., Siegel, A.J., Hiers, J.R., et al. (2006) Effects of Marathon Running on Platelet Activation Markers : Direct Evidence for In Vivo Platelet Activation. *American Journal of Clinical Pathology*. [Online] 125 (2), 296–300. Available from: doi:10.1309/PRF5N7P2XM6E243H [Accessed: 9 September 2014].
- Krip, B., Gledhill, N., Jamnik, V. & Warburton, D. (1997) Effect of alterations in blood volume on cardiac function during maximal exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 29 (11), 1469–1476. Available from: doi:10.1097/00005768-199711000-00013.
- Krüger, K., Frost, S., Most, E., Völker, K., et al. (2009) Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. [Online] 296 (5), R1518-27. Available from: doi:10.1152/ajpregu.90994.2008 [Accessed: 12 September 2016].
- Krüger, K. & Mooren, F.C. (2014) Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exercise immunology review*. [Online] 20117–134. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974724>.
- Krüger, K. & Mooren, F.C. (2007) T cell homing and exercise. *Exercise immunology review*. [Online] 1337–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198659>.
- Kusy, K. & Zieliński, J. (2015) Sprinters versus long-distance runners: how to grow old healthy. *Exercise and sport sciences reviews*. [Online] 43 (1), 57–64. Available from: doi:10.1249/JES.0000000000000033.
- Labrie, F. (2005) Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of Endocrinology*. [Online] 187 (2), 169–196. Available from: doi:10.1677/joe.1.06264 [Accessed: 13 September 2016].
- Lages, C.S., Suffia, I., Velilla, P.A., Huang, B., et al. (2008) Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. [Online] 181 (3), 1835–1848. Available from: doi:181/3/1835 [pii] [Accessed: 21 April 2014].
- Lamm, M.E. (1998) Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. *The American journal of physiology*. [Online] 274 (4 Pt 1), G614-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575841> [Accessed: 13 September 2016].

- Larbi, A. & Fulop, T. (2014) From ‘truly naïve’ to ‘exhausted senescent’ T cells: When markers predict functionality. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. [Online] 85 (1), 25–35. Available from: doi:10.1002/cyto.a.22351 [Accessed: 30 March 2014].
- LaVoy, E.C., Bosch, J. a., Lowder, T.W. & Simpson, R.J. (2013) Acute aerobic exercise in humans increases cytokine expression in CD27- but not CD27+ CD8+ T-cells. *Brain, Behavior, and Immunity*. [Online] 27 (1), 54–62. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2012.09.006.
- Levada-Pires, A.C., Cury-Boaventura, M.F., Gorjão, R., Hirabara, S.M., et al. (2009) Induction of lymphocyte death by short- and long-duration triathlon competitions. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. [Online] 41 (10), 1896–1901. Available from: doi:10.1249/MSS.0b013e3181a327a2.
- Lira, F.S., Rosa, J.C., Zanchi, N.E., Yamashita, A.S., et al. (2009) Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell biochemistry and function*. [Online] 27 (2), 71–75. Available from: doi:10.1002/cbf.1540 [Accessed: 26 June 2016].
- Littwitz-Salomon, E., Akhmetzyanova, I., Vallet, C., Francois, S., et al. (2015) Activated regulatory T cells suppress effector NK cell responses by an IL-2-mediated mechanism during an acute retroviral infection. *Retrovirology*. [Online] 1266. Available from: doi:10.1186/s12977-015-0191-3 [Accessed: 1 September 2016].
- Lowder, T., Dugger, K., Deshane, J., Estell, K., et al. (2010) Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 24 (1), 153–159. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2009.09.011 [Accessed: 3 March 2016].
- Luz Correa, B., Ornaghi, A.P., Cerutti Muller, G., Engroff, P., et al. (2014) The inverted CD4:CD8 ratio is associated with cytomegalovirus, poor cognitive and functional states in older adults. *NeuroImmunoModulation*. [Online] 21 (4), 206–212. Available from: doi:10.1159/000356827.
- Mahmud, S.A., Manlove, L.S. & Farrar, M.A. (2013) Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAK-STAT*. [Online] 2 (1), e23154. Available from: doi:10.4161/jkst.23154 [Accessed: 16 October 2014].
- Mairböurl, H. (2013) Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in physiology*. [Online] 4332. Available from: doi:10.3389/fphys.2013.00332.
- Margarida, S., Anne, O., Saraiva, M. & O’Garra, A. (2010) The regulation of {IL-10} production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. [Online] 10 (3), 170–181. Available from: doi:10.1038/nri2711 [Accessed: 19 February 2014].
- Marina, B.-S., Carmeli, E., Ljubuncic, P., Reznick, A.Z., et al. (2008) Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation. *Free radical biology & medicine*. [Online] 44 (2), 202–214. Available from:

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.019.

- Martins, R.A., Neves, A.P., Coelho-Silva, M.J., Verissimo, M.T., et al. (2010) The effect of aerobic versus strength-based training on high-sensitivity C-reactive protein in older adults. *Eur J Appl Physiol.* [Online] 110 (1), 161–169. Available from: doi:10.1007/s00421-010-1488-5.
- Martins, R. a, Cunha, M.R., Neves, A.P., Martins, M., et al. (2009) Effects of aerobic conditioning on salivary IgA and plasma IgA, IgG and IgM in older men and women. *International journal of sports medicine.* [Online] 30 (12), 906–912. Available from: doi:10.1055/s-0029-1237389 [Accessed: 6 March 2014].
- Mattern, C.O., Gutilla, M.J., Bright, D.L., Kirby, T.E., et al. (2003) Maximal lactate steady state declines during the aging process. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985).* [Online] 95 (6), 2576–2582. Available from: doi:10.1097/00005768-200305001-01172.
- McArdle, W.D., Katch, F.I. & Katch, V.L. (2014) *Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance.* 8th edition. Williams & Wilkins (ed.). Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- McCarthy, D.A., Macdonald, I., Grant, M., Marbut, M., et al. (1992) Studies on the immediate and delayed leucocytosis elicited by brief (30-min) strenuous exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology.* [Online] 64 (6), 513–517. Available from: doi:10.1007/BF00843760.
- Mikkelsen, U.R., Couppé, C., Karlsen, A., Grosset, J.F., et al. (2013) Life-long endurance exercise in humans: circulating levels of inflammatory markers and leg muscle size. *Mechanisms of ageing and development.* [Online] 134 (11–12), 531–540. Available from: doi:10.1016/j.mad.2013.11.004 [Accessed: 10 September 2014].
- Minganti, C., Ferragina, A., Demarie, S., Verticchio, N., et al. (2011) The use of session RPE for interval training in master endurance athletes: Should rest be included? *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness.* [Online] 51 (4), 547–554. Available from: doi:R40113681 [pii].
- Minuzzi, L.G., Carvalho, H.M., Brunelli, D., Rosado, F., et al. (2016) Acute Hematological and In ammatory Responses to High-intensity Exercise Tests: Impact of Duration and Mode of Exercise. *Int J Sports Med.* [Online] 371–9. Available from: doi:10.1055/s-0042-117723.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., et al. (2009) Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity.* [Online] 30 (6), 899–911. Available from: doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019.
- Moore, K.W., Vieira, P., Fiorentino, D.F., Trounstein, M.L., et al. (1990) Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science (New York, N.Y.).* [Online] 248 (4960), 1230–1234. Available from:

doi:10.1126/science.250.4980.494-a.

- Mooren, F.C., Lechtermann, A. & Völker, K. (2004) Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 361476–1483. Available from: doi:10.1249/01.MSS.0000139897.34521.E9.
- Moro-García, M.A., Alonso-Arias, R., López-Vázquez, A., Suárez-García, F.M., et al. (2012) Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. [Online] 34 (2), 479–495. Available from: doi:10.1007/s11357-011-9240-6 [Accessed: 12 September 2016].
- Moro-García, M.A., Fernández-García, B., Echeverría, A., Rodríguez-Alonso, M., et al. (2014) Frequent participation in high volume exercise throughout life is associated with a more differentiated adaptive immune response. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 3961–74. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2013.12.014 [Accessed: 1 September 2014].
- de Moura Braz, S.C., de Melo, A.S., da Glória Aureliano de Melo Cavalca, M., Martins, S.M., et al. (2014) Increase in the Expression of CD4 + CD25+ Lymphocytic T Cells in the Indeterminate Clinical Form of Human Chagas Disease After Stimulation With Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Immunology*. [Online] 34 (8), 991–998. Available from: doi:10.1007/s10875-014-0092-6.
- Mueller, S.M., Knechtle, B., Knechtle, P. & Toigo, M. (2014) Physiological alterations after a marathon in the first 90-year-old male finisher: case study. *SpringerPlus*. [Online] 3608. Available from: doi:10.1186/2193-1801-3-608 [Accessed: 24 October 2015].
- Müller, L. & Pawelec, G. (2013) Aging and immunity - Impact of behavioral intervention. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 398–22. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2013.11.015 [Accessed: 29 April 2014].
- Neville, V., Gleeson, M. & Folland, J.P. (2008) Salivary IgA as a risk factor for upper respiratory infections in elite professional athletes. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 40 (7), 1228–1236. Available from: doi:10.1249/MSS.0b013e31816be9c3 [Accessed: 21 September 2014].
- Nieman, D.C. (1994) Exercise, infection, and immunity. *International journal of sports medicine*. [Online] 15 Suppl 3S131-41. Available from: doi:10.1055/s-2007-1021128 [Accessed: 3 January 2016].
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Smith, L.L., Utter, A.C., et al. (2001) Cytokine changes after a marathon race. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. [Online] 91 (1), 109–114. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408420 [Accessed: 21 April 2016].
- Nieman, D.C., Johanssen, L.M. & Lee, J.W. (1989) Infectious episodes in runners before and after a roadrace. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. [Online] 29 (3), 289–296. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2635263 [Accessed: 1 March 2016].

- Nieman, D.C., Nehlsen-Cannarella, S.L., Fagoaga, O.R., Henson, D. a, et al. (1998) Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. [Online] 84 (4), 1252–1259. Available from: doi:10.1097/00005768-199805000-00005.
- Papacosta, E. & Nassis, G.P. (2011) Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. *Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia*. [Online] 14 (5), 424–434. Available from: doi:10.1016/j.jsams.2011.03.004 [Accessed: 22 July 2016].
- Papacosta, E., Nassis, G.P. & Gleeson, M. (2016) Salivary hormones and anxiety in winners and losers of an international judo competition. *Journal of Sports Sciences*. [Online] 34 (13), 1281–1287. Available from: doi:10.1080/02640414.2015.1111521 [Accessed: 12 September 2016].
- Pawelec, G. (2012) Hallmarks of human {'}immunosenescence{'}: adaptation or dysregulation? *Immunity & ageing: I & A*. [Online] 9 (1), 15. Available from: doi:10.1186/1742-4933-9-15.
- Pawelec, G. (2006) Immunity and ageing in man. *Experimental gerontology*. [Online] 41 (12), 1239–1242. Available from: doi:10.1016/j.exger.2006.09.005.
- Pawelec, G. (2014) Immunosenescence: role of cytomegalovirus. *Experimental gerontology*. [Online] 541–5. Available from: doi:10.1016/j.exger.2013.11.010 [Accessed: 12 September 2016].
- Peake, J. & Suzuki, K. (2004) Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exercise immunology review*. [Online] 10129–141. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15633591>.
- Peake, J.M., Della Gatta, P., Suzuki, K. & Nieman, D.C. (2015) Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise immunology review*. [Online] 218–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826432> [Accessed: 24 November 2015].
- Pedersen, B. & Hoffman-Goetz, L. (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews*. 80 (3), 1055–1081.
- Pedersen, B.K. & Febbraio, M.A. (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*. [Online] 88 (4), 1379–1406. Available from: doi:10.1152/physrev.90100.2007 [Accessed: 31 July 2016].
- Perry, C., Pick, M., Bdoiach, N., Hazan-Halevi, I., et al. (2013) Endurance Exercise Diverts the Balance between Th17 Cells and Regulatory T Cells. *PLoS ONE*. [Online] 8 (10), 1–8. Available from: doi:10.1371/journal.pone.0074722 [Accessed: 3 March 2016].
- Pike, K. a & Tremblay, M.L. (2013) Regulating naïve and memory CD8 T cell homeostasis--a role for protein tyrosine phosphatases. *The FEBS journal*. [Online] 280 (2), 432–444. Available from: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08587.x.

- Pollock, R.D., Carter, S., Velloso, C.P., Duggal, N.A., et al. (2015) An investigation into the relationship between age and physiological function in highly active older adults. *The Journal of Physiology*. [Online] 593 (3), 657–680. Available from: doi:10.1113/jphysiol.2014.282863.
- Powers, S.K. & Howley, E.T. (2012) *Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance*. McGraw-Hill.
- Prieto-Hinojosa, A., Knight, A., Compton, C., Gleeson, M., et al. (2014) Reduced thymic output in elite athletes. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 3975–79. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2014.01.004 [Accessed: 21 September 2014].
- Reaburn, P. & Dascombe, B. (2008) Endurance performance in masters athletes. *European Review of Aging and Physical Activity*. [Online] 5 (1), 31–42. Available from: doi:10.1007/s11556-008-0029-2 [Accessed: 6 July 2016].
- Reihmane, D. & Dela, F. (2014) Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *European journal of sport science*. [Online] 14 (3), 242–250. Available from: doi:10.1080/17461391.2013.776640 [Accessed: 24 December 2014].
- Reihmane, D., Jurka, A., Tretjakovs, P. & Dela, F. (2013) Increase in IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-9, but not sICAM-1, concentrations depends on exercise duration. *European journal of applied physiology*. [Online] 113 (4), 851–858. Available from: doi:10.1007/s00421-012-2491-9 [Accessed: 6 December 2015].
- Reinke, S., Geissler, S., Taylor, W.R., Schmidt-Bleek, K., et al. (2013) Terminally Differentiated CD8+ T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans. *Science Translational Medicine*. [Online] 5 (177), 177ra36-177ra36. Available from: doi:10.1126/scitranslmed.3004754 [Accessed: 8 November 2016].
- Rittweger, J.J., di Prampero, P.E., Maffulli, N. & Narici, M. V (2009) Sprint and endurance power and ageing: an analysis of master athletic world records. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. [Online] 276 (October 2008), 683–689. Available from: doi:10.1098/rspb.2008.1319.
- Rodriguez-Miguel, P., Fernandez-Gonzalo, R., Almar, M., Mejías, Y., et al. (2014) Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. [Online] 36 (6), 9734. Available from: doi:10.1007/s11357-014-9734-0 [Accessed: 21 April 2016].
- Röhling, M., Herder, C., Stemper, T. & Müssig, K. (2016) Influence of Acute and Chronic Exercise on Glucose Uptake. *Journal of Diabetes Research*. [Online] 20161–33. Available from: doi:10.1155/2016/2868652.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A. (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*. [Online] 10 (7), 490–500. Available from: doi:10.1038/nri2785 [Accessed: 1 September 2016].
- Sallam, N. & Laher, I. (2016) Exercise Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Aging

- and Cardiovascular Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. [Online] 20161–32. Available from: doi:10.1155/2016/7239639.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., et al. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. [Online] 401 (6754), 708–712. Available from: doi:10.1038/44385.
- Santos, V.C., Levada-Pires, A.C., Alves, S.R., Pithon-Curi, T.C., et al. (2013) Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. *Cell biochemistry and function*. [Online] 31 (3), 237–243. Available from: doi:10.1002/cbf.2877 [Accessed: 10 April 2014].
- Scheer, B.V. & Murray, A. (2011) Al Andalus Ultra Trail: An Observation of Medical Interventions During a 219-km, 5-Day Ultramarathon Stage Race. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. [Online] 21 (5), 444–446. Available from: doi:10.1097/JSM.0b013e318225b0df.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. [Online] 1813 (5), 878–888. Available from: doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Scheller, J., Garbers, C. & Rose-John, S. (2014) Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Seminars in Immunology*. [Online] 26 (1), 2–12. Available from: doi:10.1016/j.smim.2013.11.002.
- Schett, G., Dayer, J.-M. & Manger, B. (2015) Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*. [Online] 12 (1), 14–24. Available from: doi:10.1038/nrrheum.2016.166.
- Schmidt, A., Oberle, N. & Krammer, P.H. (2012) Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology*. [Online] 3 (March), 51. Available from: doi:10.3389/fimmu.2012.00051 [Accessed: 19 February 2014].
- Senchina, D.S. & Kohut, M.L. (2007) Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clinical interventions in aging*. [Online] 2 (1), 3–16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2684080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed: 10 April 2014].
- Shaikh, S.R. & Edidin, M. (2006) Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *The American journal of clinical nutrition*. [Online] 84 (6), 1277–1289. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158407> [Accessed: 29 July 2016].
- Sharma, S., Dominguez, A.L. & Lustgarten, J. (2006) High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. [Online] 177 (12), 8348–8355. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17142731> [Accessed: 6 October 2016].

- Shaw, K.L., Ostrow, A. & Beckstead, J. (2005) Motivation and the Senior Athlete. An examination of the psychometric properties of the Sport Motivation Scale. *Topics in Geriatric Rehabilitation*. 21 (3), 206–214.
- Shephard, R.J., Kavanagh, T., Mertens, D.J., Qureshi, S., et al. (1995) Personal health benefits of Masters athletics competition. *British journal of sports medicine*. [Online] 29 (1), 35–40. Available from: doi:10.1136/bjism.29.1.35 [Accessed: 19 September 2016].
- Shinkai, S., Kohno, H., Kimura, K., Komura, T., et al. (1995) Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc*. [Online] 27 (11), 1516–1526. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8587488>.
- Silva, L.C.R., de Araújo, A.L., Fernandes, J.R., Matias, M. de S.T., et al. (2016) Moderate and intense exercise lifestyles attenuate the effects of aging on telomere length and the survival and composition of T cell subpopulations. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. [Online] 38 (1), 24. Available from: doi:10.1007/s11357-016-9879-0.
- Simpson, R.J. (2011a) Aging, Persistent Viral Infections, and Immunosenescence. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. [Online] 39 (1), 23–33. Available from: doi:10.1097/JES.0b013e318201f39d.
- Simpson, R.J. (2011b) Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise ‘make space’? *Exercise and sport sciences reviews*. [Online] 39 (1), 23–33. Available from: doi:10.1097/JES.0b013e318201f39d [Accessed: 1 March 2016].
- Simpson, R.J., Bigley, A.B., Spielmann, G., LaVoy, E.C.P., et al. (2016) Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. *Exercise Immunology Review*. [Online] 228–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853134> [Accessed: 1 September 2016].
- Simpson, R.J., Cosgrove, C., Chee, M.M., McFarlin, B.K., et al. (2010) Senescent phenotypes and telomere lengths of peripheral blood T-cells mobilized by acute exercise in humans. *Exercise immunology review*. [Online] 16 (713), 40–55. Available from: doi:TNK0120.
- Simpson, R.J., Cosgrove, C., Ingram, L. a, Florida-James, G.D., et al. (2008) Senescent T-lymphocytes are mobilised into the peripheral blood compartment in young and older humans after exhaustive exercise. *Brain Behav Immun*. [Online] 22 (4), 544–551. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2007.11.002 [Accessed: 11 March 2014].
- Simpson, R.J., Florida-James, G.D., Cosgrove, C., Whyte, G.P., et al. (2007) High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood compartment in human subjects. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. [Online] 103 (1), 396–401. Available from: doi:10.1152/jappphysiol.00007.2007 [Accessed: 5 May 2014].
- Simpson, R.J. & Guy, K. (2010) Coupling aging immunity with a sedentary lifestyle: has the damage already been done?--a mini-review. *Gerontology*. [Online] 56 (5), 449–458. Available from: doi:10.1159/000270905.

- Simpson, R.J., Kunz, H., Agha, N. & Graff, R. (2015) Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Progress in molecular biology and translational science*. [Online] 135355–380. Available from: doi:10.1016/bs.pmbts.2015.08.001.
- Simpson, R.J., Lowder, T.W., Spielmann, G., Bigley, A.B., et al. (2012) Exercise and the aging immune system. *Ageing research reviews*. [Online] 11 (3), 404–420. Available from: doi:10.1016/j.arr.2012.03.003 [Accessed: 14 July 2014].
- Singh, T. & Newman, A.B. (2011) Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing research reviews*. [Online] 10 (3), 319–329. Available from: doi:10.1016/j.arr.2010.11.002 [Accessed: 21 April 2014].
- Słowinska-Lisowska, M. & Majda, J. (2002) Hormone plasma levels from pituitary-gonadal axis in performance athletes after the 400 m run. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. [Online] 42 (2), 243–249. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032423> [Accessed: 12 September 2016].
- Spielmann, G., Bollard, C.M., Bigley, A.B., Hanley, P.J., et al. (2014) The effects of age and latent cytomegalovirus infection on the redeployment of CD8+ T cell subsets in response to acute exercise in humans. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 39142–151. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2013.05.003 [Accessed: 21 September 2014].
- Spielmann, G., McFarlin, B.K., O'Connor, D.P., Smith, P.J.W., et al. (2011) Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 25 (8), 1521–1529. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2011.07.226 [Accessed: 6 March 2014].
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Møller, K., et al. (2003) IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. [Online] 285 (2), E433–E437. Available from: doi:10.1152/ajpendo.00074.2003.
- Steensberg, a, Toft, a D., Bruunsgaard, H., Sandmand, M., et al. (2001) Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 91 (4), 1708–1712.
- Tanaka, H., Monahan, K.D. & Seals, D.R. (2001) Age-predicted maximal heart rate revisited. *Journal of the American College of Cardiology*. [Online] 37 (1), 153–156. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153730> [Accessed: 12 April 2016].
- Tanaka, H. & Seals, D.R. (2008) Endurance exercise performance in Masters athletes: age-associated changes and underlying physiological mechanisms. *The Journal of physiology*. [Online] 586 (1), 55–63. Available from: doi:10.1113/jphysiol.2007.141879.
- Tanaka, H. & Seals, D.R. (2003) Invited Review: Dynamic exercise performance in Masters athletes: insight into the effects of primary human aging on physiological functional capacity. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. [Online] 95 (5), 2152–2162. Available from: doi:10.1152/jappphysiol.00320.2003.

- Tauro, S., Nguyen, P., Li, B. & Geiger, T.L. (2013) Diversification and senescence of Foxp3+ regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*. [Online] 43 (5), 1195–1207. Available from: doi:10.1002/eji.201242881 [Accessed: 15 September 2014].
- Teixeira, A.M., Rama, L., Carvalho, H.M., Borges, G., et al. (2014) Changes in naïve and memory T-cells in elite swimmers during a winter training season. *Brain, behavior, and immunity*. [Online] 39186–193. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2014.01.002 [Accessed: 24 August 2014].
- Timmons, B.W., Tarnopolsky, M. a, Snider, D.P. & Bar-Or, O. (2006) Immunological changes in response to exercise: influence of age, puberty, and gender. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 38 (2), 293–304. Available from: doi:10.1249/01.mss.0000183479.90501.a0.
- Tossige-Gomes, R., Ottone, V.O.O., Oliveira, P.N.N., Viana, D.J.S.J.S., et al. (2014) Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. [Online] 0 (ahead), 000–000. Available from: doi:10.1590/1414-431X20143187 [Accessed: 21 April 2014].
- Traiperm, N., Gatterer, H. & Burtscher, M. (2013) Plasma electrolyte and hematological changes after marathon running in adolescents. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 45 (6), 1182–1187. Available from: doi:10.1249/MSS.0b013e3182831a93 [Accessed: 21 September 2014].
- Trochimiak, T. & Hübner-Woźniak, E. (2012) Effect of exercise on the level of immunoglobulin a in saliva. *Biology of sport*. [Online] 29 (4), 255–261. Available from: doi:10.5604/20831862.1019662 [Accessed: 16 July 2014].
- Tsai, M.-L., Ko, M.-H., Chang, C.-K., Chou, K.-M., et al. (2011) Impact of intense training and rapid weight changes on salivary parameters in elite female Taekwondo athletes. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. [Online] 21 (6), 758–764. Available from: doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01099.x [Accessed: 13 September 2016].
- Turner, J.E. (2016) Is immunosenescence influenced by our lifetime ‘dose’ of exercise? *Biogerontology*. [Online] 17 (3), 581–602. Available from: doi:10.1007/s10522-016-9642-z.
- Turner, J.E., Aldred, S., Witard, O.C., Drayson, M.T., et al. (2010) Latent Cytomegalovirus infection amplifies CD8 T-lymphocyte mobilisation and egress in response to exercise. *Brain, Behavior, and Immunity*. [Online] 24 (8), 1362–1370. Available from: doi:10.1016/j.bbi.2010.07.239.
- Turner, J.E., Campbell, J.P., Edwards, K.M., Howarth, L.J., et al. (2014) Rudimentary signs of immunosenescence in Cytomegalovirus-seropositive healthy young adults. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. [Online] 36 (1), 287–297. Available from: doi:10.1007/s11357-013-9557-4 [Accessed: 12 September 2016].

- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D.J. (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. [Online] 1843 (11), 2563–2582. Available from: doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014 [Accessed: 10 July 2014].
- Uchiyama, M., Jin, X., Yin, E., Shimokawa, T., et al. (2015) Treadmill exercise induces murine cardiac allograft survival and generates regulatory T cell. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. [Online] 28 (3), 352–362. Available from: doi:10.1111/tri.12491 [Accessed: 3 March 2016].
- Urhausen, A., Gabriel, H. & Kindermann, W. (1995) Blood Hormones as Markers of Training Stress and Overtraining. *Sports Medicine*. [Online] 20 (4), 251–276. Available from: doi:10.2165/00007256-199520040-00004 [Accessed: 13 September 2016].
- van de Veerdonk, F.L. & Netea, M.G. (2013) New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. *Frontiers in immunology*. [Online] 4 (July), 167. Available from: doi:10.3389/fimmu.2013.00167 [Accessed: 27 February 2014].
- Vervoorn, C., Quist, a M., Vermulst, L.J., Erich, W.B., et al. (1991) The behaviour of the plasma free testosterone/cortisol ratio during a season of elite rowing training. *International journal of sports medicine*. [Online] 12 (3), 257–263. Available from: doi:10.1055/s-2007-1024677.
- Vervoorn, C., Vermulst, L.J., Boelens-Quist, A.M., Koppeschaar, H.P., et al. (1992) Seasonal changes in performance and free testosterone: cortisol ratio of elite female rowers. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. [Online] 64 (1), 14–21. Available from: doi:10.1007/BF00376433.
- Vining, R.F. & McGinley, R.A. (1987) The measurement of hormones in saliva: Possibilities and pitfalls. *Journal of Steroid Biochemistry*. [Online] 27 (1–3), 81–94. Available from: doi:10.1016/0022-4731(87)90297-4 [Accessed: 13 September 2016].
- Vining, R.F., McGinley, R.A. & Symons, R.G. (1983) Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clinical chemistry*. [Online] 29 (10), 1752–1756. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225566> [Accessed: 13 September 2016].
- Volpe, E., Sambucci, M., Battistini, L. & Borsellino, G. (2016) Fas–Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*. [Online] 7382. Available from: doi:10.3389/fimmu.2016.00382 [Accessed: 5 October 2016].
- Walsh, N., Gleeson, M., Pyne, D., Nieman, D., et al. (2011) Position statement. Part two: Maintaining immune health. *Exercise immunology review*. 1764–6103.
- Walsh, N., Gleeson, M.M., Shephard, R., Woods, J., et al. (2011) Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exercise immunology review*. 176–63.
- Wang, J., Song, H., Tang, X., Yang, Y., et al. (2012) Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports*. [Online] 22

- (5), 643–652. Available from: doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01288.x [Accessed: 12 March 2016].
- Wills, M., Akbar, A., Beswick, M., Bosch, J., et al. (2011) Report from the second cytomegalovirus and immunosenescence. *Immunity & ageing: I & A*. [Online] 8 (1). Available from: doi:10.1186/1742-4933-8-10.
- Wiswell, R. a, Jaque, S. V, Marcell, T.J., Hawkins, S. a, et al. (2000) Maximal aerobic power, lactate threshold, and running performance in master athletes. *Medicine and science in sports and exercise*. [Online] 32 (6), 1165–1170. Available from: doi:10.1097/00005768-200006000-00021.
- Woods, J.A., Wilund, K.R., Martin, S.A. & Kistler, B.M. (2012) Exercise, inflammation and aging. *Aging Dis.* [Online] 3 (1), 130–140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500274> [Accessed: 26 June 2016].
- Wu, I.-C., Lin, X.-Z., Liu, P.-F., Tsai, W.-L., et al. (2010) Low serum testosterone and frailty in older men and women. *Maturitas*. [Online] 67 (4), 348–352. Available from: doi:10.1016/j.maturitas.2010.07.010.
- Yazici, M., Kaya, A., Kaya, Y., Albayrak, S., et al. (2009) Lifestyle modification decreases the mean platelet volume in prehypertensive patients. *Platelets*. [Online] 2058–63. Available from: doi:10.1080/09537100802613449.
- Yeh, S.-H., Chuang, H., Lin, L.-W., Hsiao, C.-Y., et al. (2006) Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells. *British journal of sports medicine*. [Online] 40 (3), 239–243. Available from: doi:10.1136/bjism.2005.022095 [Accessed: 12 May 2016].
- Yeh, S.-H., Chuang, H., Lin, L.-W., Hsiao, C.-Y., et al. (2009) Regular Tai Chi Chuan exercise improves T cell helper function of patients with type 2 diabetes mellitus with an increase in T-bet transcription factor and IL-12 production. *British journal of sports medicine*. [Online] 43 (11), 845–850. Available from: doi:10.1136/bjism.2007.043562 [Accessed: 15 April 2016].
- Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. & Mori, T. (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *Journal of biochemistry*. [Online] 147 (6), 781–792. Available from: doi:10.1093/jb/mvq043 [Accessed: 28 April 2016].
- Yuzefpolskiy, Y., Baumann, F.M., Kalia, V. & Sarkar, S. (2014) Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation. *Cellular & molecular immunology*. [Online] Available from: doi:10.1038/cmi.2014.48 [Accessed: 4 November 2014].
- Zavorsky, G.S. (2000) Evidence and possible mechanisms of altered maximum heart rate with endurance training and tapering. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. [Online] 29 (1), 13–26. Available from: doi:10.2165/00007256-200029010-00002.



---

## **Anexos**



## Anexo 1 – Questionário de saúde

NÚMERO: \_\_\_\_\_ NOME: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Fumador:  Sim  Não

1. Sofre atualmente de alguma doença?

Sim  Não

Se sim apresente detalhes: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

2. Toma atualmente algum medicamento?

Sim  Não

Se sim apresente detalhes: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

3. Toma atualmente algum suplemento?

Sim  Não

Se sim apresente detalhes: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

4. Descreva os alimentos consumidos nas últimas 24h

Refeições	Alimentos (incluindo bebidas)	Porções (i.e.: copos, colheres de sopa, chávena, etc)
Pequeno Almoço		
Reforço		
Almoço		
Lanche		
Jantar		
Ceia		

5. Apresente qualquer informação adicional sobre sua saúde que julgue relevante durante o período que participou do estudo:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Anexo 2 – Histórico Desportivo**

NÚMERO: \_\_\_\_\_ NOME: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

**Parte 1: Ilustração da prática desportiva ao longo da vida**

Ano / Etapa	Idade	Categoria / Modalidades	Horas por semana no desporto	Meses por ano no desporto	Lesões

**Parte 2: Desenvolvimento de atividades de treino durante a época ANO 2014/2015**

Etapa	Actividades	Categoria	Horas/semana	Esforço físico	Competição (no caso de haver competição, incluir pormenores, tipo de prova...)	Resultados
				<input type="checkbox"/> fácil <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> intenso <input type="checkbox"/> muito intenso <input type="checkbox"/> _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
				<input type="checkbox"/> fácil <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> intenso <input type="checkbox"/> muito intenso <input type="checkbox"/> _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
				<input type="checkbox"/> fácil <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> intenso <input type="checkbox"/> muito intenso <input type="checkbox"/> _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
				<input type="checkbox"/> fácil <input type="checkbox"/> moderado <input type="checkbox"/> intenso <input type="checkbox"/> muito intenso <input type="checkbox"/> _____	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	



## Exercício e mobilização de linfócitos T senescentes: Uma meta-análise

### Exercise and mobilization of senescent T lymphocytes: A meta-analysis

Luciéle Guerra Minuzzi<sup>1\*</sup>, Ana Maria Miranda Botelho Teixeira<sup>1</sup>, José Pedro Ferreira<sup>1</sup>

ARTIGO DE REVISÃO | REVIEW ARTICLE

#### RESUMO

O objectivo deste estudo foi avaliar a hipótese que o exercício físico induz aumentos na mobilização de células T senescentes. Foi realizado um levantamento sistematizado de estudos empíricos indexados nas bases de dados PUBMED e ScienceDirect, utilizando as palavras-chave: “exercise”, “exercise-induced mobilization of T lymphocytes”, “exercise-induced mobilization of CD8”, “immune space”, “senescent T-cell mobilization”, “naive T-cell repertoire”, “senescent T-cell repertoire”. Foram encontrados 442 estudos (PUBMED = 99 estudos; ScienceDirect = 343 estudos), sendo que seis preencheram todos os critérios definidos para inclusão na meta-análise. Os estudos que cumpriram os critérios de inclusão foram avaliados quanto a qualidade metodológica com a escala de PEDro e analisados utilizando o software Comprehensive Meta-analysis. Foram calculados a diferença entre os erros padrão da média (*Std diff in means*), o intervalo de confiança (95% CI), e os scores Z e P (*Z-value* e *P-value*). O exercício físico aumentou a mobilização de células T senescentes para o sangue periférico, quando comparados os valores agudos obtidos logo após o término do exercício com os valores pré-exercício. É possível que esta mobilização preferencial leve a indução da apoptose destas células criando espaço para a produção de células T virgens.

*Palavras-chaves:* Exercício, Células T senescentes, Imunosenesescência, Espaço imune

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the hypothesis of increased mobilization of senescent T cells to the peripheral blood induced by exercise. The systematic survey of indexed empirical studies was conducted in PubMed and ScienceDirect databases using the keywords: “exercise”, “exercise-induced mobilization of T lymphocytes”, “exercise-induced mobilization of CD8”, “immune space”, “senescent T-cell mobilization”, “naive T-cell repertoire”, “senescent T-cell repertoire”. The main criterion was the mobilization of senescent T lymphocytes after exercise. After search, 442 studies (PUBMED = 99 studies; ScienceDirect = 343 studies) were found and six met all the criteria for inclusion in the meta-analysis. The studies that met the inclusion criteria were assessed for methodological quality with the PEDro scale. Data were analyzed using Comprehensive Meta-analysis software. The difference between the standard errors of the mean (*Std diff in means*), the confidence interval (95 % CI), and P and Z scores (*Z-value* and *P-value*) were calculated. In conclusion, acute exercise mobilizes a population of CD8+ T-cells exhibiting a senescent phenotype into the peripheral blood compartment. It is possible that this mobilization induces apoptosis of these cells and create a vacant space for the production of naive T cells.

*Keywords:* Exercise, senescent T cells, immunosenescence, immune space

Artigo recebido a 06.01.2014; Aceite a 25.06.2014

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física - Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

\* *Autor correspondente:* Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física - Universidade de Coimbra Pavilhão III - Santa Clara, 3040-156, Coimbra, Portugal *E-mail:* lucielegm@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Teorias sobre o mecanismo do envelhecimento humano foram propostas, inúmeras vezes, ao longo dos últimos 2000 anos e ainda não temos uma explicação geralmente aceita e comprovada sobre este fenômeno universal da vida. Isto porque o envelhecimento consiste em vários eventos com uma variedade de causas, sendo que ninguém foi capaz de apontar uma causa predominante (Burzynski, 2003). Determinar até que ponto os fatores genéticos e o estilo de vida influenciam os declínios funcionais associados à idade e à magnitude das respostas adaptativas ao exercício (ou seja, treinabilidade) em populações mais jovens e mais idosas, é uma área de investigação ativa (Chodzko-Zajko et al., 2009).

Se o tempo de vida do ser humano aumenta, existe uma tendência a ocorrer, de modo concomitante, um aumento da carga de morbidade da população, levando a uma maior prevalência de doenças infecciosas e malignas relacionadas com a idade. A resistência de um organismo à doença e à infecção é comprometida com a idade devido ao aparecimento de declínios inevitáveis no funcionamento normal do sistema imune (Simpson et al., 2012). Durante o envelhecimento, em particular, a capacidade para combater infecções está diminuída pelo sistema imune, tal como evidenciado pelo aumento do número de infecções com sintomas mais graves, de duração prolongada e pior diagnóstico. Além disso, a reativação de infecções crônicas ocorre numa frequência maior em humanos e ratos idosos. Estas disfunções sugerem alterações em todos os componentes do sistema imune, mas as alterações mais consistentes e significativas são vistas no compartimento dos linfócitos T (Lages et al., 2008).

O braço adaptativo do sistema imune (isto é, células T, células B e seus produtos) parece diminuir mais com o aumento da idade e as alterações relacionadas com a idade no interior do compartimento das células T (isto é, a razão CD4/CD8 invertida, baixas respostas proliferativas, o aumento das células de memória e baixa síntese de IL-2) são características marcantes do

Perfil de Risco Imune - uma mistura de biomarcadores imunes que foram utilizados para prever morbidade e mortalidade em idosos (Pawelec, 2006).

A expansão clonal de células T, em resposta a um estímulo antigénico é um processo fundamental da imunidade adaptativa, permitindo a identificação de antígenos específicos de células T efetoras para combater os patógenos invasores. No entanto, esta expansão clonal não é infinita, e após ciclos repetidos e excessivos de divisão celular, as células T sofrem paragem do ciclo celular e tornam-se senescentes. Neste estado, as células T não serão mais expandidas clonalmente sob futura estimulação antigénica, mas ainda mantém as propriedades de células efetoras (por exemplo, reconhecer e matar as células infetadas por vírus) e ainda são capazes de produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\gamma$  (Spielmann et al., 2011). Nomeadamente, a estimulação antigénica faz com que células T proliferem (sofrem expansão clonal via divisão celular) e se diferenciem em células T efetoras que desempenham funções especializadas, tais como a secreção de citocinas, reconhecimento e morte de células alvo, e a ativação de macrófagos e células B produtoras de anticorpos. A exposição antigénica repetida (isto é, ao longo da vida) aumenta a frequência de células T senescentes no sangue e tecidos. O aparecimento de células T senescentes ocorre devido ao excesso de expansões clonais que ocorrem como parte de uma resposta imune normal à reativação viral ou à invasão do organismo ao longo da vida. Isso, juntamente com uma redução de células T naïve recém-funcionais saindo do timo atrofiado, contribui para a diminuição do repertório de células T naïve (isto é, reduzido espaço imune).

Assim, a exposição repetida a estímulos antigénicos de crescimento durante todo o tempo de vida (ou seja, reativação de infecções virais latentes) leva a mais “rounds” de divisão celular e senescência prematura. Na medida em que essas células T senescentes ainda retêm funções imediatas das células efetoras (ou seja, morte de

células infetadas por vírus), e são altamente pró-inflamatórias, o seu acúmulo no sangue e nos tecidos pode também contribuir para um certo número de patologias associadas com a inflamação (Simpson & Guy, 2010).

Linfócitos T senescentes são células experientes em antigénio que expressam KLRG1 e/ou CD57 na superfície celular (Simpson et al., 2008). A expressão de KLRG1, como marcador de senescência replicativa, é dependente do número de divisões celulares seguindo a estimulação antigénica. Células T CD8<sup>+</sup> expressando KLRG1 são células experientes em antigénios com uma capacidade diminuída para proliferar, mas ainda mantendo capacidades efetoras imediatas, tais como o reconhecimento e morte de células-alvo (Simpson et al., 2008). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> com alta expressão de CD57 tem uma reduzida habilidade de proliferar, citotoxicidade aumentada, produzem menos IL-2 mas mais IFN- $\gamma$ , e tem características indicativas de senescência replicativa, incluindo telômeros encurtados e aumento da expressão de KLRG1. Essas mesmas populações celulares falham em expressar CD28, uma importante molécula co-estimuladora para a ativação e proliferação de linfócitos T naive após um encontro antigénico.

Os efeitos benéficos do exercício podem vir tanto de perspectivas de prevenção e / ou rejuvenescimento (Simpson & Guy, 2010). Em primeiro lugar, a partir do ponto de vista da prevenção, o exercício pode provocar efeitos secundários sobre o sistema imune, devido às suas bem conhecidas propriedades redutoras de estresse, limitando assim o potencial de reativação viral latente induzida por estresse e erosão dos telômeros. Em segundo lugar, a partir do ponto de vista do tratamento/rejuvenescimento, o exercício regular pode levar à destruição do excesso de clones virais específicos de células T por meio de apoptose, libertando o "espaço imune" para ser ocupado pelas células T naive e expandindo o repertório antigénico de células T (Simpson, 2011). Para que este processo aconteça, Simpson and Guy (2010) propõem a existência de três fases distintas que devem ocorrer:

- 1) uma mobilização seletiva de células T senescentes dos tecidos periféricos para o compartimento do sangue durante o exercício; 2) extravasamento de células T senescentes da circulação e sua posterior apoptose nos tecidos periféricos durante a recuperação do exercício; 3) geração subsequente de células T naive para substituir as células T senescentes deletadas. Detalhadamente, o exercício agudo provoca a mobilização preferencial de células T altamente diferenciadas e senescentes dos tecidos periféricos para o compartimento do sangue (linfocitose), sob a influência de catecolaminas.

Por outro lado, o exercício aumenta a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), glicocorticóides, e citocinas pró-inflamatórias, expondo assim as células T senescentes a um meio de estímulos pró-apoptóticos. Recetores de superfície celular de morte (FAS / FAS ligante (FasL)) são "up-regulados" em células T senescentes, que também estão sujeitos a danos oxidativos de ADN no sangue. Estas células suscetíveis à apoptose, juntamente com células T naive e de memória danificadas, saem do compartimento sanguíneo durante a fase de recuperação do exercício (linfocitopenia) e migram para tecidos específicos. Uma parte destas células T senescentes subsequentemente sofrem apoptose nos tecidos periféricos, criando assim espaço vago. Por conseguinte, a redução no número de células T conduz a um feedback positivo, aumentando a saída de células T naive do timo ou de locais de desenvolvimento de células T extra timo (isto é, fígado, intestinos). Estas células T recém-geradas preenchem o espaço vago e contribuem para um repertório expandido de células T naive. Repetições deste processo em resposta ao exercício habitual reduzem o número de células T senescentes ao longo do tempo, diminuindo o risco de infeção e aumentando a longevidade saudável (Simpson & Guy, 2010).

No presente estudo realizamos uma pesquisa bibliográfica com o objetivo de avaliar a hipótese que o exercício físico induz aumentos na mobilização de células T senescentes.

## MÉTODO

O levantamento bibliográfico sistematizado de estudos empíricos foi realizado nas bases de dados PUBMED e Science Direct, sendo o período selecionado para a busca o compreendido entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2012. Para a realização da busca on-line utilizaram-se os seguintes termos de busca ou descritores: *exercise*, *exercise-induced mobilization of T lymphocytes*, *exercise-induced mobilization of CD8*, *immune space*, *senescent T-cell mobilization*, *naive T-cell repertoire*, *senescent T-cell repertoire*.

### Critérios de inclusão e exclusão na revisão

Na presente meta-análise foram incluídos apenas estudos publicados em língua inglesa. A pesquisa foi limitada a artigos de revistas científicas, não tendo sido consideradas teses e outras dissertações, capítulos de livros e estudos não publicados. A base de dados analisada também não incluiu artigos de revisão e estudos publicados antes do ano 2000.

O principal critério de inclusão foi a mobilização de linfócitos T senescentes após o exercício.

O interesse desta meta-análise era obter informações quanto aos efeitos agudos do exercício, pelo que foram excluídos os resultados de estudos com intervenções de suplementação e/ou treino, sendo apenas considerados os resultados dos efeitos agudos apresentados pelos diferentes estudos. Quando diferentes intensidades de exercício foram avaliadas, apenas foi incluída para efeito de análise, o valor de intensidade mais elevado. Quando diferentes faixas etárias foram consideradas, foram apenas incluídos os resultados referentes a indivíduos até 40 anos de idade. Não foi objetivo do estudo considerar a intensidade e a idade como variáveis moderadoras, podendo tal ser equacionado em futuros estudos.

Foram considerados apenas os linfócitos T CD8<sup>+</sup> senescentes. Para determinar a senescência foram aceites os marcadores: KLRG1<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>, KLRG1<sup>+</sup>/CD57<sup>+</sup>, KLRG1<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup>.

No presente estudo foram encontrados 442 artigos em duas bases de dados: PUBMED (99 estudos) e Science Direct (343 estudos). Após a identificação dos critérios de interesse através da leitura criteriosa dos respectivos resumos, foram selecionados um total de 69 estudos. Destes, seis preencheram todos os critérios definidos para inclusão na meta-análise. Os demais estudos (63) foram excluídos por: i) estarem repetidos nas diferentes base de dados e nos critérios de busca (n = 50), ii) serem artigos de revisão (n = 02), iii) não apresentarem resultados estatísticos que possibilitassem a análise do estudo ou iv) por não contemplarem os critérios de inclusão nomeados anteriormente (marcadores de senescência, por exemplo) (n = 11).

### Análise Estatística

Depois de concluída a seleção dos estudos, os dados foram inseridos e projetados em gráficos do tipo forest plots e funnel plot com o auxílio de um software informático específico, o Comprehensive Meta-Analysis, version 2.0 copyright 2006.

Os dados foram classificados como sendo contínuos, tendo sido extraídos os valores de média e de erro padrão da média bem como o número total de indivíduos pertencentes a cada um dos estudos selecionados.

Para medir o tamanho do efeito (*effect size*) foi utilizado um intervalo de confiança (CI) de 95%. Os resultados foram inseridos e apresentados de forma a avaliar também a heterogeneidade ( $\text{Chi}^2$  e  $p < 0,05$ ) e a inconsistência ( $I^2$ ) para cada conjunto de dados (Higgins, Thompson, Deeks, & Altman, 2003).

Para a seleção dos estudos, observou-se cuidadosamente possíveis vieses que pudessem prejudicar os resultados apresentados para cada um dos estudos. Foi utilizado o gráfico de dispersão no formato de funil para avaliar o risco de viés de publicação, por meio da avaliação da assimetria aplicada ao gráfico (Egger, Davey Smith, Schneider, & Minder, 1997). Quando não há qualquer risco de viés de publicação, o gráfico apresenta a figura de um funil invertido (Higgins & Green, 2008), sendo a simetria ou a

assimetria definidas informalmente, por meio de avaliação visual (Egger et al., 1997).

Esta meta-análise foi realizada com base no modelo fixo.

A figura 1 apresenta um fluxograma que sintetiza as diferentes etapas e estratégias de seleção utilizadas, tendo por base a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.



Figura 1. Fluxograma das estratégias de seleção. \* Referente aos critérios de inclusão e exclusão, ou estarem repetidos, ou por não conterem resultados estatísticos suficientes; \*\* número de estudos no final do processo de pesquisa e inclusão.

Os estudos que cumpriram os critérios de inclusão foram avaliados quanto à qualidade metodológica com a escala de PEDro, baseada na lista Delphi desenvolvida por Verhagen e colaboradores no Departamento de Epidemiologia, da Universidade de Maastricht (Verhagen et al., 1998). Originalmente a escala de PEDro apresenta 11 critérios, no entanto os critérios número 7 e 8 (*7. Todos os avaliadores que mediram pelo menos um resultado-chave, fizeram-no de forma cega; 8. Medições de pelo menos um resultado-chave foram obtidas em mais de 85% dos sujeitos inicialmente distribuídos pelos grupos*) foram agrupados num único critério: Medição-cega dos resultados chave, porque nos pareceu mais apropriado. Se o score PEDro

do estudo fosse menor que quatro, o estudo era classificado como de baixa qualidade metodológica e excluído. Nenhum dos seis estudos selecionados obteve pontuação inferior a quatro. A análise individual de cada estudo considerando a escala de PEDro está resumida na Tabela 1.

Depois de selecionados os estudos, os dados foram inseridos e analisados utilizando o software Comprehensive Meta-analysis. Foram calculados a diferença entre os erros padrões da média (*Std diff in means*), o intervalo de confiança (95% CI), e os scores Z e P (Z-value e P-value). Alguns procedimentos foram aplicados para corrigir vies causados por várias origens de erros, tais como erros da amostra e erros de medida.

Tabela 1

Qualidade metodológica dos estudos incluídos. Classificação dos estudos através da Escala de PEDro.

Estudos	Critérios										
	1- Elegibilidade	2- Distribuição aleatória	3- Locação cega (Confiencialidade)	4- Amostra homogênea	5- Sujeitos cego	6- Avaliadores cego	7-8 Medição cega dos resultados-chave	9- Intenção de tratamento	10- Comparação entre os grupos	11- Mensurações de variabilidade	12- Itens totais reportados
Spielmann et al., (2011)	X	X		X			X	X		X	6/10
Campbell et al., (2009)	X	X		X			X	X		X	6/10
Simpson et al., (2007)	X	X		X			X	X		X	6/10
Simpson et al., (2010)	X	X		X			X	X		X	6/10
Wang e Lin, (2010)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10/10
Simpson et al., (2008)	X	X		X			X	X		X	6/10

## RESULTADOS

Na análise foram incluídos seis estudos, que contabilizavam um total de 150 sujeitos. Quando avaliamos o risco de viés de publicação (Figura 2), por meio de assimetria, para cada

conjunto de estudos sobre o exercício e a mobilização de linfócitos T senescentes, verificamos que os dados apresentavam um risco reduzido de viés de publicação, de acordo com os baixos valores de assimetria apresentados.

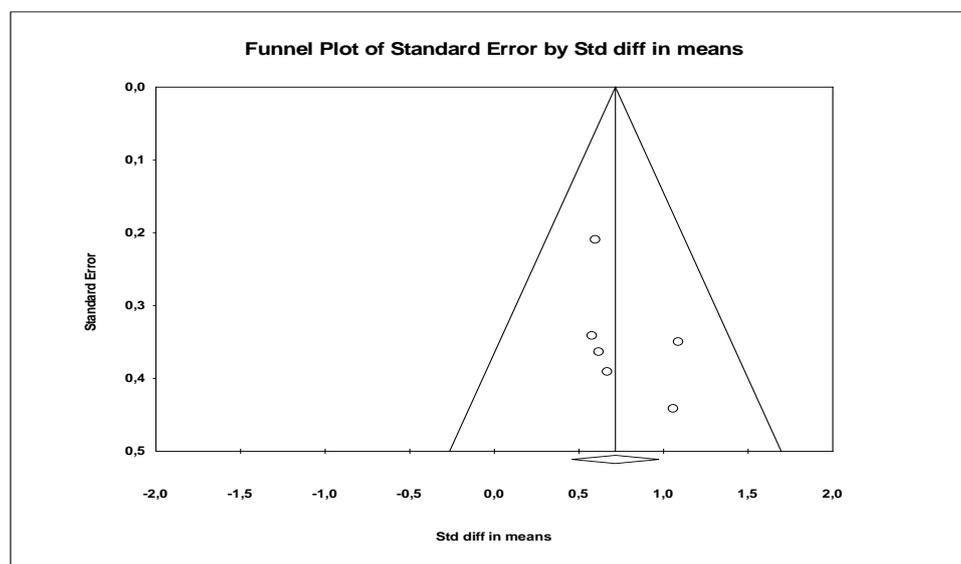


Figura 2. Gráfico de dispersão no formato de funil que apresenta a relação da diferença de média (MD) entre valores agudos obtidos logo após o término do exercício e os valores do pré-exercício, e o erro padrão [SE (MD)] de cada grupo de dados incluídos na meta-análise. Por outro lado, um eventual risco mais elevado de viés de publicação nunca deveria ser demasiadamente valorizado, tendo em conta o reduzido número de estudos utilizados nesta meta-análise.

A tabela 2 apresenta os estudos selecionados para a meta-análise com autor/ano, resumo da intervenção (número de sujeitos, a média e o

desvio padrão da idade, os testes utilizados e as variáveis analisadas), resposta imune (inclui os

objetivos do estudo e as variáveis imune incluídas no estudo), conclusões (apresentação dos principais resultados e conclusões) e eficiência (apresenta o resumo estatístico dos principais resultados destacados nos estudos).

Todos os estudos investigaram sujeitos do sexo masculino. A idade compreendida variou de 20 a 40 anos e o nível de aptidão física alterou entre sedentários (Wang, Chen, & Weng, 2011), saudáveis (Campbell et al., 2009; Simpson et al., 2008; Spielmann et al., 2011) e treinados (Simpson et al., 2007, 2010).

Nos estudos de Campbell et al. (2009) e Wang, Chen, e Wen (2011) os sujeitos pedalarão em intensidades correspondentes a 85% e 50% da  $W_{\text{máx}}$  predita, respetivamente. Nestes dois estudos os indivíduos não realizaram o esforço até a exaustão voluntária e apenas foram incluídos os resultados dos grupos que realizaram o exercício em normoxia (Wang et al., 2011) e em alta intensidade (Campbell et al., 2009). Os efeitos agudos foram observados após 20 minutos (Campbell et al., 2009) e 30 minutos (Wang et al., 2011) de ciclismo. Simpson et al. (2007) e Simpson et al. (2010) utilizaram o mesmo protocolo de exercício, corrida em passadeira rolante a 80% do  $VO_{2\text{máx}}$ , enquanto Simpson et al. (2008) submeteu seus avaliados a um protocolo máximo em passadeira. No caso destes três estudos, os indivíduos realizaram o exercício até a exaustão. Por outro lado, Spielmann et al. (2011) correlacionou o  $VO_{2\text{máx}}$  com o acúmulo de células T senescentes. Neste caso, não foram consideradas as correlações relacionadas a idade que o estudo investigou.

Os estudos incluídos nesta meta-análise evidenciaram que linfócitos T com características senescentes são mobilizados dos compartimentos periféricos para o sangue imediatamente após a realização de uma sessão de exercício. O padrão de aumento foi semelhante entre os estudos considerando o valor de p observado (Tabela 2).

Linfócitos T senescentes foram analisados quanto a presença dos marcadores de superfície celular  $KLRG1^+$ ,  $CD57^+$ ,  $CD28^-$ . Somente o es-

tudo de Campbell et al. (2009) não determinaram a senescência através desse marcador, mas através da expressão de CD57. O estudo de (Simpson et al., 2010) especialmente investigou se as células expressando  $KLRG1$  eram linfócitos T terminalmente diferenciados ( $KLRG1^+/CD28^-/CD57^+$ ) ou uma população de células T memória-efetoras ( $KLRG1^+/CD28^+/CD57^-$ ) que não atingiram a diferenciação terminal. Os resultados mostraram que o aumento na proporção de células  $KLRG1^+$  dentro da subserie de células T  $CD8^+$  após o exercício é devido principalmente a uma mobilização seletiva de células T altamente diferenciadas exibindo um fenótipo  $KLRG1^+/CD57^+$  (56% aumento) e  $KLRG1^+/CD28^-$  (61% aumento) na superfície celular.

Diferente dos outros estudos que determinaram os efeitos agudos do exercício, Spielmann et al. (2011) examinaram a associação entre os valores de  $VO_{2\text{máx}}$  de homens saudáveis (18-24 anos) e o acúmulo de células T senescentes. Neste estudo somente foi considerado o grupo jovem. Análises de regressão univariada mostraram que o  $VO_{2\text{máx}}$  foi inversamente associado com células T  $CD8^+$  senescentes ( $KLRG1^+/CD57^+$ ,  $r = -0,287$ ,  $p < 0,01$ ;  $KLRG1^+/CD28^-$ ,  $r = -0,350$ ,  $p < 0,001$ ), podendo indicar que a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbia durante o curso natural do envelhecimento pode prevenir o acúmulo de células T senescentes com especificidade antigénica limitada.

A figura 3 apresenta os resultados finais relativos aos 6 estudos incluídos no estudo, tendo por base a partir da utilização do programa *Comprehensive Meta-analysis*. O exercício físico aumentou o número de células T senescentes em todos os estudos analisados, ao comparar os valores agudos obtidos logo após o término do exercício com os valores pré-exercício. Os resultados são apresentados como a diferença entre os erros padrões da média (0,715), onde  $Z = 5,478$  sendo esse efeito significativo ( $p < ,001$ ).

Tabela 2

Estudos incluídos na meta-análise: Exercício, espaço imune e células T senescentes.

Autor/Ano	Resumo intervenção	Resposta Imune	Resultados clínicos	Conclusões
(Spielmann et al., 2011)	102 homens saudáveis. Idade: 39 ± 6 anos. VO <sub>2max</sub> estimado através do protocolo de Bruce.	Associação entre VO <sub>2max</sub> e o acúmulo relacionado a idade das células T senescentes. O fenótipo dos linfócitos (LTs) T foi determinado pela expressão de KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>+</sup> , KLRG1 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup> , em células T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> utilizando citometria de fluxo.	VO <sub>2max</sub> inversamente associado com células senescentes (KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>+</sup> ) (r = -0,287; p <0,01).	A aptidão aeróbia foi associada com uma baixa proporção de células T senescentes e uma alta proporção de células naive em adultos saudáveis. A associação bem aceita entre a idade e as células T senescentes não existia quando a idade foi ajustada para VO <sub>2max</sub> , indicando que a capacidade aeróbia pode ser um determinante mais forte das mudanças fenotípicas das células T do que a idade cronológica. Como resultado, a aptidão aeróbia poderia exercer efeitos protetores sobre o envelhecimento do sistema imune.
(Campbell et al., 2009)	13 homens fisicamente ativos. Idade: 20,9 ± 1,5 anos. Pedalar a 85% da W <sub>max</sub> predita (intensidade alta). Duração de 20 min/serie. Amostras sanguíneas obtidas antes, durante e no minuto final do exercício +15, e +60 min.	Efeito de diferentes intensidades de exercício na mobilização de LTs CD8 <sup>+</sup> e células NK. O marcador de superfície para determinar a senescência de LTs CD8 <sup>+</sup> foi CD57 <sup>+</sup> .	Aumento na mobilização de LTs CD8 <sup>+</sup> CD57 <sup>+</sup> (p < 0,001) em comparação ao baseline.	O exercício mobiliza linfócitos com um perfil celular explícito, caracterizado por um potencial efector citotóxico imediato e uma alta propensão para migrar para os tecidos periféricos.
(Simpson et al., 2007)	Oito corredores masculinos (idade: 29 ± 9 anos) realizaram um protocolo na esteira a 80% do consumo máximo de oxigênio até a exaustão voluntária. LTs isolados antes, imediatamente após e 1h após o exercício.	Examinar os efeitos agudos de uma corrida de alta intensidade em esteira rolante sobre subpopulações de LTs. Marcadores de superfície de senescência (KLRG1 <sup>+</sup> ou CD57 <sup>+</sup> ).	O número de todos os LTs CD3 expressando KLRG1 <sup>+</sup> e CD57 <sup>+</sup> aumentou com o exercício (P < 0,01 comparado com os valores pré-exercício).	Uma população de linfócitos T expressando KLRG1 é mobilizada e subsequente removida da corrente sanguínea em resposta a uma séria aguda de exercício de alta intensidade. Como resultado, a população de LTs T dos compartimentos linfóides periféricos, que é responsável pelo aumento induzido pelo exercício no número de LTs T no sangue, está provavelmente num estágio de envelhecimento biológico e tem uma reduzida capacidade de expansão clonal do que as células T residentes no sangue.

(Simpson & Guy, 2010)	Nove sujeitos masculinos (26.4 ± 6.7 anos) moderadamente treinados ( $VO_{2max} = 56.9 \pm 5.1$ ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ) completaram um protocolo exaustivo em esteira rolante a 80% do $VO_{2max}$ pré-determinado. Amostras de sangue (6mL) obtidas antes, imediatamente após e 1h após o exercício.	Determinar se o aumento na proporção de células T KLRG1 <sup>+</sup> no sangue imediatamente após o exercício é devido a uma mobilização seletiva de células diferenciadas terminalmente com um fenótipo senescente (p.ex. KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>+</sup> e KLRG1 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup> ), ou uma população das também chamadas células experienciadas em antigénios com um fenótipo de memória (p.ex. KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>-</sup> ; KLRG1 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup> ).	Mobilização imediatamente após o exercício (subpopulação CD8 <sup>+</sup> ): KLRG1 <sup>+</sup> /CD28 <sup>-</sup> (61% aumento, p<0.01); KLRG1 <sup>-</sup> /CD28 <sup>+</sup> (diminuiu, p<0.01); KLRG1 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup> (permaneceu inalterada, p>0.05); KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>+</sup> (56% aumento, p<0.05); KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>-</sup> (24% aumento, p<0.05) Nenhuma resposta observada em CD4 <sup>+</sup> (p>0.05);	O aumento na proporção de células KLRG1 <sup>+</sup> dentro da subpopulação de células T CD8 <sup>+</sup> após o exercício é devido principalmente a mobilização seletiva de células T altamente diferenciadas exibindo o fenótipo de superfície celular KLRG1 <sup>+</sup> /CD57 <sup>+</sup> e KLRG1 <sup>+</sup> /CD28 <sup>+</sup> .
(Wang et al., 2011)	10 homens sedentários, exercício em normoxia (50%W <sub>max</sub> sob 21%O <sub>2</sub> , N-T).	Elucidar como várias formas de prognoxia afetam as características fenotípicas de subpopulação de LTs T no sangue.	Valor de p < 0.05 em todas as condições.	Antes da intervenção o exercício até a exaustão aumentou a mobilização de CD3, CD4, CD8 ou CD8bright expressando moléculas ativadas (CD11a) ou senescentes (KLRG1) dentro do compartimento periférico.
(Simpson et al., 2008)	16 sujeitos do sexo masculino. 8 adultos jovens (19 a 24 anos), 8 adultos mais velhos (50 a 60 anos) completaram um protocolo máximo (Bruce) em esteira rolante. LTs isolados antes, imediatamente após e 1h após o exercício.	Comparar a frequência de LTs T senescentes no sangue entre adultos jovens e velhos seguindo uma série aguda de exercício exaustivo. Marcadores de superfície analisados: KLRG1 <sup>+</sup> e CD57 <sup>+</sup> por citometria de fluxo.	A percentagem de todas as células CD8 expressando KLRG1 <sup>+</sup> ou CD57 <sup>+</sup> aumentou imediatamente após o exercício (P < 0,05 comparado com os valores pré-exercício).	Uma série aguda de exercício exaustivo aumentou a proporção de LTS T senescentes (KLRG1 <sup>+</sup> e CD57 <sup>+</sup> ).

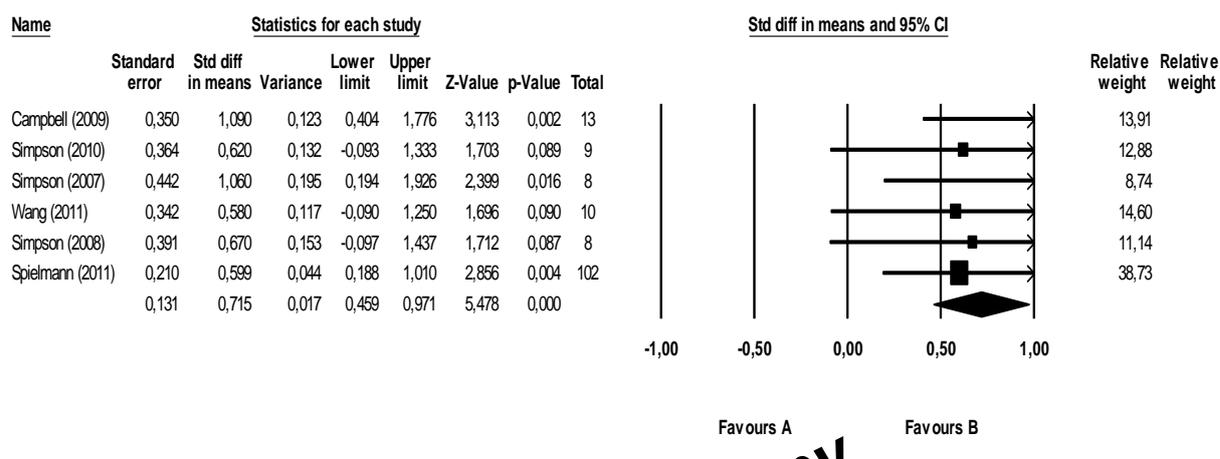


Figura 3. Efeitos agudos do exercício sobre o número de células T senescentes

## DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a hipótese do aumento da mobilização de células T senescentes induzido pelo exercício. A expansão de clones de células T CD8<sup>+</sup> senescentes associadas a infecções virais persistentes ocupa uma grande proporção do espaço imune que, em condições de baixa exposição ao patógeno e reativações virais menos latentes, seria ocupado principalmente por células T naive. Na medida em que o número total de células T periféricas é estreitamente regulado, um acúmulo supérfluo de células T experientes em antígeno pode reduzir a saída de células T naive, diminuindo o número e a porcentagem de células capazes de montar respostas imunes a novos agentes patogênicos. Nesta situação, estas células T resistentes à apoptose e altamente diferenciadas, sobrecarregam o espaço imune, traduzindo-se em menor repertório de células T para os antígenos novos, resultando numa vigilância imunológica reduzida e num risco aumentado de infecção (Simpson & Guy, 2010).

A análise dos seis estudos incluídos nesta meta-análise mostrou que o exercício físico ou uma boa aptidão aeróbia é capaz de aumentar a mobilização de células T senescentes no sangue periférico. A mobilização de células T experientes em antígeno a partir dos tecidos periféricos para o sangue, poderia gerar um “espaço vago”

onde as células T naive eventualmente ocupariam espaço (Simpson et al., 2007, 2008; Simpson & Guy, 2010). Essas células caracterizam-se por linfócitos citotóxicos com um perfil celular claramente definido, caracterizado por um imediato potencial citotóxico efetor e uma alta propensão para migrar dentro dos tecidos periféricos (Campbell et al., 2009).

Sugere-se que os linfócitos mobilizados com exercício sejam mais sensíveis a apoptose. Este processo poderia ser causado por estímulos pró-apoptóticos induzidos pelo exercício sobre as células T circulantes e provocando vias apoptóticas iniciais antes que a célula deixasse o compartimento do sangue. Como os linfócitos são conhecidos por saírem do sangue durante a fase de recuperação de exercício, uma parte destas células extravasadas (tendo já encontrado um estímulo pró-apoptótico) pode subsequentemente morrer por apoptose em tecidos periféricos (Simpson, 2011). Leucócitos CD57<sup>+</sup> e KLRG1<sup>+</sup> (senescentes) foram mais suscetíveis a apoptose induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* comparado com linfócitos expressando CD28, CD62L, ou CD11a (Wang & Lin, 2010).

Os marcadores de senescência sobre as subpopulações de linfócitos T são considerados também eficientes marcadores do envelhecimento biológico sistêmico (Simpson et al., 2008). Embora o CD45RA e o CCR7 sejam marcadores eficientes de diferenciação das células

T, a identificação de células T CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup> como células terminalmente diferenciadas (ex: senescentes) é controversa devido ao facto destas células ainda demonstrarem níveis eficazes de proliferação após ativação do recetor de célula T (TCR). Atualmente, a expressão combinada de KLRG1 e CD57, ou a expressão de KLRG1 na ausência de CD28 parecem ser marcadores mais aceites de senescência das células T, pois as células com este fenótipo são incapazes de sofrer futuras divisões, não expressam o CD27 e o CCR7, e têm uma baixa expressão de CD127 (Simpson, 2011; Simpson & Guy, 2010). Foi por esse motivo que esta meta-análise incluiu estudos que tivessem avaliado esta combinação de marcadores, embora essa opção tenha eliminado um certo número de estudos (11 no total), o que certamente é a maior limitação do estudo, procurou-se uma melhor confiabilidade e maior atualidade dos resultados.

Spielmann et al. (2011) descobriram que os indivíduos com valores de VO<sub>2máx</sub> acima da média tinham menos células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> senescentes e mais células T CD8<sup>+</sup> naive do que aqueles com valores abaixo da média de VO<sub>2máx</sub>, mesmo após ajuste para idade, índice de massa corporal e percentagem de gordura corporal. Surpreendentemente, os autores verificaram que a associação, bem aceite, entre idade e o número de células T senescentes já não existia, quando a idade era ajustada para o VO<sub>2max</sub>, indicando que a aptidão aeróbia pode ser um forte determinante de mudanças fenotípicas de células T, mais do que a própria idade cronológica. Este efeito foi limitado às células senescentes, sendo que o VO<sub>2max</sub> não foi associado com as células de memória efetora (KLRG1<sup>+</sup>/CD28<sup>+</sup>) após o ajuste para a idade. Os autores consideraram que o seu estudo foi o primeiro a mostrar que a aptidão aeróbia está associada a uma moderação do acúmulo natural relacionado com a idade de células T senescentes no sangue periférico, com destaque para os efeitos benéficos da manutenção de um estilo de vida fisicamente ativo sobre o envelhecimento do sistema imunitário. Isso reforça a intuição de que a atividade

física regular pode exercer propriedades preventivas e / ou de “rejuvenescimento” do envelhecimento do sistema imune por amenizar a acumulação relacionada com a idade, de células T senescentes e prevenir a rápida transição para a categoria de Perfil de Risco Imune mais tarde na vida (Simpson & Guy, 2010). Os autores postularam que a manutenção de altos níveis de aptidão aeróbia durante o curso natural do envelhecimento pode ajudar a prevenir o acúmulo de células T senescentes, que têm especificidade antigénica limitada, ao mesmo tempo, mantendo um número suficiente de células T naive capazes de reconhecer e responder a novos antígenos (Spielmann et al., 2011).

Os resultados do estudo de Spielmann et al. (2011) apontam uma série de implicações importantes para os benefícios preventivos do exercício contra a imunossenescência associada ao envelhecimento. Em primeiro lugar, dado que a proporção de células T senescentes aumenta em 10% por década de vida, na idade avançada, em homens saudáveis / assintomáticos, seria razoável postular que níveis elevados de aptidão física e exercício regular poderiam prevenir ou impedir o acúmulo de células T senescentes por décadas. Em segundo lugar, os níveis de atividade e aptidão física são os principais fatores moderadores na relação idade-imunossenescência e são preditores independentes da "idade imunológica". Em terceiro lugar, o valor terapêutico do exercício em melhorar a imunocompetência da população em envelhecimento assintomático e imunocomprometidos clinicamente (por exemplo, HIV +) é potencialmente imenso (Hong, 2011).

## CONCLUSÕES

O exercício físico aumentou a mobilização de células T senescentes para o sangue periférico, quando comparados os valores agudos obtidos logo após o término do exercício com os valores pré-exercício. É possível que esta mobilização preferencial leve a indução da apoptose destas células criando espaço para a produção de células T virgens.

**Agradecimentos:**

Nada a declarar

**Conflito de Interesses:**

Nada a declarar.

**Financiamento:**

Nada a declarar.

**REFERÊNCIAS**

- Burzynski, S. R. (2003). Gene silencing--a new theory of aging. *Medical Hypotheses*, *60*(4), 578–583.
- Campbell, P. T., Campbell, K. L., Wener, M. H., Wood, B. L., Potter, J. D., McTiernan, A., & Ulrich, C. M. (2009). A yearlong exercise intervention decreases CRP among obese postmenopausal women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *41*(8), 1533–1539. <http://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31819c7feb>
- Chodzko-Zajko, W. J., Proctor, D. N., Fiatarone Singh, M. A., Minson, C. T., Nigg, C. R., Salem, G. J., & Skinner, J. S. (2009). American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *41*(7), 1510–1530. <http://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181a0c95c>
- Egger, M., Davey Smith, G., Schneider, M., & Minder, C. (1997). Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *315*(7109), 629–634.
- Higgins, J. P. T., & Green, S. (Eds.). (2008). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc.
- Higgins, J. P. T., Thompson, S. G., Deeks, J. J., & Altman, D. G. (2003). Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *327*(7414), 557–560. <http://doi.org/10.1136/bmj.327.7414.557>
- Hong, S. (2011). Can we jog our way to a younger-looking immune system? *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(8), 1519–1520. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.002>
- Lages, C. S., Suffia, I., Velilla, P. A., Huang, B., Warsaw, G., Hildeman, D. A., ... Choungnet, C. (2008). Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *Journal of Immunology*, *181*(3), 1835–1848.
- Pawelec, G. (2006). Immunity and ageing in man. *Experimental Gerontology*, *41*(12), 1239–1242. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2006.09.005>
- Simpson, R. J. (2011). Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise «make space»? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *39*(1), 23–33. <http://doi.org/10.1097/JES.0b013e318201f39d>
- Simpson, R. J., Cosgrove, C., Chee, M. M., McFarlin, B. K., Bartlett, D. B., Spielmann, G., ... Shiels, P. G. (2010). Senescent phenotypes and telomere lengths of peripheral blood T-cells mobilized by acute exercise in humans. *Exercise Immunology Review*, *16*, 40–55.
- Simpson, R. J., Cosgrove, C., Ingram, L. A., Florida-James, G. D., Whyte, G. P., Pircher, H., & Guy, K. (2008). Senescent T-lymphocytes are mobilized into the peripheral blood compartment in young and older humans after exhaustive exercise. *Brain, Behavior, and Immunity*, *22*(4), 544–551. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.11.002>
- Simpson, R. J., Florida-James, G. D., Cosgrove, C., Whyte, G. P., Macrae, S., Pircher, H., & Guy, K. (2007). High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood compartment in human subjects. *Journal of Applied Physiology*, *103*(1), 396–401. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00007.2007>
- Simpson, R. J., & Guy, K. (2010). Coupling aging immunity with a sedentary lifestyle: has the damage already been done?--a mini-review. *Gerontology*, *56*(5), 449–458. <http://doi.org/10.1159/000270905>
- Simpson, R. J., Lowder, T. W., Spielmann, G., Bigley, A. B., LaVoy, E. C., & Kunz, H. (2012). Exercise and the aging immune system. *Ageing Research Reviews*, *11*(3), 404–420. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.003>
- Spielmann, G., McFarlin, B. K., O'Connor, D. P., Smith, P. J. W., Pircher, H., & Simpson, R. J. (2011). Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(8), 1521–1529. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.226>
- Verhagen, A. P., de Vet, H. C., de Bie, R. A., Kessels, A. G., Boers, M., Bouter, L. M., & Knipschild, P. G. (1998). The Delphi list: a criteria list for quality assessment of randomized clinical trials for conducting systematic reviews developed by Delphi consensus. *Journal of Clinical Epidemiology*, *51*(12), 1235–1241.
- Wang, J.-S., Chen, W.-L., & Weng, T.-P. (2011). Hypoxic exercise training reduces senescent T-lymphocyte subsets in blood. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(2), 270–278. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.018>

Wang, J.-S., & Lin, C.-T. (2010). Systemic hypoxia promotes lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress during moderate exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 108(2),

371–382. <http://doi.org/10.1007/s00421-009-1231-2>



Todo o conteúdo da revista **Motricidade** está licenciado sob a [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), exceto quando especificado em contrário e nos conteúdos retirados de outras fontes bibliográficas.



# Acute Hematological and Inflammatory Responses to High-intensity Exercise Tests: Impact of Duration and Mode of Exercise

## Authors

L. G. Minuzzi<sup>1</sup>, H. M. Carvalho<sup>1</sup>, D. T. Brunelli<sup>2</sup>, F. Rosado<sup>3</sup>, C. R. Cavaglieri<sup>2</sup>, C. E. Gonçalves<sup>1</sup>, J. M. Gaspar<sup>4</sup>, L. M. Rama<sup>1</sup>, A. M. Teixeira<sup>5</sup>

## Affiliations

Affiliation addresses are listed at the end of the article

## Key words

- high-intensity exercise
- energy expenditure
- interleukin-6
- interleukin-10
- recovery

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the hematological and inflammatory responses to 4 maximal high-intensity protocols, considering energy expenditure in each test. 9 healthy volunteers performed 4 high-intensity exercise tests of short [Wingate (WANT); Repeated-sprints (RSA)] and long durations [Continuous VO<sub>2</sub> test (VCONT); intermittent VO<sub>2</sub> test (VINT)] in a cycle-ergometer, until exhaustion. Hematological parameters and IL-6, IL-10 and creatine kinase (CK) levels were determined before (PRE), POST, 30min, 1, 2, 12 and 24h after the end of the protocols. Additionally, energy expenditure was determined. Leucocytes, erythrocytes and lym-

phocytes increased at POST and returned to PRE values at 30min for all protocols. Lymphocytes had a second decreased at 2h and granulocytes increased at 2h when compared to PRE. Both variables returned to PRE values between 12–24h into recovery. The magnitude of response for IL-6 was greater in VINT and for IL-10 in VCONT. There was no association of energy expenditure within each exercise protocol with the pattern of IL-6, IL-10 and CK responses to the exercise protocols. The present finding support that similar responses after continuous or intermittent acute protocols are observed when exercises are performed to volitional failure, regardless of the duration and mode of exercise.

accepted after revision  
September 15, 2015

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-117723>  
Int J Sports Med 2016; 37: 1–9 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
ISSN 0172-4622

## Correspondence

**Luciele Guerra Minuzzi**  
Coimbra University  
Faculty of Sport Sciences and  
Physical Education  
Estádio Universitário – Pavilhão  
III - Stª Clara  
3040-156 Coimbra  
Portugal  
Tel.: +351/239/802 770  
Fax: +351/239/802 779  
[lucielegm@gmail.com](mailto:lucielegm@gmail.com)

## Abbreviations

CK	Creatine Kinase
Hb	Hemoglobin
Ht	Hematocrit
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
MPV	Mean Platelet Volume
RBC	Red Blood Cells
RER	Respiratory exchange ratio
RSA	Repeated-sprints Test
VCONT	Continuous VO <sub>2</sub> test; long-term high-intensity exercise until exhaustion in cycle-ergometer
VINT	Intermittent VO <sub>2</sub> test; long-term high-intensity exercise until exhaustion in cycle-ergometer
WANT	Wingate Anaerobic Test

## Introduction

The interactions between exercise, hematological system and immune function have been widely studied since the observation of exercise-induced leucocytosis, which has important implications for immunity [23,34]. An acute bout of exercise places an important demand on the body, depending on the model, intensity and duration of the effort. Furthermore, high-intensity exercise creates muscle damage and inflammation, leading to disturbance in cellular homeostasis and discomfort, resulting in a cytokine-mediated systemic inflammatory response [46] similar to the cytokine profile elicited after an acute episode of infection [34]. This may result in a temporary immunosuppression and can increase the susceptibility to infections [12,27] and autoimmune disorders [48]. In addition, the hormonal and adrenergic effects [34] and the enhanced anti-inflammatory cytokine response (i.e., IL-10 production) [13] have been linked with this

decrease in immune function after high-intensity exercise in active individuals.

It is known that the intensity of exercise and duration are important factors in determining the relative recruitment of the energy processes. Other factors, such as availability of oxygen and metabolic substrates, environmental factors and hormonal changes will modify the extent to which the energetic processes occur [18] and the changes in hematological and inflammatory makers that may or may not happen. For example, an inverse relationship between post-exercise muscle glycogen and IL-6 plasma cytokine levels has been found [28,37]. Additionally, a temporary depression of various aspects of immune function will usually last for 3–24 h after exercise [15].

Very few studies have considered the impact of duration and mode (continuous vs. intermittent) of exercise on immune function [8,25,26,40,41]. Hence, we focused in this study on surrogate outcomes as markers of inflammation and skeletal muscle recovery (i.e., leukocytes, IL-6, IL-10) after a single bout of maximal exercise, with different models (short-term high-intensity exercise and long-term high-intensity exercise) and their responses during a 24 h recovery period. To the best of our knowledge, this is the first study to compare maximal intensity protocols, including different durations and mode, and monitoring test responses for 24 h. Therefore, the aim of this study was to analyze the impact of duration and mode (continuous × intermittent) of 4 maximal protocols on hematological profiles and markers for systemic inflammation (IL-6 and IL-10). Additionally, we examined whether the 4 maximal protocols had different recovery patterns by looking at a 24 h post-exercise time-course response for IL-6 and IL-10.

## Methods



### Participants

The sample consisted of 9 healthy (male=6, female=3) university students (Table 1). Their  $VO_{2max}$  was  $3.1 \pm 0.7$  ( $L \cdot min^{-1}$ ; Table 1). None of the volunteers suffered from acute or chronic diseases or reported intake of medication, including antioxidants and nicotine abuse. All participants were healthy and not participating in regular exercise training. Participation was voluntary, and all participants signed an informed consent document before the participation in the study. The experimental methods and procedures were approved by the Ethics and Human Subjects Review Board at the Faculty of Sports Science and Physical Education, University of Coimbra. This study meets the ethical standards of the International Journal of Sports Medicine [17].

### Experimental design

Participants attended 4 laboratory-based testing sessions. The testing order was randomized with a interval period of 72-h between tests [43]. During this time, all participants were encouraged to not perform intense physical exertion.

We tested different models in a cross-sectional study (short-term high-intensity exercise and long-term high-intensity exercise, with 2 continuous and 2 intermittent protocols). In addition, to analyze the impact of duration, the aim of this study was also to analyze the impact of mode (continuous × intermittent). To do so, each participant completed 4 independent test protocols: 2 protocols of short-term high-intensity exercise in cycle-ergometer: 1) 30-s Wingate Anaerobic Test (WANT);

2) Repeated-sprints Test (RSA); and 2 protocols of long-term high-intensity exercise until exhaustion in cycle-ergometer: 3) Continuous  $VO_2$  test (VCONT); 4) Intermittent  $VO_2$  test (VINT). The oxygen uptake and plasma lactate accumulation were measured during the tests to determine energy system contributions and energy expenditure during exercise. Blood samples were taken at rest before (PRE), immediately post (POST), and 30 min, 1, 2, 12 and 24 h post-exercise. Blood samples were analyzed for leukocyte, lymphocyte, granulocyte and monocyte cell counts and for IL-6, IL-10 and CK plasma concentrations. An overview of the experimental protocol is presented in Fig. 1.

### Exercise protocols

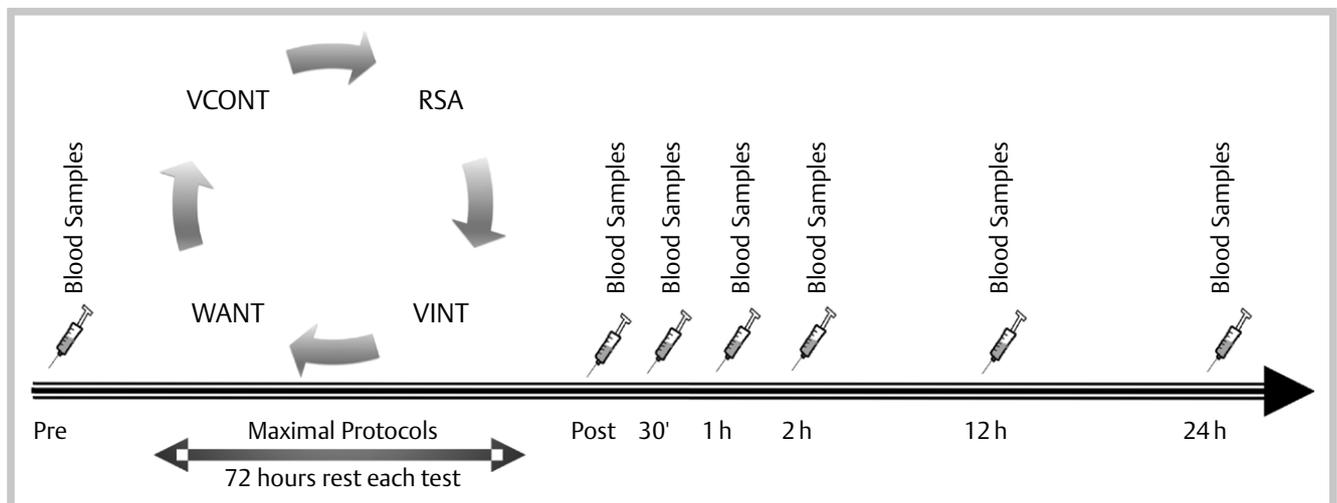
Prior to baseline measurements, participants were informed of the laboratory testing procedures. After the measurements of body mass, stature and the pre-test blood sample, participants performed the first test to exhaustion on an electronically braked cycle ergometer (Lode, Groningen, Netherlands) using an online gas collection system (Quark CPET COSMED, COSMED, Rome, Italy). Also for VCONT and VINT protocols an electronically braked cycle ergometer and the online gas collection system were used to determine  $VO_{2max}$ . During all the tests, heart rate was measured continuously using a heart rate monitor (COSMED, COSMED, Rome, Italy).  $VO_{2max}$  was determined using a voluntary criterion of exhaustion or when the following occurred: the participant reached a respiratory exchange ratio (RER) above 1.15; when oxygen uptake reached a plateau with increasing work rate; and when a heart rate close to age predicted maximal values was attained [19]. The detailed protocols are described below:

- Wingate Anaerobic Test (WANT):** participants completed a 30 s maximal effort on an electronically braked cycle ergometer at a resistance equivalent to 9% of their body mass.
- Repeated-sprints Test (RSA):** each participant performed 10 repetitions of 10-second all-out effort with 30-second of passive recovery on cycle ergometer [1,2].
- Continuous  $VO_2$  test (VCONT):** participants performed an incremental test to exhaustion on an electronically braked cycle ergometer using an online gas collection system to determine  $VO_{2max}$ . Following a 5-min warm-up, the test began at 75 W with the workload increasing by 25 W every 3 min until volitional exhaustion [5]. The value recorded for  $VO_{2max}$  in the protocol corresponded to the mean of the 2 highest values achieved over a 30-second collection period.
- Intermittent  $VO_2$  test (VINT):** participants performed an incremental intermittent test to exhaustion on an electronically braked cycle ergometer using an online gas collection system to determine  $VO_{2max}$ . Following a 5-min warm-up, the test began at 75 W with the workload increasing by 25 W every

Table 1 Participant characteristics.

	Mean	Standard Deviation	Range/Reference
Age (years)	32.22	(2.45)	26–41
Stature (cm)	174.47	(2.46)	156.3–184.2
Weight (kg)	69.20	(4.81)	47–95
IMC ( $kg \cdot m^{-2}$ )	22.47	(1.28)	19.2–28
$VO_{2max}$ ( $L \cdot min^{-1}$ )	3.123	(0.2)	1.883–4.108
$VO_{2max}$ ( $mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ )	45.51	(4.90)	37.12–51.75

Mean ± SD of physical and blood parameters measured before all test protocols in 09 health subjects



**Fig. 1** Experimental design. All participants completed 4 independent test protocols. Between trials, a minimal of 72 h of interval was ensured. Before (PRE), immediately after exercise (POST), and the following recovery sessions (30 min, 1, 2, 12, 24 h), blood samples, were collected to analyzed hematological profile and muscle damage (IL-6 and IL-10). Before the experiments, participants were familiarized with the test scheme. From the first test until the end of experimentation period, the participants were instructed to avoid alcohol consumption and smoking. Other healthy habits such as good quality of sleep and food were also requested, too.

3 min period with 1-min of passive rest, until volitional exhaustion. The value recorded for  $VO_{2max}$  in the protocol corresponded to the mean of the 2 highest values achieved over a 30-s collection period.

### Blood collection

Blood samples (~12 mL) were obtained from the antecubital vein by venepuncture. The blood was collected into tubes containing EDTA and analyzed for leukocytes (WBC), erythrocytes (RBC), granulocytes, lymphocytes, monocytes, platelets, mean platelet volume (MPV), hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), hematocrit (Ht), and mean corpuscular hemoglobin (MCH), with a full cell count, using a blood analyzer (Beckman Coulter T660; Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida). Whole blood Hb and Ht were used to estimate changes in plasma volume ( $P_v$ ) relative to Pre, established as baseline. All measurements for erythrocyte's indices, Hb and Ht following exercise testing were corrected for changes in  $P_v$  [10]. The remaining blood was centrifuged at 4 °C for 15 min at 1500 rpm. After centrifugation, plasma was stored at -80 °C for subsequent analyses. IL-6 and IL-10 plasma concentrations were determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, CA). The minimum detection limit for both IL-6 and IL-10 was <1 pg/ml. Plasma samples were assayed in duplicate. The mean coefficient variation for the duplicate analysis was 3.4% for IL-6 and 4.0% for IL-10.

CK levels were determined using the Horiba Medical Pentra C200 analyzer (Kyoto, Japan) following the manufacturer's instructions.

### Calculations of the energy expenditure and energy system contributions

In order to determine the energy system contributions and energy expenditure during exercise we measured breath-by-breath oxygen uptake ( $VO_2$ ) during exercise, post-exercise  $VO_2$  kinetics and plasma lactate accumulation (3–5 min post - pre) in each test. The total energy expenditure and the contributions of the aerobic, anaerobic lactic and anaerobic alactic metabolisms

were calculated using GEDAE-LaB (GEDAE-USP, São Paulo, Brazil) software [6]

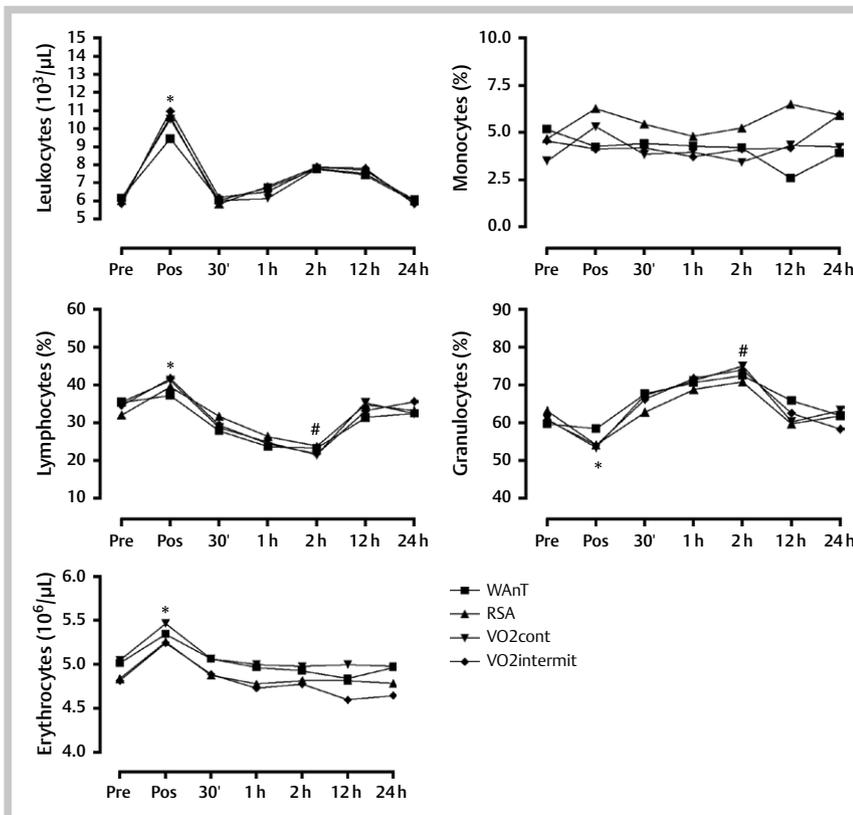
### Statistical analysis

Descriptive statistics for all dependent variables at all measurement points are presented as mean and standard deviation. To describe the patterns of changes of interleukins and CK in response to different maximal exercise protocols we considered hierarchical/multilevel modeling. Individual changes are expressed as percentage changes via logarithmic transformation of the dependent variables. The dependent variables were centered on the mean of baseline outcome (measurements at PRE). To allow the interpretation of between measurement slopes we scaled time as a discrete variable ranging from zero to 7. A dummy variable was incorporated in the models to categorize the maximal exercise protocols (WANT: 0; RSA: 1; VCONT: 3; VINT: 4) and was included at level 2. To explore differences in the rate of changes across the tests we included in the models interaction terms between the time terms (slopes) and maximal exercise protocol. Additionally, we considered the influence of energy expenditure within each exercise protocol (added as fixed effects on the multilevel models) on the pattern of IL-6, IL-10 and CK responses to the exercise protocols. Restricted maximum likelihood estimation was used to obtain the unknown parameters. We considered a covariance structure (first-order auto-regressive) to accommodate auto-correlation of within-individual residuals (Goldstein, Healy, & Rasbash, 1994; Steele, 2008). Multilevel regression models were obtained using "nlme" package (Pinheiro & Bates, 2000), within the R statistical language (R-Core-Team, 2014).

### Results

#### Leukocytes and erythrocytes counts increase immediately post-exercise in all protocols

There were significant increases in leukocyte and erythrocyte counts in POST for all protocols ( $P < 0.01$ ), returning to PRE values 30 min post-exercise. The variation observed for lympho-



**Fig. 2** Pre- vs. post-exercise changes of leukocytes, lymphocytes, granulocytes, erythrocytes and monocytes in the peripheral blood. \* $P < 0.01$  vs. pre-stage, # $P < 0.05$  vs. pre-stage.

cytes was multifaceted, in that a significant increase was observed in POST for all protocols ( $P < 0.01$ ), which was followed by a significant decrease 2 h after. However, between 12 to 24 h after the end the protocol the lymphocytes returned to basal values for all the protocols. Granulocytes decreased in POST in all tests, except in the WAnT, and increased steadily until 2 h after exercise and returning to baseline levels between 12 to 24 h post-exercise. There were no significant changes for monocytes during the experimental design (◉ Fig. 2).

#### Mode and duration of exercise does not alter the erythrocytes indices

None of the participants showed values higher than the reference range for Hb and Ht in PRE. The hemoglobin responses for the short-duration tests (WAnT e RSA) and the long-duration intermittent (VINT) test showed a significant increase ( $p < 0.01$ ) after exercise and returned to PRE values 30 min post-exercise in the WAnT, RSA and VINT. No changes were detected in the hemoglobin responses for the VCONT (◉ Table 2). The erythrocytes (MCV, MCH, MCHC) and platelet indices (MPV) were not significantly modified for all protocols in all time-points measured (◉ Table 2).

#### The time effect on cytokine concentration is dependent on mode of exercise

Responses of interleukins and CK at the different time points by exercise protocol are summarized in ◉ Table 3.

◉ Table 3 shows the multilevel regression analysis for IL-6, IL-10 and CK changes in response to exercise protocols. The patterns of IL-6, IL-10 and CK change in response to exercise are represented in ◉ Fig. 3. The exponents for intercept (WAnT) and each exercise protocol indicate that participant's pre-test values of IL-6 were higher compared to the other exercise protocols. No baseline differences were present for IL-10 and CK. For IL-6

response to Wingate anaerobic test, slope values across time indicate a decrement of response between the 24 h periods of observation (5.32 pg/mL). The non-significant exponents for the measurements times by exercise protocol interaction indicate that VINT had a similar decrement in response across the 24-h period of observation. For the RSA and VCONT, IL-6 POST values were increased (2.33 and 2.16 pg/mL, respectively), but changes after 24 h values were similar to pre-test values. IL-10 values were decreased after the 24 h period in response to Wingate anaerobic test (1.94 pg/mL), particularly presenting substantial decrements 12 h after the short-term maximal effort (1.67 pg/mL). As for the other exercise protocols, the large variability suggests that no substantial change was observed across the 24 h observation period in response to exercise. A trend of acute response post-exercise was apparent for CK in response to the maximal exercise protocols (1,17 pg/mL), but no substantial differences were observed across the 24 h period of observation. There was no association of energy expenditure within each exercise protocol with the pattern of IL-6, IL-10 and CK responses to the exercise protocols (◉ Table 4).

#### Discussion

▼ The main results of this study demonstrate that acute changes in leukocyte subpopulations, hemoglobin and hematocrit to strenuous exercise vary slightly depending on the mode (intermittent vs. continuous) and duration of exercise. It seems that variation may be more pronounced in cytokines, IL-6 and IL-10.

#### Hematological changes and exercise

None of the participants showed values higher than the reference range for leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and erythrocyte's indices. These are important because the sta-

**Table 2** Mean and standard deviations of hematological indicators at each measurements pre- and post-exercise. Mean (SD) of Hemoglobin (g.dL<sup>-1</sup>), Hematocrit (%), Mean Corpuscular Volume (fl), Mean Corpuscular Hemoglobin (pg), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g.dL<sup>-1</sup>) and Mean Platelet Volume (fl) before (PRE) e after (POST, 30', 1h, 2h, 12h, 24h) all test protocols (n=9).

Parameters		Before	After	30'	1h	2h	12h	24h
		PRE	POST					
WANT (N=9)	Hb	14.5 (0.4)	15.5 (1.8) *	14.7 (1.6)	14.3 (1.6)	14.2 (1.5)	14.4 (1.5)	14.4 (1.1)
	Ht	44.3 (4.1)	47.6 (4.1)	45.2 (4.0)	44.2 (4.3)	43.8 (4.0)	42.8 (3.7)	44.3 (3.9)
	MCV	89.1 (2.8)	89.1 (3.3)	89.0 (3.0)	89.4 (2.9)	89.1 (2.8)	88.4 (2.6)	89.2 (2.9)
	MCH	28.4 (1.1)	28.9 (1.5)	28.8 (1.6)	28.7 (1.3)	28.9 (1.4)	29.8 (1.4)	29.0 (1.0)
	MCHC	31.8 (1.2)	32.4 (1.6)	32.3 (1.2)	32.1 (0.9)	32.4 (1.0)	33.7 (1.1)	32.9 (2.0)
	MPV	8.4 (0.8)	8.7 (0.8)	8.6 (1.0)	8.3 (0.8)	8.2 (0.7)	7.6 (0.9)	8.0 (1.1)
RSA (N=8)	Hb	13.8 (1.2)	15.2 (1.2) *	13.8 (1.3)	13.7 (1.4)	13.7 (1.3)	13.8 (1.3)	13.7 (1.6)
	Ht	43.0 (3.8)	47.2 (3.3)	41.7 (6.9)	42.4 (3.6)	42.7 (3.6)	42.7 (3.6)	42.7 (4.1)
	MCV	88.9 (3.2)	89.8 (3.0)	88.3 (2.6)	88.7 (3.0)	88.8 (3.6)	88.6 (2.7)	89.2 (2.6)
	MCH	28.6 (1.5)	28.8 (1.3)	28.3 (1.2)	28.7 (1.4)	28.5 (1.2)	28.5 (1.5)	28.6 (1.7)
	MCHC	32.2 (1.0)	32.1 (0.9)	32.2 (0.9)	32.2 (1.0)	32.2 (0.8)	32.1 (1.2)	31.9 (1.6)
	MPV	8.3 (0.8)	8.8 (0.9)	8.6 (0.8)	8.4 (0.9)	8.1 (0.9)	7.4 (0.8)	7.7 (1.1)
V <sub>CONT</sub> (N=9)	Hb	14.5 (1.2)	14.7 (3.6)	14.6 (1.0)	14.3 (1.0)	14.3 (0.9)	14.3 (1.3)	14.4 (1.2)
	Ht	45.0 (3.5)	49.0 (3.6)	45.2 (6.9)	44.2 (3.3)	44.2 (3.0)	44.3 (3.9)	43.3 (3.8)
	MCV	89.0 (3.0)	89.5 (2.9)	89.1 (2.8)	88.4 (2.3)	88.7 (2.6)	88.5 (2.8)	88.9 (3.2)
	MCH	28.7 (1.3)	28.9 (1.2)	28.8 (1.1)	28.5 (1.3)	28.8 (1.2)	28.5 (0.9)	29.0 (1.1)
	MCHC	32.2 (0.9)	32.2 (0.8)	32.3 (0.7)	32.3 (1.1)	32.4 (1.0)	32.3 (0.8)	32.6 (1.0)
	MPV	8.4 (0.7)	8.9 (0.9)	8.4 (0.9)	8.3 (0.7)	8.1 (1.0)	7.5 (0.8)	7.9 (0.9)
V <sub>INT</sub> (N=8)	Hb	14.7 (1.2)	15.1 (1.2) *	14.0 (1.3)	13.6 (1.3)	13.6 (1.3)	13.1 (1.4)	13.4 (1.5)
	Ht	43.1 (3.4)	47.2 (3.6)	43.7 (3.5)	42.1 (3.6)	42.4 (3.7)	41.0 (3.6)	41.5 (3.7)
	MCV	89.3 (2.5)	89.7 (2.3)	89.3 (2.9)	88.8 (2.8)	88.8 (2.6)	89.0 (2.4)	89.0 (2.9)
	MCH	28.3 (1.4)	28.6 (1.2)	28.6 (1.3)	28.4 (1.5)	28.3 (1.5)	28.4 (1.6)	28.6 (1.6)
	MCHC	31.7 (0.9)	31.9 (1.0)	32.0 (0.8)	32.0 (1.0)	31.9 (1.1)	31.8 (1.1)	32.1 (1.1)
	MPV	8.4 (1.0)	8.9 (1.3)	8.3 (0.8)	8.2 (0.7)	7.8 (0.6)	7.2 (0.7)	7.4 (0.5)

Hemoglobin (Hb), Hematocrit (Ht), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Mean Platelet Volume (MPV). \* P<0.05 compared to PRE

**Table 3** Fixed explanatory variable results based on multilevel regression analysis of IL-6, IL-10 and CK changes (%) across 24-h in response to different high-intensity exercise protocols.

	IL-6	IL-10	CK
<i>Fixed explanatory variables</i>			
Intercept (Wingate Anaerobic test as reference)	28.7 (38.5)	0.00 (30.5)	0.0 (21.3)
Pre- to post-exercise slope (Wingate Anaerobic test as reference)	1.3 (31.7)	27.7 (27.1)	16.2 (5.6) **
Post-exercise to 30 min slope (Wingate Anaerobic test as reference)	-10.4 (32.6)	17.0 (27.9)	7.2 (7.0)
30 min to 1 h slope (Wingate Anaerobic test as reference)	-58.7 (33.4) <sup>a</sup>	-31.0 (27.9)	5.4 (7.7)
1 h to 2 h slope (Wingate Anaerobic test as reference)	-29.0 (35.1)	-16.0 (27.9)	9.5 (8.0)
2 h to 12 h slope (Wingate Anaerobic test as reference)	-138.6 (56.1) *	-51.3 (27.9) <sup>a</sup>	12.9 (8.2)
12 h to 24 h slope (Wingate Anaerobic test as reference)	-167.2 (46.7) **	-66.1 (27.9) *	5.4 (8.3)
Repeated sprints test	-79.4 (36.1) *	-13.1 (30.3)	3.9 (8.6)
Continuous VO <sub>2</sub> test	-22.5 (34.6)	6.7 (28.9)	-1.6 (8.4)
Intermittent VO <sub>2</sub> test	-60.1 (34.7) <sup>a</sup>	-2.0 (28.9)	-0.1 (8.5)
Repeated sprints test × Pre- to post-exercise slope	84.6 (43.9) *	39.2 (41.3)	-5.0 (8.1)
Repeated sprints test × Post-exercise to 30 min slope	58.1 (48.7)	21.5 (42.6)	-5.5 (10.4)
Repeated sprints test × 30 min to 1 h slope	111.1 (49.8) *	79.3 (42.6) <sup>a</sup>	-3.0 (11.2)
Repeated sprints test × 1-2 h slope	88.5 (53.8) <sup>a</sup>	51.8 (43.9)	-7.0 (12.0)
Repeated sprints test × 2-12 h slope	12.5 (60.2)	0.6 (43.9)	-6.1 (12.6)
Repeated sprints test × 12-24 h slope	123.2 (59.2) *	29.1 (44.4)	8.6 (13.2)
Continuous VO <sub>2</sub> test × Pre- to post-exercise slope	77.2 (42.1) <sup>a</sup>	64.8 (39.6) <sup>a</sup>	1.4 (7.9)
Continuous VO <sub>2</sub> test × Post-exercise to 30 min slope	30.6 (47.7)	15.0 (41.7)	8.9 (9.9)
Continuous VO <sub>2</sub> test × 30 min to 1 h slope	52.4 (47.9)	67.3 (41.0) <sup>a</sup>	4.6 (10.8)
Continuous VO <sub>2</sub> test × 1-2 h slope	9.8 (48.2)	47.9 (41.0)	8.4 (11.4)
Continuous VO <sub>2</sub> test × 2-12 h slope	-8.8 (51.3)	-2.0 (41.0)	-0.5 (11.7)
Continuous VO <sub>2</sub> test × 12-24 h slope	132.3 (48.4) **	47.7 (40.3)	-5.4 (12.0)
Intermittent VO <sub>2</sub> test × Pre- to post-exercise slope	79.5 (42.2) <sup>a</sup>	59.0 (39.6)	5.0 (7.9)
Intermittent VO <sub>2</sub> test × Post-exercise to 30 min slope	19.3 (46.8)	-14.2 (40.8)	2.3 (9.9)
Intermittent VO <sub>2</sub> test × 30 min to 1 h slope	76.2 (48.7)	47.1 (41.8)	11.2 (10.8)
Intermittent VO <sub>2</sub> test × 1-2 h slope	53.6 (49.0)	51.5 (41.8)	-1.6 (11.3)
Intermittent VO <sub>2</sub> test × 2-12 h slope	98.4 (52.5) <sup>a</sup>	26.2 (41.8)	5.2 (11.6)
Intermittent VO <sub>2</sub> test × 12-24 h slope	131.3 (51.2) **	-25.7 (43.1)	-0.5 (11.7)

\*\* P<0.01, \* P<0.05, <sup>a</sup> P<0.10

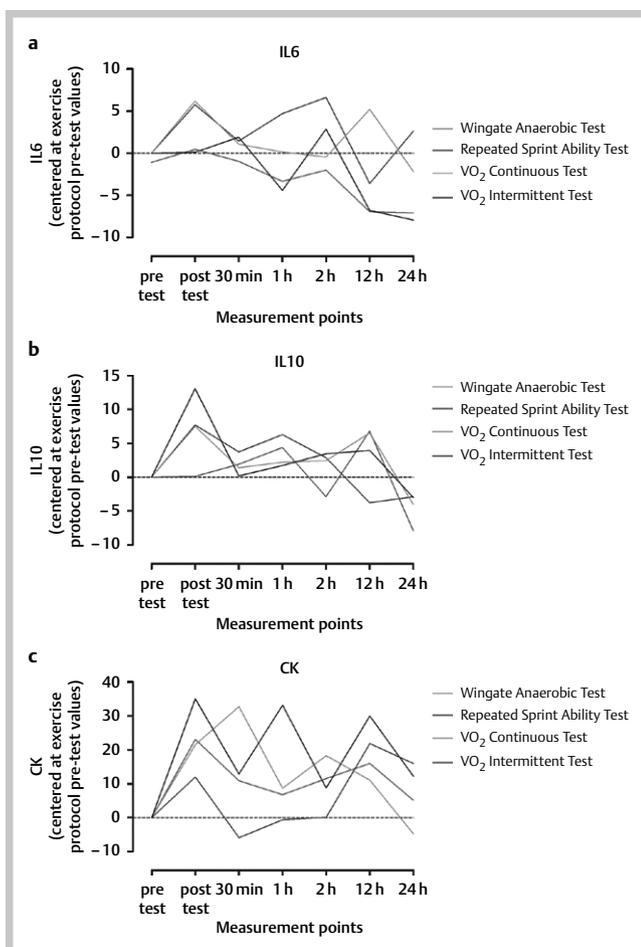
bility of hematological parameters is crucial to maintain optimal performance [3]. The consistent stability of packed cell volume and hemoglobin observed could be meanwhile used as an index of general health status before and after performances [4]. Because no significant differences between genders were found, the results are discussed together.

We found significant modifications on leukocyte counts after the effort in all protocols, but, unexpectedly, the change was the same for protocols that had 30s of duration (WANT) as for those with more than 20min of duration, on average (VCONT and VINT). In this study all test protocols were maximal. It is well known that maximal effort has substantial effects on total WBC, probably due to an increase in catecholamines. This is a first mechanism that induces the recruitment of marginated leukocytes from the pool (● Fig. 1, Panel a). After a stabilization or slight decrease of WBC (in this study 30 min after exercise) the second increase in WBC may be triggered by the increase of cortisol [4], which induces the release of leukocytes from the bone marrow. In the present study, all protocols showed a tendency

for a second increase in leukocytes 1 h after exercise (● Fig. 2). On the other hand, the lymphocytopenia observed post-exercise could be a result of immune cell migration [42], apoptosis [11] or both [24]. Considering the effect of 6 series of Wingate anaerobic cycle tests on lymphocyte apoptosis and migration, it was reported that post-exercise lymphocytopenia was a result of immune cell migration, particularly the suppressor T cell subset, rather than apoptosis [11]. Observations based on intensive treadmill running protocol at 80% maximal O<sub>2</sub> uptake, provided evidence that the mobilized lymphocytes appeared to extravasate the peripheral blood compartment [42]. More recently, observations considering the effects of 3 consecutive days of high-intensity interval running on CD4<sup>+</sup> (helper), CD8<sup>+</sup> (cytotoxic), and CD19<sup>+</sup> (B-cells) lymphocyte cell markers of apoptosis and migration in untrained individuals who completed an exertion test and later performed 3 consecutive days of an intermittent run protocol to exhaustion were reported [24]. B-cells displayed increases in both apoptotic and migratory markers following the first 2 days of intermittent running, and the apoptotic response persisted following day 3 [24]. It is possible that the ability of exercise to provide a stimulus capable of inducing apoptosis is dependent on the duration of exercise. On the other hand, the cellular migration had the greatest influence on cytotoxic T lymphocytes following each day of the interval runs [24]. In peripheral blood, granulocytes are mainly comprised of neutrophils. Neutrophils in part regulate tissue repair by phagocytosis of damaged cells, modulate the function of macrophage infiltrators, and eliminate microbial infection [47]. Acute exercise results in a first, rapid and profound neutrophilia (increase in blood neutrophil number) followed by a second, delayed increase in blood neutrophil counts a few hours later [32]. The initial increase is likely due to demargination caused by shear stress and catecholamines, whereas the later increase may be due to cortisol-induced release of neutrophils from the bone marrow [22, 49].

### IL-6 and exercise

The first report that acute exercise increased plasma IL-6 concentration was published 25 years ago [29]. It was suggested that IL-6 was produced predominantly by leukocytes as a response to exercise-induced local damage in working muscles. However, after the initial findings that circulatory blood cells were not the main source of IL-6 during exercise, researchers turned their attention to the muscle [35, 38]. In response to long-duration and high-intensity exercise, circulating levels of IL-6 increase by up to 100-fold [46]. In the current study, the levels of IL-6 increased immediately after exercise. These results suggest that, regardless of exercise mode or intensity, post-exercise increases in IL-6 may be expected. A trend of higher increase was observed for the VINT. This is probably explained by the relationship between release of IL-6 and bioavailability of carbohydrates (CHOs). Although, no association of energy expenditure within each exercise protocol with the pattern of IL-6 response to the exercise protocols was present in our study, the total energy



**Fig. 3** Changes in IL-10, IL-6 and CK before (PRE) and after (POST, 30 min, 1, 2, 12, 24 h) all test protocols (n = 9).

	Aerobic (kcal)	Anaerobic Lactic (kcal)	Anaerobic Alactic (kcal)	Total (kcal)
WANT	4.44 ± 0.88	10.78 ± 3.32	3.67 ± 1.46	18.89 ± 3.76
RSA	62.68 ± 18.03	8.79 ± 3.27	5.45 ± 3.91	76.92 ± 20.42
V <sub>CONT</sub>	149.56 ± 72.80	8.87 ± 2.30	3.81 ± 2.28	162.23 ± 73.88
V <sub>INT</sub>	196.00 ± 108.33	10.25 ± 2.22	5.22 ± 3.58	211.47 ± 111.43

**Table 4** Energy system contributions and total energy expenditure for all protocols.

expenditure for this test was the highest of all the protocols studied, with the predominance of CHO utilization (● **Table 4**). The role of glycogen availability in the contracting muscle as a primary signaling mechanism for IL-6 mRNA expression and release into the circulation is unclear [28]. However, this cytokine is a very “fuel sensing molecule” and when the higher exercise intensity leads to a faster glycogen depletion in the working muscles, plasma IL-6 concentration is enhanced [31].

Some authors have shown that more than 50% of the variation in plasma IL-6 following exercise can be explained by exercise duration alone [36] during shorter exercise bouts [39]. In this study, the difference of total time between the VCONT and VINT tests was about 8 min and twenty seconds, on average (included the intervals time in VINT), and the lactate concentrations (VCONT = 11,2 ± 3,03 mmol/L and VINT = 12,18 ± 1,73 mmol/L, data not showed) were not different between protocols ( $P \geq 0.05$ ). Contributions of the lactic anaerobic system and the aerobic system were higher in the VINT when compared to the VCONT ( $p = 0.025$  and  $p = 0.017$  respectively), indicating a higher energy expenditure and greater use of carbohydrate stores during the test. VINT is an intermittent test and the metabolic profiles of repeated-sprint performances are strongly dependent on the sprint duration and the capacity of recovery during the duration of the repeated sprints [2].

The interval workouts in VINT (1-min interval time each 3-min of test, larger test) may not have been large enough to allow for replenishing of the muscle energy supply, thus, the IL-6 increase after exercise was higher than after VCONT. Of note, the anaerobic ATP production during a single short-duration sprint ( $< 10$  s) is provided by phosphocreatine breakdown degradation and anaerobic glycolysis [9]; however, the relative contribution of anaerobic glycolysis to the performance in subsequent sprints throughout the repeated tasks is reduced, and is partially replaced by an increase in the aerobic metabolism [45].

### IL-10 and exercise

Acute exercise bouts have been shown to promote an acute phase response, resulting in post-exercise cytokine levels similar to those observed during sepsis or inflammatory disease [30]. Nevertheless, the transient increase in IL-6 circulating levels during exercise appears to be responsible for a further increase in circulating levels of anti-inflammatory cytokines IL-10 and receptor antagonist 1A (IL-1ra), by stimulating the release of cortisol and decreasing the levels of TNF- $\alpha$ . IL-10 is known to be produced mainly by regulatory T cells but also by T helper 2 (Th2), Th1 and Th17 cells, monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs), B cells and CD8<sup>+</sup> T cells [14]. Regardless of the source, the main function of IL-10 seems to be the down regulation of adaptive immune responses and reduction of inflammation-induced tissue damage [14]. In fact, IL-10 decreases the expression of MHC molecules, the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and co-stimulatory CD80 and CD86 molecules in antigen-presenting cells [14]. Furthermore, IL-10 compromises the ability of effector T cells to sustain inflammatory responses by interfering or completely inhibiting the expression of various pro-inflammatory cytokines and other soluble mediators. Thus, IL-10 is a potent promoter of an anti-inflammatory state [7, 21, 44].

In the present study, the time effect for IL-10 concentrations was more pronounced in VCONT. IL-10 is not expressed in skeletal muscle after exercise [33]. Constitutive expression of IL-10 in skeletal muscle cells is low [33], but IL-10 production may have

increased in response to the early rise in IL-6. Moreover, IL-10 production during exercise may also depend on changes in the numbers of certain T cell subsets [20]. Observations of the effects of training status and mode (sprint × endurance) on resting circulating T regulatory (Treg) cell counts and antigen-stimulated IL-10 production and the effect of an acute bout of exercise on the Treg response showed an association between high training loads (endurance) with greater resting IL-10 production and Treg cell counts than in sedentary, recreationally active and sprint-trained athletes [16]. Regardless of the exercise duration, the increase in Treg and antigen-stimulated IL-10 production reported after continuous protocols corroborate our results.

Several researchers have compared the effects of interval training vs. continuous training on hematological and inflammatory markers [19, 50, 51]. However, it is difficult to compare studies because of varying sample sizes, different exercise protocols, recovery times and different biochemical analysis techniques. In the present study, the acute response of hematological and inflammatory markers after maximal protocols was obtained from the same participants, performing all protocol tests under identical conditions.

In summary, the acute effects of maximal high-intensity exercise triggers hematological and inflammatory response that changes the normal muscle homeostasis. Particularly, the present results showed that hematological and inflammatory markers have a similar pattern of response after acute strenuous exercise tests regardless of the duration and mode (intermittent vs. continuous) of exercise. The present finding support that similar responses after continuous or intermittent acute protocols are observed when exercises are performed to volitional failure.

### Acknowledgements



Firstly, the authors would like to thank all the voluntaries that participated in this study. The study was partly funded by University of Coimbra, Faculty of Sport Sciences and Physical Education, University of Coimbra and CAPES, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil as part of LGM PhD scholarship (BEX 1417/13-4). HMC was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [PNPD/CAPES/2013]. **AMT and LR are registered in the unit UID/DTP/04213/2016.**

**Conflict of interest:** No conflict of interest is declared.

### Affiliations

- <sup>1</sup> Faculty of Sport Sciences and Physical Education, Coimbra University, Coimbra, Portugal
- <sup>2</sup> State University of Campinas – UNICAMP, Physical Education, Campinas, Brazil
- <sup>3</sup> CIDAF, **Research Centre for Sport and Physical Activity**, Centro de Investigação, Coimbra, Portugal
- <sup>4</sup> Laboratory of Cell Signaling, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil
- <sup>5</sup> Faculdade de Ciências do desporto e Educação Física, Centro de Estudos Biocinéticos, Coimbra, Portugal

### References

- <sup>1</sup> Balsom PD, Seger JY, Sjödin B, Ekblom B. Physiological responses to maximal intensity intermittent exercise. *Eur J Appl Physiol* 1992; 65: 144–149
- <sup>2</sup> Balsom PD, Seger JY, Sjödin B, Ekblom B. Maximal-intensity intermittent exercise: effect of recovery duration. *Int J Sports Med* 1992; 13: 528–533

- 3 Banfi G, Del Fabbro M, Mauri C, Corsi MM, Melegati G. Haematological parameters in elite rugby players during a competitive season. *Clin Lab Haematol* 2006; 28: 183–188
- 4 Banfi G, Roi GS, Dolci A, Susta D. Behaviour of haematological parameters in athletes performing marathons and ultramarathons in altitude ('skyrunners'). *Clin Lab Haematol* 2004; 26: 373–377
- 5 Bentley DJ, Newell J, Bishop D. Incremental exercise test design and analysis: Implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sport Med* 2007; 37: 575–586
- 6 Bertuzzi R, Melegati J, Bueno S, Ghiarone T, Pasqua LA, Gáspari AF, Lima-Silva AE, Goldman A. GEDAE-LaB: A Free Software to Calculate the Energy System Contributions during Exercise. *PLoS One* 2016; 11: e0145733
- 7 Caton AJ, Weissler KA. Regulatory cells in health and disease. *Immunol Rev* 2014; 259: 5–10
- 8 Cipryan L, Svagera Z, Vala R. IL-6 and CRP response to maximal exercise intervention. *J Sports Med Phys Fitness* 55: 813–823
- 9 Dawson B, Goodman C, Lawrence S, Preen D, Polglaze T, Fitzsimons M, Fournier P. Muscle phosphocreatine repletion following single and repeated short sprint efforts. *Scand J Med Sci Sports* 1997; 7: 206–213
- 10 Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 1974; 37: 247–248
- 11 Friedman RA, Navalta JW, Fedor EA, Kell HB, Lyons TS, Arnett SW, Schaffer MA. Repeated high-intensity Wingate cycle bouts influence markers of lymphocyte migration but not apoptosis. *Appl Physiol Nutr Metab* 2012; 37: 241–246
- 12 Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 2007; 103: 693–699
- 13 Gleeson M, Bishop N, Oliveira M, McCauley T, Tauler P, Muhamad AS. Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion. *Scand J Med Sci Sport* 2012; 22: 410–417
- 14 Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 607–615
- 15 Gleeson M, Walsh NP. The BASES expert statement on exercise, immunity, and infection. *J Sports Sci* 2012; 30: 321–324
- 16 Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M, Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol* 2013; 113: 1839–1848
- 17 Harriss DJ, Atkinson G. Ethical Standards in Sport and Exercise Science Research: 2016 Update. *Int J Sports Med* 2015; 36: 1121–1124
- 18 Henriksson J, Sahlin K. Metabolism during exercise – energy expenditure and hormonal changes. In *Textbook of sports medicine*. In: Kjaer M, Krosgaard M, Magnusson P, Engbretsen L, Roos H, Takala TW-S-Y. (ed.). Malden, Massachusetts: Blackwell Science Ltd; 2003
- 19 Hovanloo F, Arefirad T, Ahmadizad S. Effects of sprint interval and continuous endurance training on serum levels of inflammatory biomarkers. *J Diabetes Metab Disord* 2013; 12: 22
- 20 LaVoy EC, Bosch JA, Lowder TW, Simpson RJ, Emily L. Acute aerobic exercise in humans increases cytokine expression in {CD27(-)} but not {CD27(+)} {CD8(+)} T-cells. *Brain Behav Immun* 2013; 27: 54–62
- 21 Margaria S, Anne O, Saraiva M, O'Garra A. The regulation of {IL-10} production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 170–181
- 22 McCarthy DA, Macdonald I, Grant M, Marbut M, Watling M, Nicholson S, Deeks JJ, Wade AJ, Perry JD. Studies on the immediate and delayed leucocytosis elicited by brief (30-min) strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* 1992; 64: 513–517
- 23 Navalta JW, McFarlin BK, Lyons TS. Does exercise really induce lymphocyte apoptosis? *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2: 478–488
- 24 Navalta JW, Tibana RA, Fedor EA, Vieira A, Prestes J. Three consecutive days of interval runs to exhaustion affects lymphocyte subset apoptosis and migration. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 694801
- 25 Nguyen T, Obeid J, Ploeger HE, Takken T, Pedder L, Timmons BW. Inflammatory and growth factor response to continuous and intermittent exercise in youth with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2012; 11: 108–118
- 26 Nieman D, Henson D, Gojanovich G, Davis JM, Dumke C, Utter A, Murphy A, Pearce S, McAnulty S, McAnulty L. Immune changes: 2h of continuous vs. intermittent cycling. *Int J Sports Med* 2007; 28: 625–630
- 27 Nieman DC. Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1385–1394
- 28 Nieman DC, Zwetsloot KA, Meaney MP, Lomiwes DD, Hurst SM, Hurst RD. Post-Exercise Skeletal Muscle Glycogen Related to Plasma Cytokines and Muscle IL-6 Protein Content, but not Muscle Cytokine mRNA Expression. *Front Nutr* 2015; 2:
- 29 Northoff H, Berg A. Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 1991; 12 (Suppl 1): S9–S15
- 30 Nunes LAS, Grotto HZW, Brenzikofer R, Macedo DV. Hematological and biochemical markers of iron status in a male, young, physically active population. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 349182
- 31 Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans – effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83: 512–515
- 32 Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: Possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev* 2002; 8: 49–100
- 33 Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev* 2015; 21: 8–25
- 34 Pedersen B, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000; 80: 1055–1081
- 35 Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 457–465
- 36 Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise – the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 152–156
- 37 Petersen A, Pedersen B. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (Bethesda, Md 1985) 2005; 98: 1154–1162
- 38 Reihmane D, Dela F. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci* 2014; 14: 242–250
- 39 Reihmane D, Jurka A, Tretjakovs P, Dela F. Increase in IL-6, TNF- $\alpha$ , and MMP-9, but not sICAM-1, concentrations depends on exercise duration. *Eur J Appl Physiol* 2013; 113: 851–858
- 40 Sari-Sarraf V, Reilly T, Doran DA. Salivary IgA response to intermittent and continuous exercise. *Int J Sports Med* 2006; 27: 849–855
- 41 Sim M, Dawson B, Landers G, Swinkels DW, Tjalsma H, Trinder D, Peeling P. Effect of exercise modality and intensity on post-exercise interleukin-6 and hepcidin levels. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2013; 23: 178–186
- 42 Simpson RJ, Florida-James GD, Cosgrove C, Whyte GP, Macrae S, Pircher H, Guy K. High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood compartment in human subjects. *J Appl Physiol* 2007; 103: 396–401
- 43 Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 135: 355–380
- 44 Speaker KJ, Cox SS, Paton MM, Serebrakian A, Maslanik T, Greenwood BN, Fleshner M. Six weeks of voluntary wheel running modulates inflammatory protein (MCP-1, IL-6, and IL-10) and DAMP (Hsp72) responses to acute stress in white adipose tissue of lean rats. *Brain Behav Immun* 2014; 39: 87–98
- 45 Spencer M, Bishop D, Dawson B, Goodman C. Physiological and metabolic responses of repeated-sprint activities: specific to field-based team sports. *Sports Med* 2005; 35: 1025–1044
- 46 Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Liu Q, Kurakake S, Okamura N, Kumae T, Umeda T, Sugawara K. Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 348–355
- 47 Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: R1173–R1187
- 48 Tossige-Gomes R, Ottone VO, Oliveira PN, Viana DJS, Araujo TL, Grippo FJ, Rocha-Vieira E. Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Brazilian J Med Biol Res* 2014; ■■■: ■■■■–■■■■ **47(6): 492-498**
- 49 Walsh N, Gleeson MM, Shephard R, Woods J, Bishop N, Fleshner M, Green C, Pedersen B, Laurie H-G, Rogers C, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011; 17: 6–63
- 50 Weng T-P, Huang S-C, Chuang Y-F, Wang J-S. Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PLoS One* 2013; 8: e80248
- 51 Zwetsloot KA, John Casey S, Lawrence MM, Battista RA, Shanely RA, Andrew Shanely R. High-intensity interval training induces a modest systemic inflammatory response in active, young men. *J Inflamm Res* 2014; 7: 9–17

# Lifelong training improves anti-inflammatory environment and maintains the number of regulatory T cells in masters athletes

Luciele G. Minuzzi<sup>1</sup>  · Luis Rama<sup>1</sup> · Nicolette C. Bishop<sup>2</sup> · Fátima Rosado<sup>1</sup> · António Martinho<sup>3</sup> · Artur Paiva<sup>4</sup> · Ana M. Teixeira<sup>1</sup>

Received: 8 September 2016 / Accepted: 26 March 2017  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

## Abstract

**Purpose** The purpose of this study was to quantify and characterize peripheral blood regulatory T cells (Tregs), as well as the IL-10 plasma concentration, in Masters athletes at rest and after an acute exhaustive exercise test.

**Methods** Eighteen Masters athletes (self-reported training:  $24.6 \pm 1.83$  years;  $10.27 \pm 0.24$  months and  $5.45 \pm 0.42$  h/week per each month trained) and an age-matched control group of ten subjects (that never took part in regular physical training) volunteered for this study. All subjects performed an incremental test to exhaustion on a cycle ergometer. Blood samples were obtained before (Pre), 10 min into recovery (Post), and 1 h after the test (1 h).

**Results** Absolute numbers of Tregs were similar in both groups at rest. Acute exercise induced a significant increase in absolute numbers of Tregs at Post ( $0.049 \pm 0.021$  to  $0.056 \pm 0.024 \times 10^9/L$ ,  $P=0.029$  for Masters;  $0.048 \pm 0.017$  to  $0.058 \pm 0.020 \times 10^9/L$ ,  $P=0.037$  for control) in both groups. Treg mRNA expression for FoxP3, IL-10, and TGF- $\beta$  in sorted Tregs was similar throughout the trials in

both groups. Masters athletes showed a higher percentage of subjects expressing the FoxP3 (100% for Masters vs. 78% for Controls,  $P=0.038$ ) and TGF- $\beta$  (89% for Masters vs. 56% for Controls,  $P=0.002$ ) after exercise and a higher plasma IL-10 concentration ( $15.390 \pm 7.032$  for Masters vs.  $2.411 \pm 1.117$  for control  $P=0.001$ ,  $ES=2.57$ ) at all time-points. KLRG1 expression in Tregs was unchanged.

**Conclusion** Our findings showed that Masters athletes have elevated anti-inflammatory markers and maintain the number of Tregs, and may be an adaptive response to life-long training.

**Keywords** Treg cells · Master athletes · Aging · FoxP3 · TGF-beta · Interleukin-10

## Abbreviations

1 h	1 h post-exercise
APCs	Antigen-presenting cells
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor G1
IL	Interleukin
Pre	Before exercise
Post	10 min into recovery
VO <sub>2max</sub>	Maximal oxygen consumption
URTI	Upper respiratory tract infection
Tregs	Regulatory T cells

Communicated by William J. Kraemer.

✉ Luciele G. Minuzzi  
lucielegm@gmail.com

<sup>1</sup> Faculty of Sports Science and Physical Education, University of Coimbra, Pavilhão III, Estádio Universitário de Coimbra, Santa-Clara, 3040-156 Coimbra, Portugal

<sup>2</sup> School of Sport, Exercise and Health Sciences, Loughborough University, Ashby Road, Loughborough, Leicestershire LE11 3TU, UK

<sup>3</sup> Portuguese Institute for Blood and Transplantation, São Martinho do Bispo, Coimbra, Portugal

<sup>4</sup> Flow Cytometry Unit-Clinical Pathology Service, University Hospital Centre of Coimbra, Coimbra, Portugal

## Introduction

Strenuous exercise is commonly associated with increased symptoms of upper respiratory tract infection (URTI) in athletes (Nieman et al. 1989; Gleeson et al. 2012), suggesting that high-volume exercise may have an immunosuppressive effect (Gleeson 2007). The immunological mechanisms that underlie this apparent increase in infection

susceptibility in athletes are probably multi-factorial and include perturbations of the T-cell compartment (Cosgrove et al. 2012; Tossige-Gomes et al. 2014; Simpson et al. 2015).

Regulatory T cells (Tregs) are crucial in maintaining immunological tolerance and negative control of pathological immune responses (Fehérvari and Sakaguchi 2004; Sakaguchi et al. 2010; Schmidt et al. 2012; de Moura Braz et al. 2014; Littwitz-Salomon et al. 2015). Tregs secrete IL-10 and TGF- $\beta$  as additional mechanisms to suppress target cell activity (Corthay 2009). Besides expressing the IL-2 receptor  $\alpha$ -chain (CD25), Tregs also express the FoxP3 (Forkhead Box P3) transcription factor, a control gene that is key to their development and function (Campbell and Ziegler 2007). TGF- $\beta$  triggers FoxP3 expression in precursors (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) and, together with IL-2, is a key regulator of signalling pathways that maintain FoxP3 expression and suppressive function in Tregs (Fu et al. 2004; Perry et al. 2013). Tregs can also express the KLRG1, a marker of senescence and differentiation of IL-10 production capacity by Tregs (Tauro et al. 2013). The Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1), ITIM-bearing receptor for cadherin-family proteins, is expressed on NK cells and on a minority of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Henson and Akbar 2009). Given the central role of Tregs in immune homeostasis, any age-related loss of Treg function would be predicted to contribute to over-active immune function encountered in elderly humans as a syndrome of chronic inflammation and the age-related increase in the risk for autoimmune disorders (Fessler et al. 2013). Conversely, the age-related increase in Treg numbers could result in compromised immune responses, increasing the risk of malignancies and infections amongst the elderly. This expansion of the Treg population can only be considered physiologically relevant if the suppressive function of the accumulated aged Tregs remains intact. Indeed, IL-10 production by Tregs and FoxP3 expression has been shown to be preserved with aging (Jagger et al. 2014). However, IL-10 expression was elevated among KLRG1<sup>+</sup> Treg cells (Tauro et al. 2013). Though KLRG1 serves as a marker for senescence, signalling through KLRG1 could result in altered T-cell function (Tauro et al. 2013). Actually, KLRG1<sup>+</sup> Treg cells are somewhat more potent than KLRG1<sup>-</sup> cells in suppressing naive T-cell proliferation *in vitro* (Beyersdorf et al. 2007).

Aging is a natural process, but with increasing life expectancy worldwide, activities that can mitigate the effects of aging on the immune system are gaining attention. This includes the practice of exercise/physical activity. The impact of exercise on immune system has been extensively studied. However, most studies have investigated the acute effects of exercise and there are few research related to chronic effects or longitudinal baseline studies. Evidence suggests that circulating numbers of Tregs increase

following an acute bout of strenuous exercise in humans (Handzlik et al. 2013). Moreover, evidence of an association between high training load, increased *in vitro* antigen-stimulated IL-10 production and greater numbers of circulating Tregs, supports the hypothesis that Tregs mediate inhibitory effects through increases IL-10 production in highly physically active individuals, and this may play an important role in modifying respiratory infection risk (Gleeson and Walsh 2012; Handzlik et al. 2013).

The immune response to acute exercise is transitory and variable, being influenced by a range of factors such as the intensity, duration, and mode of the exercise. The effects of exercise training on immunosenescence are inconsistent, probably due to differences in experimental design among these studies (Simpson et al. 2012; de Araújo et al. 2013; Pollock et al. 2015; Silva et al. 2016).

Masters athletes represent an interesting sub-demographic group of adults, because many of them express a highly unique physiological phenotype that could be termed 'exceptionally successful aging' (Tanaka and Seals 2008). Thus, the study of Masters athletes provides an opportunity to investigate the effects long-term training on the aging immune system *per se* and the influence of long-term training adaptations on acute exercise responses. Therefore, the purpose of this study was to quantify and functionally characterize peripheral blood Tregs, as well as the expression of a senescence marker, in Masters athletes after an exercise incremental test to exhaustion.

## Materials and methods

### Subjects

Nineteen Masters athletes (3 female, 16 male) over 40 years who had participated in training and competitions for more than 20 years volunteered for this study. The study also included a healthy, non-smoking and body weight- and age-matched control group of ten subjects (four female, six male) (Table 1). All participants completed a comprehensive health-screening questionnaire before testing commenced used for inclusion/exclusion criteria. The inclusion criteria for masters was a minimum of 20 years of regular training and competition participation. Moreover, the master athletes should be currently participating in regular training and competition (judo, swimmers, and athletics). The inclusion criteria for the control group were to have performed no regular physical training in the last 20 years. Participants were only included if they were non-smokers and had no known cardiovascular, musculoskeletal or neurological diseases or were taking any medication like statins.

**Table 1** Participant characteristics

	Control (N = 10)	Masters (N = 19)	P value
Age (years)	54.2 ± 5.94	53.2 ± 9.08	0.759
Height (cm)	168.6 ± 8.53	170.4 ± 5.29	0.480
Body mass (kg)	70.4 ± 12.93	74.9 ± 15.55	0.444
BMI (kg m <sup>-2</sup> )	24.6 ± 3.18	25.7 ± 4.65	0.526
VO <sub>2max</sub> (ml kg min <sup>-1</sup> )	29.3 ± 4.14	40.2 ± 11.45*	0.001

Values are Mean ± Standard Deviation (SD)

N = Masters (19), Control (10), *BMI* body mass index, *VO<sub>2max</sub>* maximal oxygen consumption

\**P* < 0.001 compared to Control group

On average, master athletes had an experience of training of 24.6 ± 1.8 years. Each year, the athletes trained 10.3 ± 0.2 months and approximately 5 h per week (5.5 ± 0.4 h) per month trained. All subjects provided their written, informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics and Human Subjects Review Board at the Faculty of Sports Science and Physical Education, University of Coimbra.

### Experimental design

Participants arrived at the laboratory at 09:00 having refrained from caffeine and alcohol in the previous 24 h and avoided strenuous exercise 72 h prior to the laboratory procedures. Participants sat quietly for 15 min while they completed a comprehensive health-screening questionnaire. Resting venous blood samples (15 mL) were taken from an antecubital vein by venipuncture in a seated position into three vacutainer K<sub>3</sub>EDTA tubes (Becton–Dickinson, Oxford, UK). A maximal protocol test was performed for determination of VO<sub>2max</sub>. Ten min and 1 h into completion of exercise protocol 15-mL blood samples were collected in the same manner as described before. Haematological analysis, plasma IL-10 concentration, flow cytometry procedures, cell purification, and mRNA expression in purified Treg cells are described in the following.

### VO<sub>2max</sub> determination

VO<sub>2max</sub> was determined using an incremental cycling protocol performed on an electro-magnetically braked cycle ergometer (Lode Excalibur Sport V4.67, Groningen, The Netherlands). After the measurements of body weight, stature and a pre-test blood sample, participants began cycling at 75 W; power output was increased in 25 W every 3 min until volitional fatigue. Expired gas was collected via breath-by-breath automated gas-analysis system (Quark CPET COSMED, COSMED, Rome, Italy). Heart-rate,

using short range telemetry (COSMED, Rome, Italy), and ratings of perceived exertion Borg Cr-10 scale (RPE) were recorded each 3-min stage and during the final of the test.

### Haematological analysis

Immediately after collection, blood cell counts: total leukocytes, lymphocytes, monocytes, and granulocytes were determined using an automated cell counter (Coulter ACT Diff, Beckman Coulter, USA).

### Cytokines

Plasma was extracted from one of the tubes by centrifugation at 4 °C, at 2500 rpm for 15 min, and stored at –80 °C until further use.

Plasma IL-10 concentration was evaluated using a commercially available ELISA kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, CA). The minimum detection limit for IL-10 was <1 pg/ml. Plasma samples were assayed in duplicate. The mean coefficient variation for the duplicate analysis was 3.55%.

### Flow cytometry

Immunofluorescent staining of whole blood was performed using an eight-colour immunophenotyping strategy on a FACSCanto II (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) identified specific lymphocyte populations and Tregs. The peripheral blood cells were stained with the following monoclonal antibodies (mAb): anti-human CD3-PB (pacific blue, clone UCHT1, Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-human CD4-APC-H7 (allophycocyanin-hilite 7, Clone 13B8.2, Beckman Coulter, Miami, FL, USA), anti-human CD8-KO (Krome Orange, Clone 5MZ.332, Beckman Coulter, Miami, FL, USA), anti-human CD25-PE (phycoerythrin, Clone 2A3, BD Bioscience, San Jose, CA, USA), anti-human CD127-FITC (fluorescein isothiocyanate, Clone R.34.34, Beckman Coulter), anti-human CD27-PECy5 (phycoerythrin–cyanine 5, clone R.8.01, Beckman Coulter), anti-human CD45RA-PECy7 (phycoerythrin–cyanine 7, Clone L48, BD Bioscience) and anti-human/mouse KLRG1-APC (allophycocyanin, Clone 2F1/KLRG1, Biolegend, San Diego, CA). Briefly, peripheral blood cells were labelled and incubated for 10 min at room temperature in the dark. After this, 2 ml of FACS lysing Solution (BD Biosciences) was added; cells were incubated at room temperature for a further 10 min and then washed with 2 ml of PBS. The tubes were then centrifuged at 540 g for 5 min and the supernatant was discarded. The cells were resuspended in 0.5 ml PBS, and immediately acquired in a FACSCanto II (BD) flow cytometer.

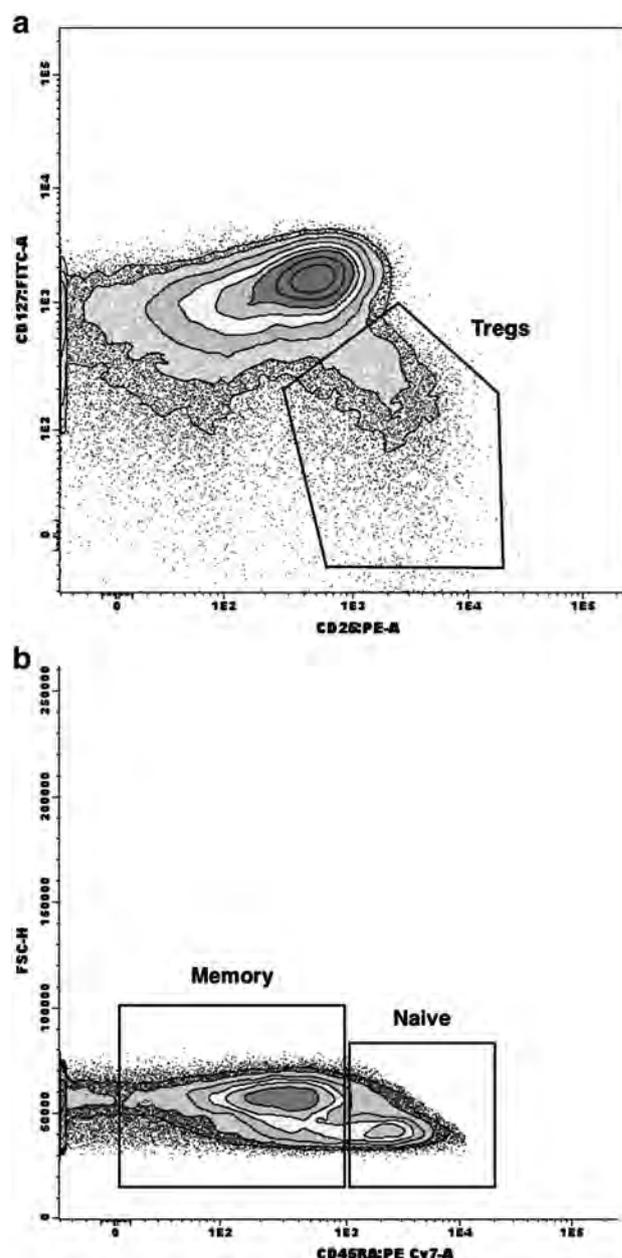
For acquisition initially, 1,000,000 events, corresponding to all nucleated cells present in the sample, were collected and information stored. A lymphocyte population was first gated from the PB cells according to their low forward and side scatter. T lymphocytes were identified according to their positivity for CD3 and typical light scatter. Tregs cells were defined based in the following phenotype:  $CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$  and subdivided into naive ( $CD45RA^+$ ) and memory ( $CD45RA^-$ ) cells. An inversion relationship between CD127 and FoxP3 expressed in  $CD4^+CD25^{++}$  cells has been described (Liu et al. 2006), allowing accurate estimation of this Treg cell population via flow cytometry (Handzlik et al. 2013) (Fig. 1). Senescent T cells were detected based on the expression of  $KLRG1^+$ . The FACSCanto II was routinely calibrated using Calibrite beads (BD Biosciences) and single labelled antibody tubes were used for further compensation adjustments. Data analysis was performed in the Infinicyt version 1.7 software (Cytognos, Salamanca, Spain). Absolute counts were calculated using a dual platform methodology (flow cytometry and haematological cell analyser—Beckman Coulter LH 750, Miami, USA).

### Cell purification by fluorescence-activated cell sorting

$CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$  Tregs-cell populations were purified by FACS (using a FACS Aria II flow cytometer; BD) according to their typical phenotype. The purified cell populations were subsequently used for mRNA expression studies.

### Analysis of mRNA expression in purified Treg cells

The content of purified cell sorted  $CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$  Tregs-cell population, were transferred to a 1.5-mL Eppendorf tube and centrifuged for 5 min at 300 g, and the pellet was resuspended in 350  $\mu$ L of RLT Lysis Buffer (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was extracted with the RNeasy Micro kit (Qiagen) in accordance with the instructions of the manufacturer. Total RNA was eluted in a 20- $\mu$ L volume of RNase-free water and was reverse-transcribed with Tetra cDNA Synthesis (Biolone, London, UK) in accordance with the instructions of the manufacturer. Relative quantification of gene expression by real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in the LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Real-time PCRs were carried out using 1 $\times$  QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) and 1 $\times$  QuantiTect Primer Assay (TGF- $\beta$ 1: QT00025718; IL-10: QT00041685; FoxP3: QT00048286) (Qiagen) in a final volume of 10  $\mu$ L. The reactions were performed using the following thermal profile: one cycle of 10 min at 95  $^{\circ}$ C, 50 cycles of 10 s at 95  $^{\circ}$ C, 20 s at 55  $^{\circ}$ C and 30 s at 72  $^{\circ}$ C, one cycle of 5 s at



**Fig. 1** Identification of Treg cells via flow cytometry. **a** CD127 vs. CD25 identifying  $CD3^+CD4^+CD25^{++}CD127^{low/-}$  (Treg) cells. **b** FSC-H vs. CD45RA gating naive ( $CD4^+ CD45RA^+$ ) and memory ( $CD4^+ CD45RA^-$ ) Treg cells

95  $^{\circ}$ C, 1 min at 65  $^{\circ}$ C and continuous at 97  $^{\circ}$ C, and one cycle of 10 s at 21  $^{\circ}$ C. Real-time PCR results were analysed with the LightCycler software (Roche Diagnostics). The GeNorm software (Primer Design Ltd., Southampton, UK) was used to select the reference genes to normalize data. The reference genes used for gene expression analysis were cytochrome c1 (CYC1; QT00209454) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; QT012504271). The normalized expression levels of the

genes of interest were calculated using the delta Ct (change in threshold cycle) method.

### Statistical analysis

All data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Group comparisons were assessed using the Mann–Whitney *U* test. Sequential changes by acute exercise were assessed by repeated-measures analysis of variance for data with normal distribution. When the distributions deviated from normal distribution, a Friedman test with Dunn's post hoc test was undertaken to evaluate the statistical differences in time. Because no differences between genders were found when analysing the Treg subpopulations, final statistical analysis was done without separating the samples by gender. Significance was accepted at  $P < 0.05$ . Correlation between subsets populations and age were assessed according to Spearman's rank correlation coefficient. Percentage of differences was tested using cross-tabulation and Chi-Square Test. All statistical analyses were performed using SPSS 23.0 (SPSS, Chicago, IL). To report the strength of the exercise intervention or magnitude of effect of condition (Masters vs. control) the Cohen's effect size (ES) was calculated and was categorized by convention as ( $d=0.2$  small effect;  $d=0.5$  medium effect;  $d=0.8$  or more, large effect) using G\*Power Version 3.1.9.2. The graphs are building using the GraphPad Prism version 5.0.

### Results

There were no significant differences for height, body weight and BMI between groups (Table 1).  $VO_{2max}$  was higher for master athletes when compared to the older group ( $P=0.001$ ; Table 1). The exercise induced a significant increase of the leukocyte numbers ( $P=0.003$ ,  $ES=1.21$ ). Post hoc analysis revealed that the total leukocyte count returned to pre-exercise values at 1 h (control,  $P=0.001$ ,  $ES=1.57$ ; Masters,  $P=0.001$ ,  $ES=0.73$ ). Lymphocytes exhibited a significant biphasic response to exercise, whereby exercise induced an increase in lymphocyte count in both groups at Post (control,  $P=0.001$ ,  $ES=1.32$ ; Masters  $P=0.005$ ,  $ES=0.82$ ) compared to baseline values; however, 1 h post-exercise values were significantly lower than Pre for Masters athletes only ( $P=0.002$ ,  $ES=0.53$ ), but returned to baseline for control subjects ( $P=0.426$ ). Monocytes and granulocytes showed an increase at Post (control,  $P=0.045$ ,  $ES=1.11$ , Masters,  $P=0.054$ ,  $ES=0.70$  for monocytes; control,  $P=0.045$ ,  $ES=0.50$ , Masters,  $P=0.024$ ,  $ES=0.40$  for granulocytes; Table 2).

To assess any effects of long-term exercise on Tregs, we first looked at differences at baseline. There were no significant differences in the proportion (%) of

**Table 2** Haematological variables and leukocyte counts

	Pre	Post	1 h
WBC ( $\times 10^9/L$ )			
Control	6.70 $\pm$ 1.41	8.80 $\pm$ 1.93*	5.88 $\pm$ 1.76
Masters	6.94 $\pm$ 1.89	8.94 $\pm$ 3.13*	6.88 $\pm$ 2.19
Lymphocytes ( $\times 10^9/L$ )			
Control	2.00 $\pm$ 0.66	3.20 $\pm$ 1.03*	1.77 $\pm$ 0.66
Masters	2.00 $\pm$ 0.74	3.26 $\pm$ 1.75*	1.55 $\pm$ 0.92 <sup>§</sup>
Monocytes ( $\times 10^9/L$ )			
Control	0.41 $\pm$ 0.17	0.60 $\pm$ 0.17*	0.35 $\pm$ 0.10
Masters	0.45 $\pm$ 0.19	0.58 $\pm$ 0.18*	0.38 $\pm$ 0.18
Granulocytes ( $\times 10^9/L$ )			
Control	3.80 $\pm$ 1.22	4.40 $\pm$ 1.17*	3.77 $\pm$ 1.64
Masters	4.05 $\pm$ 1.17	4.73 $\pm$ 1.91*	4.38 $\pm$ 1.68

Values are Mean  $\pm$  SD

*n* Masters (19), control (10). Pre (before), Post (10 min into recovery), 1 h (1 h after the test), WBC white blood cells

\* $P < 0.05$  from Pre to Post, <sup>§</sup> $P < 0.05$  from Pre

$CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$  Tregs either within the total lymphocytes population or within the  $CD4^+$  T-cell population, between the two studied groups at baseline (Table 3,  $P=0.890$ ). The frequency of naïve ( $CD45RA^+$ ) and memory ( $CD45RA^-$ ) Tregs subpopulations was also similar for both groups (Table 3).

There was no significant effect of acute exercise on the proportion of  $CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$  Tregs within total lymphocytes and  $CD4^+$  T cells (Table 3). However, acute exercise induced a significant increase in the numbers of Tregs at Post (Table 3,  $P=0.034$ ,  $ES=0.31$  for Masters;  $P=0.033$ ,  $ES=0.53$  for control) and returned to pre-exercise values at 1 h post (Table 3).

The ability of exercise to induce FoxP3, TGF- $\beta$  and IL-10 mRNA expression was evaluated in purified  $CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$  Treg cells. FoxP3 and TGF- $\beta$  mRNA expression was similar in all measurements from both groups. Similarly, IL-10 mRNA expression was not altered in response to exercise (Fig. 2; Table 4). Interestingly, in the Masters group the percentage of cases where IL-10 mRNA expression was detected remained unchanged (Pre = 61.1%; Post = 66.7% and 1 h Post = 50% of all subjects), while in the control group there was a tendency for a fewer cases expressing mRNA for IL-10 (Pre = 22.2%; Post = 55.6% and 1 h = 22.2%) (Table 4). For FoxP3 and TGF- $\beta$  after exercise the number of detected cases was also different between groups, with higher results for Masters athletes (Table 4). Since the expression of reference genes CYC1 and GAPDH was achieved in all the samples, the negative cases for FoxP3, TGF- $\beta$  and IL-10 mRNA are truly undetectable.

**Table 3** Frequency (among total lymphocytes or CD4<sup>+</sup>T cells) and absolute counts ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) of CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-low</sup> Treg cells, in response to acute exercise

Regulatory T cells	Pre	Post	1 h
%Total			
Control	0.69 $\pm$ 0.25	0.63 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.27
Masters	0.68 $\pm$ 0.23	0.61 $\pm$ 0.23	0.58 $\pm$ 0.25
%CD4			
Control	6.13 $\pm$ 1.36	5.72 $\pm$ 1.22	6.40 $\pm$ 1.80
Masters	6.80 $\pm$ 1.43	6.44 $\pm$ 1.42	7.43 $\pm$ 0.91
Absolute counts			
Control	0.048 $\pm$ 0.017	0.058 $\pm$ 0.020*	0.042 $\pm$ 0.025
Masters	0.049 $\pm$ 0.021	0.056 $\pm$ 0.024*	0.044 $\pm$ 0.023
Naïve (% of Tregs)			
Control	11.50 $\pm$ 4.91	15.20 $\pm$ 8.72	10.17 $\pm$ 4.55
Masters	14.37 $\pm$ 7.05	14.15 $\pm$ 6.74	11.96 $\pm$ 6.11
Memory (% of Tregs)			
Control	88.49 $\pm$ 4.91	84.79 $\pm$ 8.72	89.82 $\pm$ 4.55
Masters	85.62 $\pm$ 7.05	85.84 $\pm$ 6.74	87.83 $\pm$ 6.02

Values are mean  $\pm$  SD

*n* Masters (19), control (10). Pre (before), Post (10 min into recovery), 1 h (1 h after the test)

\**P* < 0.05 from Pre to Post

Plasma IL-10 concentration was significantly higher in Masters athletes compared with the control group before and after the exercise test (*P* = 0.001, ES = 2.57). Acute exercise had no influence on IL-10 concentrations (Fig. 3).

KLRG1 was not highly expressed on Tregs with expression around 2% of Tregs in Masters athletes at baseline and 3.1% of Tregs in the control group. This remained unchanged Post and 1 h post (Fig. 4). Of interest, however, was the number of subjects expressing this marker of senescence: 6 out of 18 (33%) in the Masters group vs. 5 out of 10 (50%) in the control group (Table 4).

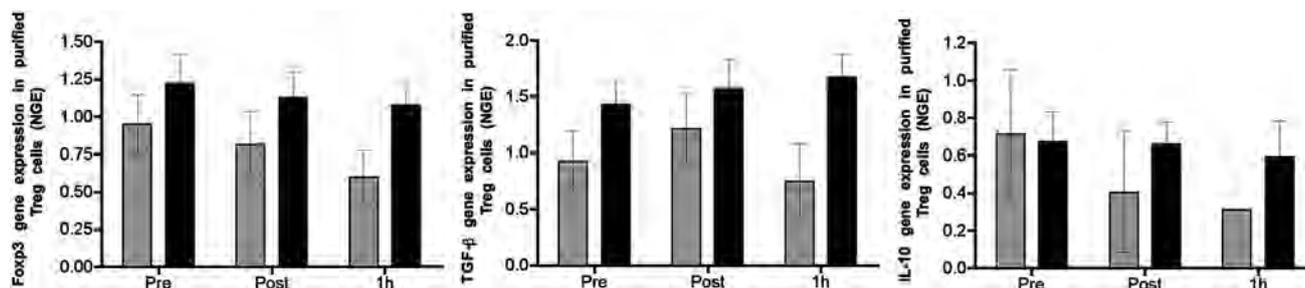
## Discussion

The purpose of this study was to quantify and characterize peripheral blood Tregs after acute, maximal exercise in two groups with distinct differences in lifelong exercise habits; Masters athletes and an age-matched healthy control group. The main findings of this study demonstrate that both groups have similar levels of resting circulating Tregs as well as similar levels of lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T cells. The Masters athlete group have increased activation levels of Tregs at baseline when compared to the control group (increased percentage of subjects expressing the FoxP3, TGF- $\beta$  and a higher plasma IL-10 concentration).

Masters and Controls had similar numbers of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-low</sup> Tregs at baseline, suggesting that lifelong training does not affect these cells numbers. Tregs maintain self-tolerance and control excessive immune responses to foreign antigens. Age-dependent gain of Treg activity may result in weakened immunity, such as increased risk of developing malignancies and infections amongst the elderly. Conversely, age-related loss of Treg function would be predicted to cause an over-active immune state, which has been reported in elderly as higher inflammation status and increased risk for autoimmunity (Jagger et al. 2014).

The number of studies examining the effect of exercise on Treg function, phenotype, and suppressive effects is scarce. Some researchers showed that exercise increases the number and function of Treg cells in murine models (Wang et al. 2012; Uchiyama et al. 2015), murine asthma models (Lowder et al. 2010) and humans (Lages et al. 2008; Handzlik et al. 2013; Teixeira et al. 2014).

We found that absolute counts of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-low</sup> cells increased immediately post-exercise in both groups. It is well known that maximal efforts have profound effects on total leukocytes, marked by an acute inflammatory response that is characterized by leukocytosis and leukocyte activation, release of inflammatory mediators and tissue damage (Tossige-Gomes et al. 2014). In our study an increase in the absolute number



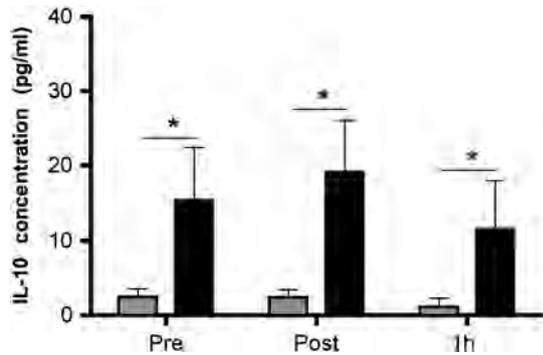
**Fig. 2** Effect of acute exercise on FoxP3, TGF- $\beta$  and IL-10 gene expression in purified CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-low</sup> Treg cells. Data are shown as Mean  $\pm$  SD (Grey box control group; Black box Masters group). Pre (before), Post (10 min into recovery), 1 h (1 h after the test)

**Table 4** Number of detected cases for FoxP3, TGF- $\beta$ , and IL-10 mRNA expression

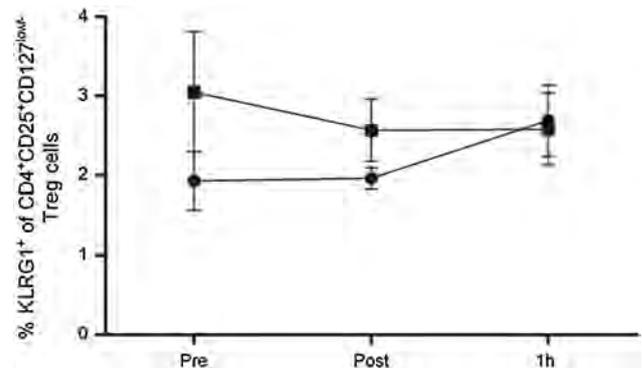
Genes	Pre			Post			1 h		
	Control N (%)	Master N (%)	<i>P</i>	Control N (%)	Masters N (%)	<i>P</i>	Control N (%)	Masters N (%)	<i>P</i>
FoxP3									
Yes	9 (100)	17 (94)	0.471	7 (78)	18 (100)	0.038	5 (56)	16 (89)	0.050
No	0 (00)	1 (06)		2 (22)	0 (00)		4 (44)	2 (11)	
TGF $\beta$									
Yes	6 (67)	18 (100)	0.009	5 (56)	18 (100)	0.002	3 (33)	18 (100)	0.003
No	3 (33)	0 (00)		4 (44)	0 (00)		6 (67)	0 (00)	
IL-10									
Yes	2 (22)	11 (61)	0.057	5 (56)	12 (67)	0.573	2 (22)	9 (50)	0.166
No	7 (78)	7 (39)		4 (44)	6 (33)		7 (78)	9 (50)	
KLRG1									
Yes	5 (50)	6 (33)	0.387	5 (50)	6 (33)	0.387	5 (50)	6 (33)	0.387
No	5 (50)	12 (67)		5 (50)	12 (67)		5 (50)	12 (67)	

Pre (before exercise), Post (post-exercise); 1 h (1 h post-exercise)

*P* Pearson Chi-Square



**Fig. 3** Acute exercise effects on IL-10 plasma levels. Data are shown as mean  $\pm$ SD (Grey box control group; Black box Masters group). Pre (before, Masters  $n=16$ ; control  $n=8$ ), Post (10 min into recovery, Masters  $n=16$ ; control  $n=10$ ); 1 h (1 h after the test, Masters  $n=16$ ; control  $n=4$ ). \*Different from Control,  $P<0.001$



**Fig. 4** Percentage of KLRG1<sup>+</sup> Treg cells among CD4<sup>+</sup>T cells. Data are shown as mean  $\pm$ SD. Pre (before); Post (10 min into recovery); 1 h (1 h after the test). Black squares represent group control ( $n=6$  from 18 of total; 01 outlier); black circles represent Masters group ( $n=5$  positive cases from a total of 10)

of granulocytes and monocytes, and lymphocytes was observed, arguing that some of the leukocytosis observed in the Masters and Control groups may be due to a local inflammatory response caused by tissue injury. However, this is a temporary response and 1 h after exercise the values returned to pre-exercise values. Because of this, the increase in Tregs observed at Post might simply reflect the increase in total numbers of lymphocytes (Handzlik et al. 2013).

In addition, the phenotype of circulating Tregs remained unchanged, as assessed by the functional markers FoxP3 and TGF- $\beta$ . In fact, we did not find any differences in Treg FoxP3, TGF- $\beta$  and IL-10 mRNA expression in both studied groups following exercise, but the number of detected cases (number of subjects where the expression of these markers

was detected) was different between groups (Table 4). The higher number of detected cases in Masters athletes for FoxP3 after exercise implies that lifelong exercise influences acute exercise responses for transcription factor FoxP3 in Masters athletes. Yeh et al. (2009) demonstrated that exercise training increased the T-cell expression of FoxP3, in the periphery, of type-2 diabetic patients. Yeh et al. (2006) also showed that the production of regulatory T-cell mediators TGF- $\beta$  and IL-10 under varicella zoster virus stimulation was increased after a 12 week-programme of tai chi chuan exercise in middle-aged volunteers. Our results showed that acute exercise maintained TGF- $\beta$  detection rates in Masters athletes, but not in the control group, where TGF- $\beta$  detection rates decreased 11% in Post and 34% 1 h post-exercise (Table 4). TGF- $\beta$  has potent

immunoregulatory properties and has been shown to induce IgA secretion. This suggests improved mucosal immunity defences leading to a lower risk of autoimmune and inflammatory disorders (Yeh et al. 2006). Also, TGF- $\beta$  can play an essential role in the suppression of inflammation. TGF- $\beta$  inhibits activity of T and B-lymphocytes and natural killer cells. In addition, TGF- $\beta$  also influences the production of other cytokines via FoxP3-dependent and—independent mechanisms (Yoshimura et al. 2010).

One of the main molecules identified as responsible for immunomodulation by Tregs is IL-10. It is, therefore, possible that elevation in IL-10 secretion may be associated with increased numbers of circulating Treg cells, the primary source of IL-10 within the body (Gleeson et al. 2011). IL-10 appears to be as an immunosuppressive cytokine with broad anti-inflammatory properties, in particular by the inhibition of macrophage and DCs functions. IL-10 down regulates the expression of MHC class II and costimulatory molecules such as CD80 and CD86, affecting the T-cell-stimulating capacity of APCs (Fujio et al. 2010).

In our study, IL-10 gene expression was similar between both groups at baseline (Pre), but IL-10 plasma concentrations were higher in the Masters athletes group. Handzlik et al. (2013) showed that high training loads are associated with higher resting Treg cell counts and greater IL-10 production following antigen stimulation. By showing a strong relationship between the increase in the number of Treg and high production of IL-10 *in vitro*, the authors suggested that athletes engaged in high training loads had a greater ability to secrete IL-10 because of the increase in Treg numbers. On the other hand, Hwang et al. showed that Tregs from elderly individuals (age >65) inhibited the proliferation of responder cells and that the production of IL-10 was reduced. This agrees with our results where the lower concentrations of IL-10 were found in the control group (Fig. 3). Together, these results support the anti-inflammatory effects of exercise theory proposed by Gleeson et al. (2011).

Recently, the expression of KLRG1 in Tregs has been linked with altered function and senescence (Tauro et al. 2013). In a model of autoimmune disease, KLRG1<sup>+</sup>Tregs expressed higher levels of activation markers (FoxP3 and CD25) and were at a terminal differentiation stage. Furthermore, KLRG1<sup>+</sup> Tregs produced more IL-10. Our results showed that a very small percentage of regulatory T cells were KLRG1<sup>+</sup> and differences (albeit non-significant) were observed in the number of cases expressing KLRG1 between the groups, the Masters group having approximately 50% less Tregs KLRG1<sup>+</sup> when compared with the control group.

The discrimination between naïve and memory Tregs is biologically relevant. Although both naïve and memory

Tregs are suppressive, they possess distinct homing receptors that allow migration into either lymphoid organs or inflamed tissues, respectively (Miyara et al. 2009; van der Geest et al. 2014). Naïve Tregs might play an important role in the maintenance of the Treg pool in adults, whereas the increase of memory Treg cells was associated with a decreased humoral response to vaccine (van der Geest et al. 2014). Based on the expression of CD45RA, we divided CD4<sup>+</sup> T cells into naïve (CD45RA<sup>+</sup>) and memory (CD45RA<sup>-</sup>) cells, but no differences in naïve and memory populations were found between controls and Masters. Consistent with previous studies (Hwang et al. 2009); in the present study, most of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD127<sup>-/low</sup> cells had the memory phenotype (CD45RA<sup>-</sup>). Unlike other studies (Miyara et al. 2009; Booth et al. 2010; van der Geest et al. 2014) that showed that the proportions of circulating naïve Tregs decreased with age, whereas memory Treg cells were increased (a tendency observed for our control group), we observed a tendency to maintain/increase the proportions of the naïve cells in the Masters athlete group, while a maintenance/reduction was observed in the control group (Fig. 4). This, however, was not statistically significant and a higher number of subjects will need to be analysed to substantiate, or not, these findings.

The primary limitation of this study was the small sample size due to the difficulty in finding masters athletes with the training characteristics required for this study. The same occurred for the control group, since these individuals had to have the social, healthy and physical characteristics matched with the athletes. Furthermore, the questionnaire to determine the characteristics of training is based on participant recall. It is difficult to establish the training history after a mean training period of  $24.6 \pm 1.83$  years. Our intention was to analyse an overview of lifelong training providing data of the past and current physical activities of participants. Because the training-specific adaptations are related to the nature (aerobic-based, resistance-based, balance-based training), intensity, and duration of the exercise training (Chodzko-Zajko et al. 2009), cautious interpretation of the results obtained is warranted.

## Conclusions

Overall, despite the limitations described above, the results of this study have important implications. We show that lifelong training appears to be an important non-pharmacological intervention that clearly induces a health profile. Masters athletes showed high levels of the immunoregulatory cytokine IL-10 at rest and in response to a maximal exercise test when compared to the age-matched control group. The numbers of Tregs were the same in Masters and control group suggesting that lifelong training does not

interfere in age-related loss or increase in Tregs numbers. Moreover, Masters athletes had increased percentage of subjects expressing FoxP3 and TGF- $\beta$  mRNA. This is the first study to show that Masters athletes have elevated anti-inflammatory markers and maintain the number and markers of activation of regulatory T cells as adaptive responses to lifelong training. Future research should include larger samples and functional testing.

**Acknowledgements** The authors would like to thank all the master athletes and others participants that volunteered to contribute in this study.

#### Compliance with ethical standards

**Funding** The study was funded by the Faculty of Sport Sciences and Physical Education, University of Coimbra. In addition, the present manuscript was accomplished with support from CAPES, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil (LGM—Grants Number BEX-1417/13–4). AMT and LR are registered in the unit UID/DTP/04213/2016.

**Conflict of interest** All authors declare no conflicts of interest.

## References

- Beyersdorf N, Ding X, Tietze JK, Hanke T (2007) Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1. *Eur J Immunol* 37:3445–3454. doi:10.1002/eji.200737126
- Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T et al (2010) Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol* 184:4317–4326. doi:10.4049/jimmunol.0903781
- Campbell DJ, Ziegler SF (2007) FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 7:305–310. doi:10.1038/nri2061
- Chodsko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh M a et al (2009) American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc* 41:1510–1530. doi:10.1249/MSS.0b013e3181a0c95c
- Corthay A (2009) How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70:326–336. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x
- Cosgrove C, Galloway SDR, Neal C et al (2012) The impact of 6-month training preparation for an Ironman triathlon on the proportions of naive, memory and senescent T cells in resting blood. *Eur J Appl Physiol* 112:2989–2998. doi:10.1007/s00421-011-2273-9
- de Araújo AL, Silva LCR, Fernandes JR, Benard G (2013) Preventing or reversing immunosenescence: can exercise be an immunotherapy? *Immunotherapy* 5:879–893. doi:10.2217/imt.13.77
- de Moura Braz SC, de Melo AS, da Glória Aureliano de Melo Cavalc M et al (2014) Increase in the expression of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> lymphocytic T cells in the indeterminate clinical form of human chagas disease after stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Immunol* 34:991–998. doi:10.1007/s10875-014-0092-6
- Fehérvári Z, Sakaguchi S (2004) CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J Clin Invest* 114:1209–1217. doi:10.1172/JCI23395
- Fessler J, Ficjan A, Duftner C, Dejaco C (2013) The impact of aging on regulatory T-cells. *Front Immunol* 4:1–6. doi:10.3389/fimmu.2013.00231
- Fu S, Zhang N, Yopp AC et al (2004) TGF-beta induces Foxp3<sup>+</sup> T-regulatory cells from CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>—precursors. *Am J Transplant* 4:1614–1627. doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x
- Fujio K, Okamura T, Yamamoto K (2010) The Family of IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> T cells. *Adv Immunol* 105:99–130. doi:10.1016/S0065-2776(10)05004-2
- Gleeson M (2007) Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 103:693–699. doi:10.1152/jappphysiol.00008.2007
- Gleeson M, Walsh NP (2012) The BASES expert statement on exercise, immunity, and infection. *J Sports Sci* 30:321–324. doi:10.1080/02640414.2011.627371
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ et al (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 11:607–615. doi:10.1038/nri3041
- Gleeson M, Bishop N, Oliveira M, et al (2012) Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion. *Scand J Med Sci Sport* 22:410–417. doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01272.x
- Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M et al (2013) The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol* 113:1839–1848. doi:10.1007/s00421-013-2614-y
- Henson SM, Akbar AN (2009) KLRG1—more than a marker for T cell senescence. *Age* 31:285–291. doi:10.1007/s11357-009-9100-9
- Hwang K-A, Kim H-R, Kang I (2009) Aging and human CD4<sup>(+)</sup> regulatory T cells. *Mech Ageing Dev* 130:509–517. doi:10.1016/j.mad.2009.06.003
- Jagger A, Shimojima Y, Goronzy JJ, Weyand CM (2014) Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review. *Gerontology* 60:130–137. doi:10.1159/000355303
- Lages CS, Suffia I, Velilla PA et al (2008) Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol* 181:1835–1848
- Littwitz-Salomon E, Akhmetzyanova I, Vallet C, et al (2015) Activated regulatory T cells suppress effector NK cell responses by an IL-2-mediated mechanism during an acute retroviral infection. *Retrovirology* 12:66. doi:10.1186/s12977-015-0191-3
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z et al (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 203:1701–1711. doi:10.1084/jem.20060772
- Lowder T, Dugger K, Deshane J et al (2010) Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. *Brain Behav Immun* 24:153–159. doi:10.1016/j.bbi.2009.09.011
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A et al (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899–911. doi:10.1016/j.immuni.2009.03.019
- Nieman DC, Johanssen LM, Lee JW (1989) Infectious episodes in runners before and after a roadrace. *J Sports Med Phys Fitness* 29:289–296
- Perry C, Pick M, Bdoiach N et al (2013) Endurance exercise diverts the balance between Th17 cells and regulatory T cells. *PLoS One* 8:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0074722
- Pollock RD, Carter S, Velloso CP et al (2015) An investigation into the relationship between age and physiological function in highly active older adults. *J Physiol* 593:657–680. doi:10.1113/jphysiol.2014.282863
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10:490–500. doi:10.1038/nri2785

- Schmidt A, Oberle N, Krammer PH (2012) Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 3:51. doi:10.3389/fimmu.2012.00051
- Silva LCR, de Araújo AL, Fernandes JR, et al (2016) Moderate and intense exercise lifestyles attenuate the effects of aging on telomere length and the survival and composition of T cell subpopulations. *Age (Omaha)* 38:1–16. doi:10.1007/s11357-016-9879-0
- Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G et al (2012) Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev* 11:404–420. doi:10.1016/j.arr.2012.03.003
- Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R (2015) Exercise and the regulation of immune functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135:355–380. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.08.001
- Tanaka H, Seals DR (2008) Endurance exercise performance in Masters athletes: age-associated changes and underlying physiological mechanisms. *J Physiol* 586:55–63. doi:10.1113/jphysiol.2007.141879
- Tauro S, Nguyen P, Li B, Geiger TL (2013) Diversification and senescence of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 43:1195–1207. doi:10.1002/eji.201242881
- Teixeira AM, Rama L, Carvalho HM, et al (2014) Changes in naïve and memory T-cells in elite swimmers during a winter training season. *Brain Behav Immun* 39:186–193. doi:10.1016/j.bbi.2014.01.002
- Tossige-Gomes R, Ottone VO, Oliveira PN et al (2014) Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Braz J Med Biol Res* 0:000–000. doi:10.1590/1414-431X20143187
- Uchiyama M, Jin X, Yin E et al (2015) Treadmill exercise induces murine cardiac allograft survival and generates regulatory T cell. *Transpl Int* 28:352–362. doi:10.1111/tri.12491
- van der Geest KSM, Abdulahad WH, Tete SM et al (2014) Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Exp Gerontol* 60:190–196. doi:10.1016/j.exger.2014.11.005
- Wang J, Song H, Tang X, et al (2012) Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sport* 22:643–652. doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01288.x
- Yeh S-H, Chuang H, Lin L-W et al (2006) Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells. *Br J Sports Med* 40:239–243. doi:10.1136/bjism.2005.022095
- Yeh S-H, Chuang H, Lin L-W et al (2009) Regular Tai Chi Chuan exercise improves T cell helper function of patients with type 2 diabetes mellitus with an increase in T-bet transcription factor and IL-12 production. *Br J Sports Med* 43:845–850. doi:10.1136/bjism.2007.043562
- Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T (2010) Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem* 147:781–792. doi:10.1093/jb/mvq043

